



**NATÁLIA FAUSTINO PIRES**

**ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DE  
GENES RELACIONADOS À DEFESA INDUZIDA  
EM *Coffea arabica* POR SOLOFLEX<sup>®</sup> E  
REFORCE<sup>®</sup> CONTRA *Hemileia vastatrix***

**LAVRAS - MG**

**2011**

**NATÁLIA FAUSTINO PIRES**

**ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DE GENES  
RELACIONADOS À DEFESA INDUZIDA EM *Coffea arabica* POR  
SOLOFLEX<sup>®</sup> E REFORCE<sup>®</sup> CONTRA *Hemileia vastatrix***

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

Orientador

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende

**LAVRAS - MG**

**2011**

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

Pires, Natália Faustino.

Análise quantitativa da expressão de genes relacionados à defesa induzida em *Coffea arabica* por Soloflex® e Reforce® contra *Hemileia vastatrix* / Natália Faustino Pires. – Lavras : UFLA, 2011. 61 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.  
Orientador: Mario Lúcio Vilela de Resende.  
Bibliografia.

1. Cafeeiro. 2. Ferrugem alaranjada. 3. Indução de resistência. 4. Fertilizantes foliares. 5. Doença fúngica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.7323

**NATÁLIA FAUSTINO PIRES**

**ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DE GENES  
RELACIONADOS À DEFESA INDUZIDA EM *Coffea arabica* POR  
SOLOFLEX<sup>®</sup> E REFORCE<sup>®</sup> CONTRA *Hemileia vastatrix***

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

APROVADA em 28 de fevereiro de 2011.

Dr. Eduardo Romano de Campos Pinto                      EMBRAPA

Dr. Luciano Vilela Paiva    UFLA

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2011**

*A Deus*

*À minha família*

*Ao meu namorado, Davi*

*Aos meus amigos*

*Aos que acreditaram...*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus caminhos e permitir que eu chegasse até aqui.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT), pela concessão de bolsa durante o curso através da CAPES.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, onde realizei parte dos experimentos.

À minha família, pelo apoio e confiança.

À minha amiga, Eula, pela força e ajuda nos experimentos.

Ao Davi, meu namorado, pelo carinho, paciência, apoio emocional e por suas orações.

A Neusa, minha sogra, pelas orações, força e credibilidade.

Ao prof. Dr. Mário Lúcio V. Resende, pela oportunidade de tê-lo como orientador deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Dr. Eduardo Romano, pelos ensinamentos transmitidos, pelo incentivo e pela confiança.

Ao prof. Dr. Luciano Paiva, pela oportunidade e disponibilização do Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA, por ele coordenado, onde realizei parte dos experimentos.

Aos colegas do LCBM e LFP da UFLA, em especial, Pedro e Eula.

A Magda, pelo apoio na etapa final e crucial deste trabalho.

À amiga Fábria da UFRJ, pela ajuda com os experimentos e pelo incentivo.

Aos colegas do LPPI e LPP2 da Embrapa, em especial Sineide e Lecir, pelo apoio e por sua amizade.

Aos amigos de Lavras, em especial Lúdia e família, pelo apoio, força e carinho, jamais esquecidos.

A Lidiane, Gaby e Aninha, pela amizade e apoio durante minha estada em Lavras.

Por fim, a todos que mesmo não mencionados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, muito obrigada!

*“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima”.* (Louis Pasteur).

*“Se o conhecimento pode criar problemas, não é através da ignorância que podemos solucioná-los”.* (Isaac Asimov).

