



ANA CRISTINA ANDRADE MONTEIRO

**ASSOCIAÇÃO DE INDUTORES DE
RESISTÊNCIA PARA O MANEJO DA
FERRUGEM DO CAFEIRO E ANÁLISE
BIOQUÍMICA DA RESPOSTA DE DEFESA
INDUZIDA**

LAVRAS - MG

2011

ANA CRISTINA ANDRADE MONTEIRO

**ASSOCIAÇÃO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA PARA O MANEJO
DA FERRUGEM DO CAFEIEIRO E ANÁLISE BIOQUÍMICA DA
RESPOSTA DE DEFESA INDUZIDA**

Dissertação 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 Mestre.

Orientador

PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende

LAVRAS - MG

2011

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

Monteiro, Ana Cristina Andrade.

Associação de indutores de resistência para o manejo da ferrugem do cafeeiro e análise bioquímica da resposta de defesa induzida / Ana Cristina Andrade Monteiro. – Lavras: UFLA, 2011.

86 p.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende.

Bibliografia.

1. *Coffea arabica*. 2. Extratos vegetais. 3. Fosfitos. 4. Proteínas.
5. Patogênese. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.739425

ANA CRISTINA ANDRADE MONTEIRO

**ASSOCIAÇÃO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA PARA O MANEJO
DA FERRUGEM DO CAFEIEIRO E ANÁLISE BIOQUÍMICA DA
RESPOSTA DE DEFESA INDUZIDA**

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

APROVADA em 25 de fevereiro de 2011.

Dr. Élberis Pereira Botrel UFLA

Dr. Eduardo Alves UFLA

PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

LAVRAS - MG

2011

*Aos meus pais Cleber e Mara, pelos ensinamentos e amor
Às minhas avós, Junia (in memoriam) e Êta,
pelo carinho e incentivo de sempre.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado força, para dar mais um passo em minha caminhada.

À universidade Federal de Lavras, em especial ao programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela oportunidade de realização do Mestrado, e ao CNPq pela concessão de bolsa de estudos.

Ao professor Mário Lúcio Vilela de Resende, pela orientação, amizade e confiança na realização do presente trabalho.

Aos professores Dr. Eduardo Alves e Dr. Élberis Pereira Botrel, pela participação na banca e pelas valiosas sugestões.

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

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, Ana Maria, Eloisa, Cleber, Bruno, Rute, Letícia e Tarley, pela agradável convivência e atenção, durante o transcorrer do curso.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo: Pedro, Vanessa, Márcia, Ricardo, Lívia, Thais, Moisés, Kátia, Luiz Henrique, Eliane, Bruno, Dario, Andre, Amanda, Joyce, Henrique, Rodolfo, Érika, Dayane, Manoel e Écio, pela convivência e auxílio nos ensaios.

Aos amigos e, também, “orientadores” Pedro, Lívia, Vanessa, Márcia e Ricardo pela disposição em me auxiliar.

Aos meus pais, Cleber e Mara, pelo amor e atenção durante toda minha vida, pelos ensinamentos e por muitas vezes renunciarem aos seus próprios sonhos para realizar os meus.

Aos meus irmãos Lucas e Marcos e sobrinha Clara pelo apoio incondicional, amizade e momentos de descontração.

Ao tio Tadeu, Juliana, Mariana e Rafael, pela boa convivência durante estes anos em Lavras.

À toda minha família que sempre torceu por mais esta conquista em minha vida, em especial avó Êta.

Aos meus amigos de Lavras e Samonte, pela boa convivência, amizade, paciência, muitas conversas, risadas e bons momentos que passamos juntos, em especial à Vanessa e às “Flores”.

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

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

Muito obrigada!

RESUMO

A ferrugem alaranjada é uma das principais doenças do cafeeiro e, cada vez mais, buscam-se novas alternativas de controle dessa enfermidade. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar indutores de resistência associados e isoladamente para o manejo da ferrugem em mudas de cafeeiro, além de estudar o efeito destes na ativação de mecanismos envolvidos na resposta de defesa. Para cumprir os objetivos, foram realizados três experimentos. O primeiro foi conduzido em casa de vegetação com a cultivar Mundo Novo utilizando-se os indutores e associações: NEFID (extrato de folha de cafeeiro); NEFID + fosfito de cobre 5,0 mL L⁻¹; NEFID + fosfito de manganês 5,0 mL L⁻¹; NEFID + fosfito de cobre 2,5 mL L⁻¹ + fosfito de manganês 2,5 mL L⁻¹; ECFC (extrato de casca de café); ECFC + fosfito de cobre 5,0 mL L⁻¹; ECFC + fosfito de manganês 5,0 mL L⁻¹; ECFC + fosfito de cobre 2,5 mL L⁻¹ + fosfito de manganês 2,5 mL L⁻¹; fosfito de cobre 5,0 mL L⁻¹; fosfito de manganês 5,0 mL L⁻¹; ASM (acibenzolar-S-metil) 0,2 g L⁻¹; Viça-Café Plus® 7,0 g L⁻¹; fungicida (ciproconazol + azoxistrobina) 1,25 mL L⁻¹, uma testemunha inoculada e uma absoluta. No segundo experimento avaliou-se o efeito dos tratamentos utilizados no primeiro experimento na germinação de urediniósporos de *H. vastatrix*. No terceiro experimento avaliou-se o efeito do NEFID, fosfito de manganês, associação de NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês, ASM e do fungicida ciproconazol + azoxistrobina, tratamentos estes que obtiveram melhores resultados no primeiro experimento, na atividade de enzimas de defesa, nos teores de fenóis e de lignina. O NEFID + Fosfito de Cu + Fosfito de Mn reduziu em 84% severidade da ferrugem e apresentou 85% de inibição da germinação dos esporos de *H. vastatrix*. Observou-se que todas as associações de indutores de resistência mais os tratamentos NEFID e ECFC proporcionaram maior crescimento das mudas. No experimento bioquímico, observou-se que, para a associação de NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês, com inoculação, o NEFID, sem inoculação, e ASM, inoculado e não inoculado houve aumento na atividade de peroxidase. Maior atividade de quitinase foi observada em folhas de cafeeiro tratadas com fosfito de manganês e ASM, não inoculadas com *H. vastatrix*. A associação de NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês, NEFID, fosfito de manganês e fungicida ciproconazol + azoxistrobina promoveram aumento da atividade de β -1,3-glucanase em folhas de cafeeiro não inoculadas. Quanto ao teor de lignina, não houve diferença significativa nos tratamentos. Observou-se, também, que houve maiores teores de fenóis solúveis totais em plantas tratadas com ASM e fungicida, sem inoculação do patógeno e em todos os tratamentos, com exceção da testemunha, com inoculação do patógeno. A associação de NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês, NEFID e fosfito de manganês controlaram a

ferrugem em mudas de cafeeiro, pelo aumento da atividade das proteínas de defesa, dos fenóis solúveis totais e, também, pela toxidez direta ao patógeno. A associação de produtos que apresentem diferentes modos de ação, como indução de resistência e toxidez direta a patógenos, que sejam menos tóxicos ao homem e ambiente tenham um futuro promissor numa agricultura sustentável.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. Ferrugem. Extratos vegetais. Fosfitos. Proteínas relacionadas à patogênese. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

Leaf rust is a major coffee disease and farmers are increasingly seeking new alternatives to control this disease. The present work was to evaluate the inductors of resistance associated or isolated for the management of rust in coffee seedlings, and to study the effect of the activation of mechanisms involved in the defense response. To meet the objectives, three experiments were carried out. The first was conducted in a greenhouse with the cultivar Mundo Novo using inductors of resistance and associations: NEFID (coffee leaf extract); NEFID + copper phosphite 5.0 mL L⁻¹, NEFID + manganese phosphite 5.0 mL L⁻¹; NEFID + copper phosphite 2.5 mL L⁻¹ + manganese phosphite 2.5 mL L⁻¹; ECFC (bark extract of coffee); ECFC + copper phosphite 5.0 mL L⁻¹; ECFC + manganese phosphite 5.0 mL L⁻¹; ECFC + copper phosphite 2.5 mL L⁻¹ + manganese phosphite 2.5 mL L⁻¹; copper phosphite 5.0 mL L⁻¹; manganese phosphite 5.0 mL L⁻¹; ASM (acibenzolar-S-methyl) 0.2 g L⁻¹, Viça-Café Plus[®] 7.0 g L⁻¹; fungicide (cyproconazole + azoxystrobin) 1.25 mL L⁻¹, an inoculated and an absolute control. In the second experiment we evaluated the effect of the treatments used in the first experiment in regards to germination of urediniospores of *H. vastatrix*. The third experiment evaluated the effect of NEFID, manganese phosphite, association NEFID + copper phosphite + manganese phosphite, ASM and the fungicide cyproconazole + azoxystrobin, as these treatments worked best in the first experiment in regards to the activity of enzymes defense, the levels of phenolics and lignin. The NEFID + copper phosphite + manganese phosphite reduced rust severity by 84% and presented 85% of inhibition of the germination of the spores of *H. vastatrix*. It was observed that all the associations of inductors of resistance plus treatments of NEFID and ECFC provided better growth of seedlings. In the biochemical experiment, it was observed that for the association of NEFID + copper phosphite + manganese phosphite, inoculated, NEFID, without an inoculation, and ASM, inoculated and not inoculated; there was an increase in peroxidase activity. Increased Chitinase activity was observed in coffee leaves treated with ASM and manganese phosphite, not inoculated with *H. vastatrix*. The association of NEFID + copper phosphite, + manganese phosphite, NEFID, manganese phosphite and and fungicide cyproconazole + azoxystrobin promoted increased of β -1,3-glucanase activity in uninoculated leaves of coffee. As for the lignin content, there was no significant difference in treatments. It was also noted that there were higher levels of total soluble phenols in plants treated with ASM and fungicide without pathogen inoculation and in all treatments except the control, with pathogen inoculation. The association of NEFID + copper phosphite + manganese phosphite, NEFID and manganese phosphite controlled the coffee rust of seedlings, increased activity of defense proteins, total soluble

phenols and also by direct toxicity to the pathogen. The association of products with different modes of action, such as inducers of resistance and direct toxicity to pathogens, which are less toxic to humans and the environment has a promising future in sustainable agriculture.

Keywords: *Coffea Arabica*. Rust. Plant extracts. Phosphites. Pathogenesis-related proteins. Phenolic compounds.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Associação de indutores de resistência para o manejo da ferrugem do cafeeiro e análise bioquímica da resposta de defesa induzida	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Importância da cultura do cafeeiro	15
2.2	Ferrugem do cafeeiro	16
2.3	Indução de resistência	18
2.4	Nutrição mineral e doenças do cafeeiro	22
	REFERÊNCIAS	27
	CAPÍTULO 2 Associação de indutores de resistência na proteção de mudas de cafeeiro contra <i>Hemileia vastatrix</i>	32
1	INTRODUÇÃO	34
2	MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1	Obtenção das formulações bióticas	36
2.2	Obtenção das formulações abióticas	36
2.3	Obtenção do inóculo de <i>H. vastatrix</i> e inoculação	36
2.4	Obtenção das mudas de cafeeiro	37
2.5	NEFID e ECFC associados a fosfitos de cobre e manganês na proteção de mudas de cafeeiro contra a ferrugem em casa de vegetação	37
2.6	Avaliação <i>in vitro</i> da toxicidade das formulações bióticas e associações com fosfitos de cobre e manganês sobre a germinação de urediniosporos de <i>H. vastatrix</i>	39
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49
	CAPÍTULO 3 Mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa ativada por indutores de resistência e fungicida contra <i>Hemileia vastatrix</i> em mudas de cafeeiro	53
1	INTRODUÇÃO	55
2	MATERIAL E MÉTODOS	57
2.1	Obtenção dos produtos	57
2.2	Obtenção das plantas, do inóculo e inoculação	57
2.3	Preparo de extratos foliares para a avaliação de proteínas totais e da atividade de peroxidase de guaiacol, quitinase e β-1,3-glucanase	58
2.3.1	Proteínas totais	59
2.3.2	Peroxidase de guaiacol (POX; EC 1.11.1.7)	59

2.3.3	Quitinase (CHI; EC 3.2.1.14)	59
2.3.4	β -1,3-glucanase (GLU; EC 3.2.1.6)	60
2.4	Preparo de tecidos foliares para a avaliação de lignina solúvel e de fenóis solúveis totais	60
2.4.1	Determinação de lignina solúvel	61
2.4.2	Determinação de fenóis solúveis totais	62
2.5	Delineamento experimental e análises dos dados	62
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.1	Peroxidase de guaicol (POX; EC 1.11.1.7)	64
3.2	Quitinase (CHI; EC 3.2.1.14)	68
3.3	β -1,3-glucanase (GLU; EC 3.2.1.6)	71
3.4	Lignina solúvel e fenóis totais	76
4	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS	80
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	85

CAPÍTULO 1

Associação de indutores de resistência para o manejo da ferrugem do cafeeiro e análise bioquímica da resposta de defesa induzida

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro (*Coffea arabica* L.) é uma das espécies agrônômicas mais relevantes no Brasil, sendo de significativa importância para a economia nacional. Alguns fatores limitam a produção de café, como condições climáticas adversas, deficiências nutricionais e, principalmente, a presença de pragas e doenças. Dentre as doenças do cafeeiro, destaca-se a ferrugem alaranjada.

A ferrugem alaranjada é causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, um parasita biotrófico exclusivo do gênero *Coffea*. Estima-se que as perdas na produção de café, em virtude da ferrugem variem de 35% a 50% na ausência de medidas de controle (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

Os sistemas de controle da doença atualmente empregados envolvem tratamentos químicos que, além de onerarem o custo de produção, podem ser prejudiciais ao homem e ao ambiente. A adoção de métodos alternativos de controle das doenças com produtos menos tóxicos, pode reduzir parte dos custos na lavoura cafeeira.

Como medida alternativa de controle de doenças de plantas, tem-se a resistência induzida (RI), que tem como objetivo evitar ou atrasar a entrada e ou subsequente atividade do patógeno em seus tecidos, por meio de mecanismos de defesa próprios (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Cavalcanti et al. (2005) e Resende et al. (2004) relatam que a RI em plantas pode ocorrer por meio do tratamento com agentes bióticos (extratos vegetais, microrganismos ou parte desses) ou abióticos (substâncias químicas).

A utilização de fertilizantes foliares como os fosfitos tem ganhado importância no controle de doenças (DATNOFF; SEEBOLD; CORREA, 2001), pois, estes além de nutrir as plantas, podem atuar indiretamente como indutores de resistência e diretamente sobre o patógeno. Outra forma de controle que desperta o interesse dos especialistas da área é a utilização de produtos naturais, como extratos de plantas, principalmente, extratos de folha de café e de casca de fruto de café, que apresentam eficiência comprovada no controle de doenças no cafeeiro, cacauzeiro, algodoeiro e tomateiro (UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS - UFLA, 2006, 2007).

Dessa forma, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar indutores de resistência bióticos e abióticos associados e isoladamente para o manejo da ferrugem do cafeeiro, além de estudar o efeito destes na ativação de mecanismos envolvidos na resposta de defesa.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da cultura do cafeeiro

O gênero *Coffea* apresenta mais de 100 espécies botânicas conhecidas e entre as espécies cultivadas, *Coffea arabica* (café arábica) e *Coffea canephora* (café robusta) são as mais importantes economicamente. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2010), a espécie *C. arabica* é responsável por mais de 75% da produção nacional.

O Brasil destaca-se como principal produtor e exportador de café, sendo esta cultura uma importante fonte de divisa para o país. Segundo a CONAB (2010), a produção nacional de café beneficiado foi de 48,09 milhões de sacas de 60 quilos. O resultado representa um acréscimo de 21,9%, quando comparado com a produção de 39,47 milhões de sacas obtidas na safra 2009. Tal crescimento é justificado pelo ano de alta produção, aliado às condições climáticas favoráveis durante o ciclo da cultura.

