



CLÁUDIO OGOSHI

**FOSFITO DE POTÁSSIO NO CONTROLE DE
Colletotrichum gloeosporioides, ISOLADO DE
PLANTAS DE CAFEIEIRO COM SINTOMAS DE
MANCHA MANTEIGOSA**

**LAVRAS-MG
2011**

CLÁUDIO OGOSHI

FOSFITO DE POTÁSSIO NO CONTROLE DE *Colletotrichum gloeosporioides*, ISOLADO DE PLANTAS DE CAFEIRO COM SINTOMAS DE MANCHA MANTEIGOSA

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

Dr. Mario Sobral de Abreu

**LAVRAS-MG
2011**

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

Ogoshi, Cláudio.

Fosfito de potássio no controle de *Colletotrichum
gloeosporioides*, isolado de plantas de cafeeiro com sintomas de
mancha manteigosa / Cláudio Ogoshi. – Lavras : UFLA, 2011.
90 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.
Orientador: Mário Sobral de Abreu.
Bibliografia.

1. *Coffea arabica*. 2. Indução de resistência. 3. Microscopia
eletrônica. 4. Fungos fitopatogênicos. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 632.44

CLÁUDIO OGOSHI

FOSFITO DE POTÁSSIO NO CONTROLE DE *Colletotrichum gloeosporioides*, ISOLADO DE PLANTAS DE CAFEIRO COM SINTOMAS DE MANCHA MANTEIGOSA

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.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2011.

Dr. Eduardo Alves UFLA

Dra. Flávia Maria Avelar Gonçalves UFLA

Dr. Mario Sobral de Abreu
Orientador

LAVRAS - MG

2011

Aos meus pais Cláudio Moacir Ogoshi e Maria Neide da Silva Ogoshi pela luta
pra que eu pudesse realizar este sonho e, os quais me orgulham muito.

À minha irmã Iêda e sobrinha Rafaella pelo amor e carinho.

À minha noiva, Rosana Claudio Silva, pelo amor e companheirismo durante
estes anos.

Aos meus primos, tios e avós que sempre me incentivavam aos estudos.

Ao meu tio Flávio Carlos Ogoshi (*in memoriam*) pelos conselhos e ajuda durante
minha formação como Eng^o Agrônomo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me ajudado a entender que os estudos seria a forma mais adequada pra eu seguir meu caminho e retribuir os esforços que meus pais fizeram por mim.

Ao meu orientador, Dr. Mario Sobral de Abreu pelas oportunidades e ensinamentos oferecidos desde minha graduação.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo incentivo à pesquisa por meio da concessão das bolsas de estudos.

Aos professores, Dra. Flávia Maria Avelar Gonçalves e Dr. Eduardo Alves, pela disposição e colaboração para o melhoramento do meu trabalho.

Aos demais Professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, pelos ensinamentos durante o mestrado.

Ao pesquisador Dr. Pedro Martins Ribeiro Júnior, pela imensa contribuição e infinita paciência que tanto me auxiliaram na conclusão deste trabalho.

Ao Bruno Marque Silva e Fabiano José Perina pela grande ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos de Laboratório Helon, Fernanda, Cecília, Felipe e Marcelo.

A todos os meus amigos dos laboratórios de Microscopia Eletrônica, Clínica Epidemiológica, Fisiologia do Parasitismo, Bacteriologia, Virologia e Nematologia pela grande colaboração.

Ao Núcleo de Estudos em Fitopatologia pela oportunidade de contribuir com o grupo e pela realização de grandes eventos na área de fitopatologia.

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar o efeito do fosfito de potássio na germinação, formação de apressórios e no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*; verificar o controle *in vivo* do patógeno; estudar os mecanismos envolvidos na resposta de defesa em mudas de cafeeiro e analisar os eventos de germinação e penetração do patógeno por meio da microscopia eletrônica de varredura. Foram realizados quatro experimentos. Os tratamentos utilizados foram: fosfito de potássio nas doses 1,25 mL L⁻¹; 2,5 mL L⁻¹; 5,0 mL L⁻¹ e 10,0 mL L⁻¹; Acibenzolar-S-Metil 0,1g L⁻¹ e água destilada esterilizada que foi a testemunha padrão. As doses 5,0 mL L⁻¹ e 10,0 mL L⁻¹ de fosfito de potássio se destacaram na redução da porcentagem de conídios germinados, na inibição da formação de apressórios e na redução do índice de velocidade do crescimento micelial. O fosfito de potássio na dose 10,0 mL L⁻¹ reduziu a área abaixo da curva de progresso da severidade da doença em 62,5% destacando-se dos demais tratamentos. Esse mesmo tratamento sem inoculação aumentou a atividade da peroxidase um dia depois da pulverização, da polifenoloxidase seis dias após e da quitinase três dias. Já quando inoculado, não induziu aumento da atividade da peroxidase, mas aos 13 dias após pulverização houve um pico de formação das enzimas polifenoloxidase e da quitinase. Todos os tratamentos não induziram aumento da formação da β -1,3 glucanase. A germinação dos conídios, observados por meio da microscopia eletrônica de varredura, iniciou-se quatro horas após a inoculação do patógeno com máximo de formação 12 horas após, onde se iniciou a formação dos apressórios. A penetração ocorreu na maioria das vezes mecanicamente e com 16 horas após inoculação, constataram-se hifas do patógeno dentro dos tecidos da planta. Este trabalho mostrou que o fosfito de potássio é um produto promissor no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em cafeeiro, mas para que o mesmo venha se tornar uma inovação tecnológica para os produtores são necessários mais estudos em campo.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. Indução de resistência. Antracnose. Fosfitos.

ABSTRACT

The present study was aimed to evaluate the effect of potassium phosphite on germination, appressorium formation and mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides*; check the control of the pathogen in vivo, study the mechanisms involved in the defense response in coffee seedlings and analyze the events of germination and penetration of the pathogen by scanning electron microscopy. Four experiments were conducted. The treatments were: doses of potassium phosphite 1,25 mL L⁻¹; 2,5 mL L⁻¹; 5,0 mL L⁻¹ and 10,0 mL L⁻¹; Acibenzolar-S-Metil 0,1g L⁻¹ and water sterile. The doses 5.0 mL L⁻¹ and 10.0 mL L⁻¹ of potassium phosphite stood out in reducing the percentage of germinated conidia, inhibition of appressorium formation and in reducing the rate of speed of mycelial growth of pathogen. The dose of potassium phosphite 10.0 mL L⁻¹ reduced the area under the curve of progress of disease severity by 62.5% standing out from the other treatments. This treatment without inoculation increased peroxidase activity 1 day after spraying, 6 days after spraying of polyphenoloxidase and 3 days after spraying of chitinase. When inoculated, did not induce increase of peroxidase activity, but at 13 days after spraying there was a peak of formation of the enzymes polyphenoloxidase and chitinase. All treatments failed to induce increased β -1, 3 glucanase activity. Conidial germination, observed by scanning electron microscopy, it started four hours after inoculation of the pathogen, with a maximum formation after 12 hours, where initiated the formation of appressoria. Penetration occurred most often mechanically and 16 hours after inoculation, was observed hyphae of the pathogen within the plant tissues. This study showed that potassium phosphite is a promising product in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* in coffee, but for this product will become a technological innovation for the farmers need more field studies.

Keywords: *Coffea arabica*. Induction of resistance. Anthracnose. Phosphites.

SUMÁRIO

	CAPITULO 1 Introdução geral.....	10
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Mancha manteigosa	13
2.1.1	Sintomas e sinais da mancha manteigosa	14
2.1.2	Transmissibilidade de <i>C.gloeosporioides</i>, agente da mancha manteigosa	14
2.2	<i>Colletotrichum</i> spp. em cafeeiro	15
2.3	Indução de resistência em plantas	16
2.3.1	Fosfitos na indução de resistência em plantas	19
	REFERÊNCIAS	22
	CAPITULO 2 Efeito do fosfito de potássio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> contra <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em cafeeiro.....	27
1	INTRODUÇÃO	30
2	MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1	Obtenção do isolado de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	32
2.2	Efeito direto de fosfito de potássio na germinação e formação de apressórios em esporos de <i>C. gloeosporioides</i>	32
2.3	Efeito do fosfito de potássio e ASM na inibição do crescimento micelial de <i>C. gloeosporioides</i>	33
2.4	Efeito do fosfito de potássio sobre a severidade da mancha manteigosa em mudas de café	34
2.4.1	Obtenção das mudas de café	34
2.4.2	Preparo das mudas para a inoculação	32
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1	Efeito direto do fosfito de potássio na germinação e formação de apressórios em esporos de <i>C. gloeosporioides</i>	39
3.2	Inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> com o fosfito de potássio	41
3.3	Fosfito de potássio no controle de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> agente da mancha manteigosa, <i>in vivo</i>	42
4	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS	47
	CAPITULO 3 Indução de resistência em cafeeiro contra <i>C. gloeosporioides</i> pela aplicação do fosfito de potássio.....	50
1	INTRODUÇÃO	53
2	MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1	Obtenção das mudas	55
2.2	Inoculação	55

2.3	Tratamentos e tempos de coleta.....	56
2.4	Preparo de extratos foliares para a avaliação de proteínas totais e da atividade de peroxidase de guaiacol, quitinase e b-1,3-glucanase.....	57
2.4.1	Determinação de proteínas totais.....	57
2.4.2	Peroxidases de guaiacol.....	57
2.4.3	Polifenoloxidades.....	58
2.4.4	Quitinase (CHI; EC 3.2.1.14).....	58
2.4.5	β -1,3-glucanase (GLU; EC 3.2.1.6).....	59
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
3.1	Atividade de peroxidases.....	60
3.2	Atividade de polifenoloxidase.....	62
3.3	Quitinase e β -1,3-glucanase.....	64
4	CONCLUSÕES.....	69
5	REFERÊNCIAS.....	70
	CAPITULO 4 Ação do fosfito de potássio nos eventos de germinação e penetração de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>: avaliação por meio da microscopia eletrônica de varredura.....	73
1	INTRODUÇÃO.....	76
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	77
2.1	Obtenção do isolado de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e ajuste da suspensão de esporos.....	77
2.2	Aplicação dos produtos.....	77
2.3	Inoculação.....	78
2.4	Coleta das amostras.....	78
2.5	Preparo das amostras para visualização no microscópio eletrônico de varredura (MEV).....	79
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
4	CONCLUSÕES.....	87
	REFERÊNCIAS.....	88
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90

CAPITULO 1

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

A agricultura é de extrema importância para a economia brasileira, onde somente o agronegócio, representa cerca de um terço do PIB e valor semelhante das exportações totais do país.

Nesse cenário, a cafeicultura tem se destacando, pois, o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e, desde sua chegada ao país, em 1727, foi o maior gerador de riquezas e o produto mais importante da história nacional, tornando-se uma das principais atividades agrícolas do país, especialmente pela geração de emprego e renda em municípios interioranos dos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Bahia, Rondônia, Rio de Janeiro entre outros.

O estado de Minas Gerais é responsável por mais da metade da produção nacional de café, com produção estimada de 21,96 milhões de sacas de café arábica (60Kg) na safra 2010/2011, o que representa 50,7% da produção brasileira de café (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2011).

Dentre os principais problemas enfrentados na cultura do café pelos agricultores está o manejo das doenças, com destaque àquelas de enfermidades fúngicas como a ferrugem alaranjada (*Hemileia vastatrix*); antracnoses (*Colletotrichum spp*); cercosporiose (*Cercospora coffeicola*); mancha de phoma (*Phoma spp.*), entre outras.

No Brasil as lavouras de café vêm sendo acometidas por doenças causadas por *Colletotrichum spp.*, como por exemplo, as antracnoses em folhas e frutos, mancha manteigosa e a seca de ponteiros. Dentre esses problemas, um dos mais graves é a mancha manteigosa, porque os cafeeiros doentes têm sua produção totalmente afetada, o que pode ser observado pela morte de

hipocótilos, mumificação e abscisão de folhas e frutos, murcha e seca descendente de ramos plagiotrópicos.

Considerando que a mancha manteigosa é uma doença altamente destrutiva, o controle químico seria uma das práticas mais utilizadas, porém, até o presente momento, não existe nenhum produto químico registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para *Colletotrichum* spp. Além disso, a utilização dos fungicidas, principalmente, os sistêmicos, apresenta algumas restrições, tais como: risco de seleção de populações de patógenos resistentes, riscos ambientais e sociais e o alto custo de aplicação. Em função desses problemas, a utilização dos produtos alternativos no controle de doenças de plantas tem se destacado, principalmente, os indutores de resistência como os sais de fosfito.

Os objetivos desse trabalho foram: Avaliar o efeito do fosfito de potássio na germinação, formação de apressórios e no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*; Verificar a ação do fosfito de potássio na redução da área abaixo da curva de progresso da severidade da doença; Analisar os mecanismos envolvidos na resposta de defesa no patossistema *Colletotrichum*-cafeeiro quando aplicado o fosfito de potássio e Estudar os eventos de germinação e penetração do patógeno por meio da microscopia eletrônica de varredura.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mancha manteigosa

A primeira descrição da mancha manteigosa foi feita na Costa Rica, acreditando ser uma doença de natureza virótica (WELLMAN, 1957). Em 1972 a etiologia da doença foi elucidada como sendo de origem fúngica, cujo patógeno era *Colletotrichum* spp. (VARGAS; GONZALES, 1972). Estes autores iniciaram o estudo da doença, mas como não conseguiram reproduzir os sintomas inoculando o patógeno, sugeriram que, provavelmente, essa doença era condicionada por um caráter genético, o qual refletia na suscetibilidade da planta.

No Brasil, a doença foi descrita primeiramente no Estado de São Paulo (BITANCOURT, 1958) e, posteriormente, foram relatados novos focos em outros estados brasileiros. No Espírito Santo foi detectada a doença em *Coffea canephora* (MANSK; MATIELLO, 1977) e em Minas Gerais, no ano de 1999, foi constatada perda total da produção em uma lavoura no município de Cristais (OROZCO, 2003).

Estudando a caracterização morfológica e a patogenicidade de *Colletotrichum* spp. obtidos de regiões cafeeiras do estado de Minas Gerais, Dorizzotto (1993), identificou o isolado da mancha manteigosa como *Colletotrichum coffeanum* (*Colletotrichum gloeosporioides*), com características morfológicas idênticas as do agente da *Coffee Berry Disease* (CBD). Dias (2002) caracterizou morfológicamente e bioquimicamente os isolados de *Colletotrichum* spp. Provenientes de folhas, ramos e frutos de cafeeiro com sintomas da mancha manteigosa e de seca de ponteiros, estudou os efeitos de diferentes temperaturas no comportamento dos isolados bem como realizou teste de patogenicidade em plântulas, obtidas por cultura de embrião. O autor

verificou que o isolado proveniente da mancha manteigosa foi patogênico em hipocótilos e constatou que o agente causal da mancha manteigosa era *Colletotrichum gloeosporioides*. Este resultado foi reforçado por Orozco (2003), que ainda sugeriu a denominação de *Colletotrichum gloeosporioides* raça mancha manteigosa.