## RESUMO

Entre várias doenças que atingem o cafeeiro, a ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, é uma das mais destrutivas, podendo ocasionar decréscimos na produção que variam de 35% a 50%. Diversos estudos vêm sendo realizados a partir da perspectiva do controle dessa doença pela ativação de mecanismos de defesa inerentes às plantas, através da aplicação prévia de produtos bióticos ou abióticos, não tóxicos, que atuam como indutores de resistência. Soloflex<sup>®</sup> e Reforce<sup>®</sup> são dois indutores de resistência que já comprovaram sua eficácia no controle ao fungo *Hemileia vastatrix*, mas os mecanismos moleculares que controlam a resistência são pouco conhecidos. Este trabalho estudou, pela primeira vez, a expressão de genes relacionados à defesa induzida por esses dois elicitores. A estratégia utilizada foi a avaliação da expressão quantitativa de genes marcadores das vias SAR e ISR após o tratamento com esses elicitores. Desta forma, a expressão dos genes *AOS2*, *GLU1* e *PR5*, foi avaliada por PCR após tratamento com Soloflex<sup>®</sup> e Reforce<sup>®</sup> em cafeeiro, em tempo Real. Análises do perfil de expressão de cada gene indicaram que os tratamentos com Soloflex<sup>®</sup> e Reforce<sup>®</sup> induziram a expressão do gene *GLU1* em mudas de cafeeiro suscetíveis à ferrugem alaranjada 192 e 24 horas, respectivamente, após a pulverização. Para o gene *AOS2*, houve indução após 24 horas apenas para as plantas tratadas com Reforce<sup>®</sup>. O gene *PR5* apresentou aumento da expressão 24 horas após o tratamento com os dois indutores, Soloflex<sup>®</sup> e Reforce<sup>®</sup>. A expressão gênica foi potencializada pelo patógeno em mudas de cafeeiro pulverizadas com Soloflex<sup>®</sup> e Reforce<sup>®</sup> para os genes *GLU1* e *PR5*. Para o gene *GLU1*, a indução ocorreu 24 horas após a inoculação das plantas pulverizadas tanto com Reforce<sup>®</sup>, quanto com Soloflex<sup>®</sup> e, para o gene *PR5*, a indução ocorreu 24 horas após a inoculação nas plantas tratadas com Reforce<sup>®</sup> e 48 horas após a inoculação naquelas tratadas com Soloflex<sup>®</sup>, não se observando variações significativas de indução para o gene *AOS2*. Nossos dados sugerem então que o tratamento das plantas de café com Soloflex<sup>®</sup> e Reforce<sup>®</sup> aumentam a expressão de genes relacionados à resposta de defesa, resposta esta mediada pelo ácido salicílico e pelo ácido jasmônico. Estudos mais detalhados deverão ser conduzidos futuramente para confirmar esta hipótese.

Palavras chave: Defesa induzida. Cafeeiro. *Hemileia vastatrix*. PCR em tempo real.

## ABSTRACT

The coffee rust, or coffee leaf rust caused by *Hemileia vastatrix* one of the most devastating diseases of coffee plants. It decreases significantly the crop yield, which damages and economic losses could range from 35% to 50%. Several studies are being undertaken aiming at controlling this disease through the activation of the natural defense mechanisms of the coffee plant by prior application of biotic or abiotic products. Soloflex<sup>®</sup> and Reforce<sup>®</sup> are two resistance inducers that have proven to be very effective in controlling *Hemileia vastatrix*. However, the molecular mechanisms mediating responses to these products are little known. In this work, we present for the first time, a study on the gene expression involved in the induced defense by these two elicitors. We evaluated the quantitative expression for the gene markers of SAR and ISR pathways upon treatment with these two elicitors. Thus, we evaluated real time quantitative PCR for the gene expression in coffee for *AOS2*, *GLU1* e *PR5* after treatment with Soloflex<sup>®</sup> and Reforce<sup>®</sup>. Analysis of each gene expression profile that treatments with Soloflex<sup>®</sup> and Reforce<sup>®</sup> induced gene expression in coffee seedling *GLU1* susceptible to leaf rust 192 and 24 hours, respectively, after spraying. *AOS2* for gene induction upon 24 hours there for the plants treated with Reforce<sup>®</sup> only. Expression of the *PR5* gene increased upon 24 hours of treatment with both inducers, Soloflex<sup>®</sup> and Reforce<sup>®</sup>. The gene expression was enhanced by the pathogen in coffee seedling sprayed with Soloflex<sup>®</sup> and Reforce<sup>®</sup> for *GLU1* and *PR5* genes. *GLU1* for gene induction occurred 24 hours upon inoculation of plants treated with both Reforce<sup>®</sup> and with Soloflex<sup>®</sup>. While the *PR5* gene induction occurred 24 hours upon inoculation for plants treated with Reforce<sup>®</sup> and 48 hours upon inoculation on plants treated with Soloflex<sup>®</sup>. No significant variations were observed for the *AOS2* gene induction. Our data demonstrate that these two products increase the gene expression related to defense responses in coffee plants. Accordingly, our data suggest that coffee plants treatment with Soloflex<sup>®</sup> and Reforce<sup>®</sup> showed an increase in the gene expression related to their defense responses, which was mediated by the salicylic acid and the jasmonic acid. Further and detailed studies should be conducted to confirm this hypothesis.