No entanto, a cultura ainda apresenta alguns problemas fitossanitários, que causam severas perdas quando não tomadas medidas de controle eficazes. Dentre as doenças do cafeeiro, as principais são: ferrugem, causada por *Hemileia vastatrix* Berk. & Br; cercosporiose, causada por *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke; antracnose dos frutos (CBD), causada por *Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge, ainda não presente no Brasil; galhas causadas pelos nematoides do gênero *Meloidogyne*; mancha de Phoma, causada por *Phoma* sp., entre outras (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

2.2 Ferrugem do cafeeiro

A ferrugem alaranjada, considerada uma das doenças mais impactantes do cafeeiro, foi constatada no Brasil em janeiro de 1970 e logo se disseminou para todas as regiões cafeeiras do país (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005). Possui como agente causal o fungo *Hemileia vastatrix*, pertencente à família Pucciniaceae, ordem Uredinales, classe dos Uredinomycetes. Trata-se de um patógeno biotrófico, com ciclo de vida incompleto, pois, até o momento, as fases de pécnio e écio são desconhecidas (AGRIOS, 2005; GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997).

A disseminação de *H. vastatrix* ocorre mais eficientemente pela ação do vento, das gotas da chuva, do escorrimento de água pelas margens do limbo foliar para a superfície inferior e pela ação do homem durante os tratos culturais (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

O fungo desenvolve-se na superfície abaxial foliar, quando há condições de umidade e temperatura propícias para a germinação dos urediniósporos, geralmente 24 horas após a infecção (SILVA; GUERRA-GUIMARÃES; NICOLE, 2005). Em seguida, ocorre formação de tubos germinativos, apressórios e da hifa de penetração, a qual atravessa o ostíolo do estômato e continuam seu desenvolvimento na câmara subestomática, colonizando as células subsidiárias e do mesófilo, formando estruturas denominadas haustórios, responsáveis pela absorção de nutrientes das células do hospedeiro pelo patógeno (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

Os sintomas da doença iniciam-se na forma de manchas cloróticas translúcidas com 1 a 3 mm de diâmetro na face abaxial do limbo foliar que, rapidamente, atingem até 1 cm de diâmetro. Na face abaxial, desenvolvem-se massas pulverulentas de coloração amarelo-alaranjada, formadas por

urediniósporos do patógeno. Áreas de tonalidade amarelada na face adaxial do limbo foliar correspondem às regiões infectadas. Com o tempo as lesões aumentam de tamanho, deixando em seu centro uma área necrótica, onde a esporulação é reduzida, com uma produção de esporos de coloração esbranquiçada de menor viabilidade, chegando a cessar (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997).

Ocasionalmente, os sintomas são também observados nas extremidades de ramos em desenvolvimentos e em frutos verdes. O sintoma mais notável da doença em plantações é a desfolha, que reduz a área fotossintética da planta, resultando em morte de ramos, comprometendo o florescimento, a produção e a qualidade física dos grãos de café (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997).

No Brasil, estima-se que as perdas decorrentes apenas à ferrugem do cafeeiro sejam da ordem de 30% da produção quando na ausência de medidas de controle, principalmente, em virtude da predominância de plantas de cafeeiro (*C. arabica* L.) susceptíveis à maioria das raças de *H. vastatrix*, incluindo a raça II, predominante no país (MAZZAFERA; FAZOULI; CARVALHO, 1993; PEREIRA; SAKIYAMA, 1999; RODRIGUES; BITTENCOURT; RIJO, 1975). Segundo Zambolim e Vale (2003), a severidade da ferrugem e os prejuízos ocasionados na produção do cafeeiro, de modo geral, variam de região para região e de ano para ano em decorrência da carga pendente dos cafeeiros e das condições climáticas prevalentes. Em anos de alta produção essas perdas podem chegar a 50% (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

A ferrugem do cafeeiro é de difícil controle, mas resultados satisfatórios são obtidos pelo uso de fungicidas sistêmicos, em aplicações sistemáticas, durante a estação chuvosa, dependendo da severidade da doença. O controle é realizado mediante pulverizações foliares e, também, por meio de aplicações via solo com fungicidas sistêmicos associados ou não a inseticidas. Porém, o uso

inadequado destes fungicidas pode selecionar novas raças fisiológicas resistentes do patógeno (AGRIOS, 2005).

Há muito se procura obter cultivares portadoras de genes de resistência a *H. vastatrix* que possam substituir as cultivares tradicionais de *C. arabica* susceptíveis, as quais requerem um controle ordenado da doença. No entanto, esse processo tem sido dificultado pelo aparecimento de novas raças fisiológicas do patógeno, que levam à “quebra” da resistência das cultivares melhoradas (VÁRZEA et al., 2002).

2.3 Indução de resistência

A indução de resistência em plantas contra patógenos representa um método alternativo no controle de doenças, a qual ativa os mecanismos de defesa latentes na planta. A resistência induzida pode ser ativada em plantas por uma série de substâncias, evitando ou atrasando a entrada e/ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos, por meio de mecanismos próprios de defesa. Cavalcanti et al. (2005) e Resende et al. (2004) relatam que a resistência induzida em plantas pode ocorrer por meio do tratamento com agentes bióticos (extratos vegetais, microrganismos ou parte desses) ou abióticos (substâncias químicas).

A resistência induzida (RI) é dividida em duas categorias, a resistência sistêmica adquirida (RSA) (STICHER; MAUCHI-MANI; MÈTRAUS, 1997) e a resistência sistêmica induzida (RSI) (LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). Na primeira, a resistência desenvolve-se de forma sistêmica ou localizadamente em resposta a um patógeno que causa uma lesão necrótica (reação de hipersensibilidade) ou por aplicação exógena de ácido salicílico ou compostos sintéticos, como o acibenzolar-S-metil (ASM) e o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA). No fenômeno RSA, a resistência expressa, geralmente, é efetiva contra

amplo espectro de patógenos e está associada com a produção de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs). Muitas delas possuem atividade antimicrobiana e são excelentes marcadores moleculares para a resposta de resistência (HAMMERSCHMIDT; SMITH-BECKER, 1999). Já na RSI, a molécula sinalizadora é mediada pelo ácido jasmônico e o etileno, além de não ocorrer acúmulo de PRPs (LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998).

As PRPs são proteínas de plantas que se acumulam rapidamente nos tecidos vegetais após o contato com patógenos ou em resposta ao tratamento com determinados compostos químicos ou a outros tipos de estresse (LOON et al., 1994). Localizam-se no espaço intercelular, no vacúolo e na parede celular e estão presentes em diversas espécies de plantas pertencentes a diferentes famílias (LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998).

Entre as PRPs, hidrolases, como as β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.6) e quitinases (CHI; EC 3.2.1.14), são relatadas principalmente como inibidoras do crescimento fúngico (LOON; STRIEN, 1999). As quitinases são proteínas antifúngicas, que catalisam a hidrólise da ligação β -1,4 glicosídica presente em biopolímeros de quitina, componente da parede celular de muitos fungos (BRUNNER et al., 1998). Já as β -1,3-glucanases, são enzimas que hidrolisam polímeros de β -1,3-glucana, compostos que, juntamente com a quitina, conferem resistência à parede celular dos fungos (CORNELISSEN; MELCHERS, 1993).

As peroxidases (POX; EC 1.11.1.7) são outra importante classe de proteínas relacionadas à patogênese. Além de oxidarem os compostos fenólicos, estas enzimas aumentam a sua velocidade de polimerização em substâncias similares à lignina, que se depositam na parede celular e interferem no posterior crescimento e desenvolvimento do patógeno (AGRIOS, 2005). Peroxidases, também, estão envolvidas na geração de espécies reativas de oxigênio e na oxirredução de vários substratos, usando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KAWAOKA et al., 2003).

Outra importante molécula induzida é a lignina, que proporciona suporte mecânico e desempenha funções protetoras nos vegetais. A lignificação pode impedir o desenvolvimento do fungo nos tecidos vegetais de várias maneiras: estabelecimento de barreira mecânica ao avanço e desenvolvimento do patógeno; modificação da parede celular, tornando-a mais resistente ao ataque de enzimas hidrolíticas; aumento da resistência das paredes à difusão de toxinas produzidas pelos patógenos, impedindo que os nutrientes do hospedeiro sejam utilizados pelo invasor (CAVALCANTI et al., 2005).

Avanços na pesquisa envolvendo a indução de resistência em plantas vêm sendo acompanhados pelo desenvolvimento de produtos comerciais que apresentam eficácia, estabilidade e menor impacto ao ambiente. Estes produtos podem melhorar a produtividade agrícola pela redução de perdas ocasionadas por estresses bióticos e abióticos, dentro do conceito de amplo espectro de ação, conferido por estes indutores. Resultados promissores foram alcançados com o uso do indutor químico de resistência acibenzolar S-metil (ASM, produto do grupo benzotriazolone ou BTH). A aplicação do produto proporcionou proteção contra *H. vastatrix* em mudas de cafeeiro das cultivares Mundo Novo e Catuaí Vermelho M-99 (GUZZO et al., 2001; MARCHI; BORGES; RESENDE, 2002).

O efeito indutor do ASM contra a ferrugem foi confirmado por Nojosa (2003), onde o tratamento com ASM proporcionou uma percentagem de controle de 56,82% em folhas destacadas e de 52% em mudas de café. Nas plantas tratadas com ASM foi possível observar um aumento considerável nos teores de clorofila *a* e *b*, nos teores de lignina e na atividade de peroxidase. Segundo Martins et al. (1998) este produto foi capaz, em condições controladas, de induzir proteção contra *H. vastatrix* por até 10 semanas.

Nardi et al. (2006), utilizando-se das técnicas de PCR quantitativo em tempo real e de microarranjo, observaram que a pulverização com ASM em cafeeiro induziu a expressão de genes de defesa, típicos da resistência sistêmica

adquirida. A principal resposta nas folhas foi a expressão de genes relacionados à explosão oxidativa e ao aumento de barreiras físicas e químicas, como glutatona-S-transferase, superóxido dismutase, peroxidase, quitinase e lipoxigenase.

Em cafeeiro, substâncias extraídas de esporos germinados ou esporos autoclavados de *H. vastatrix*, foram capazes de induzir incrementos nos níveis de compostos fenólicos e nas atividades das enzimas peroxidases e polifenoloxidasas, além de induzir proteção contra inoculações posteriores de *H. vastatrix* (GUZZO; MARTINS; MORAES, 1987; MAXEMIUC-NACCACHE, 1983; MAXEMIUC-NACCACHE; DIETRICH, 1985). Maxemiuc-Naccache, Braga e Dietrich (1992) detectaram aumentos nas atividades de quitinase e β -1,3-glucanase, três dias após a inoculação em plantas resistentes, enquanto que nas plantas suscetíveis esse aumento só foi verificado após 21 dias. Segundo Martins, Roveratti e Moraes (1986), esporos de outros fungos como *Puccinia psidii* e *Tranzschelia pruni-spinosae* var. *discolor*, também, conferiram proteção ao cafeeiro contra *H. vastatrix*. Quando os extratos de *Puccinia psidii* e *Tranzschelia pruni-spinosae* var. *discolor* foram aplicados três dias antes da inoculação de *H. vastatrix*, houve controle da ferrugem de 85 e 93,7%, respectivamente.

A utilização de produtos naturais, como extratos vegetais ou de subprodutos da cadeia produtiva do café, extratos de folhas ou de casca de frutos de café, merecem destaque na indução de resistência. UFLA (2006, 2007) solicitou o depósito de patente para formulação à base de extratos de folhas de café (*C. arabica* L.) (PI 0603575-2) e para formulação à base de cascas de frutos de café (PI 0705598-6). Tais formulações, as quais têm como principal matéria prima reciclável folhas de cafeeiro que caem ao solo (em razão de doenças, colheita de frutos, podas e outros estresses) e subproduto do beneficiamento dos grãos (endocarpo, mesocarpo e exocarpo), podem ser usadas

com ou sem espalhantes-adesivos ou outros adjuvantes, para o controle de doenças no cafeeiro, cacaueteiro, algodoeiro e tomateiro.

A utilização das formulações à base de casca de café e de folhas de café infectadas com *H. vastatrix* proporcionou considerável proteção de mudas de cafeeiro contra os patógenos *P. costarricensis* e *C. coffeicola* (AMARAL, 2005; BARGUIL et al., 2005; RESENDE et al., 2004). Foram observadas diminuições na percentagem da mancha de phoma de 20% e 38%, para extrato de casca de café e extrato de folhas de café com ferrugem, respectivamente (BARGUIL et al., 2005; RESENDE et al., 2004). Para cercosporiose, Amaral (2005) observou reduções na percentagem da doença de 40% e 37%, respectivamente, em plantas tratadas com formulações à base de extrato de casca de café e extrato de folhas de café com ferrugem. Santos et al. (2007) observaram em testes de campo, que o tratamento com formulações à base de extrato de folhas de café reduziu a área abaixo da curva de progresso da mancha de phoma em 61%, comparada à testemunha pulverizada com água e em 30% em relação à testemunha pulverizada com Viça-Café Plus®.

2.4 Nutrição mineral e doenças do cafeeiro

Os efeitos da nutrição mineral no crescimento e produção das plantas são usualmente explicados em termos de funções dos nutrientes no metabolismo vegetal. Entretanto, os nutrientes minerais podem aumentar ou diminuir a resistência de plantas a patógenos. As principais mudanças na planta proporcionadas pela nutrição mineral, responsáveis por alterar a intensidade de doenças, são a espessura da parede celular e cutícula, a manutenção de compostos solúveis dentro das células, como açúcares simples e aminoácidos, variações na suberização, na silificação e na lignificação dos tecidos, na síntese e no acúmulo de compostos fenólicos (MARSCHNER, 1995).

Todos os nutrientes minerais influenciam, de uma maneira ou de outra, a incidência ou severidade da doença (GRAHAM; WEBB, 1991; HUBER, 1980). Muitos compostos produzidos por meio de rotas metabólicas secundárias são formados após o contato com o patógeno, proporcionando maior resistência às doenças. Esses compostos são geralmente enquadrados como fitoalexinas, que se acumulam ao redor dos sítios de infecção, dependendo da disponibilidade dos vários nutrientes (GRAHAM; WEBB, 1991).

Vários micronutrientes são cofatores de enzimas envolvidas na rota dos fenilpropanoides, principal rota de síntese de fitoalexinas, conforme esquema de Graham e Webb (1991) (Figura 1).

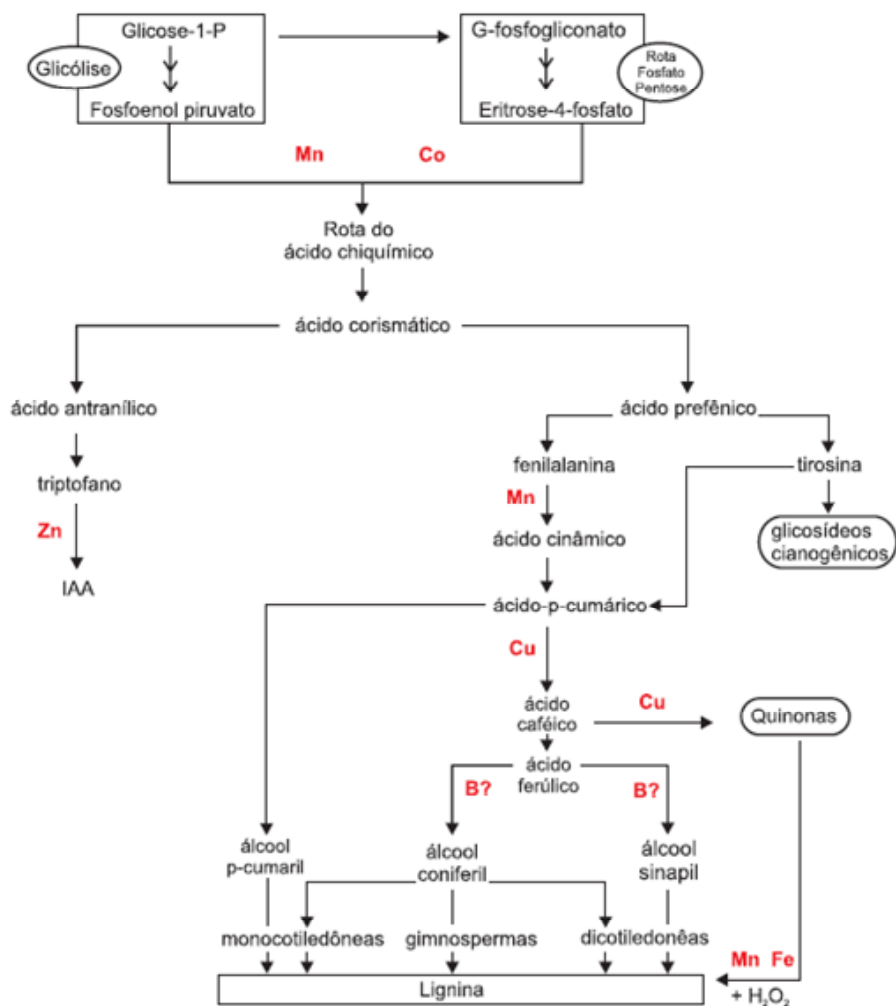


Figura 1 Micronutrientes como cofatores enzimáticos na rota para a síntese de lignina e fenóis a partir do ácido chiquímico (GRAHAM; WEBB, 1991)

Entre os produtos comercializados como fertilizantes foliares ricos em micronutrientes, os fosfitos são aqueles mais frequentemente relatados na literatura como indutores de respostas de defesa em plantas, incluindo a síntese de fitoalexinas (JACKSON et al., 2000; NOJOSA, 2003; NOJOSA; RESENDE;

RESENDE, 2005). Os fosfitos são análogos ao fungicida etil fosfonato (fosetyl-AI), o qual comprovadamente induz a síntese de fitoalexinas em citrus (AFEK; STZEJNBERG, 1989). Mais recentemente, os fosfitos têm sido formulados com sais de manganês, cobre ou zinco, e recomendados para o controle de oomicetos e de fungos causadores de podridões do colo, raiz, troncos e frutos (RESENDE et al., 2008).