2.1.1 Sintomas e sinais da mancha manteigosa

Inicialmente os sintomas da mancha manteigosa aparecem em folhas novas, com o aparecimento de mancha de cor verde-clara, de aspecto oleoso, menos brilhante que a superfície da folha, medindo de 2 a 10 mm de diâmetro. Em estágios avançados, as manchas apresentam coloração verde-pálida a amarela e bordas irregulares. Por fim, as manchas coalescem, determinando queda prematura das folhas. (MANSK; MATIELLO, 1977; VARGAS; GONZÁLES, 1972; WELLMAN, 1957). Ataques intensos são observados em folhas e ramos novos de plantas adultas, ocorrendo necrose e seca de ramos na parte apical, podendo levar a morte das plantas de forma descendente (FERREIRA et al., 2004).

Em estudos histopatológicos, por meio de microscopia eletrônica de varredura em ramos de cafeeiros com sintomas da mancha manteigosa, observou-se que, nos tecidos doentes, houve intensa colonização dos vasos do xilema e floema. Nestas regiões ocorreu um intenso crescimento de hifas, responsáveis pela murcha e morte de ramos (PEREIRA et al., 2009).

2.1.2 Transmissibilidade de *C. gloeosporioides*, agente da mancha manteigosa

Acredita-se que a principal forma de transmissão de *Colletotrichum gloeosporioides* seja via sementes infectadas (FERREIRA et al., 2010;

OROZCO, 2003), pois, em lavouras de café aparentemente sadias aparecem plantas isoladas ou pequenas reboleiras de plantas com sintomas foliares da mancha manteigosa. Além disso, abaixo dessas plantas, observa-se a presença de plântulas com sintomas característicos da doença (FERREIRA, 2006). Orozco (2003) colheu sementes de plantas com sintomas foliares de mancha manteigosa e semeou-as em areia estéril. O autor isolou dessas plântulas o fungo com as mesmas características daquelas observadas em isolados de plantas adultas sintomáticas, sugerindo que a doença é expressa somente em condições especiais de suscetibilidade da planta e ou modificação das condições ambientais.

2.2 *Colletotrichum* spp. em cafeeiro

Fungos filamentosos do gênero *Colletotrichum* são economicamente importantes em todo o mundo, causando principalmente o sintoma de necrose nos tecidos das plantas colonizadas. A espécie *Colletotrichum gloeosporioides* é o principal fitopatógeno que predomina nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (WALLER, 1992).

A primeira descrição de *Colletotrichum* em cafeeiro foi feita por Noack, em 1901, referente a um isolado do Brasil, denominado de *C.coffeanum*. No Kenya, em 1926, foi relatada a variante “virulans” de *Colletotrichum* em café, associada a “*Coffee Berry Disease*” (MCDONALD, 1926). No Brasil, em 1958, foi descrita uma enfermidade em folhas de *Coffea arabica* L. como sendo a mancha manteigosa (BITANCOURT, 1958). Posteriormente, essa doença foi caracterizada como sendo causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (OROZCO, 2003). Essa doença nos últimos anos tem gerado perdas de produção e se encontra disseminada na maioria dos estados brasileiros produtores de café (FERREIRA, 2004; OROZCO, 2003).

Dentre as doenças causadas por *Colletotrichum* spp., destacam-se duas: a CBD (*Colletotrichum kahawae* J.M.Waller & P.D. Bridge), restrito ao continente africano e a mancha manteigosa (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.). A CBD ataca os frutos em todos os estádios de formação (FIRMAN; WALLER, 1977). No continente africano, os maiores problemas são descritos na região do Kenya, onde há relatos na redução da produtividade em torno de 50 a 80% (GRIFFITHS; GIBBS; WALLER, 1971; VAN DER GRAAFF, 1979). Essa espécie é relatada na literatura como sendo próxima geneticamente das espécies de *Colletotrichum gloeosporioides*, distinguindo-se principalmente pelas técnicas moleculares, pela capacidade de utilizar citrato e tartarato como única fonte de carbono e, ainda, por meio da virulência (BRIDGE et al., 2008; OROZCO, 2003; WALLER, 1992). Diversos estudos foram realizados tentando verificar a ocorrência da CBD nos cafezais brasileiros e em outros países produtores de café, mas tal fato não foi observado, mostrando que essa doença é restrita ao continente africano (BRIDGE et al., 2008; NGUYEN et al., 2009; OROZCO, 2003).

2.3 Indução de resistência em plantas

As plantas são expostas continuamente a um grande número de agentes patogênicos, o que torna necessária a formação de mecanismos de defesa para se proteger, por meio da montagem de barreiras que restringem a invasão do patógeno. Para um patógeno infectar a planta é necessário que o mesmo consiga penetrar e colonizar os tecidos do hospedeiro, retirar os nutrientes para sua sobrevivência, bem como neutralizar as reações de defesa das plantas (PASCHOLATI; LEITE, 1995; TAIZ; ZIGER, 2004). Ao contrário, as plantas necessitam se defender dos microorganismos potencialmente invasores, utilizando diversos mecanismos de resistência. Estes podem ser subdivididos em

pré e pós-formados, ou seja, existem antes da chegada do patógeno ou são ativados após a chegada do mesmo (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

No caso dos pré-formados, encontram-se os fatores estruturais, tais como, a cutícula, tricomas, estômatos, vasos condutores ou fatores bioquímicos, os quais envolvem a presença de fenóis, alcaloides, fototoxinas, glicosídeos cianogênicos e fenólicos. Já para os pós-formados, as barreiras estruturais podem envolver a lignificação, suberificação, formação de papilas, camadas de abscisão e de cortiça e as tiloses. E para os bioquímicos pós-formados englobam o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese, bem como a atividade de quitinases e β -1,3 glucanases (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

A indução de resistência em plantas consiste no aumento da capacidade de defesa da planta contra amplo espectro de organismos fitopatogênicos, incluindo fungos, bactérias e vírus (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). A resistência resultante pode ser obtida por um agente indutor biótico ou abiótico, de natureza inorgânica, orgânica ou sintética (RIBEIRO JÚNIOR, 2008). Essas moléculas capazes de ativar respostas de defesas nas plantas são chamadas de elicitores, atuando como indutores de resistência (MAZARO, 2007; STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997). As moléculas elicitoras são de natureza variáveis sendo mais comum a ocorrência de carboidratos, lipídeos, proteínas e glicoproteínas (WULFF; PASCHOLATI, 1999). Plantas tratadas com moléculas elicitoras podem levar não apenas a uma resposta de resistência, mas a uma expressão sincronizada de diversos mecanismos de defesa, culminando com a indução de resistência. Este fenômeno é caracterizado pela transformação de uma relação incompatível entre planta-patógeno, em que ocorre a doença, numa relação compatível.

A proteção obtida contra determinado patógeno pode ser local ou sistêmica, dependendo do intervalo de tempo entre o tratamento inicial (indutor e a inoculação do mesmo (desafiador). A duração pode ser de poucos dias a

algumas semanas ou pode durar todo o ciclo de vida da planta (PASCHOLATI; LEITE, 1995; RIBEIRO JÚNIOR, 2008). A indução de resistência pode ser dividida em duas categorias, a resistência sistêmica adquirida (RSA) e a resistência sistêmica induzida (RSI) (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997; VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). Na RSA a resistência se desenvolve sistemicamente ou localizadamente em resposta a um patógeno que causa uma lesão necrótica (HR) ou por aplicação exógena de ácido salicílico ou compostos sintéticos, como o o Éster-S-Metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotioico (Acibenzolar-S-Metil, ASM) e o ácido 2,6 dicloroisonicotinico INA (RIBEIRO JÚNIOR, 2008). A resistência expressada geralmente é efetiva contra amplo espectro de patógeno e está associada à produção de PR proteínas (HAMMERSCHMIDT, 1999; STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997). Já na RSI, a molécula sinalizadora é mediada pelo ácido jasmônico e o etileno, sem envolver a expressão de PR proteínas (RIBEIRO JÚNIOR, 2008; VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998).

A interação planta-patógeno envolve mecanismos bioquímicos onde os genes de alerta são ativados, resultando na síntese de novos compostos e no aumento da atividade enzimática, importantes para a defesa da plantas. A infecção por fitopatógenos é acompanhada pela síntese de várias proteínas, conhecidas como proteínas relacionadas com a patogênese (PRPs), codificadas pela planta hospedeira. Estas são produzidas por muitas plantas hospedeiras como resposta a infecção por patógenos e participam ativamente no fenômeno de resistência induzida (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997). Os mecanismos moleculares envolvidos na SAR indicam que o início dela é acompanhado por aumento local e sistêmico de níveis endógenos de ácido salicílico (MÉTRAUX et al., 1990) e simultaneamente, um aumento da expressão de um grupo enorme de genes incluindo aqueles que traduzem para proteínas PRP's, as quais apresentam atividade antimicrobiana (VAN LOON;

VAN STRIEN, 1999). Várias enzimas são fundamentais na defesa das plantas contra os fitopatógenos, como as: peroxidases, β -1,3- glucanases, quitinases, polifenoloxidasas, entre outras.

As peroxidases são glicoproteínas capazes de catalizar diversas reações, como a oxidação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo importante nas reações de defesa das plantas, pois agem como sinalizador para outras respostas de defesa (ZÁMOCKY et al., 2001). A peroxidase é uma importante enzima presente em plantas e está envolvida em diversas reações, como ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético (IAA), oxidação de fenóis, cicatrização de ferimentos, defesa de patógenos e regulação da elongação de células (CAMPOS et al., 2004; KAO, 2003). Também estão envolvidas na resposta de hipersensibilidade (HR), síntese de lignina e suberina para o espessamento da parede celular por adição de compostos fenólicos (QUIROGA et al., 2000).

As β -1,3- glucanases são capazes de ativar os mecanismos de defesa das plantas e agir diretamente sobre o patógeno (RIBEIRO JÚNIOR, 2008; VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). Uma pequena quantidade desta enzima é sintetizada e secretada para a lamela média (espaço intercelular) e, com o crescimento fúngico neste espaço, ela começa a degradar a parede celular do fungo e os fragmentos liberados por essa ação funcionam como eliciadores, com indução da síntese de grande quantidade de quitinases e β -1,3- glucanases que são acumuladas nos vacúolos. Quando o patógeno consegue penetrar na célula, esses são rompidos e liberam grande quantidade dessas enzimas, reprimindo a ação do mesmo (MAUCH; STAEHELIN, 1989; RIBEIRO JÚNIOR, 2008).

2.3.1 Fosfitos na indução de resistência em plantas

O fósforo elementar (P) não ocorre na natureza, pois é muito reativo e combina rapidamente com outros elementos, como o oxigênio (O) e o hidrogênio (H). Quando totalmente oxidado, o fósforo fica ligado a quatro átomos de oxigênio, molécula conhecida como fosfato. Porém, quando não é totalmente oxidado e o hidrogênio ocupa o lugar de um átomo de oxigênio, a molécula resultante é chamada de fosfito. Esta mudança provoca diferença significativa que influencia a solubilidade, absorção e os efeitos no metabolismo e na fisiologia vegetal (LOVATT; MIKKELSEN, 2006; RIBEIRO JÚNIOR, 2008). Ainda não existem evidências concretas de que as plantas utilizam fosfitos como fonte direta de P. Por isso, os mesmos não são aplicados como fonte de P e, sim, como um ativador de defesas das plantas (LOVATT; MIKKELSEN, 2006; MCDONALD; GRANT; PLAXTON, 2001).

Os fosfitos são rapidamente absorvidos pelas plantas, pois, apresentam alto grau de solubilidade e mobilidade. O caráter sistêmico dos fosfitos (ascendentes e descendentes) e a rápida absorção pelas raízes, caules e folhas, permitem vários métodos de aplicação de acordo com o tipo de planta e características de fitopatógeno a ser controlado. A eficiência da aplicação do fosfito em determinados patossistemas deve-se ao fato de que a planta apresenta melhor assimilação na presença de fósforo, tornando-se capaz de ativar mecanismos de defesa e produzir fitoalexinas e substâncias naturais de autodefesa (NOJOSA; RESENDE; RESENDE, 2005; REUVENI; AGAPOV; REUVENI, 1994). As respostas fisiológicas proporcionadas pelos fosfitos podem estar relacionadas ao metabolismo do açúcar, à estimulação da rota do ácido shiquímico ou a alterações hormonais e químicas nas plantas (LOVATT; MIKKELSEN, 2006; RIBEIRO JÚNIOR, 2008).

O interesse pelos fosfitos surgiu com o produto comercial (fosetil-Al), em virtude da capacidade do mesmo em translocar-se das folhas para as raízes e controlar algumas doenças do sistema radicular (LOVATT; MIKKELSEN,

2006). Atualmente o fosfito é comercializado como sal de potássio, manganês, cobre, zinco, sendo recomendado no controle dos fungos do gênero *Phytophthora*, *Pythium*, e dos fungos de podridões do colo, raiz, tronco e frutos (LOVATT; MIKKELSEN, 2006; MCDONALD; GRANT; PLAXTON, 2001; RIBEIRO JÚNIOR, 2008). Na forma de sal, como o de potássio, o mesmo parece ter efeito similar ao fungicida fosetil-Al. Este é constituído por três moléculas de etil fosfonato ligadas ao alumínio que neutralizam suas cargas negativas. O fosfito é liberado pela hidrólise do etil fosfonato, favorecendo a proteção da plantas contra fungos fitopatogênicos, com translocação de forma descendente na planta, via floema, das folhas para as raízes (MCDONALD; GRANT; PLAXTON, 2001). Processo semelhante parece ocorrer com os fosfitos, que causam acúmulo de fósforo nas formas de polifosfato e pirofosfato, onde a redução da doença provocada por *Phytophthora* está relacionada ao metabolismo do pirofosfato, o qual interfere em várias rotas metabólicas fundamentais ao patógeno (NIERE; DEANGELIS; GRANT, 1994; RIBEIRO JÚNIOR, 2008).

REFERÊNCIAS

- BITANCOURT, A. A. As fermentações e podridões da cereja de café. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, São Paulo, v. 32, n. 359, p. 7-14, jan. 1958.
- BRIDGE, P. D. et al. Variability of *Colletotrichum kahawae* in relation to other *Colletotrichum* species from tropical perennial crops and the development of diagnostic techniques. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, n. 5, p. 274–80, May 2008.
- CAMPOS, A. D. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 637-643, jul. 2004.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café: primeira estimativa – janeiro/2011**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 17 fev. 2011.
- DIAS, M. D. **Caracterização morfológica, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. em *Coffea arabica* L.** 2002. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.
- DORIZZOTTO, A. **Caracterização morfológica e patogenicidade de *Colletotrichum* spp. associados a cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em dois municípios de Minas Gerais.** 1993. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1993.
- FERREIRA, J. B. **Aspectos histopatológicos, epidemiologia e controle da mancha manteigosa em *Coffea arabica* L.** 2006. 159 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

FERREIRA, J. B. et al. Prejuízos ocasionados pela mancha manteigosa em cafeeiros (*Coffea arabica* L.). In: ENCONTRO SUL MINEIRO DE CAFEICULTURA, 10., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: Necaf, 2004. 1 CD ROM.