Keywords: Induced defense. Coffee. *Hemileia vastatrix*. Real time PCR.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	14
2.1	Considerações gerais sobre a interação <i>Coffea arabica</i> - <i>Hemileia vastatrix</i> .....	14
2.2	Indução de resistência .....	16
2.3	Mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na indução de resistência .....	18
2.4	Indutores de resistência .....	22
2.4.1	Reforce® - fertilizante foliar à base de fosfito .....	25
2.4.2	Soloflex® - fertilizante foliar à base de ácido húmico e fúlvico .....	27
3	MATERIAL E MÉTODO .....	29
3.1	Planta e patógeno .....	29
3.2	Obtenção e inoculação do patógeno .....	29
3.3	Avaliação da indução de resistência em plantas de café suscetíveis .....	30
3.4	Extração do RNA .....	31
3.5	Quantificação do RNA total e tratamento com DNase I .....	32
3.6	Síntese de DNA complementar (cDNA) .....	33
3.7	Busca <i>in silico</i> para escolha de genes relacionados à SAR .....	33
3.8	Desenho e síntese de <i>primers</i> .....	34
3.9	RT-qPCR .....	36
4	RESULTADOS .....	38
4.1	Quantificação do nível de expressão dos genes <i>AOS2</i> , <i>GLU1</i> e <i>PR5</i> por PCR em tempo real, avaliado em mudas de cafeeiro após tratamento com Reforce® e Soloflex® .....	38
4.2	Quantificação do nível de expressão dos genes <i>AOS2</i> , <i>GLU1</i> e <i>PR5</i> por PCR em tempo real avaliado em mudas de cafeeiro inoculadas com <i>Hemileia vastatrix</i> após terem sido tratadas com Reforce® e Soloflex® .....	41
5	DISCUSSÃO .....	43
6	CONCLUSÃO .....	47
	REFERÊNCIAS .....	48

## 1 INTRODUÇÃO

O café é uma das mais importantes culturas do comércio agrícola mundial e este fato faz com que os cafeicultores busquem, continuamente, aumentar a produtividade e reduzir os custos de sua produção. Representa também uma fonte significativa de renda para vários países da América Latina, África e Ásia (DA MATTA, 2004) e é uma das espécies agrônômicas mais importantes para o Brasil, principal produtor e exportador mundial desta cultura (FURLANI JÚNIOR et al., 2007). Dentre as espécies cultivadas, *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre (café robusta) são as mais importantes economicamente, sendo a primeira responsável por 70 % do café comercializado mundialmente (FAZUOLI et al., 2002; MATIELLO et al., 2002).

Existem várias doenças que atingem o cafeeiro, dentre essas, a ferrugem alaranjada causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* (Berkeley & Broome) é uma das doenças mais destrutivas, podendo ocasionar decréscimos na produção que variam entre 35% e 50% (MATIELLO et al., 2002; ZAMBOLIM et al., 2002).