Diversos trabalhos têm apresentado resultados satisfatórios com a utilização de fosfitos como possíveis eliciadores de resistência a doenças do cafeeiro. Em mudas de cafeeiro, produtos contendo fosfitos foram eficazes no controle de *P. costarricensis*, reduzindo a severidade da mancha de phoma, sem diferir dos fungicidas tebuconazole e fosetyl-AI (NOJOSA, 2003; NOJOSA et al., 2009). O mesmo autor observou que a aplicação de fosfitos nas mudas proporcionou acúmulo de lignina e de fenóis solúveis (NOJOSA, 2003). Ribeiro Júnior (2008) observou que pulverizações de fosfitos de potássio, manganês e zinco em cafeeiros adultos por dois anos consecutivos (de dezembro a julho) proporcionaram em ano de alta produção, reduções de 30% e 25%, respectivamente, na severidade da ferrugem e cercosporiose; no ano de baixa produção, reduções respectivas de 53% e 32% na severidade da ferrugem e cercosporiose foram alcançadas. Como consequência, aumentos de 26% e 44% no enfolhamento das plantas foram detectados, nos anos de alta e baixa produtividade, respectivamente. Utilizando-se pulverizações com fosfito de cobre, Toyota (2008) observou em ano de baixa produção, redução de 81% na severidade da ferrugem, semelhante ao controle obtido com pulverizações de epoxiconazole + piraclostrobin.

Em experimentos realizados com mudas de cafeeiro pulverizadas com fosfitos de potássio, manganês e cobre e inoculadas com *C. coffeicola*, Ribeiro Júnior (2008) e Toyota (2008) observaram maiores atividades das enzimas de

defesa peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase e aumento no teor de fenóis solúveis totais.

Diante do exposto, nota-se que estudos de resistência induzida em cafeeiro já apresentam resultados preliminares promissores. No entanto, a indução de resistência com a aplicação de formulações à base de extratos naturais, puros ou associados a fosfitos, bem como a natureza das respostas bioquímicas de defesa de cafeeiros contra *H. vastatrix*, ainda não foram elucidadas.

REFERÊNCIAS

- AFEK, U.; STZEJNBERG, A. Effects of fosetyl-Al and phosphorous acid on scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus to *Phytophthora citrophthora*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, n. 7, p. 736-739, July 1989.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. New York: Academic, 2005. 922 p.
- AMARAL, D. R. **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais**. 2005. 96 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- BARGUIL, B. M. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 535-537, set./out. 2005.
- BRUNNER, F. et al. Substrate specificities of tobacco chitinases. **Plant Journal**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 225-234, Apr. 1998.
- CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas contra patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 263 p.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira café safra 2010, quarta estimativa, dezembro/2010**. Brasília, 2010. Disponível em:
<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/10_12_14_11_47_58_boletim_cafe_dezembro_2010.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2011.
- CORNELISSEN, B. J. C.; MELCHERS, L. S. Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 3, p. 709-712, Mar. 1993.
- DATNOFF, L. E.; SEEBOLD, K. W.; CORREA, F. J. Use of silicon for integrated disease management: reducing fungicide applications and enhancing host plant resistance. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDORFER, G. H. (Ed.). **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Elsevier Science, 2001. p. 171-184.

GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 184-200.

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

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

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F.; MORAES, W. B. C. Induced protection of coffee plants to *Hemileia vastatrix*: I., partial purification of the extracellular inducer from heat-killed urediniospores of the pathogen. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 4, p. 377-385, dez. 1987.

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

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

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

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

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

LOON, L. C. van et al. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 12, n. 3, p. 245-264, June 1994.

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

MARCHI, C. E.; BORGES, M. F.; RESENDE, M. L. V. Proteção induzida por benzotriazolone contra a ferrugem-alaranjada (*Hemileia vastatrix*) em cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 1103-1106, set./out. 2002.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. New York: Academic, 1995. 889 p.

MARTINS, E. M. et al. Ação protetora do acibenzolar-S-metil (Bion) em plantas de cafeeiro contra ferrugem. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 24., 1998, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas: SBC, 1998. p. 177-178.

MARTINS, E. M.; ROVERATTI, D. S.; MORAES, W. B. C. Elicitation of stress metabolites in coffee leaves by non pathogens. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 3, p. 683-693, maio/jun. 1986.

MAXEMIUC-NACCACHE, V. **Alterações bioquímicas em folhas de *Coffea arabica* resistentes e suscetíveis à infecção por *Hemileia vastatrix* (ferrugem do cafeeiro)**. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1983.

MAXEMIUC-NACCACHE, V.; BRAGA, M. R.; DIETRICH, S. M. C. Chitinase and β -1, 3-glucanase changes in compatible and incompatible combinations between coffee leaf disks and coffee rust (*Hemileia vastatrix*). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 145-150, abr./jun. 1992.

MAXEMIUC-NACCACHE, V.; DIETRICH, S. M. C. Changes in phenols and oxidative enzymes in resistant and susceptible *Coffea arabica* inoculated with *Hemileia vastatrix* (coffee rust). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 7, n. 4, p. 185-190, dez. 1985.

MAZZAFERA, P.; FAZUOLI, L. C.; CARVALHO, A. Ploidy and resistance of *Coffea arabica* and related species to coffee rust. **Journal of Genetics & Breeding**, Rome, v. 47, n. 3, p. 267-270, 1993.

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

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

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

NOJOSA, G. B. A.; RESENDE, M. L. V.; RESENDE, A. V. Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos.** Piracicaba: FEALQ, 2005. v. 1, p. 139-153.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 417-453.

PEREIRA, A. A.; SAKIYAMA, N. S. Melhoramento genético do cafeeiro visando resistência às doenças. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, GENÉTICA E MELHORAMENTO DO CAFEEIRO, 3., 1999, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1999. p. 117-140.

RESENDE, M. L. V. et al. Induction of resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. In: THE INTERNATIONAL JOINT WORKSHOP ON PR-PROTEINS AND INDUCED RESISTANCE, 1., 2004, Helsingor. **Proceedings...** Helsingor: Danish, 2004. p. 79.

_____. **Manejo fitossanitário da cultura do cafeeiro.** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2008. 35 p.

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

RODRIGUES, J. C. J.; BITTENCOURT, A. J.; RIJO, L. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 13, p. 49-70, 1975.

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

SILVA, M. C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; NICOLE, M. Cytological and biochemical mechanisms involved in coffee leaf rust resistance. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E. M.; VÁRZEA, V. M. P. (Ed.). **Durable resistance to coffee leaf rust**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 249-284.

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

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Mário Lúcio Vilela de Resende et al. **Composição para indução de resistência em plantas, a base de extratos de casca de frutos de café**. BR n. PI 0705598-6, 19 abr. 2007.

_____. **Formulação para indução de resistência em plantas, a base de extrato vegetal obtido de folhas do cafeeiro**. BR n. PI 0603575-2, 2 ago. 2006.

VÁRZEA, V. M. P. et al. Resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 297-320.

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

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

CAPÍTULO 2

Associação de indutores de resistência na proteção de mudas de cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar indutores de resistência associados e isoladamente no manejo da ferrugem do cafeeiro em casa de vegetação. Foram realizados dois experimentos, um *in vivo* para avaliar a proteção das mudas de cafeeiro contra *H. vastatrix* e outro *in vitro* para avaliar o efeito dos tratamentos na inibição da germinação dos urediniósporos. Foram utilizados os indutores e suas associações: NEFID (extrato de folhas de cafeeiro); NEFID + fosfito de cobre 5,0 mL L⁻¹; NEFID + fosfito de manganês 5,0 mL L⁻¹; NEFID + fosfito de cobre 2,5 mL L⁻¹ + fosfito de manganês 2,5 mL L⁻¹; ECFC (extrato de casca de café); ECFC + fosfito de cobre 5,0 mL L⁻¹; ECFC + fosfito de manganês 5,0 mL L⁻¹; ECFC + fosfito de cobre 2,5 mL L⁻¹ + fosfito de manganês 2,5 mL L⁻¹; fosfito de cobre 5,0 mL L⁻¹; fosfito de manganês 5,0 mL L⁻¹; ASM (acibenzolar-S-metil) 0,2 g L⁻¹; Viça-Café Plus[®] 7,0 g L⁻¹; fungicida (ciproconazol + azoxistrobina) 1,25 mL L⁻¹, uma testemunha inoculada e uma testemunha absoluta (sem inoculação). No experimento *in vivo*, foram utilizadas mudas da cultivar Mundo Novo e realizaram-se três aplicações dos tratamentos em intervalos de 40 dias. Sete dias após a primeira aplicação, as plantas foram inoculadas. O tratamento NEFID + Fosfito de Cu + Fosfito de Mn reduziu a severidade da ferrugem em 84% e apresentou toxidez direta inibindo em 85% germinação dos urediniósporos de *H. vastatrix*. Todas as associações dos indutores testados e os extratos NEFID e ECFC aplicados isoladamente proporcionaram maior crescimento das mudas.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. Ferrugem. Extratos vegetais. Fosfitos. Controle de doença e germinação de esporos.

ABSTRACT

This study was to evaluate the inductors of resistance associated and isolated with the management of coffee rust in the greenhouse. Two experiments were conducted, one *in vivo* to assess the protection of coffee plants against *H. vastatrix* and another *in vitro* to evaluate the effect of treatments on inhibition of germination of urediniospores. Inductors were used and their associations: NEFID (coffee leaf extract); NEFID + copper phosphite 5.0 mL L⁻¹, NEFID + manganese phosphite 5.0 mL L⁻¹; NEFID + copper phosphite 2.5 mL L⁻¹ + manganese phosphite 2.5 mL L⁻¹; ECFC (bark extract of coffee); ECFC + copper phosphite 5.0 mL L⁻¹; ECFC + manganese phosphite 5.0 mL L⁻¹; ECFC + copper phosphite 2.5 mL L⁻¹ + manganese phosphite 2.5 mL L⁻¹; copper phosphite 5.0 mL L⁻¹; manganese phosphite 5.0 mL L⁻¹; ASM (acibenzolar-S-methyl) 0.2 g L⁻¹, Viça-Café Plus[®] 7.0 g L⁻¹; fungicide (cyproconazole + azoxystrobin) 1.25 mL L⁻¹, an inoculated and an absolute control. In the *in vivo* experiment, the seedlings used were from the cultivar Mundo Novo with three applications of treatments at intervals of 40 days. Seven days after the first application, plants were inoculated. Treatment NEFID + Cu phosphite + Mn phosphite reduced the severity of rust by 84% and showed direct toxicity in 85% inhibiting germination of urediniospores of *H. vastatrix*. All associations of the inductors and the tested extracts NEFID and ECFC applied alone resulted in greater plant growth.

Keywords: *Coffea Arabica*. Rust. Plant extracts. Phosphites. Disease control and germination of spores.

1 INTRODUÇÃO

A cultura do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) representa uma importante commodity para o Brasil, que é o maior produtor e exportador desta espécie agrônômica. No entanto, a presença de pragas e doenças constitui fatores limitantes à sua produção. A ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., exclusivo do gênero *Coffea*, é uma das mais importantes doenças que afetam as lavouras cafeeiras. Suas perdas podem variar de 35% a 50% na ausência de medidas de controle (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

O principal método de controle da ferrugem é o químico. Porém, o uso indiscriminado de fungicidas pode causar danos ao homem e desequilíbrios ambientais. Para contornar esses problemas, vários estudos estão sendo realizados visando desenvolver métodos alternativos de controle de doenças de plantas (RESENDE et al., 2002).

Dentre estes métodos, destaca-se a indução de resistência (IR) em plantas, que consiste na ativação dos mecanismos de defesa latentes da planta (HAMMERSCHMIDT; DANN, 1997) que pode ocorrer por meio do tratamento com agentes bióticos, como extratos vegetais, microrganismos ou parte desses, ou abióticos, substâncias químicas (CAVALCANTI et al., 2005; RESENDE et al., 2004).

A eficiência dos extratos vegetais no controle de fitopatógenos é observada em diversos patossistemas (BONALDO et al., 2004; GUZZO; MARTINS; MORAES, 1987). Universidade Federal de Lavras - UFLA (2006, 2007) solicitou o depósito de patente para formulação à base de extratos de folhas de café (*C. arabiaca* L.) (PI 0603575-2) e para formulação à base de cascas de frutos de café (PI 0705598-6). Tais formulações proporcionaram considerável proteção de mudas de cafeeiro contra os patógenos *Hemileia*

vastatrix, *Phoma costarricensis* e *Cercospora coffeicola* (AMARAL, 2005; BARGUIL et al., 2005; RESENDE et al., 2004; SANTOS et al., 2007), além de apresentarem eficiência no controle de doenças em cacaueteiro, algodoeiro e tomateiro (MEDEIROS et al., 2009; UFLA, 2006, 2007).

Entre os produtos comercializados como fertilizantes foliares, os fosfitos têm se destacado por atuarem diretamente sobre o patógeno, além de atuarem indiretamente, induzindo resposta de defesa na planta (JACKSON et al., 2000; NOJOSA; RESENDE; RESENDE, 2005). Em mudas de cafeeiro, produtos contendo fosfitos foram eficazes em reduzir a severidade da mancha de Phoma (NOJOSA, 2003; NOJOSA et al., 2009). Ribeiro Júnior (2008) observou que pulverizações de fosfitos de potássio, manganês e zinco em cafeeiros adultos proporcionaram reduções na severidade da ferrugem e cercosporiose, além de proporcionarem aumento no enfolhamento das plantas. Utilizando-se pulverizações com fosfito de cobre, Toyota (2008), também, observou redução na severidade da ferrugem.

Estudos com a resistência induzida no manejo de doenças em cafeeiro, por meio de extratos vegetais e fosfitos, já apresentam resultados promissores. No entanto, a resistência induzida em cafeeiro pela aplicação de formulações à base de extratos vegetais associados a fosfitos, ainda, não foram estudados. Assim, objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito de extratos vegetais associados a fosfitos no manejo da ferrugem em mudas de cafeeiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das formulações bióticas

As formulações à base de folhas de cafeeiro (NEFID) e de casca de frutos de cafeeiro (ECFC) foram processadas no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo do Departamento de Fitopatologia da UFLA. O NEFID foi ajustado para 15 g de peso seco L⁻¹, enquanto que o ECFC para 20 g de peso seco L⁻¹. A forma de processamento e a composição destes produtos encontram-se sob sigilo de patente (UFLA, 2006, 2007).

2.2 Obtenção das formulações abióticas

Foram utilizados produtos comerciais à base de fosfito de cobre, Fulland[®] (20% de P₂O₅ e 4% Cu), adquirido junto à empresa Sudoeste Agropecus Ltda.; fosfito de manganês, Reforce[®] Mn (51,0% de P₂O₅ e 9,7% de Mn), adquirido da Agrichem do Brasil Ltda.; como padrão de controle da ferrugem em cultivos orgânicos foi utilizado o Viça-Café plus[®] (produto à base de cobre e outros micronutrientes), adquirido da Café Brasil Insumos Agrícolas Ltda.; o Bion[®] (acibenzolar-S-metil - ASM) como padrão de indução de resistência, e o fungicida PrioriXtra[®] (ciproconazol + azoxistrobina) como padrão de controle em cultivos convencionais, ambos da Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.