FERREIRA, J. B. et al. Transmissibilidade e efeito do tratamento de sementes de cafeeiros com mancha manteigosa (*Colletotrichum gloeosporioides*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 101-108, jan./fev. 2010.

FIRMAN, I. D.; WALLER, J. M. Coffee arabica disease and other *Colletotrichum* disease of coffee. **Phytopathological Papers**, CMI Kew, n. 20, p. 1-53, 1977.

GRIFFITHS, E.; GIBBS, J. N.; WALLER, J. M. Control of coffee berry disease. **Annual Applied Biology**, London, v. 67, n. 1, p. 45-74, Jan. 1971.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiology and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 2, p. 77-84, Aug. 1999.

KAO, C. H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, Heidelberg, v. 39, n. 2, p. 83-89, Feb. 2003.

LOVATT, C. J.; MIKKELSEN, R. L. Phosphite fertilizers: what are they? Can you use them? What can they do? **Better Crops**, Norcross, v. 90, n. 4, p. 11-13, Out. 2006.

MANSK, Z.; MATIELLO, J. B. Ocorrência de mancha manteigosa em café "Conilon" (*Coffea canephora*, Pierre) no Estado do Espírito Santo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Anais...** Guarapari: IBC/GERCA, 1977. p. 172-173.

MAUCH, F.; STAEHELIN, S. A. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1, 3-glucanase in bean leaves. **Plant Cell**, Rockville, v. 1, n. 4, p. 447-457, Apr. 1989.

MAZARO, C. M. **Indução de resistência às doenças em morangueiro pelo uso de elicitores**. 2007. 87 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MCDONALD, A. E.; GRANT, B. R.; PLAXTON, W. C. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, n. 10, p. 1505-1519, Oct. 2001.

MCDONALD, J. A preliminary account of a disease of green coffee berries in Kenya colony. **Transactions of the British mycological Society**, Manchester, v. 11, n. 1, p. 145–154, Aug. 1926.

MÉTRAUX, J. P. et al. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. **Science**, Whashington, v. 250, n. 4983, p. 1004-1006, Nov. 1990.

NGUYEN, T. H. P. et al. Variation among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from infected coffee berries at different locations in Vietnam. **Plant Pathology**, Oxford, v. 58, n. 5, p. 898–909, Oct. 2009.

NIERE, J. O.; DEANGELIS, G.; GRANT, B. R. The effect of phosphonate on acid-soluble phosphorus components in the genus *Phytophthora*. **Microbiology**, Basingstoke, v. 140, n. 7, p. 1661-1670, July 1994.

NOACK, F. As manchas das folhas dos cafeeiros. **Boletim da Agricultura**, São Paulo, n. 1, p. 5, jan. 1902.

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, v. 1, p. 139-153, 2005.

OROZCO, E. F. M. **Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae*.** 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos.** 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1, n. 22, p. 417-453, 1995.

PEREIRA, I. S. et al. Estudos histopatológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides* – cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 1, p. 117-123, out. 2009.

QUIROGA, M. et al. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 4, p. 1119-1127, Apr. 2000.

REUVENI, R.; AGAPOV, V.; REUVENI, M. Foliar spray of phosphates induces growth increase and systemic resistance to *Puccinia sorghi* in maize. **Plant Pathology**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 245-250, Apr. 1994.

RIBEIRO JÚNIOR, P. M. **Fosfitos na proteção e na indução de resistência do cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* e *Cercospora coffeicola*.** 2008. 105 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B. M.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, n. 1, p. 235-270, Sept. 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

VAN DER GRAAF, N. A. On the possible occurrence of the coffee berry disease in Brazil. **FAO**, Rome, v. 27, n. 4, p. 118-118, Feb. 1979.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, n. 1, p. 453-483, Sept. 1998.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. 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.

VARGAS, G. E.; GONZALEZ, U. L. C. La mancha mantecosa del café causada por *Colletotrichum* spp. **Turrialba**, San José, v. 22, n. 2, p. 129-135, Apr./June 1972.

WALLER, J. M. *Colletotrichum* diseases of plantation and other cash crops. In: JEGER, M. J.; BAILEY, J. A. (Ed.). **Colletotrichum diseases: biology, pathology and control**. Cab: Wallingford, 1992. p. 167-185.

WELLMAN, F. L. Blister spot of arabica coffee from virus in Costa Rica. **Turrialba**, San José, v. 7, n. 4, p. 115-116. Oct./Dec. 1957.

WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Partial characterization of sorghum phytoalexin elicitors isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 428-435, Sept. 1999.

ZÁMOCKY, M. et al. The molecular peculiarities of catalase-peroxidases. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 492, n. 3, p. 177-182, Mar. 2001.

CAPITULO 2

Efeito do fosfito de potássio *in vitro* e *in vivo* contra *Colletotrichum gloeosporioides* em cafeeiro

RESUMO

A mancha manteigosa vem se destacando nos últimos anos e cada vez mais se torna necessário conhecer as medidas alternativas de controle para essa doença, visto que não existem produtos químicos registrados para tal enfermidade. O presente trabalho teve como objetivos: Avaliar o efeito do fosfito de potássio na germinação, formação de apressórios e no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* e verificar a ação do mesmo na redução da severidade da doença. Os tratamentos consistiram de fosfito de potássio nas doses 1,25 mL L⁻¹; 2,50 mL L⁻¹; 5,0 mL L⁻¹ e 10,0 mL L⁻¹; Acibenzolar-S-Metil 0,1g L⁻¹ e da testemunha padrão com água destilada esterilizada. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Diagnose e Enfermidades Fúngicas em Plantas e na casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. As doses 5,0 mL L⁻¹ e 10,0 mL L⁻¹ de fosfito de potássio se destacaram quanto à redução da porcentagem de conídios germinados, na inibição da formação de apressórios e na redução do índice de velocidade de crescimento micelial do patógeno. O fosfito de potássio na dose de 10 mL L⁻¹ foi o melhor tratamento no controle da doença, apresentando a menor área abaixo da curva de progresso da severidade em torno de 62,5 %.

Palavras-chave: Mancha manteigosa. Severidade. Controle. *Coffea arabica*.

ABSTRACT

The spot butterfly has been increasing in recent years and increasingly becomes necessary to know the alternative control measures for this disease, since there are no chemicals registered for this disease. This study aimed to evaluate the effect of potassium phosphite on germination, appressorium formation and mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides* and check the action of the reduction in disease severity. The treatment consisted of doses of potassium phosphite 1.25 mL L⁻¹, 2.50 mL L⁻¹, 5.0 mL L⁻¹ and 10.0 mL L⁻¹; Acibenzolar-S-methyl 0.1 g L⁻¹ and a standard check with sterile distilled water. The experiments were conducted in the Laboratory Diagnosis of Fungal Diseases in Plants and in the greenhouse of the Department of Plant Pathology in Federal University of Lavras. The doses 5.0 mL L⁻¹ and 10.0 mL L⁻¹ of potassium phosphite is outstanding as to reduce the percentage of germinated conidia, inhibition of appressorium formation and in reducing the rate of mycelial growth rates of the pathogen. The potassium phosphite at a dose of 10 mL L⁻¹ was the best treatment for disease control, showed the smallest area under the curve severity progress around 62.5%.

Keywords: Spot butterfly. Severity. Control. *Coffea arabica*.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a mancha manteigosa vem ganhando destaque, pois, observações em campo têm revelado o seu agravamento, principalmente, quando o fitopatógeno ataca as flores e frutos em expansão e as plantas doentes não conseguem produzir frutos, mesmo com boa brotação e, na medida em que começam a desenvolver os frutos “chumbinhos”, estes mumificam e caem no solo, chegando a perdas totais das produções (FERREIRA, 2006).

A mancha manteigosa é de tal complexidade que, apesar dos esforços das pesquisas, ainda é incerta a reprodutibilidade dos sintomas. Várias metodologias de inoculações com diferentes isolados do patógeno foram realizadas, mas, a característica típica dos sintomas em folhas (mancha oleosa de cor verde-pálida) ainda não foi elucidada. Têm-se apenas resultados positivos de necrose e morte de hipocótilos e necrose de frutos, quando são inoculados com isolado da doença.

Uma das grandes preocupações desse fitopatógeno é a transmissibilidade via sementes, pois, lotes de sementes obtidas de plantas com sintomas da mancha manteigosa, quando submetidos à formação de plântulas, tiveram alto índice de mortalidade, em torno de 95 % (FERREIRA et al., 2010).

Considerando que o *Colletotrichum gloeosporioides* é um patógeno altamente destrutivo aos cafeeiros, o controle químico seria uma das práticas mais utilizadas. Porém, além dos diversos problemas ocasionados pela utilização irracional dos mesmos, é importante ressaltar a inexistência de produtos registrados para o controle de *Colletotrichum* spp., na cultura do cafeeiro. Além disso, plantas com mancha manteigosa, mesmo quando pulverizadas com fungicidas, têm significativas queda de frutos e plantas sadias apresentam produções 95 % superiores às plantas doentes (FERREIRA, 2006).

Portanto, a procura por produtos alternativos, que sirvam como defensivos e que possam causar menor dano ao ambiente, vem crescendo. Algumas dessas alternativas é a utilização de produtos indutores de resistência, como por exemplo, os sais de fosfito que apresentam resultados satisfatórios para diversas culturas e patógenos.

Com isso, objetivou-se nesse trabalho avaliar o efeito do fosfito de potássio *in vitro* e *in vivo* contra *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da mancha manteigosa em cafeeiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do isolado de *Colletotrichum gloeosporioides*

O isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* foi obtido de seca de ponteiros de cafeeiros, com sintomas foliares da mancha manteigosa, no campo experimental da UFLA. Tecidos infectados foram desinfestados com álcool a 50% por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 1%, por 1 minuto, lavados em água destilada e esterilizada e secos em papel de filtro esterilizado. Em seguida, transferidos para placa de Petri contendo meio de cultura MEA a 2% (extrato de malte e ágar) e mantidos, durante sete dias, em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

Foi realizado teste de patogenicidade dos isolados em folhas de cafeeiro e, em seguida, foram obtidas as culturas monospóricas. Suspensão de esporos (1×10^2 esporos/mL), das colônias puras de *C. gloeosporioides* foi vertida em placas de Petri contendo meio agar-água a 2%. Após 4 horas em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 horas em câmara de fluxo laminar e em microscópio de luz, esporos germinados, foram transferidos individualmente para placas de Petri contendo MEA a 2%. Discos de micélio dos isolados monospóricos foram preservados em água destilada e esterilizada, seguindo o método de Castellani (1967).

2.2 Efeito direto do fosfito de potássio na germinação e formação de apressórios em esporos de *C. gloeosporioides*

Para se verificar o efeito do fosfito de potássio sobre a germinação dos esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*, foram realizados testes de germinação em lâminas escavadas. O experimento foi montado em lâminas de

uma cavidade, e estas foram dispostas em placas de Petri de 9 cm com discos de papel de filtro, do mesmo diâmetro no fundo da placa, esterilizados e umedecidos com água destilada e esterilizada. Cada cavidade da lâmina recebeu uma alíquota de 40µl da suspensão de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* (1×10^6 esporos/mL), cuja quantificação foi feita em câmara de Neubauer, e outra alíquota de 40µl do fosfito de potássio (Reforce[®] – 25% de K₂O e 35% de P₂O₅ p/v da Agrichem do Brasil Ltda[®]) nas concentrações de 1,25; 2,5; 5,0; e 10,0 mL L⁻¹, e do Acibenzolar-S-Metil, ASM (Bion[®] - Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.) a 0,1 g L⁻¹. A testemunha consistiu de água destilada e esterilizada. As placas foram mantidas em condição de câmara úmida durante 14 horas a 25°C. Depois desse período foi realizada a paralisação da germinação com uma gota de lactofenol. Para avaliação foi feita a contagem de 100 esporos por repetição, em um total de 5 repetições, com o auxílio de microscópio de luz. Foi considerado esporo germinado aquele que apresentou qualquer emissão de tubo germinativo, independente do seu comprimento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições. Para a avaliação do número médio de esporos germinados, a superfície abaxial da cavidade das lâminas escavadas foram divididas em 4 quadrantes (formato de cruz), onde foram determinados quatro campos para amostragem. Foram contados 25 esporos germinados em cada um dos campos, num total de 100 esporos. A unidade experimental foi constituída por uma lâmina. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

2.3 Efeito do fosfito de potássio e ASM na inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*

Alíquotas do fosfito de potássio nas concentrações 1,25; 2,5; 5,0; e 10,0

mL L⁻¹ e do ASM a 0,1 g L⁻¹ foram misturados com MEA a 2%, previamente autoclavado, onde cada placa de Petri (9,0 cm de diâmetro) recebeu 10 mL dessa mistura. Discos de 0,9 cm do isolado de *C. gloeosporioides* foram repicados para o centro das placas contendo os tratamentos acima citados e estas foram incubadas a 23±2°C, com fotoperíodo de 12 horas. A testemunha foi repicada em meio MEA a 2%, sem nenhuma aplicação. A avaliação do crescimento micelial foi feita a cada 24 horas, medindo-se o diâmetro das colônias, até que a testemunha ocupasse toda a superfície do meio.

Com as medições diárias foi calculado o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), por meio da fórmula de Maguire (1962):

$$IVCM = [\Sigma (D - D_a)] / N$$

em que:

D = diâmetro médio atual

Da = diâmetro médio do dia anterior

N = número de dias após a inoculação

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições e a parcela experimental foi constituída de uma placa. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

2.4 Efeito do fosfito de potássio sobre a severidade da mancha manteigosa em mudas de café

2.4.1 Obtenção das mudas de café

As mudas foram obtidas a partir de sementes colhidas de plantas com

sintomas da mancha manteigosa da cultivar Catuaí Vermelho, produzidas na safra de 2009/2010, coletadas na Fazenda da Laje, localizada no município de Paraguaçu, Minas Gerais.

As sementes foram obtidas de frutos no estádio cereja, colhidos manualmente. Os frutos foram submetidos ao despulpamento e, em seguida, as sementes foram desmuciladas por fermentação em água, por 24 horas. Após a retirada da mucilagem, foram lavadas em água corrente e dispostas em bandejas forradas com papel de filtro esterilizado e colocadas à sombra para a retirada do excesso de água. Em seguida, as mesmas foram semeadas em bandejas de isopor com 96 células contendo o substrato comercial Vida Verde[®]. Essas foram levadas para a casa de vegetação localizada no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

2.4.2 Preparo das mudas para a inoculação

As mudas de café foram inoculadas quando apresentaram 4 pares de folhas verdadeiras completamente expandidas, em torno de 9 meses após a semeadura. Três dias antes da inoculação, as mudas foram submetidas a condições de câmara úmida, feita com o auxílio de sacos plásticos e mantidas em câmara de crescimento à temperatura de 30 °C. A pulverização com os tratamentos foi realizada sete dias antes da inoculação de *C. gloeosporioides* com pulverizador manual de 0,5 L, sempre no final da tarde.