Entre os métodos de controle da ferrugem, no Brasil, o controle químico tem se mostrado eficaz e vem sendo realizado através da utilização de fungicidas protetores cúpricos e/ou de fungicidas sistêmicos do grupo dos triazóis. O uso racional desses produtos tem efeito benéfico no curto prazo, no entanto, no longo prazo, pode ocorrer a seleção de novas raças resistentes aos fungicidas aplicados, além da contaminação do ecossistema e de danos à saúde humana. Além desses aspectos, devido ao seu efeito na microbiota, eliminando inimigos naturais, pode levar ao agravamento de outras doenças e pragas do cafeeiro (MATIELLO et al., 2002; ZAMBOLIM et al., 2002). Para contornar esse problema, vários estudos estão sendo realizados com o objetivo de métodos

alternativos de controle de doenças de plantas, de baixo impacto ambiental (GUZZO et al., 2001; TOYOTA, 2008).

Existe ainda a perspectiva de controle da doença pela ativação dos mecanismos de defesa inerentes das plantas, através da aplicação prévia de produtos bióticos ou abióticos, não tóxicos, que atuam como indutores de resistência (MARTINS, 1991; MORAES, 1992). Essa forma de resistência à doença induzida (*induced disease resistance*) em plantas suscetíveis pode ser dividida em SAR (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) e em indução de resistência sistêmica (*Induced Systemic Resistance*, ISR) (HAMMERSCHMIDT; MÉTRAUX; VAN LOON, 2001; STICHER; MAUCHMANI; MÉTRAUX, 1997). Fenotipicamente, estas duas formas de resistência a doenças se assemelham, mas são resultados de duas vias distintas. A SAR é mediada por ácido salicílico e a ISR está envolvida com a via da síntese do ácido jasmônico e etileno (VERHAGEN; VAN LOON; PIETERSE, 2006). A indução de resistência a doenças tem sido demonstrada em várias interações hospedeiro-patógeno, conferindo proteção sistêmica a longo prazo e a uma ampla gama de microrganismos (DURRANT; DONG, 2004; RYALS et al., 1996).

Várias pesquisas foram estimuladas tendo em vista essa perspectiva promissora do controle de doenças através da indução de resistência, visando ao esclarecimento dos aspectos bioquímicos e moleculares envolvidos neste processo. Uma estratégia que tem sido utilizada para elucidar as bases moleculares da resistência induzida envolve o estudo da expressão gênica em plantas, após tratamento com elicitores, patógenos ou indutores químicos ativadores da SAR e ISR (KOHLER; SCHWINDLING; CONRATH, 2002; SCHENK et al., 2000; XIONG et al., 2001). Podem ser mencionados como indutores abióticos utilizados nesses estudos, o ácido  $\beta$ -aminobutírico, o ácido salicílico e seu análogo funcional, o éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-

tiadiazole-7-carbotióico (acibenzolar-S-metil, ASM) (FRIEDRICH et al., 1996; JAKAB et al., 2001; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1998).

A utilização de produtos comerciais como os fertilizantes foliares também tem ganhado importância no controle de doenças. Em mudas de cafeeiro, produtos contendo fosfitos foram eficazes na indução de resistência contra *Phoma costarricensis* e *Hemileia vastatrix* (NOJOSA, 2003).

Porém, há ainda insuficiência de estudos relacionados ao modo de ação de produtos que atuam como indutores de resistência, como Reforce<sup>®</sup> e Soloflex<sup>®</sup> e dos mecanismos moleculares envolvidos na ativação de respostas de defesa. A elucidação desses aspectos contribui para a utilização adequada da resistência induzida no manejo integrado de pragas e doenças do cafeeiro, visando ao aumento da produtividade sem causar danos ao meio ambiente.

Com o propósito de contribuir para o esclarecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta de defesa, ativada em plantas contra fitopatógenos, esse trabalho tem por objetivo analisar o perfil de expressão de genes marcadores de SAR e ISR relacionados à defesa em cafeeiro cv. Mundo Novo, após tratamento com Soloflex<sup>®</sup> e Reforce<sup>®</sup>, através de PCR em tempo real.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Considerações gerais sobre a interação *Coffea arabica* - *Hemileia vastatrix*

O cafeeiro pertencente ao gênero *Coffea*, família Rubiaceae, é formado por cerca de 100 espécies conhecidas (BRIDSON, 1994). Dentre as espécies cultivadas, *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre (café robusta) são as mais importantes economicamente, sendo a primeira responsável por 70 % do café comercializado mundialmente (FAZUOLI et al., 2002; MATIELLO et al., 2002).