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

Urediniósporos de *H. vastatrix* foram coletados a partir de pústulas em folhas de cafeeiros infectados naturalmente em lavoura localizada em campo

experimental da UFLA. A coleta foi realizada mediante raspagem dos urediniósporos das pústulas com pincel de cerdas macias e acondicionados em microtubos de 2,0 mL. Estes foram armazenados em temperatura ambiente, protegidos da luz, por um período máximo de 48 horas.

Para a inoculação das plantas, foi preparada uma suspensão na concentração de 1×10^5 de urediniósporos mL^{-1} de ágar-água (0,2%), contendo Tween 20 (0,05%) (SALUSTIANO et al., 2008). Antes da inoculação, a viabilidade do inóculo foi testada, determinando-se a percentagem de urediniósporos germinados em lâminas escavadas mantidas no escuro por 16 horas a 23°C.

2.4 Obtenção das mudas de cafeeiro

Mudas de cafeeiro cv. Mundo Novo, com seis meses de idade, adquiridas de viveiro comercial, foram transplantadas para sacos de polietileno de 2,0 kg contendo substrato composto por terra, areia e esterco bovino, na proporção 2:1:1. As mudas foram mantidas em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFLA, durante todo o período experimental, onde foram irrigadas periodicamente e receberam adubações complementares com adubo NPK mais micronutrientes.

2.5 NEFID e ECFC associados a fosfitos de cobre e manganês na proteção de mudas de cafeeiro contra a ferrugem em casa de vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia-UFLA, em delineamento de blocos casualizados (DBC), com 14 tratamentos (Tabela 1) e quatro repetições, sendo cada parcela experimental composta por sete mudas, com nove meses de idade.

Tabela 1 Tratamentos com formulações à base de extratos vegetais e fosfitos, associados e isoladamente, avaliados em experimento em mudas de cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*, em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia, UFLA

Tratamentos	Doses
1) NEFID	15 g peso seco. L ⁻¹
2) NEFID+ fosfito de cobre	15 g peso seco. L ⁻¹ + 5 mL.L ⁻¹
3) NEFID + fosfito de manganês	15 g peso seco. L ⁻¹ + 5 mL.L ⁻¹
4) NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês	15 g peso seco. L ⁻¹ + 2,5 mL.L ⁻¹ + 2,5 mL.L ⁻¹
5) ECFC	20 g peso seco. L ⁻¹
6) ECFC + fosfito de cobre	20 g peso seco. L ⁻¹ + 5 mL.L ⁻¹
7) ECFC + fosfito de manganês	20 g peso seco. L ⁻¹ + 5 mL.L ⁻¹
8) ECFC + fosfito de cobre + fosfito de manganês	20 g peso seco. L ⁻¹ + 2,5 mL.L ⁻¹ + 2,5 mL.L ⁻¹
9) Fosfito de cobre	5 mL.L ⁻¹
10) Fosfito de manganês	5 mL.L ⁻¹
11) Acibenzolar-S-metil (ASM)	2 g.L ⁻¹
12) Viça-café Plus [®]	10 g.L ⁻¹
13) Ciproconazol + azoxistrobina	1,25 mL.L ⁻¹
14) Testemunha absoluta	---
15) Testemunha inoculada	--

*NEFID: extrato de folha de café; ECFC: extrato de casca de fruto de café

As mudas foram pulverizadas com os tratamentos até o ponto de escorrimento, utilizando-se um pulverizador manual. Foram realizadas três aplicações dos tratamentos em intervalos de 40 dias. Sete dias após a primeira aplicação, as plantas foram inoculadas com *H. vastatrix*, mediante pulverização com uma suspensão de urediniósporos e, em seguida, submetidas a uma câmara úmida, no escuro, por um período de 48 horas.

As avaliações da ferrugem foram realizadas quinzenalmente, a partir dos 40 dias após a inoculação, totalizando cinco avaliações, utilizando-se a escala diagramática proposta por Cunha et al. (2001). A altura das plantas foi avaliada no dia da primeira pulverização e, a partir desta, foi realizada em intervalos quinzenais até o final do experimento. Em seguida, foram calculadas as áreas abaixo da curva de progresso da incidência da doença (AACPID), da severidade

da ferrugem (AACPSD) e da altura das plantas (AACPA), conforme Shaner e Finney (1977). Os dados foram analisados pelo programa estatístico Sisvar versão 5.1 (FERREIRA, 2000).

2.6 Avaliação *in vitro* da toxicidade das formulações bióticas e associações com fosfitos de cobre e manganês sobre a germinação de urediniósporos de *H. vastatrix*

Para a realização do teste *in vitro* foram utilizados os mesmos tratamentos do experimento instalado na casa de vegetação (Tabela 1).

O teste de germinação foi montado em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo 10,0 mL de meio ágar-água (2%). Sobre o meio, foram depositados 500 µL do tratamento, juntamente com 100 µL da suspensão de inóculo na concentração de 1×10^5 urediniósporos de *H. vastatrix* mL⁻¹ e homogeneizados com o auxílio de alça de Drigalsky. As placas foram incubadas em câmara de crescimento a 23° C por 16 h no escuro. Após esse período, utilizou-se solução de lactoglicerol + azul de tripan para paralisar a germinação do urediniósporos.

As avaliações foram realizadas em microscópio estereoscópio, onde foi avaliada a percentagem de germinação dos urediniósporos. Foi considerado como germinado o urediniósporo que apresentava tubo germinativo com comprimento superior ao seu tamanho.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com oito repetições, sendo cada repetição constituída de um quadrante da placa, onde foram avaliados 50 urediniósporos por quadrante. A porcentagem de esporos germinados foi analisada pelo programa estatístico Sisvar versão 5.1 (FERREIRA, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento que apresentou menor área abaixo da curva de progresso da incidência da ferrugem do cafeeiro (AACPI) foi o fungicida (ciproconazol + azoxistrobina) com 100% de redução em relação à testemunha inoculada, seguido pela mistura de NEFID + Fosfíto de cobre + Fosfíto de manganês com 78% de redução da incidência. Os demais tratamentos não diferiram da testemunha e proporcionaram reduções na AACPI variando de 55 a 16 (Gráfico 1A).

Para a área abaixo da curva de progresso da severidade da ferrugem do cafeeiro (AACPS), o efeito do fungicida foi similar ao observado para AACPI, com 100% de redução em relação à testemunha inoculada. Os tratamentos NEFID + Fosfíto de cobre + Fosfíto de manganês e Fosfíto de manganês apresentaram, depois do tratamento com o fungicida, menor AACPS, com redução de 84 e 70%, respectivamente (Gráfico 1B).

Para a curva de progresso da incidência e da severidade da ferrugem, observou-se, para a maioria dos tratamentos, aumento progressivo na intensidade entre os 55 e 85 dias após a primeira pulverização. O fungicida controlou totalmente a doença em todas as épocas de avaliação. Mudanças de cafeeiro tratadas com a associação dos indutores NEFID + fosfíto de cobre + fosfíto de manganês apresentaram menor incidência e severidade da ferrugem dos 55 aos 115 dias após a primeira aplicação (Gráfico 2 A e B).

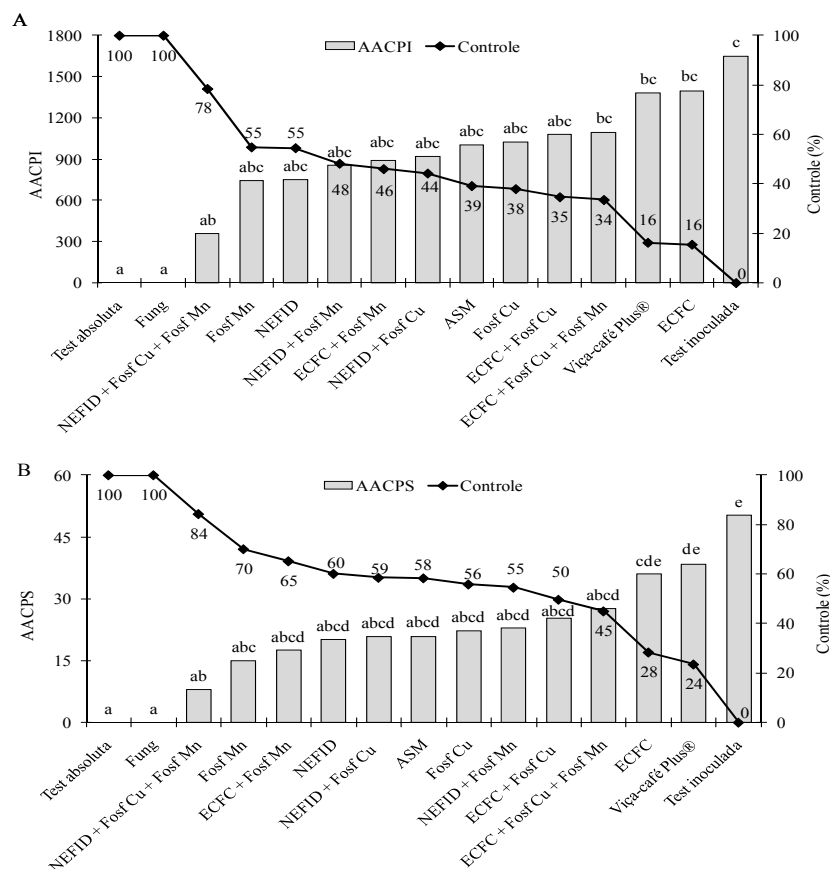


Gráfico 1 Área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) (A) e da severidade da ferrugem do cafeeiro (AACPS) (B) e percentagem de controle. Tratamentos: Test absoluta (testemunha absoluta), Fung (Fungicida ciproconazol + azoxistrobina), NEFID + Fosf Cu + Fosf Mn (extrato de folha de café + fosfito de cobre + fosfito de manganês), Fosf Mn (fosfito de manganês), NEFID (extrato de folha de café), NEFID + Fosf Mn (extrato de folha de café + fosfito de manganês), ECFC + Fosf Mn (extrato de casca de café + fosfito de manganês), NEFID + Fosf Cu (extrato de folha de café + fosfito de cobre), ASM (acibenzolar-S-metil), Fosf Cu (fosfito de cobre), ECFC + Fosf Cu (extrato de casca de café + fosfito de cobre), ECFC + Fosf Cu + Fosf Mn (extrato de casca de café + fosfito de cobre + fosfito de manganês), ECFC (extrato de casca de café), Viça-café Plus[®], Test inoculada (testemunha inoculada). Após 3 pulverizações. Barras com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

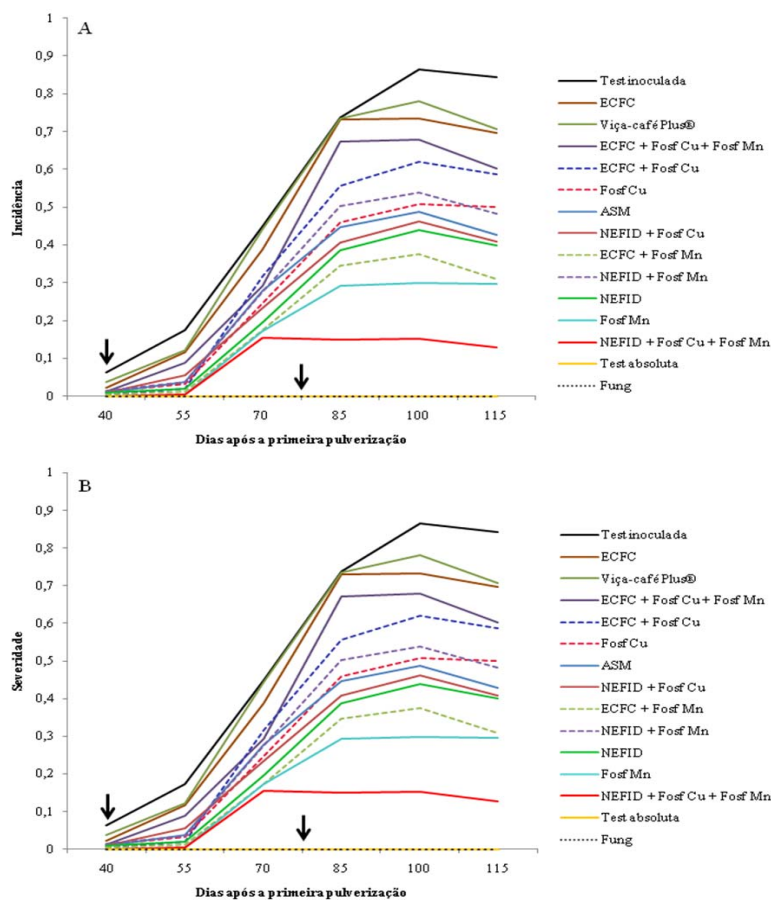


Gráfico 2 Efeito dos tratamentos na curva de progresso da incidência (A) e da severidade (B) da ferrugem em mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo. Primeira pulverização 7 dias antes da inoculação e as demais, indicadas pelas setas, aos 40 e 80 dias após a primeira. Tratamentos: Test inoculada (testemunha inoculada), ECFC (extrato de casca de café), Fung (Fungicida ciproconazol + azoxistrobina), Test absoluta (testemunha absoluta), NEFID + Fosf Cu + Fosf Mn (extrato de folha de café + fosfito de cobre + fosfito de manganês), ECFC + Fosf Mn (extrato de casca de café + fosfito de manganês), Fosf Mn (fosfito de manganês), ASM (acibenzolar-S-metil), NEFID (extrato de folha de café), ECFC + Fosf Cu (extrato de casca de café + fosfito de cobre), Fosf Cu (fosfito de cobre), ECFC + Fosf Cu + Fosf Mn (extrato de casca de café + fosfito de cobre + fosfito de manganês), NEFID + Fosf Cu (extrato de folha de café + fosfito de cobre), Viça-café Plus[®], NEFID + Fosf Mn (extrato de folha de café + fosfito de manganês)

A utilização de extratos de folha de café, de casca de fruto de café e fosfitos, aplicados isoladamente no controle de doenças em plantas vem sendo estudados em diversos patossistemas, inclusive no controle de doenças em cafeeiro. Santos et al. (2007), ao estudarem estes extratos vegetais no controle da ferrugem, cercosporiose e mancha de phoma, em cafeeiro orgânico, obtiveram bons resultados. Para a ferrugem, o tratamento com extrato de folha de café proporcionou AACPS 31% inferior ao observado na testemunha pulverizada com água, enquanto que o extrato de casca de fruto de café reduziu em 49%.

No presente trabalho o uso do NEFID apresentou 60% de redução da severidade da ferrugem em mudas de cafeeiro, resultado superior ao observado por Amaral (2005) e Barguil et al. (2005) para outras doenças do cafeeiro, em que ao utilizarem EFID, formulação similar ao NEFID, observaram redução de 38% na severidade da mancha de phoma e de 37% na severidade da cercosporiose, respectivamente. O uso de ECFC proporcionou 28% de redução da severidade da ferrugem em mudas de cafeeiro, resultados semelhantes ao observado por Toyota (2008), em que o uso deste mesmo extrato reduziu em 23% a severidade desta doença em cafeeiro em condição de campo.

Existem diversos estudos com a utilização de fosfitos no controle de doenças de plantas. Em cafeeiro, em condições de campo, a pulverização com fosfito de cobre, 10mL.L^{-1} , reduziu a AACPS da ferrugem em 81% quando comparado à testemunha e semelhante ao tratamento com fungicida (epoxiconazole + piraclostrobina) (TOYOTA, 2008). No presente trabalho, a dosagem do fosfito de cobre foi de 5mL.L^{-1} e apresentou redução de 56% da severidade da ferrugem em mudas de cafeeiro, resultado que corrobora com Toyota (2008), em que a mesma dosagem reduziu, aproximadamente, 50% da AACPS da ferrugem em condição de campo.

Ribeiro Júnior (2008) avaliou diferentes fosfitos no controle da ferrugem do cafeeiro em condições de campo e o tratamento com fosfito de manganês na

dosagem de 3,33 mL L⁻¹ proporcionou, em ano de alta produção, 25% de redução da severidade e, em ano de baixa produção, 54% de redução da severidade desta doença. No presente trabalho, o tratamento com fosfito de manganês proporcionou 70% de controle da ferrugem em mudas de cafeeiro, possivelmente em função da maior dosagem utilizada (5,0 mL L⁻¹).