A inoculação foi realizada com uma gota de 10 µL da suspensão de *Colletotrichum gloeosporioides*, na face abaxial das folhas, em locais marcados com discos autocolantes com orifícios de 1,4 cm de diâmetro. Foram feitos ferimentos nos locais da inoculação com um conjunto de agulhas entomológicas para permitir a penetração e colonização do fungo. Posteriormente sobre a área inoculada, colocou-se um disco de papel semipermeável com 1,3 cm de

diâmetro, previamente umedecido, formando uma micro câmara úmida (ABREU, 1988). Essa foi retirada 48 horas após a inoculação.

Os tratamentos estão representados na Tabela 1 e foram aplicados sete dias antes da inoculação do patógeno.

Tabela 1 Tratamentos pulverizados em mudas de cafeeiro sete dias antes da inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*

Tratamentos	Produtos	Doses	Empresas
Fosfito de Potássio	Reforce ®	1,25 mL/L	Agrichem do Brasil Ltda
Fosfito de Potássio	Reforce ®	2,5 mL/L	Agrichem do Brasil Ltda
Fosfito de Potássio	Reforce ®	5,0 mL/L	Agrichem do Brasil Ltda
Fosfito de Potássio	Reforce ®	10,0 mL/L	Agrichem do Brasil Ltda
ASM	Bion ®	0,2g/L	Syngenta Proteção de Cultivos Ltda
Testemunha	Água destilada	-----	-----

As avaliações da severidade da doença foram realizadas aos 7, 14, 21, 28, 35 dias após a inoculação. Para a avaliação da severidade foi utilizado uma escala de notas de Várzea adaptada por Martins (2008) representada na Tabela 2.

Tabela 2 Critérios de avaliação do espectro de reação a *Colletotrichum* spp. Em folhas de café

Nota (grau de sintomas)	Severidade / Sintomas
0	Ausência de reação visível
1	Pequenas e poucas (1 a 2) lesões cloróticas ou acastanhadas
2	Mais de 2 lesões acastanhadas ou lesões coalescentes. O diâmetro da lesão excede 0,5 mm
3	Extensas lesões acastanhadas com numerosos pontos pretos ou lesões escuras. Mais de 50% de áreas lesionadas.
4	Área totalmente necrosada

A partir desses dados foi determinado o índice da doença (ID), conforme a fórmula proposta por Cirulli e Alexander, citado por Carvalho (2004):

$$ID = \sum (F \times V) / (N \times X) \times 100$$

em que:

F= número de plantas com determinado grau de sintomas

V= grau de sintomas

N= número total de plantas inoculadas

X= grau máximo de sintomas

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi obtida com base nos índices de severidade de acordo com Shaner e Finney (1977), calculados pela fórmula:

$$AACPD = \sum_{i=1}^n [(X_i + X_{i+1} + 1) / 2] [t_{i+1} - t_i]$$

em que:

X= intensidade da doença

t= o tempo

n= o número de avaliações no tempo

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com quatro repetições. A parcela experimental foi composta por uma folha com 4 discos autocolantes. Os dados obtidos para severidade (índice de doença) foram submetidos ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito direto do fosfito de potássio na germinação e formação de apressórios em esporos de *C. gloeosporioides*

As doses 5,0 mL/L e 10,0 mL/L de fosfito de potássio se destacaram quanto à menor porcentagem de conídios germinados, sendo 27,6 % e 20,8 % respectivamente. Ainda, esses conídios germinados, praticamente não formaram apressórios, fato interessante, pois, por meio destes, que o patógeno consegue romper a superfície do hospedeiro e realizar o processo de penetração e colonização do mesmo (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Apesar de ter apresentado resultado inferior em relação às anteriores, a dose 2,5 mL/L foi estatisticamente superior à testemunha, apresentado 37,8% dos conídios germinados e somente 4% formaram apressórios (Gráfico 1). O Acibenzolar-S-Metil e a menor dose de fosfito de potássio, não obtiveram resultados satisfatórios quanto à germinação, porém nesse último, a formação de apressórios foi baixa, em torno de 8 %.

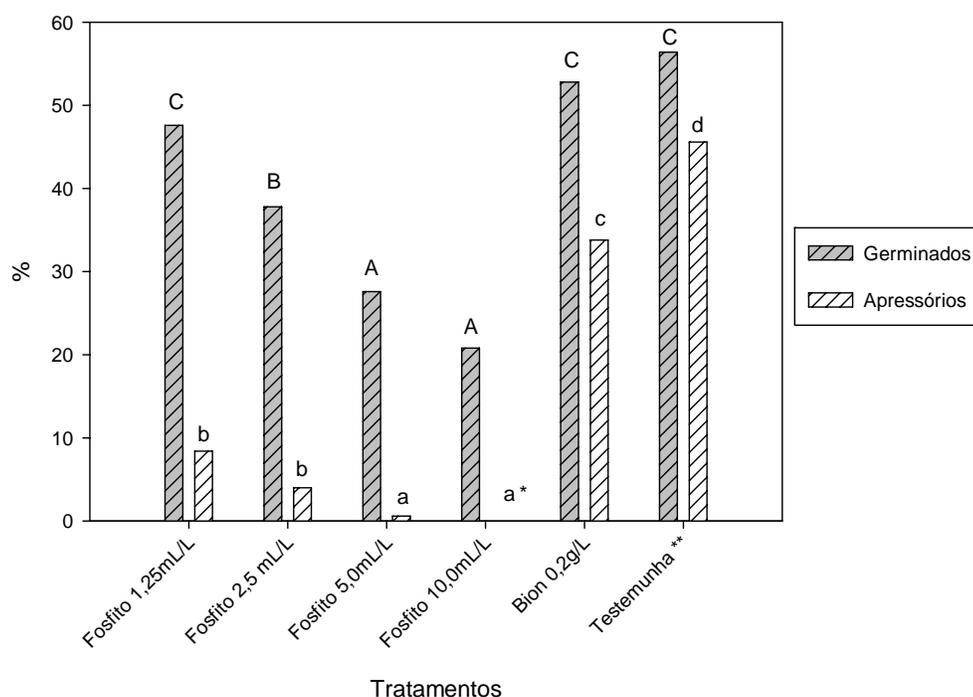


Gráfico 1 Porcentagem de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* germinados e que formaram apressórios *in vitro*, na presença de fosfito de potássio e Acibenzolar-S-Metil. UFLA, 2010
 **Testemunha com água destilada. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. CV= 25,09%

Resultados semelhantes foram observados em outros patossistemas, onde o fosfito de potássio nas doses 2,5 e 5,0 mL/L reduziu a germinação dos conídios de *Verticillium dahliae* em 100 e 99%, enquanto que nas doses de 0,62 e 1,25 mL/L reduziu 65% e 89% respectivamente (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2006). Além disso, esses autores relataram que o ASM (0,1 g L⁻¹) não apresentou efeito fungicida, reduzindo apenas 40% da germinação dos conídios.

Pereira (2009) realizou testes *in vitro* com o fosfito de potássio contra *Plasmopara viticola* e, as doses 4,5 mL L⁻¹ e 6,0 mL L⁻¹, inibiram a germinação dos esporângios em 48,2% e 40,6% em relação à testemunha padrão. O ASM, embora tenha diferido estatisticamente da testemunha, apresentou baixa inibição, mostrando a inexistência do efeito tóxico do produto.

No presente trabalho ficou clara a ação fungicida do fosfito de potássio aos conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, pois, além da baixa porcentagem de conídios germinados, também, houve baixa formação de apressórios.

3.2 Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* com o fosfito de potássio

Assim como para a germinação e formação de apressórios, os melhores tratamentos que inibiram o crescimento micelial do patógeno foram as duas maiores doses de fosfito de potássio, ou seja, 5,0 mL L⁻¹ e 10,0 mL L⁻¹, representando uma inibição de 20,9 e 19,5 % respectivamente. O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) das duas menores doses de fosfito de potássio foi igual estatisticamente com o do ASM e da testemunha padrão (Gráfico 2).

Resultado semelhante foi observado por Nojosa et al. (2009), que constataram que o fosfito de potássio a 10,0 mL/L proporcionou inibição de 62,3 % do crescimento micelial de *Phoma costarricensis*, destacando-se dos demais tratamentos testados. Esse efeito direto do fosfito de potássio sobre o crescimento micelial de fungos tem sido verificado para outros patossistemas, como para *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da mancha foliar de gala e mancha foliar de *Glomerella* em maçã (ARAÚJO et al., 2008; ARAÚJO; VALDEBENITO-SANHUEZA; STADNIK, 2010).

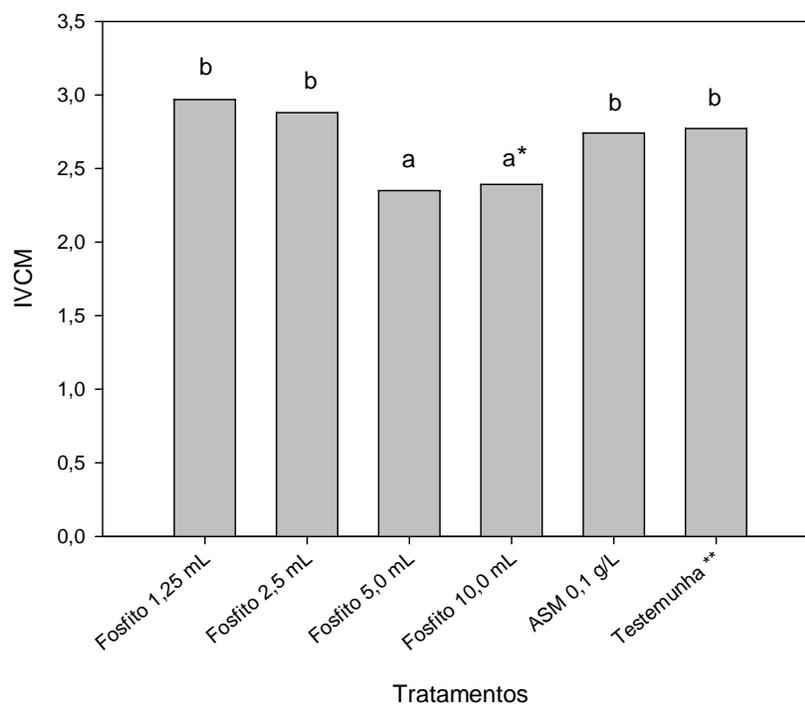


Gráfico 2 Índice de Velocidade do Crescimento Micelial (IVCM) de *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*, em presença de fosfito de potássio e Acibenzolar-s-Metil. UFLA, 2010.**Testemunha sem aplicação. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. CV= 12,73%

3.3 Fosfito de potássio no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* agente da mancha manteigosa, *in vivo*

A testemunha absoluta não apresentou qualquer sintoma da doença. O fosfito de potássio na dosagem de 10 mL L⁻¹ foi o melhor tratamento, apresentando a menor área abaixo da curva de progresso da severidade

(AACPS), diferindo-se estatisticamente da testemunha inoculada e dos demais tratamentos. Em seguida o fosfito de potássio nas doses 1,25; 2,5 e 5,0 mL/L e o ASM apresentaram-se AACPS intermediária não havendo diferenças estatísticas entre si e diferindo estatisticamente da testemunha inoculada (Gráfico 3).

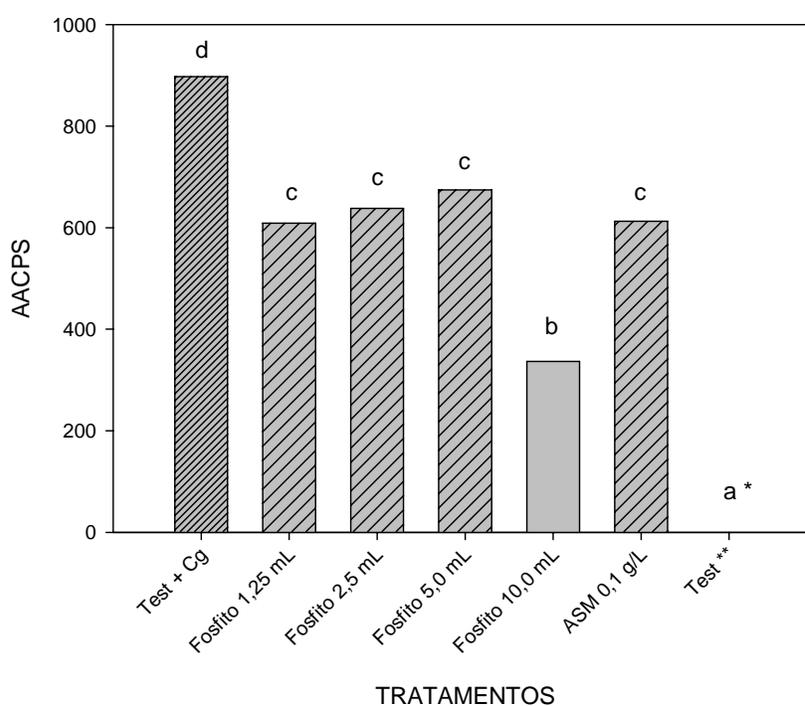


Gráfico 3 Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade (AACPS) de *Colletotrichum gloeosporioides*, em folhas de cafeeiro tratadas com fosfito de potássio e Acibenzolar-s-Metil. Test + Cg = Testemunha inoculada; **Testemunha sem inoculação. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. CV= 29,46%

Nojosa et al. (2009) observaram que o fosfito de potássio nas concentrações 2,5 e 5,0 mL L⁻¹ e o acibenzolar-S-metil (ASM) na concentração

de 0,1 g L⁻¹ quando aplicados, sete dias antes da inoculação do patógeno *Phoma costarricensis*, apresentaram as menores áreas abaixo da curva de progresso da doença, em mudas de cafeeiro da cultivar Acaiá Cerrado, com 10 meses de idade, tendo controle superior ao fungicida tebuconazole. De forma semelhante Ribeiro Júnior (2008), estudando o efeito da aplicação de fosfitos e de acibenzolar-S-metil (ASM) na proteção de mudas de cafeeiro contra *Cercospora coffeicola*, observou que a aplicação de fosfito de zinco a 2,0 mL L⁻¹, fosfito de manganês a 3,33 mL L⁻¹ e os fosfitos de potássio Hortifos[®] PK[®] e Reforce[®] ambos na concentração de 5,0 mL L⁻¹, quando aplicados sete dias antes da inoculação do patógeno, conferiram proteção parcial às mudas de cafeeiro da cultivar Mundo Novo contra *Cercospora coffeicola*, além de proporcionarem maior enfolhamento das mesmas. Além disso, o mesmo autor relata que uma aplicação de fosfito de potássio em mudas de cafeeiro com 90 dias de idade, sete dias antes da inoculação com *Cercospora coffeicola* promoveu nas plantas um aumento na atividade das proteínas PR, peroxidase, quitinase e β-1, 3 glucanase, além de aumentar os teores de fenóis solúveis totais.