O cultivo dessas espécies estende-se por mais de 50 países, ocupando uma área superior a 10 milhões de hectares, com uma produção média anual em torno de 130 milhões de sacas de café beneficiado (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2008).

*Coffea arabica* possui grande importância econômica por produzir o café mais apreciado em todos os países consumidores (MIRANDA; PEREIRA; BERGO, 1999). No entanto, esta espécie é suscetível a inúmeras doenças, destacando-se entre elas, a ferrugem alaranjada, em função dos danos e grandes prejuízos para a cafeicultura. A ferrugem alaranjada tem como agente causal o fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* (Berkeley & Broome), espécie pertencente à ordem Uredinales e à família Pucciniaceae, descrita originalmente por Berkeley, em 1869, para um tipo de ferrugem encontrada nos cafeeiros do Sri Lanka. A intensidade da doença está associada ao ambiente, ao patógeno, ao hospedeiro e ao manejo da cultura (MANSK, 1990; ZAMBOLIM et al., 1997).

Esse patógeno se desenvolve na superfície abaxial foliar a partir da germinação dos urediniosporos, na presença de água e a uma temperatura

favorável, entre 6 e 8h, podendo emitir de um a três tubos germinativos. Na extremidade do tubo, ocorre a formação de apressório usualmente sobre um estômato, que em seguida dará origem ao *peg* de penetração (hifa de penetração). Esse *peg* de penetração diferencia-se em vesícula subestomática após atravessar o ostíolo do estômato. Subsequentemente, com o desenvolvimento da hifa de infecção na câmara subestomática, haverá a colonização das células subsidiárias e do mesófilo, com a formação do micélio intercelular e, em seguida, dos haustórios, estruturas responsáveis pela absorção de nutrientes pelo patógeno, dentro das células do hospedeiro (MARTINS, 1988; ZAMBOLIM et al., 2002).

Os sintomas da ferrugem podem então ser observados na face inferior das folhas onde aparecem pequenas manchas de coloração amarelo-pálida de 1 a 3 mm de diâmetro, que evoluem, atingindo até 2 cm de diâmetro, apresentando aspecto pulverulento, com produção de uredósporos de coloração amarelo-alaranjada. Na face superior das folhas, a doença causa manchas cloróticas amareladas correspondendo aos limites da pústula na face inferior, que posteriormente necrosam. Em decorrência da formação de pústulas, ocorre redução da área fotossintética e queda precoce das folhas, o que resulta em menor desenvolvimento da florada, dos chumbinhos e também seca dos ramos plagiotrópicos, comprometendo, em alguns casos, mais de 50 % da produção do cafeeiro (BROWN et al., 1995; COSTA; ZAMBOLIM; RODRIGUES, 2007; GARÇON et al., 2004).

As medidas de controle da doença dependem do sistema de cultivo. Em lavouras conduzidas sob sistema convencional, utilizam-se, principalmente, pulverizações com fungicidas e cultivares resistente (ZAMBOLIM et al., 1997). Já em lavouras sob sistema de cultivo orgânico, utiliza-se calda bordalesa, acrescida de sais de cobre, zinco, magnésio e boro, como medida alternativa de

controle (CARVALHO; CUNHA; CHALFOUN, 2002; RICCI; ARAÚJO; FRANCH, 2002).

No Brasil, o controle químico da ferrugem, tem se mostrado eficaz e vem sendo realizado através da utilização de fungicidas protetores cúpricos e/ou de fungicidas sistêmicos do grupo dos triazóis (MATIELLO et al., 2002; ZAMBOLIM et al., 2002; ZAMBOLIM; ZAMBOLIM; VÁRZEA, 2005). Embora eficiente, o controle químico de *H. vastatrix* em cafeeiros suscetíveis representa cerca de 10-20% do custo total da produção (VEGRO; FERREIRA, 2000).