A associação de produtos pode ser uma boa alternativa para aumentar o controle de doenças de plantas. Em estudo realizado por Rebollar-Alviter et al. (2010) foi verificado que fosfito de potássio em mistura com azoxistrobina proporcionou uma menor percentagem de podridão do colo e mofo cinzento em morangueiro, quando comparado com estes produtos isoladamente. Toyota (2008) avaliou a associação de extrato de folha de café com indutor de resistência ASM, o qual proporcionou uma maior redução na AACPS da ferrugem do cafeeiro, quando comparado aos indutores aplicados de forma isolada.

Dessa forma, no presente trabalho, a associação de extratos vegetais com fosfitos, principalmente a mistura NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês, provavelmente, atuou em mais locais, estimulando maior número de sinalização para a defesa, maximizando, assim, o potencial da planta em responder à infecção (UFLA, 2007).

Os tratamentos NEFID, ECFC, ECFC + fosfito de cobre + fosfito de manganês, ECFC + fosfito de cobre e Viça-café Plus[®] proporcionaram maior incremento na altura das mudas de café inoculadas com *Hemileia vastatrix*, porém, não se diferiram estatisticamente dos tratamentos com NEFID + fosfito de manganês, NEFID + fosfito de cobre, ECFC + fosfito de cobre, NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês, fosfito de cobre, fungicida, acibenzolar-S-metil, inclusive da testemunha inoculada e da absoluta, a qual não recebeu nenhum tratamento e inoculação (Tabela 2).

Tabela 2 Área abaixo da curva de progresso da altura das mudas (AACPA) de cafeeiro cultivar Mundo Novo. Tratamentos com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

Tratamento*	AACPA	
Viça-café Plus®	2712,50	a
NEFID	2675,25	a
ECFC	2672,75	a
ECFC + Fosfito de cobre + Fosfito de manganês	2667,00	a
ECFC + Fosfito de manganês	2644,00	a
NEFID + Fosfito de manganês	2611,50	ab
NEFID + Fosfito de cobre	2605,50	ab
ECFC + Fosfito de cobre	2595,25	ab
NEFID + Fosfito de cobre + Fosfito de manganês	2542,75	ab
Testemunha absoluta	2478,00	ab
Fosfito de cobre	2469,50	ab
Fungicida ciproconazol + azoxistrobina	2434,00	ab
Testemunha inoculada	2424,25	ab
Acibenzolar-S-metil	2423,50	ab
Fosfito de manganês	2169,75	b

*NEFID: extrato de folha de café; ECFC: extrato de casca de fruto de café

Quando se observou o crescimento das mudas de cafeeiro, constatou-se que alguns tratamentos, além de proporcionarem maior redução da doença, proporcionaram plantas maiores, como é o caso da associação de NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês. Os tratamentos com fosfitos isoladamente, com o fungicida e o acibenzolar-S-metil possivelmente provocaram fitotoxidez nas mudas de cafeeiro, não proporcionando maior incremento na altura das mudas.

Amaral (2008) observou que o tratamento com EFID proporcionou bom desenvolvimento da planta, além de controlar a cercosporiose em mudas de cafeeiro. Este mesmo autor, ao testar a associação de EFID + ASM, constatou que o incremento no número médio de folhas, ao final do experimento, foi em decorrência da presença do extrato EFID, pois, o ASM, aplicado isoladamente, apresentou ligeiro aumento no número de folhas. O presente trabalho corrobora Amaral (2008), uma vez que os extratos aplicados isoladamente e em associação

com fosfitos apresentaram uma maior área abaixo da curva de progresso da altura (AACPA) das mudas, diferindo-se dos tratamentos com os fosfitos isoladamente.

No teste da avaliação dos produtos na toxidez direta a *H. vastatrix*, *in vitro*, o tratamento NEFID + fosfito de cobre inibiu apenas 7,5% da germinação de urediniósporos, apresentando semelhança estatística dos tratamentos ECFC e ECFC + fosfito de cobre, e diferindo-se dos demais tratamentos. Os tratamentos que mais inibiram a germinação dos esporos foram o fungicida ciproconazol + azoxistrobina, Viça-café Plus[®], NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês e ECFC + fosfito de cobre + fosfito de manganês (Tabela 3).

Possivelmente, no presente trabalho, o modo de ação dos fosfitos utilizados foi direto e indireto. A ação direta foi em virtude da toxidez que estes apresentaram na germinação dos urediniósporos como o fosfito de cobre que inibiu, aproximadamente, 68% da germinação, enquanto que fosfito de manganês inibiu 70%. A toxidez direta de fosfitos, também, foi relatada por outros autores: Ribeiro Júnior (2008) observou que fosfito de manganês inibiu 86% a germinação de esporos de *H. vastatrix* e Nojosa et al. (2009) relataram que fosfito de potássio inibiu 62% o crescimento micelial de *P. costarricensis*, além de impedir a formação do tubo germinativo nos conídios. No patossistema frutos de maçã x *Penicillium expansum*, Amiri e Bompeix (2011) observaram que fosfito de potássio na concentração 4 mg mL⁻¹ inibiu completamente o crescimento micelial e a germinação de conídios.

O ASM apresentou baixa inibição da germinação de urediniósporos, fato que corrobora com Guzzo et al. (2001), que observaram por meio de microscopia de fluorescência que a germinação e formação do apressório de *H. vastatrix* não foram afetadas pelo tratamento com ASM.

Os extratos NEFID e ECFC apresentaram baixíssima toxidez sobre os urediniósporos de *H. vastatrix*, inibindo apenas 27 e 17% da germinação,

respectivamente, porém apresentaram redução na intensidade da ferrugem em mudas de cafeeiro, podendo indicar que ocorreu indução de resistência nestas.

Tabela 3 Efeito dos tratamentos utilizados no experimento com mudas de cafeeiro na germinação de urediniósporos de *Hemileia vastatrix* e na porcentagem de inibição. Tratamentos com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

Tratamento*	Germinação (%)	Inibição (%)
Fungicida ciproconazol + azoxistrobina	0,00 a	100,00
Viça-café Plus®	6,25 ab	91,10
NEFID + Fosfito de cobre+Fosfito de manganês	10,75 abc	84,70
ECFC + Fosfito de cobre+Fosfito de manganês	13,50 bc	80,78
Fosfito de manganês	20,75 cd	70,46
ECFC + Fosfito de manganês	21,75 cd	69,04
Fosfito de cobre	22,75 cd	67,62
NEFID + Fosfito de manganês	31,50 de	55,16
Acibenzolar-S-metil	42,75 ef	39,15
NEFID	51,50 fg	26,69
ECFC	58,00 gh	17,44
ECFC + Fosfito de cobre	61,50 gh	12,46
NEFID + Fosfito de cobre	65,00 gh	7,47
Testemunha	70,25 h	---

*NEFID: extrato de folha de café; ECFC: extrato de casca de fruto de café

O tratamento NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês controlou a doença neste trabalho e apresentou ação tóxica sobre os urediniósporos, possivelmente em consequência da presença de fosfitos em sua formulação. É necessário mais estudos para confirmar se a associação destes indutores ativa rotas de defesa em cafeeiro contra *H. vastatrix*.

4 CONCLUSÃO

A associação dos indutores de resistência NEFID (extrato de folha de cafeeiro) + fosfito de cobre + fosfito de manganês, em 3 pulverizações, proporcionou 84% de controle da ferrugem em mudas do cafeeiro, apresentam, também, efeito inibitório na germinação dos urediniósporos.

Observou-se que a associação de ECFC (extrato de casca de fruto de café) + fosfito de manganês e fosfito de manganês proporcionam controle intermediário da ferrugem em mudas de cafeeiro, sendo mais uma alternativa para o controle desta enfermidade.

As associações entre extratos vegetais e fosfitos e os extratos isoladamente, proporcionam maior crescimento das mudas.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, D. R. **Formulações de extratos vegetais e micronutrientes na indução de resistência em mudas de cafeeiro contra *Cercospora coffeicola***. 2008. 92 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- _____. **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais**. 2005. 96 p. (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- AMIRI, A.; BOMPEIX, G. Control of *Penicillium expansum* with potassium phosphite and heat treatment. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, n. 1, p. 222-227, Feb. 2011.
- BARGUIL, B. M. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costaricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 535-537, set./out. 2005.
- BONALDO, S. M. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 128-134, mar./abr. 2004.
- CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas contra patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 263 p.
- CUNHA, R. L. et al. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para avaliar a severidade da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Resumos...** Vitória: EMBRAPA Café, 2001. p. 77-78.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- GUZZO, S. D. et al. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 89-94, jan./mar. 2001.

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F.; MORAES, W. B. C. Induced protection of coffee plants to *Hemileia vastatrix*: I., partial purification of the extracellular inducer from heat-killed urediniospores of the pathogen. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 4, p. 377-385, dez. 1987.

HAMMERSCHMIDT, H.; DANN, E. K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N. A.; RECHCIGL, J. E. (Ed.). **Environmentally safe approaches to crop disease control**. Boca Raton: CRC, 1997. p. 177-199.

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

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

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

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

NOJOSA, G. B. A.; RESENDE, M. L. V.; RESENDE, A. V. Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Org.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. v. 1, p. 139-153.

REBOLLAR-ALVITER, A. et al. A comparative evaluation of post-infection efficacy of mefenoxam and potassium phosphite with protectant efficacy of azoxystrobin and potassium phosphite for controlling leather rot of strawberry caused by *Phytophthora cactorum*. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 4, p. 349-353, Apr. 2010.

RESENDE, M. L. V. et al. Induction of resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. In: THE INTERNATIONAL JOINT WORKSHOP ON PR-PROTEINS AND INDUCED RESISTANCE, 1., 2004, Helsingor. **Proceedings...** Helsingor: Danish, 2004. p. 79.

_____. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis perniciosa* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 621-628, Oct. 2002.

_____. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 213-221, maio/jun. 2007.

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

SALUSTIANO, M. E. et al. Variabilidade em dez populações de *Hemileia vastatrix* em relação à germinação e ao comprimento do tubo germinativo em quatro temperaturas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1651-1656, set./out. 2008.

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

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

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Mário Lúcio Vilela de Resende et al. **Composição para indução de resistência em plantas, a base de extratos de casca de frutos de café**. BR n. PI 0705598-6, 19 abr. 2007.

_____. **Formulação para indução de resistência em plantas, a base de extrato vegetal obtido de folhas do cafeeiro**. BR n. PI 0603575-2, 2 ago. 2006.

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

CAPÍTULO 3

Mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa ativada por indutores de resistência e fungicida contra *Hemileia vastatrix* em mudas de cafeeiro

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar o efeito da aplicação de NEFID (extrato de folhas de cafeeiro), fosfito de manganês, associação de NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês, ASM e do fungicida ciproconazol + azoxistrobina sobre as atividades das proteínas relacionadas à patogênese, quitinase, peroxidase e β -1,3-glucanase, além dos teores de fenóis solúveis totais e lignina em folhas de cafeeiro. Mudas de cafeeiro da cultivar Mundo Novo foram pulverizadas com NEFID, fosfito de manganês ($5,0 \text{ mL L}^{-1}$), NEFID + fosfito de cobre ($2,5 \text{ mL L}^{-1}$) + fosfito de manganês ($2,5 \text{ mL L}^{-1}$), ASM ($0,2 \text{ g L}^{-1}$) e fungicida ciproconazol + azoxistrobina ($1,25 \text{ mL L}^{-1}$), com e sem inoculação com *H. vastatrix*. A inoculação foi realizada 7 dia após a pulverização com os tratamentos. Observou-se que, para a associação de NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês, com inoculação, o NEFID, sem inoculação, e ASM, inoculado e não inoculado, houve aumento na atividade de peroxidase. Maior atividade de quitinase foi observada em folhas de cafeeiro tratadas com fosfito de manganês e ASM, não inoculadas com *H. vastatrix*. A associação de NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês, NEFID, fosfito de manganês e fungicida ciproconazol + azoxistrobina promoveram aumento da atividade de β -1,3-glucanase em folhas de cafeeiro não inoculadas. Quanto ao teor de lignina, não houve diferença significativa proporcionada pelos tratamentos. Observou-se, também, que houve maior acúmulo de fenóis solúveis totais em plantas tratadas com ASM e fungicida, sem inoculação do patógeno e em todos os tratamentos, com exceção da testemunha, com inoculação do patógeno.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. Ferrugem. Peroxidase. Quitinase. β -1,3-glucanase. Lignina. Fenóis solúveis totais.

ABSTRACT

This work was carried out to verify the effect of NEFID (coffee leaf extract), manganese phosphite, association of NEFID + copper phosphite + manganese phosphite, ASM and the fungicide cyproconazole + azoxystrobin on activities of pathogenesis-related proteins, chitinase, peroxidase and β -1,3-glucanase, and the levels of total soluble phenolics and lignin in leaves of coffee. Seedlings of the cultivar Mundo Novo coffee were sprayed with NEFID, manganese phosphite (5.0 mL L^{-1}), NEFID + copper phosphite (2.5 mL L^{-1}) + manganese phosphite (2.5 mL L^{-1}), ASM (0.2 g L^{-1}) and fungicide cyproconazole + azoxystrobin (1.25 mL L^{-1}), with and without inoculation with *H. vastatrix*. The inoculation was performed 7 days after the spray treatments. It was observed that for the association of NEFID + copper phosphite + manganese phosphite with inoculation, the NEFID, without inoculation, and ASM, inoculated and uninoculated, there was an increase in peroxidase activity. Increased chitinase activity was observed in coffee leaves treated with ASM and manganese phosphite, not inoculated with *H. vastatrix*. The association of NEFID + copper phosphite + manganese phosphite, NEFID, manganese phosphite and fungicide cyproconazole + azoxystrobin promoted increased activity of β -1,3-glucanase in uninoculated leaves of coffee. As for the lignin content, there was no significant difference provided by the treatments. It was also observed that there was greater accumulation of total soluble phenols in plants treated with ASM and fungicide without pathogen inoculation and in all treatments except the control, inoculation with the pathogen.

Keywords: *Coffea Arabica*. Rust. Peroxidase. Chitinase. β -1,3-glucanase. Lignin. Total soluble phenols.

1 INTRODUÇÃO

A ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, é considerada uma das doenças mais impactantes do cafeeiro. Esta doença é de difícil controle, porém, resultados satisfatórios são obtidos pelo uso de fungicidas sistêmicos (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005). Entretanto, o uso indiscriminado destes pode causar o surgimento de patógenos resistentes, contaminar o ambiente e afetar a saúde do agricultor.

A resistência sistêmica adquirida (RSA) pode ser usada como uma medida alternativa no manejo de doenças de plantas, pois, consiste na ativação de mecanismos de defesa natural dessas contra um amplo espectro de patógenos. Alguns compostos naturais e sintéticos estimulam respostas de defesa semelhantes àquelas observadas nas interações plantas resistentes-agentes patogênicos, como a explosão oxidativa, caracterizada pela rápida geração de espécies ativas de oxigênio, reação de hipersensibilidade (HR), acúmulo de fitoalexinas, acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese e de compostos fenólicos em células adjacentes ao sítio de infecção, além da indução de barreiras estruturais (CAVALCANTI et al., 2005; LOON, 1997).

Avanços nas pesquisas com resistência induzida em plantas são acompanhados pelo surgimento de novos produtos comerciais que apresentam maior eficácia, estabilidade e menor impacto ao ambiente, além de propiciar melhora na produtividade agrícola, em virtude da redução de perdas ocasionadas por patógenos e, em alguns casos, incrementos no desenvolvimento vegetativo (RESENDE et al., 2006). O acibenzolar-S-metil (ASM) foi o primeiro indutor de resistência liberado para uso comercial (LYON; NEWTON, 1997) e, atualmente, muitos outros produtos já estão disponíveis no mercado ou em fase de pesquisa (RESENDE et al., 2006). Dentre esses produtos comerciais, a utilização de fosfitos apresenta importância no controle de doenças, pois, estes podem atuar

como indutores de resistência e diretamente sobre o patógeno (DATNOFF; SEEBOLD; CORREA, 2001).

A utilização de extratos de plantas para o controle de doenças desperta o interesse dos especialistas da área. É comprovada a eficiência de extrato de folha de café (NEFID) na proteção do cafeeiro contra *H. vastatrix*, *Cercospora coffeicola* e *Phoma tarda*, do cacaueteiro contra *Crinipellis pernicioso*, e do tomateiro contra *Xanthomonas vesicatoria* (MEDEIROS et al., 2009; RESENDE et al., 2006). Em tomateiro, este extrato induziu a expressão de genes de resposta de defesa, além de proporcionar maior atividade de peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase (MEDEIROS et al., 2009).