A utilização do fosfito de potássio no controle da severidade de doenças de plantas está mostrando resultados satisfatórios em diversos patossistemas, principalmente àqueles fitopatógenos da classe dos oomicetos, como por exemplo, o míldio da uva cujo agente etiológico é *Plasmopara viticola* (PEREIRA et al., 2010; SÔNEGO; GARRIDO; CZERMAINSKI, 2003) e podridões radiculares causada por *Pythium* e *Phytophthora* (DANIEL; GUEST, 2006; DIANESE et al., 2009; LOBATO et al., 2008). Neste a ação do fosfito está relacionada ao acúmulo de fósforo nas formas de polifosfato e pirofosfato interferindo em várias rotas metabólicas fundamentais aos patógenos (NIERE; DEANGELIS; GRANT, 1994).

Além disso, o fosfito de potássio parece ter efeito similar ao fungicida fosetil-Al, favorecendo a proteção da plantas contra fungos fitopatogênicos, com

translocação de forma descendente na planta, via floema, das folhas para as raízes (MCDONALD; GRANT; PLAXTON, 2001).

4 CONCLUSÕES

O fosfito de potássio nas doses $5,0 \text{ mL L}^{-1}$ e $10,0 \text{ mL L}^{-1}$ foram os mais eficientes no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*.

A severidade da doença foi menor para a dose $10,0 \text{ mL L}^{-1}$ de fosfito de potássio.

Os Acibenzolar-S-Metil e as outras doses de fosfito de potássio tiveram controle intermediário da doença.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. S. **Resistência horizontal a *Hemileia vastatrix* Berk & Br. Em cafeeiros descendentes do Híbrido de Timor.** 1988. 68 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1988.

ARAÚJO, L. et al. Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 2, p. 74-80, mar./abr. 2008.

ARAÚJO, L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; STADNIK, M. J. Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* e no controle pós-infeccional da mancha foliar de *Glomerella* em macieira. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 54-59, jan./fev. 2010.

CARVALHO, G. A. **Efeito in vitro e in vivo de filtrados de rizobactérias sobre *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. do cafeeiro.** 2004. 55 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researches. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 70, p. 181-184, 1967.

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

DIANESE, A. C. et al. Aplicação de fosfito de potássio, cálcio ou magnésio para a redução da podridão-do-pé do mamoeiro em casa de vegetação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 8, p. 2309-2314, nov. 2009.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000. (SISVAR 4. 1. Pacote computacional).

FERREIRA, J. B. **Aspectos histopatológicos, epidemiologia e controle da mancha manteigosa em *Coffea arabica* L.** 2006. 159 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

FERREIRA, J. B. et al. Transmissibilidade e efeito do tratamento de sementes de cafeeiros com mancha manteigosa (*C. gloeosporioides*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 101-108, jan./fev. 2010.

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

MAGUIRE, J. D. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar. 1962.

MARTINS, F. G. **Aspectos epidemiológicos e fisiológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ x mudas micropropagadas de cafeeiro (*Coffea arabica*)**. 2008. 56 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

MCDONALD, A. E.; GRANT, B. R.; PLAXTON, W. C. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, n. 10, p. 1505-1519, Oct. 2001.

NIERE, J. O.; DEANGELIS, G.; GRANT, B. R. The effect of phosphonate on acid-soluble phosphorus components in the genus *Phytophthora*. **Microbiology**, Basingstoke, v. 140, n. 7, p. 1661-1670, July 1994.

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

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 22, p. 417-453.

PEREIRA, V. F. et al. Produtos alternativos na proteção da videira contra o míldio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 1, p. 25-31, jan. 2010.

PEREIRA, V. F. **Fosfitos no manejo do míldio da videira: eficácia e modo de ação**. 2009. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

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 Agrotécnica**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 629-636, jul./ago. 2006.

RIBEIRO JÚNIOR, P. M. **Fosfitos na proteção e na indução de resistência do cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* e *Cercospora coffeicola***. 2008. 105 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

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

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R.; CZERMAINSKI, A. B. C. **Avaliação de fosfitos no controle do míldio da videira**. Bento Gonçalves: Embrapa CNPQU, 2003. 18 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 11).

CAPITULO 3

**Indução de resistência em cafeeiro contra *Colletotrichum gloeosporioides*
pela aplicação do fosfito de potássio**

RESUMO

A indução de resistência se tornou uma ferramenta fundamental no manejo de doenças em plantas, pois, apresentam várias vantagens em relação aos produtos químicos. O objetivo desse trabalho foi verificar se o fosfito de potássio induz resistência em cafeeiro contra *Colletotrichum gloeosporioides*. O experimento foi conduzido em casa de vegetação e no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo do Departamento de Fitopatologia da UFLA. Os tratamentos foram o fosfito de potássio 10,0 mL L⁻¹, Acibenzolar-S-Metil 0,1g/L e água destilada. As mudas de café e o isolado do patógeno foram obtidos de plantas adultas com sintomas foliares de mancha manteigosa. Avaliou-se a atividade das enzimas peroxidase (POX), polifenoloxidase (PPO), β -1,3 glucanase (GLU) e quitinase (CHI). Para a determinação das enzimas estudadas foram coletados tecidos foliares de cafeeiro nos tempos de 1; 3; 6; 8; 10; 13 e 17 dias após pulverização dos tratamentos (DAP), onde a inoculação ocorreu 7 (DAP). O fosfito de potássio aumentou a atividade da POX a 1 e 13 DAP e permaneceu alto até 17 DAP. Já para a PPO o pico de atividade ocorreu 6 e 13 DAP. O ASM aumentou a atividade da POX aos 10 DAP e da PPO aos 8 e 13 DAP. Quanto à quitinase, o pico da atividade ocorreu 17 DAP para o ASM. Já o fosfito de potássio incrementou a atividade da CHI aos 3 DAP, onde o pico máximo da atividade ocorreu em 13 DAP. Não houve aumento na atividade da enzima β -1,3-glucanase para todos os tratamentos.

Palavras-chave: Resistência Induzida. Enzimas. *Coffea arabica*. Fosfito.

ABSTRACT

Induction of resistance has become a fundamental tool in the management of plant diseases, because they have several advantages over chemicals. The aim of this work was to determine whether potassium phosphite induces resistance in coffee plants against *Colletotrichum gloeosporioides*. The experiment was conducted in greenhouse and in the Laboratory of Physiopathology of Department of Plant Pathology in UFLA. The treatments are potassium phosphite 10,0 mL L⁻¹, Acibenzolar-S-Metil 0,1g/L and distilled water. Coffee seedlings and pathogen isolates were obtained from adult plants with symptoms of spot butterfly. We evaluated the activity of peroxidase (POX), polyphenol oxidase (PPO), β -1, 3 glucans (GLU) and chitinase (CHI). For the determination of the enzymes were collected leaf tissues of coffee in times of 1, 3, 6, 8, 10, 13 and 17 days after spray treatment (DAP), where inoculation occurred 7 (DAP). The potassium phosphite increased the POX activity at 1 and 13 DAP and remained high until 17 DAP. As for the PPO peak activity occurred 6 and 13 DAP. ASM increased POX activity at 10 DAP and PPO for 8 and 13 DAP. As for the chitinase, the peak activity occurred 17 DAP for the ASM. Since potassium phosphite increased the activity of CHI at 3 DAP, where the peak activity occurred at 13 DAP. No increase in the activity of the enzyme β -1,3-glucanase for all treatments.

Keywords: Induced Resistance. Enzymes. *Coffea arabica*. Phosphites.

1 INTRODUÇÃO

A cafeicultura é uma das mais importantes atividades agrícolas do Brasil, especialmente pela geração de emprego e renda em diversos estados brasileiros, onde somente o estado de Minas Gerais é responsável por mais da metade da produção nacional.

Várias doenças provocam danos nessa cultura. As de origem fúngicas são as principais, causando perdas significativas quando não são tomadas medidas de controles adequadas. A maioria dessas já se conhece os sistemas de manejo satisfatórios, porém, ainda é incerto para outras doenças como aquelas cujo agente etiológico é o *Colletotrichum* spp, especialmente a mancha manteigosa.

O patossistema *Colletotrichum*-cafeeiro tem se tornando sério problema nas lavouras cafeeiras, pois uma vez atacados, os frutos apresentam ligeiras depressões circulares na polpa, de cor castanha e necróticas, as quais vão se alastrando e exibindo lesões mais profundas, podendo atingir todo o fruto, que fica mumificado. Já os sintomas nas folhas e ramos novos ocorrem causando seca e necrose, podendo levar à morte das plantas (FERREIRA, 2006).

Uma das formas de manejo para esse fitopatógeno seria a utilização dos produtos químicos. Porém, além da ausência de registro no MAPA, os mesmos quando utilizados de forma indiscriminados causa graves danos ao meio ambiente. Na atualidade, a sociedade vem se preocupando pela busca por alimentos mais saudáveis, isentos de resíduos tóxicos, fato que estimula o controle alternativo de doenças de plantas.

Nesse cenário, a indução de resistência tem se destacado, pois, consiste no aumento da capacidade de defesa das plantas contra amplo espectro de organismos fitopatogênicos, incluindo fungos, bactérias e vírus (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). A ativação dos mecanismos de defesa das plantas

pode ser obtida por um agente indutor biótico ou abiótico, de natureza inorgânica, orgânica ou sintética, sendo chamadas de elicitores.

Nessa interação ocorre um aumento da atividade enzimática, importante para a defesa das plantas, onde a infecção pelo mesmo é acompanhada pela síntese de várias proteínas codificadas pela planta hospedeira, as quais participam ativamente na resistência induzida. Várias enzimas têm a expressão aumentada nesse processo e são fundamentais nessa defesa das plantas contra os fitopatógenos, como as: peroxidases, β -1,3- glucanases, quitinases, polifenoloxidasas, entre outras.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da aplicação do fosfito de potássio nas mudas de café e sua possível influência nas atividades das enzimas de defesa da planta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das mudas

As mudas foram obtidas a partir de sementes colhidas de plantas com sintomas da mancha manteigosa da cultivar Catuaí Vermelho (com fator de suscetibilidade à doença), produzidas na safra de 2009/2010, coletadas na Fazenda da Laje, localizada no município de Paraguaçu, Minas Gerais.

As sementes foram obtidas de frutos no estágio cereja, colhidos manualmente. Os frutos foram submetidos ao despulpamento e, em seguida, as sementes foram desmuciladas por fermentação em água, por 24 horas. Após a retirada da mucilagem, foram lavadas em água corrente e dispostas em bandejas forradas com papel de filtro esterilizado e colocadas à sombra para a retirada do excesso de água. Em seguida, as mesmas foram semeadas em bandejas de isopor com 96 células contendo o substrato comercial Vida Verde[®]. Essas foram levadas para a casa de vegetação, localizada no departamento de fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

As mesmas foram utilizadas nesse experimento quando atingiu o oitavo par de folhas verdadeiras totalmente expandidas, ou seja, com aproximadamente 13 meses de idade.

2.2 Inoculação

O isolado de *Colleotrichum gloeosporioides* foi obtido de seca de ponteiros de cafeeiros, com sintomas foliares da mancha manteigosa, no campo experimental da UFLA. Em seguida foram esterilizados e mantidos, durante sete dias, em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

A inoculação foi realizada sete dias após a aplicação dos produtos com uma gota de 10 µL da suspensão de *C.gloeosporioides*, quantificada com câmara de contagem de Neubauer e ajustada para 2×10^6 conídios/mL, na face abaxial das folhas, em locais marcados com discos autocolantes com orifícios de 1,4 cm de diâmetro. Foram feitos ferimentos nos locais da inoculação com um conjunto de agulhas entomológicas para permitir a penetração e colonização do fungo. Posteriormente sobre a área inoculada, colocou-se um disco de papel semipermeável com 1,3 cm de diâmetro, previamente umedecido, formando uma micro câmara úmida (ABREU, 1988). Essa foi retirada 48 horas após a inoculação.

2.3 Tratamentos e tempos de coleta

Os tratamentos utilizados nesse experimento estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 Tratamentos pulverizados em mudas de cafeeiro para avaliação das enzimas relacionadas à defesa induzida

Tratamento	Produto	Dose	Empresa
Fosfito de Potássio	Reforce ®	10,0mL/L	Agrichem do Brasil Ltda
ASM	Bion ®	0,2g/L	Syngenta Proteção de Cultivos Ltda
Testemunha	Água Destilada	-----	-----

Para a determinação das enzimas estudadas foram coletados tecidos foliares de café nos tempos de 1; 3; 6; 8; 10; 13 e 17 dias após pulverização dos tratamentos.

Após a coleta, as amostras foram envolvidas em papel alumínio, identificadas, mergulhadas em nitrogênio líquido, onde após o congelamento, foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer, a -80°C .

2.4 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 macerados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, aproximadamente 1,0 g desse pó foram depositados em um tubo, no qual foi adicionado o tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 (10,0 mL de tampão para cada grama de amostra) e homogeneizado por 10 segundos, em agitação. Após esse processo, a suspensão foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos (4°C). Em seguida, o sobrenadante foi retirado, colocado em microtubos plásticos e utilizado como fonte enzimática, sendo armazenado a -80°C para análises posteriores.

2.4.1 Determinação de proteínas totais

A concentração de proteína total solúvel foi aferida com a utilização de uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA), ajustada para 10 μL do extrato enzimático, conforme ensaio de Bradford (1976). Todos os ensaios enzimáticos foram conduzidos em triplicatas.

2.4.2 Peroxidases de guaiacol

A atividade de peroxidase de guaiacol foi determinada pela adição de 10 μL do extrato enzimático, 20 μL de tampão acetato de sódio (50mM pH 5,2) e

ajustado para 200 μ L de solução contendo 473 μ L do tampão acetato de sódio (50mM pH 5,2), 500 μ L de guaiacol (20mM) e 500 μ L peróxido de hidrogênio (60mM). Após incubação a 30°C, por 10 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro. Uma unidade POX foi expressa como variação de 1 OD₄₈₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{480\text{nm}} \text{ mgP}^{-1} \cdot \text{Min}^{-1}$).

2.4.3 Polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase (PPO) foi determinada pela adição de 50 μ L do extrato enzimático, ajustado para 200 μ L de solução contendo 473 μ L de tampão fosfato de sódio (50mM pH 5,2), e 527 μ L de catecol (50mM). Após incubação a 30°C, por 10 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro, a 410nm. Uma unidade PPO foi expressa como variação de 1 OD₄₁₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{410\text{nm}} \text{ mgP}^{-1} \cdot \text{Min}^{-1}$).

2.4.4 Quitinase (CHI; EC 3.2.1.14)

A atividade de quitinase foi determinada pela adição de 90 μ L do extrato enzimático ajustado para 80 μ L do tampão acetato de sódio (50mM pH 5,2) e 80 μ L do reagente CM-Chitin-RBV (LOEWE Biochemica GmbH), em placas de ELISA de 96 cavidades, com volume de 350 μ L por cavidade. Após incubação a 35°C, por 90 minutos, as amostras foram acidificadas com 50 μ L de HCl 0,5N, para paralisação da reação e centrifugadas (12.000 rpm por 10 minutos), a 4°C. O sobrenadante de cada amostra foi transferida para nova microplaca, para leitura em 492nm, em um leitor EIA-compatível. A atividade CHI foi expressa pela variação de 1 OD₄₉₂ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{492\text{nm}} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

2.4.5 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 (LOEWE Biochemica GmbH). Para promover ação hidrolítica de β -1,3-glucanase, foi adotado o tempo de incubação de 90 minutos a 35°C. As amostras foram submetidas à leitura fotométrica em filtro de 620nm de um leitor EIA. A atividade GLU (da glucanase) foi expressa pela variação de 1,0 OD₆₂₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{620\text{nm}} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade de peroxidases

A atividade de peroxidases (POX), quando aplicado o ASM sem inoculação, não diferiu da testemunha absoluta. Aos 10 dias após a aplicação do produto, houve pequeno incremento na atividade da POX para o ASM com inoculação em comparação ao não inoculado, onde possivelmente houve o reconhecimento do patógeno e aumento da atividade dessa enzima (Gráfico 1).

Para o fosfito de potássio sem inoculação o pico da atividade dessa enzima foi um dia após aplicação do mesmo. Observou-se, também, que houve um aumento aos 13 dias após a pulverização. O fosfito de potássio com inoculação não induziu o aumento da atividade da POX, mostrando que o reconhecimento do patógeno não interferiu no aumento da atividade dessa enzima (Gráfico 2).

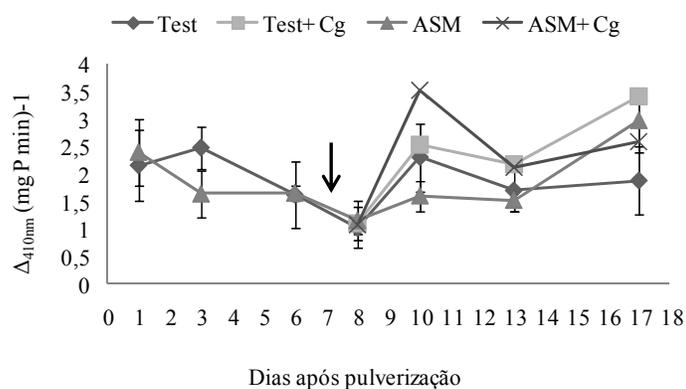


Gráfico 1 Atividade de peroxidase de guaiacol em folhas de caféiro da cultivar Catuai Vermelho, após tratamento com Acibenzolar-S-Metil (0,1g/L), em comparação com a testemunha. A seta indica que a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg) foi realizada sete dias após a pulverização. Barras indicam desvio padrão da média

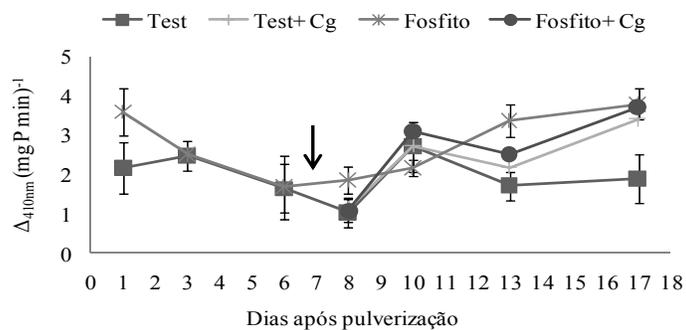


Gráfico 2 Atividade de peroxidase de guaiacol em folhas de caféiro da cultivar Catuai Vermelho, após tratamento com fosfito de potássio (10,0 mL/L) em comparação com a testemunha. A seta indica que a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg) foi realizada sete dias após a pulverização. Barras indicam desvio padrão da média

Resultados semelhantes foram encontrados por Pereira (2009), onde plantas de videira quando tratadas com o fosfito e ASM aumentam a atividade

da POX após 7,5 DAP em relação à testemunha. O pico da atividade dessa enzima ocorreu aos 8 DAP para os dois tratamentos inoculados ou não com *Plasmopara viticola*, agente etiológico do míldio da videira.

Além disso, a aplicação de 25 mM de fosfato de potássio nas primeiras folhas de cevada reduz significativamente a infecção pelo míldio (*Blumeria graminis* f.sp *hordei*) na segunda folha. O mesmo é observado nas atividades das enzimas fenilalanina amônia liase e para a peroxidase, onde o intervalo de aplicação que conferiu essa proteção foi de dois dias, e o aumento ocorreu na segunda folha inoculada com o patógeno (MITCHELL; WALTERS, 2004). Esses autores relatam que o tratamento da cevada com o fosfato de potássio dispara o aumento da atividade das enzimas associadas na defesa de plantas. A aplicação de fosfato de potássio ocasiona proteção sistêmica em pepino, contra *Colletotrichum lagenarium*, provocando rápida morte celular, acompanhada pela explosão oxidativa das células (OROBER; SIEGRIST; BUCHENAUER, 2002).

As POXs são fundamentais na defesa de plantas contra os patógenos e relatadas na literatura como sendo induzidas por fungos, bactérias, vírus e viroides (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). Os papéis das POXs na defesa de plantas é o fortalecimento da parede celular como a formação de lignina, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, ou seja, proteção celular contra reações oxidativas e aumento na produção das fitoalexinas (KRISTENSEN; BLOCH; RASMUSSEN, 1999). A atividade dessa enzima é, frequentemente aumentada em resposta ao ataque de fitopatógenos e aos tratamentos como indutores (ANTEROLA; LEWIS, 2002).

3.2 Atividade de polifenoloxidase

No tratamento com ASM sem inoculação à atividade da polifenoloxidase aumentou aos 8 DAP e permaneceu alta até 10 DAP, mas não

diferiu da testemunha absoluta. Já aos 13 DAP houve outro pico na atividade dessa enzima caindo em seguida aos 17 DAP (Gráfico 3). Resultados semelhantes foram encontrados por Ribeiro Júnior et al. (2006), onde no patossistema *V. dahliae* – Cacaueiro, a aplicação do ASM (0,2 g/L) seguido por inoculação induziu um aumento na atividade de PPO aos 18 DAP.

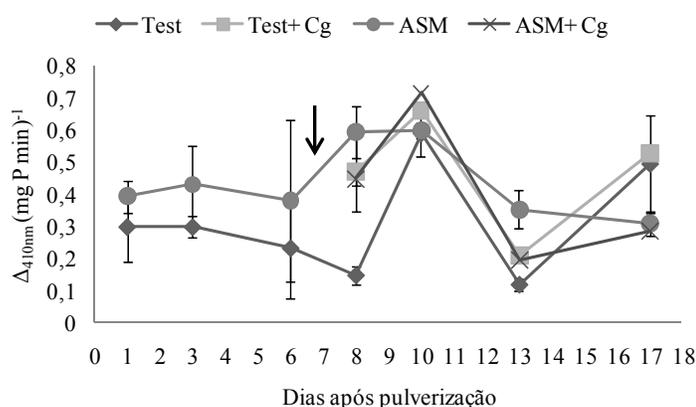


Gráfico 3 Atividade de polifenoloxidase em folhas de cafeeiro da cultivar Catuaí Vermelho, após tratamento com Acibenzolar-S-Metil (0,1g/L), em comparação com a testemunha. A seta indica que a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg) foi realizada sete dias após a pulverização. Barras indicam desvio padrão da média

Já a aplicação do fosfito de potássio sem inoculação teve o pico de atividade dessa enzima aos 6 DAP, e diminuiu logo após a inoculação do patógeno. Aos 13 DAP o fosfito de potássio com inoculação teve a atividade da polifenoloxidase aumentada, apresentando-se superior à testemunha inoculada e ao fosfito de potássio sem inoculação (Gráfico 4). Isso mostra que possivelmente a planta de café reconheceu o patógeno e ativou os mecanismos de defesa com o aumento da atividade da polifenoloxidase.

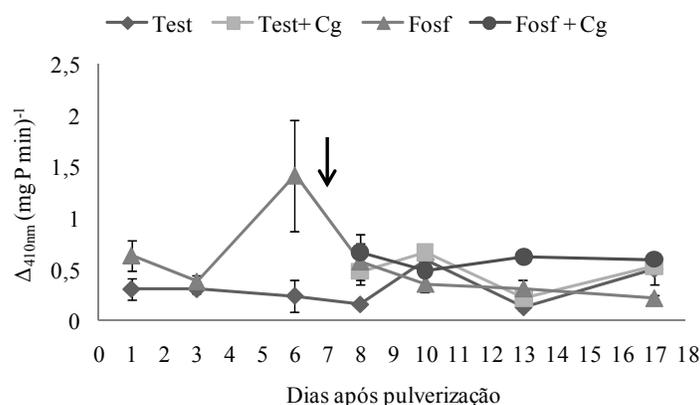


Gráfico 4 Atividade de polifenoloxidase em folhas de cafeeiro da cultivar Catuai Vermelho, após tratamento com fosfito de potássio (10,0 mL/L), em comparação com a testemunha. A seta indica que a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg) foi realizada sete dias após a pulverização. Barras indicam desvio padrão da média

A atividade da polifenoloxidase tem sido estudada em plantas como parte dos mecanismos de defesa induzida, oxidando um amplo grupo de fenóis sem a necessidade de H_2O_2 , ao contrário das peroxidases (NOJOSA et al., 2003). A pulverização de mudas de videira com o fosfito de potássio nas doses 4,5 mL/L e 6,0 mL L⁻¹ aumentou a atividade da PPO a partir dos 10 dias após a aplicação do produto (PEREIRA, 2009). Plantas de feijão que foram tratadas com o fosfito de potássio na dose 5,0 mL L⁻¹ e não inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* apresentaram o pico da atividade de PPO aos 6 dias após a pulverização, ocorrendo um decréscimo desses teores após a inoculação do patógeno (GADAGA, 2009).

3.3 Quitinase e β -1,3-glucanase

A infecção por fitopatógenos é acompanhada pela síntese de várias proteínas, conhecidas como proteínas relacionadas com a patogênese (PRPs),

codificadas pela planta hospedeira. Estas são produzidas por muitas plantas hospedeiras como resposta a infecção por patógenos e participam ativamente no fenômeno de resistência induzida (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997). Entre as PRPs, encontram-se as β -1,3-glucanase e quitinase que apresentam ação direta contra patógenos, degradando a parede celular, com o objetivo de impedir o estabelecimento do patógeno na planta (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

Nesse trabalho não se observou aumento significativo na atividade da enzima β -1,3-glucanase, tanto para o ASM quanto para o fosfito de potássio, porque todos tiveram comportamentos semelhantes à testemunha absoluta (Gráfico 5 e 6). Acredita-se que, nas condições ensaiadas, essa enzima não seja a chave na indução de resistência em cafeeiro contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Esse mesmo resultado foi encontrado por Pereira (2009) trabalhando com mudas de videira na proteção contra o mildio da uva.

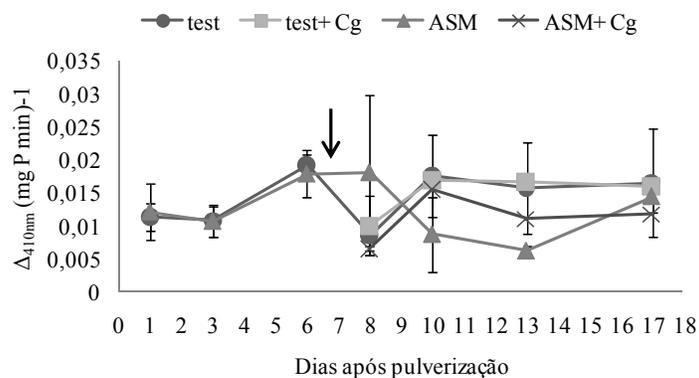


Gráfico 5 Atividade de β -1,3-glucanase em folhas de cafeeiro da cultivar catuai vermelho, após tratamento com acibenzolar-s-metil (0,1g/l), em comparação com a testemunha. a seta indica que a inoculação com *colletotrichum gloeosporioides* (cg) foi realizada sete dias após a pulverização. barras indicam desvio padrão da média

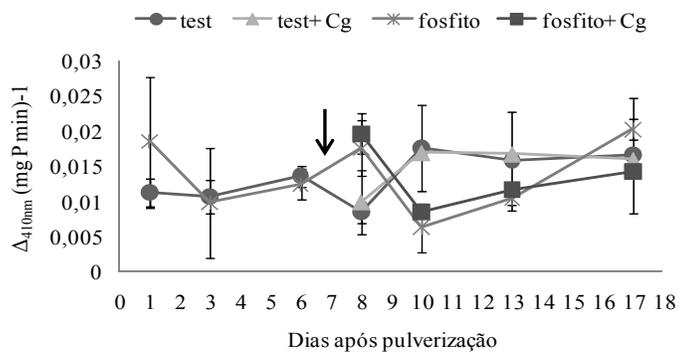


Gráfico 6 Atividade de β -1,3-glucanase em folhas de cafeeiro da cultivar Catuai Vermelho, após tratamento com fosfito de potássio (10,0 mL/L) em comparação com a testemunha. A seta indica que a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg) foi realizada sete dias após a pulverização. Barras indicam desvio padrão da média

Quanto à quitinase, o ASM sem inoculação não apresentou aumento na atividade, ao contrário quando inoculado, que ocorreu o maior incremento em 17 DAP (Gráfico 7). Resultados semelhantes foram encontrados por Ribeiro Júnior (2008), onde em mudas de cafeeiro tratadas com ASM, com e sem inoculação, a atividade da quitinase aumentou consideravelmente entre 1 e 3 DAP, em relação às plantas controle, apresentando maior pico dessa enzima aos 21 DAP. Além disso, a aplicação do ASM em folhas de mudas de cafeeiro induziu um aumento na produção de quitinase e β -1,3-glucanase 1 DAP, permanecendo alta até 35 DAP e reduzindo em torno de 60-80% a severidade da ferrugem alaranjada do cafeeiro (GUZZO et al., 2004).

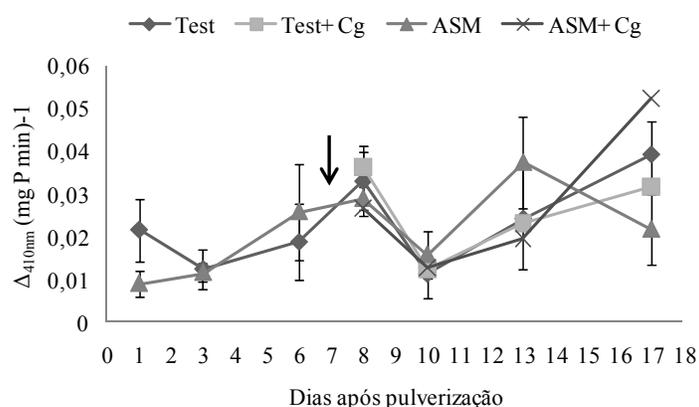


Gráfico 7 Atividade de quitinase em folhas de cafeeiro da cultivar Catuai Vermelho, após tratamento com Acibenzolar-S-Metil (0,1g/L), em comparação com a testemunha. A seta indica que a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg) foi realizada sete dias após a pulverização. Barras indicam desvio padrão da média

Nesse trabalho, o fosfito de potássio sem inoculação teve pequeno incremento na atividade dessa enzima aos 3 DAP, diferindo da testemunha cuja aplicação foi água destilada. Logo após a inoculação o fosfito de potássio diferiu dos demais tratamentos somente aos 13 DAP, mostrando que nesse momento houve um aumento da atividade da quitinase em razão do reconhecimento do

patógeno (Gráfico 8). Ribeiro Júnior (2008) relatou que o fosfito de potássio na dose $5,0 \text{ mL L}^{-1}$ aumentou a atividade da quitinase em mudas de cafeeiro logo após a inoculação com *Cercospora coffeicola* e apresentou maiores atividades aos 21DAP.