Os fungicidas agrícolas, por concepção, são produtos destinados ao manejo de fitopatógenos, tendo como objetivo fundamental provocar a morte destes microrganismos, reduzindo suas populações em níveis tais que não interfiram na qualidade e nem na quantidade de produtos agrícolas cultivados. Há relatos que fungicidas do grupo dos triazóis e estrobilurinas, além de atuarem diretamente contra patógenos fúngicos, provocam aumento na atividade de proteínas relacionadas à patogênese, aumento da atividade de fenilalanina amônia-liase e acúmulo de compostos fenólicos em diversas culturas (GARCIA et al., 2003; PASQUER et al., 2005).

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar o efeito da aplicação de ASM, NEFID, fosfito de manganês, associação de NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês e do fungicida ciproconazol + azoxistrobina sobre as atividades das proteínas relacionadas à patogênese, quitinase, peroxidase e β -1,3-glucanase, além dos teores de fenóis solúveis totais e lignina em mudas de cafeeiro inoculadas e não inoculadas com *H. vastatrix*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos produtos

A formulação à base de folhas de cafeeiro (NEFID) foi processada no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo da UFLA, sendo a mesma ajustada para 15 g de peso seco L⁻¹. É importante ressaltar que a forma de processamento e a composição da mesma encontra-se sob sigilo de patente (UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS - UFLA, 2007).

Foram utilizados produtos comerciais à base de fosfito de cobre, Fulland[®] (20% de P₂O₅ e 4% Cu), adquirido junto à empresa Sudoeste Agropecus Ltda.; fosfito de manganês e Reforce[®] Mn (51,0% de P₂O₅ e 9,7% de Mn), adquirido da Agrichem do Brasil Ltda.; o acibenzolar-S-metil (ASM) (Bion[®] - 50% de ASM) e fungicida PrioriXtra[®] (ciproconazol + azoxistrobina), da Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.

2.2 Obtenção das plantas, do inóculo e inoculação

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

Foram utilizadas mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo, com três a quatro pares de folhas definitivas, cultivadas em bandejas de isopor, de 72 células, com o substrato Vida Verde[®]. Os tempos de coleta das amostras foliares foram: 0, 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10 e 14 dias após a aplicação dos produtos. Foram utilizadas 3 repetições de 3 plantas cada, por tempo de coleta por tratamento.

A inoculação do patógeno foi realizada 7 dias após a pulverização com os tratamentos. Foram avaliados os tratamentos NEFID, NEFID + fosfito de

cobre ($2,5 \text{ mL L}^{-1}$) + fosfito de manganês ($2,5 \text{ mL L}^{-1}$), fosfito de manganês ($5,0 \text{ mL L}^{-1}$), ASM ($0,2 \text{ g L}^{-1}$) e PrioriXtra® ($1,25 \text{ mL L}^{-1}$), em plantas inoculadas e não inoculadas com *H. vastatrix*, além de duas testemunhas, plantas pulverizadas apenas com água destilada inoculadas e não inoculadas com *H. vastatrix*. Foram analisadas as atividades das enzimas peroxidase de guaiacol, quitinase, β -1,3-glucanase, além dos teores de lignina solúvel e de fenóis solúveis totais.

Para a obtenção do inóculo, uredinióporos de *H.vastatrix* foram coletados de folhas de cafeeiro naturalmente infectadas. Os esporos formados foram retirados da superfície foliar mediante raspagem, utilizando-se pincel e acondicionados em microtubos de 2,0 mL, por um período máximo de 48 horas, até a utilização. Para a inoculação, foi preparada uma suspensão de uredinióporos de *H. vastatrix*, na concentração de 1×10^5 uredinióporos mL^{-1} de ágar-água (0,2%), contendo Tween 20 (0,05%) (SALUSTIANO et al., 2008). Antes da inoculação, a viabilidade do inóculo foi testada, determinando-se a percentagem de uredinióporos germinados em lâminas escavadas e mantidas no escuro por 14 horas a 22°C .

Após a coleta, as amostras foliares foram envolvidas em papel alumínio, identificadas, mergulhadas em nitrogênio líquido e, após o congelamento, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer, a -80°C , até o preparo do material para as análises bioquímicas.

2.3 Preparo de extratos foliares para a avaliação de proteínas totais e da atividade de peroxidase de guaiacol, quitinase e β -1,3-glucanase

Os tecidos vegetais foliares foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, aproximadamente 2 g desse pó foi depositado em um tubo, ao qual se adicionou

o tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, acrescido de 1 mM de EDTA e 1 mM de β -mercaptoetanol (5mL de tampão para cada grama de amostra) e homogeneizou-se por 15 segundos, em agitação. Após filtração, em pano de trama fina, a solução foi centrifugada a 12.000 g, por 15 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi usado como fonte enzimática.

2.3.1 Proteínas totais

A concentração de proteína total solúvel foi aferida com a utilização de uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA), conforme ensaio de Bradford (1976).

2.3.2 Peroxidase de guaiacol (POX; EC 1.11.1.7)

A atividade de peroxidases de guaiacol foi determinada pela adição de 20 μ L do extrato enzimático, ajustado para 200 μ L de solução contendo acetato de sódio 50 mM pH 5,2, guaiacol 20 mM e peróxido de hidrogênio 60 mM em microplaca de 96 cavidades. Após incubação a 30 °C, por 10 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro EIA compatível, a 480nm (URBANEK; KUZNIAK-GEBAROWSKA; HERKA, 1991). Uma unidade POX foi expressa como variação de 1 OD₄₈₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{480\text{nm}} \text{ mgP}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

2.3.3 Quitinase (CHI; EC 3.2.1.14)

A atividade de quitinase foi determinada pela adição de 100 μ L do extrato enzimático ajustado para 270 μ L de uma solução com 70 μ L de acetato de sódio 50 mM pH 5,2 e 100 μ L de CM-Chitin-RBV (2 mg mL⁻¹; um substrato

específico para quitinase fornecido por LOEWE Biochemica GmbH), em microplacas de 96 cavidades, com volume de 350 μL por cavidade. Após incubação a 40 °C, por 90 minutos, as amostras foram acidificadas com 30 μL de HCl 2 N, resfriadas em banho de gelo por 10 minutos e centrifugadas a 3700 g por 10 minutos, a 4°C. Uma alíquota de 180 μL do sobrenadante de cada amostra foi transferida para nova microplaca, para leitura em 520 nm, em espectrofotômetro EIA compatível (WIRTH; WOLF, 1990). A atividade CHI foi expressa pela variação de 1 OD₅₂₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{520\text{ nm}} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

2.3.4 β -1,3-glucanase (GLU; EC 3.2.1.6)

A atividade da β -1,3-glucanase foi determinada de modo análogo ao da quitinase, apenas com substituição do substrato para CM-Curdlan-RBB (4 mg mL⁻¹; Loewe Biochemica GmbH). Para promover ação hidrolítica de β -1,3-glucanase, foi adotado tempo de incubação de 90 minutos a 40 °C. As amostras foram submetidas à leitura fotométrica em filtro de 600 nm de um leitor EIA (WIRTH; WOLF, 1990). A atividade GLU foi expressa pela variação de 1 OD₆₀₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{600\text{ nm}} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Todos os ensaios enzimáticos foram conduzidos em triplicatas.

2.4 Preparo de tecidos foliares para a avaliação de lignina solúvel e de fenóis solúveis totais

Os tecidos vegetais foliares coletados às 168 horas (7 dias) e 336 horas (14 dias) após a aplicação dos produtos foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 24 horas. Uma alíquota de 30 mg do material

lioofilizado foi transferida para microtubo de 2mL, homogeneizada com 1,5 mL de metanol a 80% e mantida sob agitação, por 15 horas, em agitador rotativo, protegido da luz à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada, a 12.000 g, por 5 minutos. O sobrenadante (extrato metanólico) foi transferido para novo microtubo, com o qual se realizou a determinação de fenóis solúveis totais, enquanto o resíduo sólido foi utilizado para determinação de lignina solúvel como descrito a seguir.

2.4.1 Determinação de lignina solúvel

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

Posteriormente, os microtubos foram centrifugados, a 12.000 g, por 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,5mL de água ultrapura e novamente centrifugado, a 12.000 g, por 10 minutos, a 4°C.

A seguir, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspense em 1,5 mL de NaOH 0,5 M e mantido em agitador rotativo, por 15 horas, à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 12.000 g, por 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante transferido para novo microtubo, ao qual foram adicionados 200 µL de HCl concentrado. A suspensão obtida foi mantida em câmara fria (4°C), por 4 horas, para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico.

A seguir, a mistura foi centrifugada a 12.000 g, por 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspense em 2,0 mL de NaOH 0,5

M. Uma alíquota de 20 μL da suspensão foi transferida para microplacas, onde se completou o volume para 200 μL de NaOH 0,5 M.

A absorbância desta solução foi determinada em espectrofotômetro EIA compatível, a 280 nm e os valores calculados com base na curva de lignina e expressos em μg de lignina solúvel por miligrama de massa seca (DOSTER; BOSTOCK, 1988).

2.4.2 Determinação de fenóis solúveis totais

Em microplacas, alíquotas de 15 μL do extrato metanólico foram misturadas a 15 μL de metanol 80% e a 30 μL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25 N, por 5 minutos, homogeneizadas com 30 μL de Na_2CO_3 1 M, por 10 minutos e diluídas com 110 μL de água destilada, à temperatura ambiente, por uma hora.

Os valores de absorbância desta reação foram determinados, a 725 nm, em espectrofotômetro EIA compatível e calculados com base em curva de ácido clorogênico. Os compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente μg de ácido clorogênico por miligrama de massa seca (SPANOS; WROLSTAD, 1990).

2.5 Delineamento experimental e análises dos dados

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com 3 plantas por parcela por coleta.

Para as análises enzimáticas foram plotadas curvas de progresso da atividade das enzimas por tempo de coleta utilizando-se o erro padrão da média. Os tratamentos foram comparados pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0,05$), utilizando-se a área abaixo da curva de progresso da atividade das enzimas: peroxidase –

AACPAPOX, quitinase – AACPACHI e β -1,3-glucanase – AACPAGLU, antes e após a inoculação (SHANER; FINNEY, 1977).

Para os teores de lignina e fenóis solúveis totais as médias, quando significativas pelo teste F, foram comparadas utilizando-se o teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$) por meio do programa Sisvar[®] 5.1 (FERREIRA, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Peroxidase de guaicol (POX; EC 1.11.1.7)

A atividade de peroxidase em folhas de mudas de café, após tratamento com NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês, sem inoculação do patógeno, apresentou aumento em relação à testemunha sem inoculação aos 7 dias após a pulverização (DAP). Nesse tratamento, com inoculação de *H. vastatrix*, a maior atividade desta enzima ocorreu aos 9 DAP (Gráfico 1A). Na análise da área abaixo da curva de progresso da atividade de peroxidase (AACPAPOX), no intervalo entre a inoculação e a última observação (14 dias), este tratamento, com inoculação, proporcionou aumento da área quando comparado com a testemunha, deferindo-se da mesma (Gráfico 4A). Toyota (2008), ao estudar a associação de extrato de folha de café com ASM aplicados em mudas de café, observou maior atividade dessa enzima aos 11 dias após aplicação.

Plantas de cafeeiro tratadas com NEFID, sem inoculação de patógeno, apresentaram picos de atividade de peroxidase aos 7, 8 e 9 DAP, em relação à testemunha sem inoculação. Para as plantas inoculadas com *H. vastatrix*, a maior atividade enzimática, em relação à testemunha inoculada, ocorreu aos 9 DAP. Posteriormente aos 9 dias da pulverização, ocorreu decréscimo da atividade, nos tratamentos com e sem inoculação, até os 14 DAP (Gráfico 1B). Para a AACPAPOX, no intervalo após a inoculação, observou-se que o tratamento com NEFID, sem inoculação, proporcionou aumento da (Gráfico 4A). Amaral (2008) observou que plantas de cafeeiro tratadas com NEFID e inoculadas com *C. coffeicola* apresentaram pico de atividade de peroxidase aos 11 dias após aplicação do tratamento. Medeiros et al. (2009) observaram que plantas de

tomate tratadas com NEFID apresentaram atividade de peroxidase superior à testemunha em todos os tempos de coleta.

O tratamento com fosfito de manganês em plantas de cafeeiro, sem inoculação de *H. vastatrix*, proporcionou maior atividade desta enzima 1, 2, 7 e 8 DAP em relação à testemunha não inoculada (Gráfico 1C). Ocorreu, também, decréscimo na atividade dessa enzima até os 14 DAP retornando ao nível das testemunhas. Após inoculação do patógeno, o pico da atividade enzimática foi aos 9 DAP, havendo, também, um decréscimo até os 14 DAP (Gráfico 1C). Toyota (2008) observou que mudas de cafeeiro tratadas com fosfito de cobre apresentaram o máximo de atividade de peroxidase aos 11 dias após aplicação. Segundo Nojosa (2003), a atividade de peroxidase em mudas de cafeeiro tratadas com fosfito de potássio, isoladamente e inoculadas com *H. vastatrix*, apresentaram atividade superior às testemunhas absoluta e inoculada. Porém, Ribeiro Júnior et al. (2006) observaram que o fosfito de potássio não apresentou efeito sobre a atividade dessa enzima em mudas de cacauzeiro contra *Verticillium dahliae*, demonstrando que a ativação desta enzima por fosfito depende do genótipo estudado.

A atividade de peroxidase em plantas tratadas com ASM, inoculadas ou não com *H. vastatrix*, foi superior em relação à testemunha em quase todos os tempos de coleta. Plantas tratadas com ASM, sem inoculação, apresentaram pico da atividade dessa enzima aos 7 DAP, enquanto que plantas tratadas com ASM e inoculadas com patógeno, apresentaram uma maior atividade de peroxidase aos 8, 9 e 10 DAP em relação à testemunha com inoculação (Gráfico 1D). Na análise da AACPAPOX, após a inoculação, observou-se que o tratamento com ASM, inoculado ou não com *H. vastatrix*, proporcionou AACPAPOX superiores à da testemunha inoculada e não inoculada (Gráfico 4A). Ribeiro Júnior (2008) observou que a atividade de POX em mudas de cafeeiro tratadas com ASM aumentou após o período de 7 DAP e a maior atividade dessa enzima ocorreu

aos 11 DAP, em plantas inoculadas e não inoculadas com *C. coffeicola*. No patossistema tomateiro x *Xanthomonas vesicatoria*, Cavalcanti et al. (2006) observaram maior atividade de peroxidase em plantas tratadas com ASM, inoculadas e não inoculadas, aos nove dias após pulverização.

A aplicação do fungicida ciproconazol + azoxistrobina em mudas de café não inoculadas proporcionou maior atividade de peroxidase aos 1 e 2 DAP. A partir desta avaliação não foi constatado aumento da atividade desta enzima em relação às testemunhas (Gráfico 1E). Contudo, Zhang et al. (2010) observaram que plantas de trigo tratadas com azoxistrobina e tebuconazole apresentaram atividade de peroxidase superior à testemunha.

As peroxidases de plantas participam de diversos processos fisiológicos, dentre eles a formação de lignina e são, frequentemente, utilizadas como marcadores enzimáticos para os estudos da resistência sistêmica adquirida (RASMUSSEN; DUNFORD; WELINDER, 1995). A atividade desta enzima é, frequentemente, aumentada em resposta aos estresses, ao ataque de patógenos e aos tratamentos com indutores, sendo a proteção celular contra reações oxidativas, também, uma das suas principais funções (ANTEROLA; LEWIS, 2002).

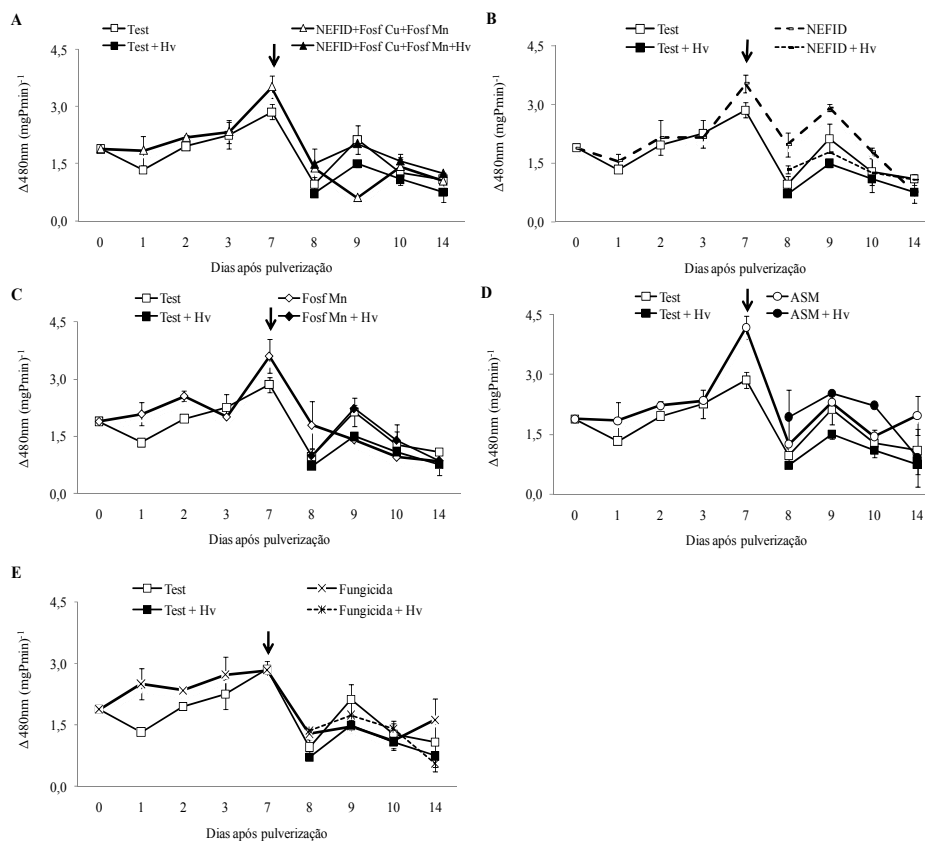


Gráfico 1 Atividade de peroxidase de guaiacol em folhas de mudas de café, após tratamentos com: NEFID + Fosf Cu + Fosf Mn – extrato de folha de café + fosfito de cobre + fosfito de manganês (A), NEFID - extrato de folha de café (B), Fosf Mn - fosfito de manganês (C), ASM – acibenzolar-S-metil (D) e fungicida – ciproconazol + azoxistrobina (E), comparados com a testemunha. Setas indicam inoculação com *H. vastatrix* (Hv), 7 dias após pulverização. Barras indicam desvio padrão da média

3.2 Quitinase (CHI; EC 3.2.1.14)

A pulverização com a associação NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês e o NEFID isoladamente não proporcionou aumento na atividade de quitinase, tanto em mudas de cafeeiro inoculadas e não inoculadas com *H. vastatrix* (Gráfico 2A e B). Toyota (2008), ao estudar a associação de extrato de folha de café com ASM em mudas de cafeeiro, observou aumento da atividade dessa enzima em tratamento com e sem inoculação com *C. coffeicola*, em relação à testemunha inoculada e absoluta. Amaral (2008) observou que plantas de cafeeiro pulverizadas com NEFID apresentaram maior atividade dessa enzima dos 14 aos 21 dias após pulverização. Esses dados não puderam ser confirmados no presente trabalho em função do intervalo amostrado. Porém, Medeiros et al. (2009) observaram, em plantas de tomate tratadas com NEFID, maior incremento na atividade de quitinase 1 dia após pulverização.

O tratamento com fosfito de manganês, sem inoculação com *H. vastatrix*, apresentou picos de atividade de quitinase aos 3 e 10 dias após pulverização e no tratamento com inoculação, o pico da atividade enzimática ocorreu aos 9 DAP (Gráfico 2C). Avaliando-se a atividade de quitinase de forma acumulada, utilizando-se a área abaixo da curva de progresso da atividade de quitinase (AACPACHI), foi verificado efeito significativo dos tratamentos com fosfito de manganês e ASM, antes da inoculação, diferindo-se dos demais tratamentos e da testemunha (Gráfico 4B). Toyota (2008) observou que mudas de cafeeiro pulverizadas com fosfito de cobre apresentaram pico da atividade dessa enzima aos 11 DAP. Também trabalhando com cafeeiro, Ribeiro Júnior (2008), comparou a atividade de quitinase em plantas tratadas com fosfito de potássio, de manganês e ASM e observou aumento na atividade de forma semelhante para esses tratamentos, tanto em plantas inoculadas como não inoculadas com *C. coffeicola*.

A aplicação de ASM em mudas de cafeeiro, sem inoculação de *H. vastatrix*, proporcionou picos de aumento na atividade de quitinase aos 3, 8 e 9 dias após pulverização, em relação à testemunha. Nesse tratamento, com inoculação do patógeno, maior atividade de quitinase ocorreu aos 9 DAP (Gráfico 2D). Guzzo et al. (2004), em trabalho com cafeeiro, observaram incremento na atividade de quitinase 1 dia após a aplicação foliar com ASM, a qual manteve-se alta até 35 dias após aplicação. Boava et al. (2010) observaram, em clones de eucalipto previamente tratados com ASM, maior incremento na atividade de quitinase aos 3 dias após inoculação com *Puccinia psidii*.

Plantas de cafeeiro tratadas com fungicida ciproconazol + azoxistrobina, sem inoculação, apresentaram pico da atividade de quitinase aos 9 e 10 DAP, enquanto que em plantas inoculadas, ocorreu maior incremento na atividade enzimática aos 9 DAP (Gráfico 2E). Petit et al. (2010) observaram aumento na atividade dessa enzima após a aplicação do fungicida fenhexamida em bagas de videira.

No período após a inoculação (7 DAP), não foi verificado efeito significativo dos tratamentos quanto ao acúmulo da atividade de quitinase (Gráfico 4B).

A quitinase é uma enzima relacionada à proteção de plantas a patógenos em diversos patossistemas (PIETERSE; TON; LOON, 2001). Esta enzima apresenta ação direta contra patógenos, degradando a parede celular, com o objetivo de impedir o estabelecimento do patógeno na planta (OKINAKA et al., 1995).

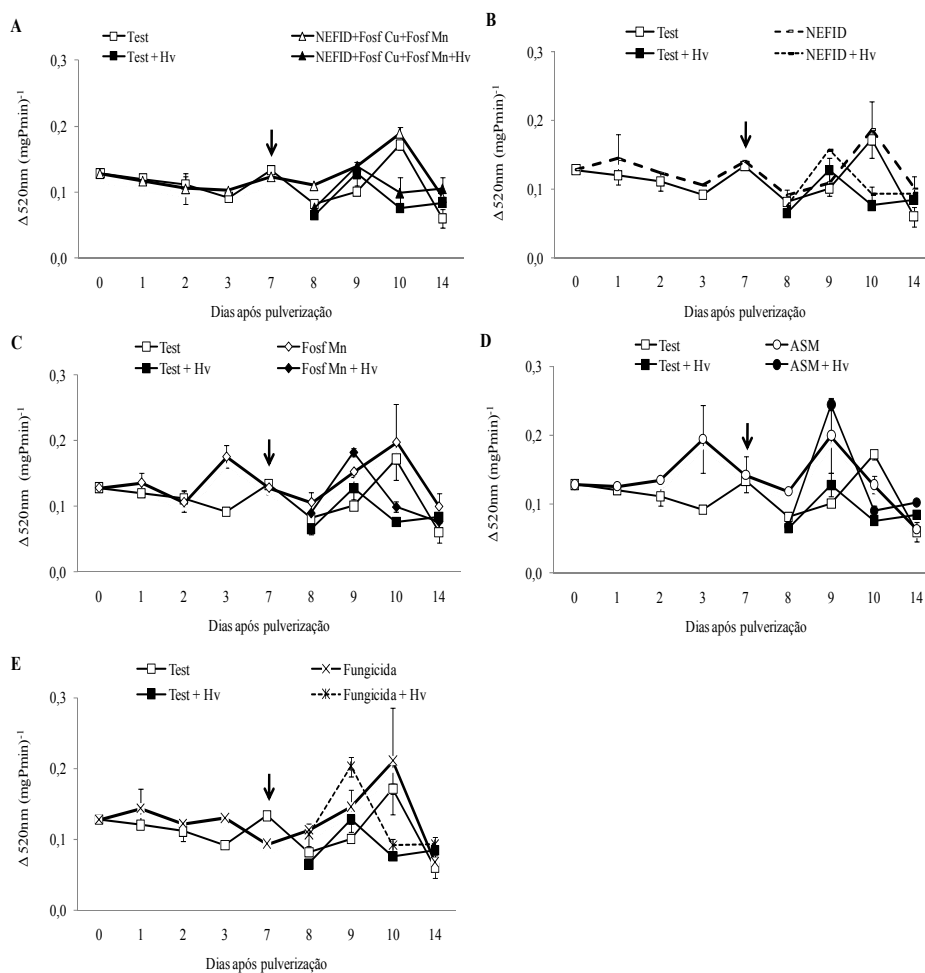


Gráfico 2 Atividade de quitinase em folhas de mudas de cafeeiro, após tratamentos com: NEFID + Fosf Cu + Fosf Mn – extrato de folha de café + fosfito de cobre + fosfito de manganês (A), NEFID - extrato de folha de café (B), Fosf Mn - fosfito de manganês (C), ASM – acibenzolar-S-metil (D) e fungicida – ciproconazol + azoxistrobina (E), comparados com a testemunha. Setas indicam inoculação com *H. vastatrix* (Hv), 7 dias após pulverização. Barras indicam desvio padrão da média

3.3 β -1,3-glucanase (GLU; EC 3.2.1.6)

A associação de NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês proporcionou maior atividade de β -1,3-glucanase aos 7 e 9 dias após pulverização em plantas de cafeeiro não inoculadas com *H. vastatrix*. Após a inoculação com patógeno, o maior incremento na atividade enzimática ocorreu aos 10 DAP (Gráfico 3A). Analisando-se a atividade de β -1,3-glucanase de forma acumulada, utilizando-se a área abaixo da curva de progresso da atividade de β -1,3-glucanase (AACPAGLU), foi verificado efeito significativo deste tratamento sem inoculação do patógeno, diferindo-se da testemunha (Gráfico 4C). Corroborando com estes resultados, Toyota (2008), ao estudar extrato de folha de café associado com ASM, em plantas de cafeeiro, observou aumento da atividade dessa enzima aos 11 dias após pulverização.

Plantas de cafeeiro pulverizadas com NEFID, sem inoculação, apresentaram maior incremento da atividade de β -1,3-glucanase aos 10 dias após pulverização, em relação às plantas pulverizadas com água, sem inoculação. Esse tratamento após a inoculação apresentou aumento da atividade enzimática aos 8 e 9 DAP (Gráfico 3B) Analisando a AACPAGLU no período após inoculação com *H. vastatrix*, verificou-se maior atividade desta enzima em plantas pulverizadas com NEFID, sem inoculação, comparadas com a testemunha (Gráfico 4C). Amaral (2008) observou, em plantas de cafeeiro tratadas com NEFID e inoculadas com *C. coffeicola*, aumento da atividade de β -1,3-glucanase até 21 dias após a pulverização. Em outra cultura, Medeiros et al. (2009) observaram em plantas de tomate tratadas com NEFID, maior incremento na atividade enzimática a partir do primeiro dia após pulverização até o último dia analisado, que corresponde ao quinto dia após pulverização.

O fosfito de manganês induziu maior atividade de β -1,3-glucanase aos 3, 8, 9 e 10 dias após pulverização em plantas de cafeeiro não inoculadas com o

patógeno. A partir da inoculação com *H. vastatrix*, a atividade dessa enzima ocorreu aos 8 e 9 DAP, sendo que a partir de 10 DAP a atividade enzimática foi igual a da testemunha inoculada (Gráfico 3C). Analisando-se a atividade de β -1,3-glucanase de forma acumulada, utilizando-se a AACPAGLU, assim como para a atividade de quitinase, foi verificado efeito significativo dos tratamentos com fosfíto de manganês e ASM, antes da inoculação, diferindo-se dos demais tratamentos e da testemunha. Após a inoculação com *H. vastatrix*, o tratamento com fosfíto de manganês, sem inoculação, proporcionou uma maior AACPAGLU quando comparado com a testemunha. (Gráfico 4C). Também trabalhando com cafeeiro, Ribeiro Júnior (2008) observou que fosfíto de manganês em plantas inoculadas com *C. coffeicola*, proporcionou atividade de β -1,3-glucanase semelhante à da testemunha inoculada. Lobato et al. (2008) observaram a expressão gênica de β -1,3-glucanase em plantas de batata após tratamento com fosfíto de potássio e inoculação com *Phytophthora infestans*.

Em plantas tratadas com ASM verificou-se maior atividade de β -1,3-glucanase aos 3 e 9 dias após pulverização. O tratamento ASM com inoculação do patógeno apresentou pico aos 9 DAP (Gráfico 3D). Em trabalhos com cafeeiro, Ribeiro Júnior (2008) observou picos da atividade dessa enzima aos 3 e 11 dias após tratamento com ASM e Guzzo, Harakava e Tsai (2009) observaram maior expressão gênica de β -1,3-glucanase 72 horas após tratamento com ASM e 48 horas após inoculação com *H. vastatrix*.

Plantas de cafeeiro tratadas com fungicida ciproconazol + azoxistrobina, sem inoculação, apresentaram maior incremento na atividade de β -1,3-glucanase no primeiro e décimo dia após pulverização. Em plantas inoculadas, a maior atividade dessa enzima ocorreu aos 14 DAP (Gráfico 3E). Avaliando-se o período após a inoculação, plantas tratadas com o fungicida, sem inoculação, apresentaram maior AACPAGLU em relação à testemunha (Gráfico 4C). Pasquer et al. (2005) monitoraram a expressão gênica em trigo, por técnica de

microarranjo, e observaram que após tratamento com azoxistrobina ocorreu uma maior expressão de genes relacionados à defesa.

As β -1,3-glucanases são enzimas que hidrolisam polímeros de β -1,3-glucana, compostos que, juntamente com a quitina, conferem resistência à parede celular dos fungos (CORNELISSEN; MELCHERS, 1993).