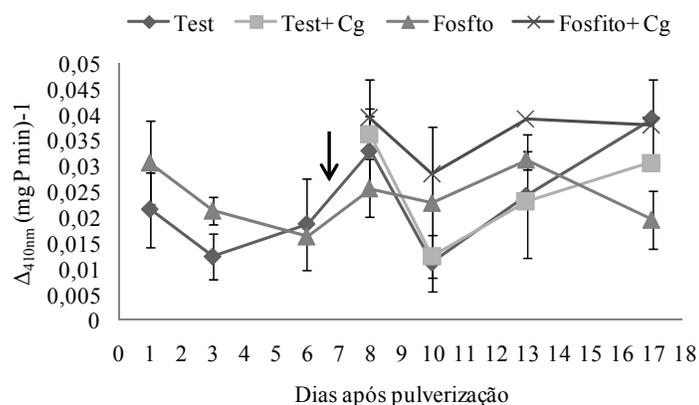


Gráfico 8 Atividade de quitinase em folhas de cafeeiro da cultivar Catuaí Vermelho, após tratamento com fosfito de potássio ($10,0 \text{ mL/L}$) em comparação com a testemunha. A seta indica que a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg) foi realizada sete dias após a pulverização. Barras indicam desvio padrão da média

Em outro trabalho, a aplicação de 50 mM de K_2HPO_4 induziu resistência sistêmica em pepino contra a antracnose causada por *Colletotrichum lagenarium*, pois, ocorreu aumento na atividade da peroxidase e quitinase na segunda folha de pepino quando se aplicou o produto na primeira folha (IRVING; KUC, 1990). Esses autores relatam que nesse patossistema a resistência sistêmica induzida se assemelha à resistência passiva, uma vez que depende da atividade das enzimas associadas a barreiras da parede celular

4 CONCLUSÕES

Ocorreu indução de resistência no patossistema Colletotrichum-Cafeeiro.

A aplicação de 10,0 mL L⁻¹ de fosfito de potássio e 0,1 g L⁻¹ de ASM aumentou a atividade da enzima peroxidase, polifenoloxidase e quitinase.

Não ocorreu aumento na atividade da enzima β-1,3-glucanase para todos os tratamentos.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. S. **Resistência horizontal a *Hemileia vastatrix* Berk & Br. em cafeeiros descendentes do híbrido de Timor.** 1988. 68 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1988.

ANTEROLA, A. M.; LEWIS, N. G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/ mutations on lignifications and vascular integrity. **Phytochemistry**, Oxford, v. 61, n. 3, p. 221-294, Oct. 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, May 1976.

FERREIRA, J. B. **Aspectos histopatológicos, epidemiologia e controle da mancha manteigosa em *Coffea arabica* L.** 2006. 159 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

GADAGA, S. J. C. **Fosfitos na proteção do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) contra a antracnose.** 2009. 82 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

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**, Botucatu, v. 30, n. 3, p. 376-381, jul./ago. 2004.

IRVING, H. R.; KUC, J. A. Local and systemic induction of peroxidase, chitinase and resistance in cucumber plants by K_2HPO_4 . **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 37, n. 5, p. 355-366, Nov. 1990.

KRISTENSEN, B. K.; BLOCH, H.; RASMUSSEN, S. K. Barley coleoptile peroxidases: purification, molecular cloning, and induction by pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, n. 2, p. 501–512, June 1999.

MITCHELL, A. F.; WALTERS, D. R. Potassium phosphate induces systemic protection in barley to powdery mildew infection. **Pest Management Science**, Malden, v. 60, n. 2, p. 126-134, Feb. 2004.

NOJOSA, G. B. A. et al. Componentes fenólicos e enzimas oxidativas em clones de *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 148-154, mar./abr. 2003.

OROBER, M.; SIEGRIST, J.; BUCHENAUER, H. Mechanisms of phosphate-induced disease resistance in cucumber. **European journal of Plant Pathology**, London, v. 108, n. 4, p. 345-353, May 2002.

PEREIRA, V. F. **Fosfitos no manejo do míldio da videira: eficácia e modo de ação**. 2009. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

RIBEIRO JÚNIOR, P. M. **Fosfitos na proteção e na indução de resistência do cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* e *Cercospora coffeicola***. 2008. 105 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B. M.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, n. 1, p. 235-270, Sept. 1997.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, n. 1, p. 453-483, Sept. 1998.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. 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.

CAPITULO 4

**Ação do fosfito de potássio nos eventos de germinação e penetração de
Colletotrichum gloeosporioides: avaliação por meio da microscopia
eletrônica de varredura**

RESUMO

A microscopia eletrônica é uma ferramenta fundamental para se conhecer as relações interparasitárias entre o patógeno e seu hospedeiro. O objetivo desse trabalho foi verificar, por meio da microscopia eletrônica de varredura, os eventos de germinação e penetração de *Colletotrichum gloeosporioides* em folhas de café. Pulverizou-se o fosfito de potássio nas doses 1,25; 2,5; 5,0 e 10,0 mL L⁻¹; Acibenzolar-S-Metil 0,1 g/L e água destilada em plantas adultas de café da cultivar Catuaí Vermelho localizadas no campo experimental da UFLA. Sete dias depois as folhas foram coletadas e, no laboratório, realizou-se o experimento com folhas destacadas. Para a avaliação da germinação coletaram-se amostras 4, 8, 12, 24 horas após a inoculação (HAI) e para penetração 8, 16, 24, 48, e 96 horas. O preparo das amostras para a visualização ao microscópio eletrônico de varredura seguiu o protocolo do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural da UFLA. Não houve interferência dos tratamentos na germinação e penetração do patógeno. O início da germinação dos conídios ocorreu em 4 HAI. A quantidade de conídios germinados aumentou com 8 HAI, porém, não se observou a formação de apressórios. Estes começaram a ser formados 12 HAI e teve o máximo de formação 24 horas depois. A penetração do patógeno ocorreu na maioria das vezes mecanicamente e 16 HAI observaram-se a presença de hifas dentro das folhas de café.

Palavras-chave: Mancha manteigosa. *Coffea arabica*. Microscopia eletrônica.

ABSTRACT

Electron microscopy is an essential tool for exploring the relationship between the pathogen and its host. The aim of this study was to verify, by scanning electron microscopy, the events of germination and penetration of *Colletotrichum gloeosporioides* on leaves of coffee. We sprayed the potassium phosphite at doses 1.25, 2.5, 5.0 and 10.0 mL L⁻¹; Acibenzolar-S-methyl 0.1 g / L and distilled water in adult plants of the cultivar Catuaí Vermelho located in the experimental field in Federal University of Lavras (UFLA). Seven days later, the leaves were collected and in the laboratory, we carried out the experiment with detached leaves. To evaluate the germination sample was collected 4, 8, 12, 24 hours after inoculation (HAI) and for penetration 8, 16, 24, 48, and 96 hours. The preparation of samples for viewing by scanning electron microscopy followed the protocol of the Laboratory of Electron Microscopy and Ultrastructural analysis of UFLA. There was no effect of treatments on the germination and penetration of the pathogen. The initiation of spore germination occurred at 4 HAI. The amount of germinated conidia increased with 8 HAI, but did not observe the formation of appressoria. These began to be formed 12 HAI and had the maximum 24 hours after. The penetration of the pathogen occurred mostly mechanically and 16 HAI observed the presence of hyphae within the leaves of coffee.

Keywords: Spot butterfly. *Coffea arabica*. Electron microscopy.

1 INTRODUÇÃO

Uma compreensão dos eventos de pré-penetração, de como o patógeno infecta e coloniza o hospedeiro e como a planta estabelece mecanismos de resistência pré e pós-formados, é fundamental para entender como os sintomas da infecção são gerados e o estabelecimento de medidas de controle da doença. Para visualizar esses processos, a microscopia eletrônica tem proporcionado contribuições fundamentais para a ciência, representando importantes ferramentas para o entendimento dos processos relacionados ao desenvolvimento das doenças em plantas, ou seja, da adesão, germinação, colonização e reprodução dos patógenos, bem como das relações interparasitárias.

Nessas relações parasitárias a planta de café defende-se dos agentes fitopatogênicos passiva ou ativamente, permitindo atrasar ou evitar a entrada dos mesmos. Dentre esses mecanismos de defesa encontram-se os fatores de resistência pós-formados, estruturais e bioquímicos, os quais podem ser induzidos pela aplicação de produtos utilizados como indutores de resistência, como por exemplo, o fosfito de potássio.

Técnicas, como as de microscopia eletrônica, têm permitido realizar descrição de alguns mecanismos de resistência e na relação *Colletotrichum gloeosporioides*-cafeeiro existem importantes trabalhos relacionados nessa área de pesquisa (FERREIRA et al., 2010; LINS; ABREU; ALVES, 2007; PEREIRA et al., 2009). Porém, ainda são escassas as informações desses eventos para esse patossistema quando se aplica um produto alternativo no controle, como os indutores de resistência.

Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar, por meio da microscopia eletrônica de varredura, os eventos de germinação e penetração de *Colletotrichum gloeosporioides* em café, quando aplicado o fosfito de potássio

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* e ajuste da suspensão de esporos

O isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* foi obtido de seca de ponteiros de cafeeiros, com sintomas foliares da mancha manteigosa, no campo experimental da UFLA. Tecidos infectados foram desinfestados com álcool a 50% por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 1%, por 1 minuto, lavados em água destilada e esterilizada e secos em papel de filtro esterilizado, em seguida, transferidos para placa de Petri contendo meio de cultura MEA a 2% (extrato de malte e ágar) e mantidos, durante sete dias, em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Em seguida foi realizado o teste de patogenicidade e obtidas as culturas monospóricas. A suspensão de esporos foi ajustada para 2×10^6 conídios/mL em câmara de contagem de Neubauer.

2.2 Aplicação dos produtos

Folhas de plantas adultas de cafeeiro da cultivar Catuaí Vermelho obtidas no campo experimental da Universidade Federal de Lavras, foram previamente marcadas e tratadas com os tratamentos representados na tabela 1. Sete dias após as aplicações, as folhas do segundo e terceiro par de ramos do terço médio da planta foram destacadas e levadas para o laboratório, em seguida, foram lavadas em água corrente e colocadas com a face abaxial para cima, em bandejas plásticas cobertas com papel alumínio perfurado e forradas com algodão umedecidos com água destilada e esterilizada, para posterior inoculação.

Tabela 1 Tratamentos pulverizados em plantas adultas de cafeeiro no campo experimental da Universidade Federal de lavras sete dias antes da inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*

Tratamentos	Produtos	Doses	Empresas
Fosfito de Potássio	Reforce ®	1,25 mL/L	Agrichem do Brasil Ltda
Fosfito de Potássio	Reforce ®	2,5 mL/L	Agrichem do Brasil Ltda
Fosfito de Potássio	Reforce ®	5,0 mL/L	Agrichem do Brasil Ltda
Fosfito de Potássio	Reforce ®	10,0 mL/L	Agrichem do Brasil Ltda
ASM	Bion ®	0,2g/L	Syngenta Proteção de Cultivos Ltda
Testemunha	Água Destilada	-----	-----

2.3 Inoculação

A inoculação foi realizada com uma gota de 10 µL da suspensão de *Colletotrichum gloeosporioides*, na face abaxial das folhas, em locais marcados com discos autocolantes com orifícios de 1,4 cm de diâmetro. Foram feitos ferimentos nos locais da inoculação com um conjunto de agulhas entomológicas para permitir a penetração e colonização do fungo. Posteriormente sobre a área inoculada, colocou-se um disco de papel semipermeável com 1,3 cm de diâmetro, previamente umedecido, formando uma micro câmara úmida (ABREU, 1988). Em seguida, as bandejas plásticas foram cobertas com plástico transparente e colocadas em câmara de crescimento com temperatura média de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.4 Coleta das amostras

A partir da área inoculada, demarcada com os discos auto colantes, foram coletadas amostras nos tempos de 4, 8, 12, 24 horas após a inoculação, na

área limítrofe de ferimento, cujo objetivo foi o de acompanhar a dinâmica de germinação do fungo e amostras com 8, 16, 24, 48, e 96 horas para acompanhar a dinâmica de penetração e ação dos tratamentos sobre as estruturas do fungo na planta, onde em cada bandeja foram colocadas nove folhas para cada tratamento (9 tempos) e em cada folha quatro discos autocolantes (4 repetições).

Em cada tempo, fragmentos das folhas com 0,5 X 0,5 cm foram transferidas para microtubos de plástico contendo 1,5 mL de solução fixadora (Karnovsky's modificado), pH 7,2, por um período de 24 horas. O preparo e a observação das amostras em microscópio eletrônico de varredura foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural (LME) do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), de acordo com a metodologia do laboratório, proposta por Alves (2004).

2.5 Preparo das amostras para a visualização no microscópio eletrônico de varredura (MEV)

As amostras foram retiradas do fixador primário e transferidas para outros microtubos plásticos contendo tampão cacodilato 0,05M, onde permaneceram por dez minutos. O tampão foi trocado três vezes utilizando de micropipeta de plástico. Em seguida, as mesmas foram imersas em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cocodilato por duas horas à temperatura ambiente. Depois as amostras foram lavadas com água destilada por três vezes e desidratada em série de acetona (25%, 50%, 75%, 90%- 10 minutos e 100% por três vezes de 10 minutos). Após essa etapa, as amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico (Balzers CPD 030) para a complementação da secagem. Secas, as amostras foram montadas em cilindros de alumínio com 12mm de diâmetro, cobertos com fita de carbono para a aderência das mesmas,

em seguida foram submetidas à metalização com ouro, no vaporizador Balzers SCD 050 e observadas em MEV.

Para avaliar os eventos de penetração as amostras foram retiradas do fixador primário e transferidas para glicerol 30% por 30 minutos. Em seguida, imergidas em recipiente de isopor contendo nitrogênio líquido e cortadas com bisturi sobre uma placa de metal. Seccionados transversalmente, os fragmentos foram colocados em microtubos plásticos contendo água destilada e preparados para MEV como descrito anteriormente.

As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP. As imagens geradas foram gravadas e manipuladas no software Photopaint, do pacote Corel Draw 12.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na interação *Colletotrichum gloeosporioides*-cafeeiro, a germinação dos conídios em hipocótilos ocorre 6 horas após inoculação, com ferimento e 12 horas sem ferimento (PEREIRA et al., 2009). Resultados semelhantes foram observados por Lins, Abreu e Alves (2007), onde a germinação dos conídios ocorreu 5 horas após inoculação para *Colletotrichum gloeosporioides*, 12 horas para *Colletotrichum acutatum* e 24 horas para *Colletotrichum dematium*, inoculados em folhas e hipocótilos de plântulas de cafeeiro proveniente de cultura de tecidos.