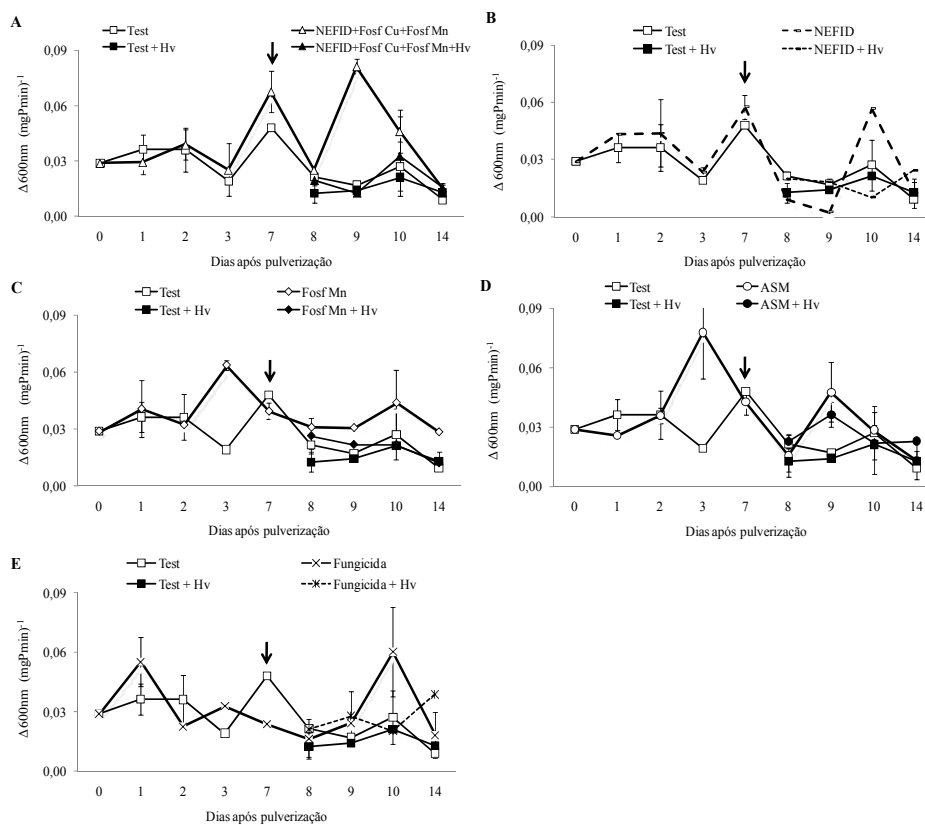


Gráfico 3 Atividade de β -1,3-glucanase em folhas de mudas de caféiro, após tratamentos com: NEFID + Fosf Cu + Fosf Mn – extrato de folha de café + fosfito de cobre + fosfito de manganês (A), NEFID - extrato de folha de café (B), Fosf Mn - fosfito de manganês (C), ASM – acibenzolar-S-metil (D) e fungicida – ciproconazol + azoxistrobina (E), comparados com a testemunha. Setas indicam inoculação com *H. vastatrix* (Hv), 7 dias após pulverização. Barras indicam desvio padrão da média

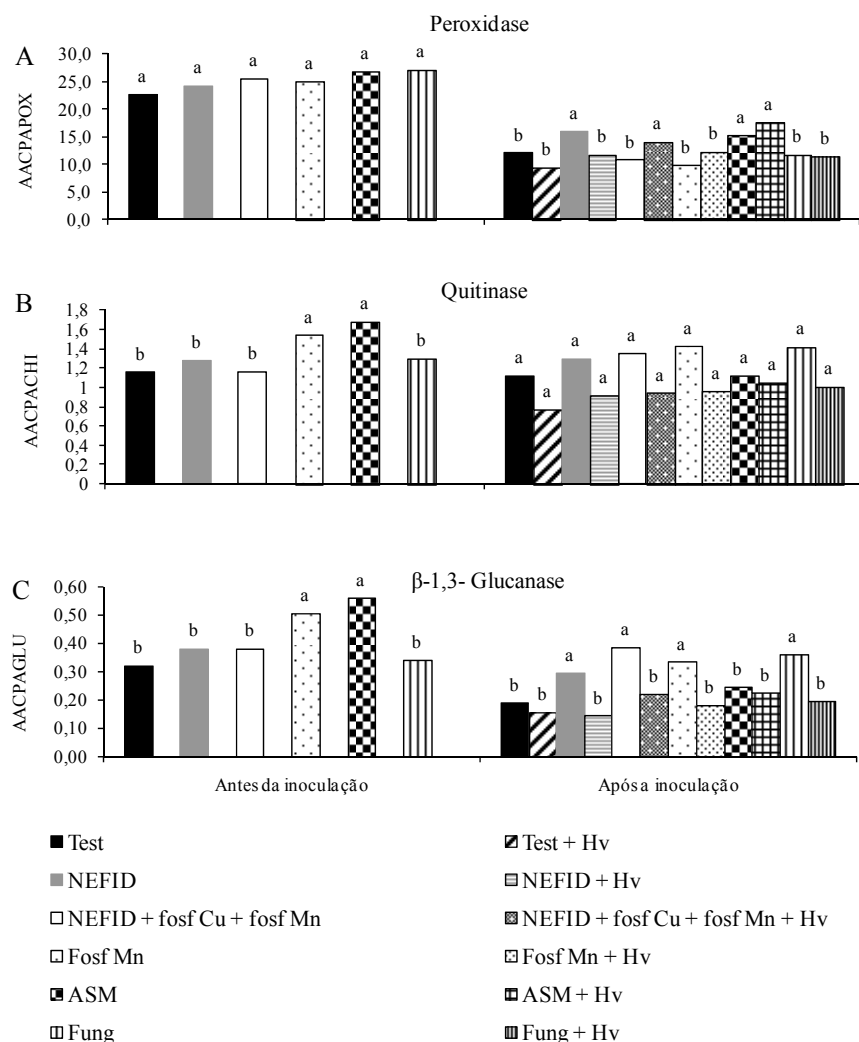


Gráfico 4 Área abaixo da curva de progresso da atividade de peroxidase de guaiacol (AACPAPOX) (A), quitinase (AACPACHI) (B) e de β -1,3-glucanase (AACPAGLU) (C) em folhas de mudas de cafeeiro, após tratamentos com: NEFID + Fosf Cu + Fosf Mn – extrato de folha de café + fosfíto de cobre + fosfíto de manganês, NEFID - extrato de folha de café, Fosf Mn - fosfíto de manganês, ASM – acibenzolar-S-metil e fungicida – ciproconazol + azoxistrobina, comparados com a testemunha. “Hv” indica inoculação com *Hemileia vastatrix* 7 dias após pulverização. Médias com mesma letra não diferem, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$)

3.4 Lignina solúvel e fenóis totais

A lignina é uma macromolécula fenólica, altamente complexa, sendo o segundo composto mais abundante nos tecidos vegetais. Este composto, geralmente, é encontrado entre a parede celular e as células adjacentes dos tecidos vegetais. Estruturas lignificadas podem interromper o desenvolvimento fúngico em tecidos vegetais e atuar como barreira com resistência à penetração ou ao desenvolvimento destes organismos (AGRIOS, 2005; HAMMERSCHMIDT; KUC, 1982; MISAGHI, 1982; NICHOLSON; WOOD, 2001; PASCHOLATI; LEITE, 1995; RIDE, 1975).

Os produtos testados não proporcionaram diferença significativa para o teor de lignina solúvel em ácido em nenhuma das datas onde foram realizadas as coletas de tecidos foliares (Tabela 1). Alves et al. (2006), semelhantemente, não observaram diferenças entre teores de lignina em cafeeiros inoculados e não inoculados, tratados com ASM. Em outro estudo, Ribeiro Júnior et al. (2006) observaram que a pulverização de fosfito de potássio e ASM não aumentou os teores de lignina em plantas de cacau inoculadas e não inoculadas com *Verticillium dahliae*.

Tabela 1 Efeito dos tratamentos nos teores foliares de lignina solúvel em ácido tioglicólico (micrograma de lignina por miligrama de massa seca) em mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo

Tratamentos ^{1,3}	Dias após pulverização	
	7	14
NEFID + Fosf Cu + Fosf Mn	122,45 a	138,43 a
NEFID + Fosf Cu + Fosf Mn + Hv ²		147,39 a
NEFID	119,84 a	127,07 a
NEFID + Hv		126,99 a
Fosfíto Mn	114,76 a	126,99 a
Fosfíto Mn + Hv		125,84 a
ASM	124,54 a	110,22 a
ASM + Hv		118,27 a
Fungicida	114,67 a	134,34 a
Fungicida + Hv		113,33 a
Testemunha	123,92 a	155,57 a
Testemunha + Hv		116,62 a
CV ⁴	11,63	14,54

¹NEFID + Fosf Cu + Fosf Mn – extrato de folha de café + fosfíto de cobre + fosfíto de manganês, NEFID - extrato de folha de café, Fosf Mn - fosfíto de manganês, ASM – acibenzolar-S-metil e fungicida – ciproconazol + azoxistrobina, comparados com a testemunha

²A inoculação com *H. vastatrix* (Hv) ocorreu aos 7 dias após pulverização

³Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P≤0,05)

⁴Coefficiente de variação (CV)

Para os fenóis solúveis totais observou-se que os tratamentos com ASM e fungicida proporcionaram maiores teores destes compostos aos 7 DAP. Aos 14 DAP todos os tratamentos que foram inoculados com *H. vastatrix*, com exceção da testemunha, apresentaram maior teor de fenóis solúveis, diferindo-se dos demais tratamentos (Tabela 2). Toyota (2008) observou que, em folhas de mudas de café, inoculadas e não inoculadas com *C. coffeicola*, e pulverizadas com ASM e fosfíto de cobre não ocorreram diferenças no acúmulo de fenóis totais, em relação à testemunha inoculada e absoluta. Porém, plantas tratadas com a associação de extrato de folha de café com ASM, inoculadas e não

inoculadas, apresentaram maior acúmulo de fenóis aos 14 dias após a pulverização.

Compostos fenólicos são conhecidos como substâncias fungitóxicas e, em alta concentração nas células, podem ser oxidados a quinonas, constituindo-se em componentes de defesa do vegetal contra fatores externos (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992; PASCHOLATI; LEITE, 1994).

Tabela 2 Efeito dos tratamentos nos teores foliares de fenóis solúveis totais (equivalente a micrograma de ácido clorogênico por miligrama de massa seca) em mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo

Tratamentos ^{1,3}	Dias após pulverização	
	7	14
NEFID + Fosf Cu + Fosf Mn	2,26 b	2,05 b
NEFID + Fosf Cu + Fosf Mn + Hv ²		2,47 a
NEFID	2,34 b	1,96 b
NEFID + Hv		2,92 a
Fosfito Mn	2,53 b	1,81 b
Fosfito Mn + Hv		2,74 a
ASM	3,09 a	2,32 b
ASM + Hv		2,78 a
Fungicida	3,18 a	2,00 b
Fungicida + Hv		2,93 a
Testemunha	2,47 b	1,60 b
Testemunha + Hv		2,03 b
CV ⁴	12,67	18,18

¹NEFID + Fosf Cu + Fosf Mn – extrato de folha de café + fosfito de cobre + fosfito de manganês, NEFID - extrato de folha de café, Fosf Mn - fosfito de manganês, ASM – acibenzolar-S-metil e fungicida – ciproconazol + azoxistrobina, comparados com a testemunha

²A inoculação com *H. vastatrix* (Hv) foi 7 dias após pulverização

³Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$)

⁴Coefficiente de variação (CV)

4 CONCLUSÃO

Folhas de cafeeiro tratadas com NEFID, sem inoculação com *H. vastatrix*, com associação de NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês, com inoculação e com ASM, inoculadas e não inoculadas apresentam aumento na atividade de peroxidase.

Maior atividade de quitinase foi observada em folhas de cafeeiro, não inoculadas com *H. Vastatrix*, tratadas com fosfito de manganês e ASM.

A associação de NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês, NEFID, fosfito de manganês e fungicida ciproconazol + azoxistrobina promovem aumento da atividade de β -1,3-glucanase em folhas de cafeeiro, não inoculadas com o patógeno.

Todos os tratamentos inoculados, com exceção da testemunha, apresentaram maiores teores de fenóis solúveis totais.

Os tratamentos utilizados não afetaram os teores de lignina.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. New York: Academic, 2005. 922 p.
- ALVES, E. et al. Inibição da germinação de conídios de *Cercospora coffeicola* sob diferentes doses do extrato de casca de café e óleo essencial de tomilho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 307-308, ago. 2006. Suplemento.
- AMARAL, D. R. **Formulações de extratos vegetais e micronutrientes na indução de resistência em mudas de cafeeiro contra *Cercospora coffeicola***. 2008. 92 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- ANTEROLA, A. M.; LEWIS, N. G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. **Phytochemistry**, Oxford, v. 61, n. 3, p. 221-294, Oct. 2002.
- BOAVA, L. P. et al. Chitinase and peroxidase activity in different stages of eucalypt leaves after inoculation with *Puccinia psidii* and acibenzolar-S-metil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 2, p. 124-128, Mar./Apr. 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.
- CAVALCANTI, F. R. et al. Activities of antioxidant enzymes and photosynthetic responses in tomato pre-treated by plant activators and inoculated by *Xanthomonas vesicatoria*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 68, n. 4/6, p. 198-208, Apr./June 2006.
- CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas contra patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 263 p.
- CORNELISSEN, B. J. C.; MELCHERS, L. S. Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 3, p. 709-712, Mar. 1993.

DATNOFF, L. E.; SEEBOLD, K. W.; CORREA, F. J. Use of silicon for integrated disease management: reducing fungicide applications and enhancing host plant resistance. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDORFER, G. H. (Ed.). **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Elsevier Science, 2001. p. 171-184.

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

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

GARCIA, P. C. et al. The role of fungicides in the physiology of higher plants: implications for defense responses. **Botanical Review**, Bronx, v. 69, n. 2, p. 162-172, Apr./June 2003.

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

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

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

LOBATO, M. C. et al. Phosphite compounds reduce disease severity in potato seed tubers and foliage. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 122, n. 3, p. 349-358, Nov. 2008.

LOON, L. C. van. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 9, p. 753-765, Dec. 1997.

LYON, G. D.; NEWTON, A. C. Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies? **Plant Pathology**, Bethesda, v. 46, n. 5, p. 636-641, Oct. 1997.

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

MISAGHI, I. J. **Physiology and biochemistry of plant-pathogen interactions**. Tucson: University of Arizona, 1982. 287 p.

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

NICHOLSON, R. L.; WOOD, K. V. Phytoalexins and secondary products, where are they and how can we measure them? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, n. 2, p. 63-69, Aug. 2001.

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

OKINAKA, Y. et al. A structural model for the mechanisms of elicitor release from fungal cell walls by plant [beta]-1,3-endoglucanase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, n. 3, p. 839-845, Nov. 1995.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 417-453.

PASQUER, F. et al. Specific pattern of changes in wheat gene expression after treatment with three antifungal compounds. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 57, n. 5, p. 693-707, Mar. 2005.

PETIT, A. N. et al. Determinants of fenhexamid effectiveness against grey mould on grapevine: respective role of spray timing, fungicide resistance and plant defences. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 10, p. 1162-1167, Oct. 2010.

PIETERSE, C. M. J.; TON, J.; LOON, L. C. van. Cross-talk between plant defense signaling pathways: boost or burden? **AgBiotechNet**, Wallingford, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2001.

RASMUSSEN, C. B.; DUNFORD, H. B.; WELINDER, K. G. Rate enhancement of compound I formation of barley peroxidase by ferulic acid, caffeic acid, and coniferyl alcohol. **Biochemistry**, Oxford, v. 34, n. 12, p. 4022-4029, Mar. 1995.

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

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

RIBEIRO JÚNIOR, P. M. et al. Fosfito de potássio na indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb., em mudas de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 629-636, jul./ago. 2006.

RIDE, J. P. Lignification in wounded wheat leaves in response to fungi and its possible role in resistance. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 5, n. 2, p. 125-128, 1975.

SALUSTIANO, M. E. et al. Variabilidade em dez populações de *Hemileia vastatrix* em relação à germinação e ao comprimento do tubo germinativo em quatro temperaturas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1651-1656, set./out. 2008.

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

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

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Mário Lúcio Vilela de Resende et al. **Composição para indução de resistência em plantas, a base de extratos de casca de frutos de café.** BR n. PI 0705598-6, 19 abr. 2007.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 13, n. 1, p. 43-50, Mar. 1991.

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

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

ZHANG, Y. J. et al. Effects of fungicides JS399-19, azoxystrobin, tebuconazole, and carbendazim on the physiological and biochemical indices and grain yield of winter wheat. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 98, n. 2, p. 151-157, Oct. 2010.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os gastos com pesticidas no manejo de uma lavoura cafeeira são altos, os quais oneram os custos de produção, além de resultarem em diversas alterações ecológicas, contaminação do solo e água e a seleção de pragas e patógenos resistentes. Cada vez mais a sociedade tem se mostrado preocupada com o meio ambiente, exigindo, assim, um modelo de sustentabilidade no qual se deve usar o mínimo de pesticidas possível e produtos de menor toxicidade para combater pragas e doenças.

A indução de resistência em plantas contra fitopatógenos representa um método alternativo no controle de doenças, que pode ser obtido por meio da utilização de indutores de resistência comerciais, extratos vegetais e fosfitos. Também se busca inovar por meio de combinações de extratos vegetais com produtos comerciais, como os fosfitos, a fim de promover maior eficiência pela combinação do modo de ação desses produtos. Sendo assim, novas formulações estão sendo desenvolvidas e testadas em casa de vegetação e campo (Fitoforce Plus[®] e Fitoforce Full[®]).

No presente estudo, a associação de NEFID + fosfíto de cobre + fosfíto de manganês, NEFID e fosfíto de manganês foram eficientes no controle da ferrugem em mudas de cafeeiro, além de proporcionarem aumento nas atividades de proteínas relacionadas à patogênese (peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase), sendo informações de grande valia para inferir que são capazes de induzir resistência em plantas de café.

Apesar de resultados promissores, faz-se necessária a realização de experimentos em campo, principalmente com a associação de indutores de resistência. Podem-se testar novas misturas entre extratos vegetais e outros fosfitos e micronutrientes. Para os estudos da resposta de defesa, torna-se necessário ampliar o número de enzimas estudadas, como, por exemplo, a

fenilalanina amônia-liase, bem como o estudo da expressão de genes que codificam para a síntese dessa e de outras enzimas de defesa.