Ferreira et al. (2009) relataram que os conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de plantas com sintomas foliares de mancha manteigosa germinam entre 6 a 8 horas após inoculação em folhas e produzem apressórios 12 horas após.

A germinação de conídios dentro do gênero *Colletotrichum* é bastante variável, iniciando-se entre 3 e 48 horas (BAILEY et al., 1992; PEREIRA et al., 2009) dependendo, ainda, de fatores externos como temperatura (OROZCO, 2003), presenças de compostos químicos (LIU; KOLATTUKUDY, 1998) e presença de materiais exógenos (BAILEY et al., 1992; SKIPP et al., 1995).

Neste trabalho, o início da germinação dos conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* em folhas de cafeeiro, para todos os tratamentos, ocorreu em 4 horas após a inoculação do patógeno (HAI) (Figura 1A e 1B). A quantidade de conídios germinados aumentou com 8 HAI, porém, não se observou a formação de apressórios (Figura 1C). Estes começaram a ser formados 12 horas depois da inoculação (Figura 1D e 1E) e teve o máximo de formação a 24 horas depois (Figura 1F, 1G e 1H).

Chen et al. (2003) relataram que a formação de apressórios por *Colletotrichum gloeosporioides* sobre folhas de cafeeiro ocorreu 6 horas após

inoculação, sendo este, o mesmo tempo necessário para a formação de apressórios em frutos verdes inoculados. Estes autores mencionam que o máximo de formação de apressórios ocorreu 18 HAI, enquanto que para *Colletotrichum kahawae* inoculado sobre folhas e frutos de café apresentou máxima formação de apressórios 6 HAI.

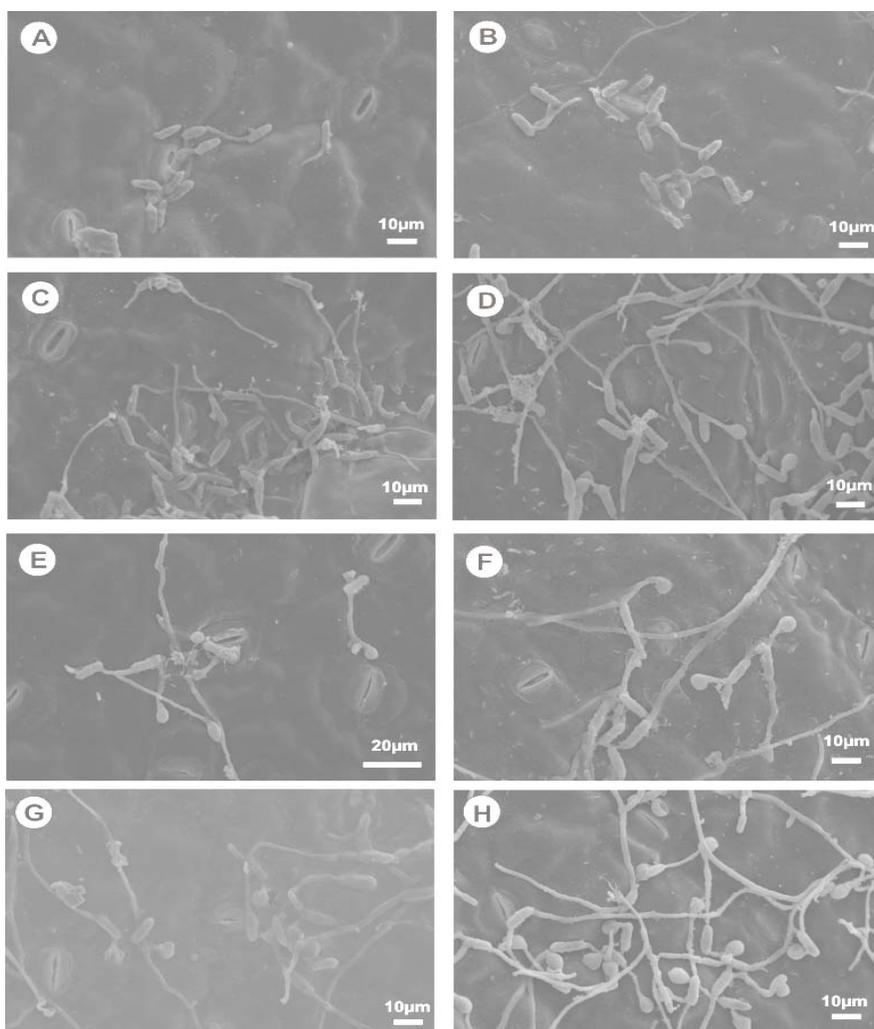


Figura 1 Eletromicrografia de varredura mostrando a dinâmica de germinação de *Colletotrichum gloeosporioides* em folhas de café tratado com: fosfito de potássio 1,25; 2,5; 5,0 e 10 mL L⁻¹; ASM 0,1g L⁻¹ e água destilada esterilizada. (A) fosfito de potássio 1,25mL L⁻¹ 4 horas após inoculação. (B) Testemunha inoculada 4 horas após inoculação. (C) fosfito de potássio 10,0 mL L⁻¹ 8 horas após inoculação. (D) Fosfito de potássio 2,5 mL L⁻¹ 12 horas após inoculação. (E) Fosfito de potássio 10,0 mL L⁻¹ 12 horas após inoculação. (F) ASM 0,1 g L⁻¹ 24 horas após inoculação. (G) Fosfito de potássio 5,0 mL L⁻¹. (H) Testemunha 24 horas após inoculação

Na interação *Colletotrichum*-cafeeiro, poucos são os trabalhos que evidenciam os processos de penetração do patógeno, principalmente, quando se aplica um produto indutor de resistência. Neste trabalho, a penetração ocorreu na maioria das vezes de forma direta e raramente por meio dos estômatos (Figura 2 A), onde a partir de 12 horas após inoculação observou-se a degradação da cutícula pela aderência dos apressórios (Figura 2B). Esses resultados, também, foram observados por Ferreira et al. (2009) e Pereira et al. (2009). A penetração mecânica da hifa de infecção no hospedeiro é ocasionada em função da formação de apressórios com sua respectiva melanização (FERREIRA et al., 2009). Isso acontece para a maioria das espécies de *Colletotrichum*, principalmente, aquelas que infectam tecidos novos (BAILEY et al., 1992).

Não houve diferença no processo de penetração do patógeno para todos os tratamentos utilizados (Figura 2D, 2E). Pois, em ambos, observou-se a presença de hifas dentro dos tecidos de folhas de cafeeiro a partir de 16 horas após inoculação (Figura 2C) e isso foi observado até 96 HAI. (2F, 2G, 2H).

Isso ocorreu possivelmente em função da formação de apressórios ter ocorrido entre 12 e 24 horas após inoculação. Porque os mesmos têm funções de adesão, penetração e sobrevivência do patógeno (FERREIRA et al., 2009). Os eventos envolvidos na pré penetração e penetração das espécies de *Colletotrichum* parecem ser análogas, porém, existem diferenças entre as espécies no mecanismo de adesão, melanização e produção de cutinases para penetração na cutícula da planta (PERFECT et al., 1999).

Vários autores relatam que a colonização de *Colletotrichum* spp. associado ao cafeeiro ocorre sistematicamente, translocando-se dentro da planta de modo descendente e ascendente (FERREIRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2009).

Nesse trabalho a ineficiência do fosfito de potássio em reduzir a germinação e penetração de *Colletotrichum gloeosporioides* possivelmente está

relacionada com o pouco tempo que o produto ficou na planta, já que aos sete dias após a aplicação as folhas foram destacadas para posterior inoculação em laboratório. Além disso, ao retirar a folha da planta no campo, possivelmente alterou a sua fisiologia e, conseqüentemente, não conseguiu reduzir a colonização do patógeno.

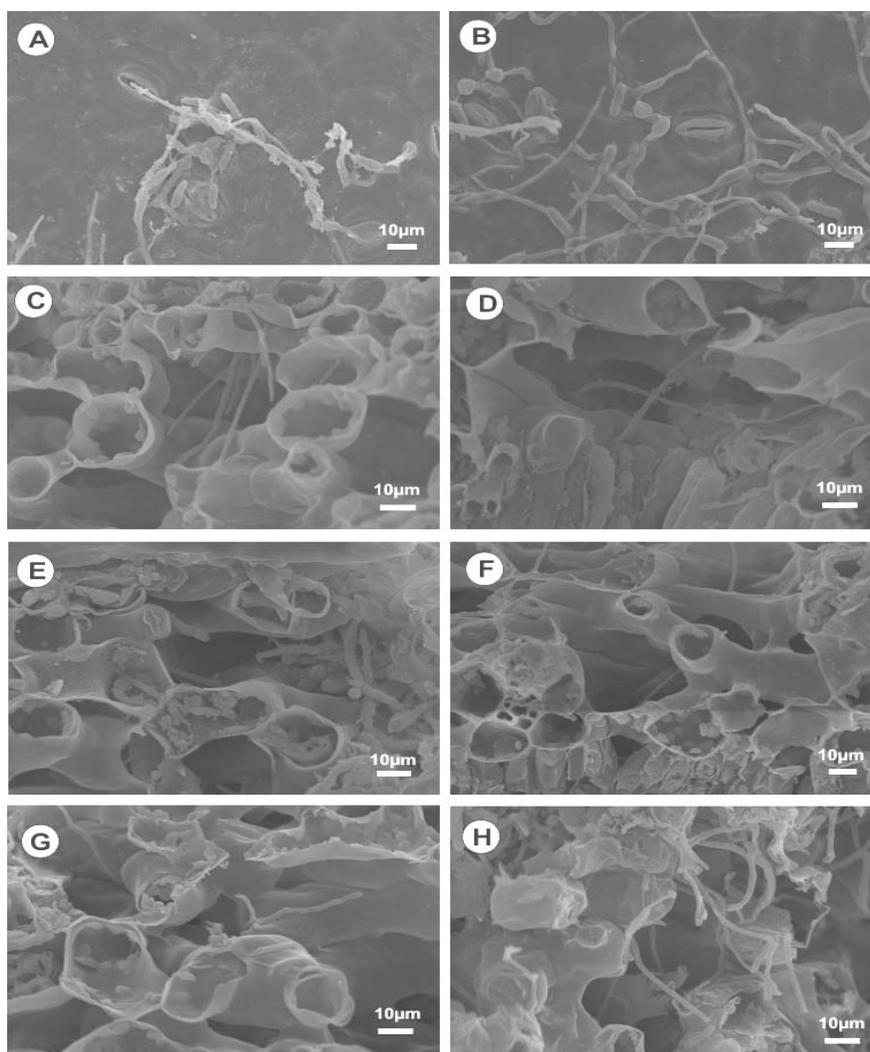


Figura 2 Eletromicrografia de varredura mostrando a dinâmica de penetração de *Colletotrichum gloeosporioides* em folhas de cafeeiro tratadas com: fosfito de potássio 1,25; 2,5; 5,0 e 10 mL L⁻¹; ASM 0,1g L⁻¹ e água destilada esterilizada. (A) fosfito de potássio 5,0 mL L⁻¹ 12 horas após inoculação. (B) Testemunha 24 horas após inoculação. (C) Testemunha 16 horas após inoculação. (D) Fosfito de potássio 10,0 mL L⁻¹ 24 horas após inoculação. (E) Fosfito de potássio 10,0 mL L⁻¹ 48 horas após inoculação. (F) ASM 0,1 g L⁻¹ 48 horas após inoculação. (G) Fosfito de potássio 5,0 mL L⁻¹ 96 horas após inoculação (H) Testemunha 96 horas após inoculação

4 CONCLUSÕES

O fosfito de potássio (nas condições ensaiadas) não alterou a dinâmica de germinação e penetração de *Colletotrichum gloeosporioides*.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. S. **Resistência horizontal a *Hemileia vastatrix* Berk & Br. em cafeeiros descendentes do Híbrido de Timor.** 1988. 68 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1988.

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura.** Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 43 p. Apostila.

BAILEY, J. A. et al. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). ***Colletotrichum* biology, pathology and control.** Wallingford: CAB International, 1992. p. 88-120.

CHEN, Z. J. et al. Heat shock-induced susceptibility of green coffee leaves and berries to *Colletotrichum gloeosporioides* and its association to PR and hsp70 gene expression. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 63, n. 4, p. 181-190, Oct. 2003.

FERREIRA, J. B. et al. Eventos do processo de infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* inoculados em folhas de *Coffea arabica* L. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 4, p. 273-281, out./dez. 2009.

FERREIRA, J. B. et al. Transmissibilidade e efeito do tratamento de sementes de cafeeiros com mancha manteigosa (*C. gloeosporioides*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 101-108, jan./fev. 2010.

LINS, S. R. O.; ABREU, M. S.; ALVES, E. Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 488-496, nov./dez. 2007.

LIU, Z. M.; KOLATTUKUDY, P. E. Identification of a gene product induced by hard-surface contact of *Colletotrichum gloeosporioides* conidia as an ubiquitin-conjugating enzyme by yeast complementation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, n. 14, p. 3592–3597, July 1998.

OROZCO, E. F. M. **Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae***. 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

PEREIRA, I. S. et al. Estudos histopatológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides* – cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 1, p. 117-123, out. 2009.

PERFECT, S. E. et al. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 27, n. 2/3, p. 186-198, July/Aug. 1999.

SKIPP, R. A. et al. *Colletotrichum*. In: KOHMOTO, K.; SINGH, U. S.; SINGH, R. P. (Ed.). **Pathogenesis and host specificity in plant diseases**. Pergamon: Elsevier Science, 1995. p. 119-142.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As utilizações dos fosfitos no manejo de doenças de plantas têm se destacado nos últimos anos. Pois, apresentam ação direta contra os patógenos, são capazes de ativar respostas de defesa induzidas em plantas e são comercializados como adubos foliares. Além disso, contribuem para a produção de alimentos mais saudáveis, sendo menos tóxicos ao homem e ao meio ambiente.

No presente trabalho, o fosfito de potássio mostrou-se promissor no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em mudas de cafeeiro, pois, além de ter efeito direto no patógeno, também, induziu a ativação de algumas enzimas de defesa das plantas. Porém, torna-se necessário a continuação de estudos de manejo nesse patossistema com outras fontes de fosfitos, como por exemplo, o fosfito de cobre que está tendo bastante sucesso no controle da ferrugem do cafeeiro e, também, a utilização de misturas com fungicidas.

Apesar de ter observado o efeito direto *in vitro* do fosfito de potássio contra *Colletotrichum gloeosporioides* o mesmo não foi observado por meio da microscopia eletrônica de varredura *in vivo*, isso porque, não se aplicou o produto como sendo curativo. Então, a utilização da microscopia eletrônica para verificar se um produto indutor de resistência também atua diretamente no patógeno depende do tempo de aplicação do mesmo.