O controle químico pode também acarretar sérias consequências como, por exemplo, a contaminação do solo, do fruto e dos trabalhadores rurais, além de elevar o custo final da produção. Outra consequência desse controle químico é o surgimento de novas raças do fungo, resistentes, selecionadas pelos fungicidas usados de forma indiscriminada. Um método promissor para o controle da ferrugem alaranjada e de menor impacto ambiental consiste na utilização de indutores de resistência, bióticos ou abióticos, os quais ativam genes relacionados à defesa da planta. Resultados promissores foram alcançados por Guzzo et al. (2001), com a aplicação do indutor químico de resistência acibenzolar-S-metil (ASM) em plantas de café cv. Mundo Novo, o que proporcionou proteção contra *H. vastatrix* por 10 semanas.

## **2.2 Indução de resistência**

As plantas desenvolvem sofisticados mecanismos de resistência para se defender contra doenças, onde moléculas sinalizadoras como o ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) desempenham um papel crucial. Atualmente, elucidar as vias desses mecanismos de sinalização que regulam a resistência de plantas a doenças é um dos principais tópicos de pesquisa na

interação planta-patógeno (VERHAGEN; VAN LOON; PIETERSE, 2006). Em plantas suscetíveis, a resistência pode também ser ativada após uma infecção primária causada por fitopatógenos ou em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos, sendo conhecida como resistência induzida a doenças, podendo ser dividida em (SAR) e em indução de resistência sistêmica (ISR) (HAMMERSCHMIDT; MÉTRAUX; VAN LOON, 2001). Este fenômeno de indução de resistência se caracteriza pela ativação dos mecanismos de defesa inerentes às plantas em decorrência da aplicação de microrganismos ou de substâncias de origem microbiana ou química, que atuam contra fungos, bactérias, nematóides e vírus, conferindo proteção sistêmica de amplo espectro e de longa duração (DE NARDI et al., 2006; GORLACH et al., 1996; MISHINA; ZEIER, 2007).

O fenômeno da SAR tem sido demonstrado em várias interações hospedeiro-patógeno e implica a produção de um sinal liberado a partir do sítio inicial da penetração do patógeno ou do local de aplicação do indutor e sua posterior translocação para outras partes da planta, ativando nesses tecidos reações de defesa e impedindo, à distância, uma posterior infecção do patógeno (AUX, 2001).

Foi descrito por Ray (1901) e Beauverie (1901), o primeiro relato de indução de resistência, no qual obtiveram indução de resistência em begônias pelo uso de isolados atenuados de *Botrytis cinerea* e relacionaram a indução às condições ambientais de cultivo. Esse estudo foi confirmado por Carbonne e Kalaljev (1932), que mostraram que a SAR depende, também, da condição do hospedeiro. Chester (1933) observou que plantas suscetíveis podiam adquirir resistência contra doenças após uma infecção primária causada por patógenos ou após o tratamento com formas atenuadas de agentes patogênicos. Posteriormente, Ross (1961) demonstrou que plantas de fumo -- após a infecção localizada com o vírus do mosaico do fumo (TMV) e a conseqüente formação de

lesões necróticas nas folhas inferiores -- adquiriam resistência sistêmica contra vários patógenos. Na década de 60, Cruikshank e Mandryk (1960) estenderam esse estudo, inoculando uma suspensão de esporos de *Peronospora tabacina*, agente causal do míldio no caule de plantas de fumo -- e obtiveram aumento da resistência a doenças foliares.

Dean e Kuc (1986) e Kuc, Shockley e Kearney (1975) demonstraram posteriormente a indução de resistência em plantas de pepino após o tratamento localizado com diferentes microrganismos patogênicos, como o vírus da necrose do fumo (TNV), *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* e *Colletotrichum lagenarium*. As plantas foram protegidas de quatro a seis semanas contra pelo menos 12 doenças causadas por fungos, bactérias e vírus como, por exemplo, a antracnose e a sarna, causadas, respectivamente, por *C. lagenarium* e *Cladosporium cucumerinum*; a mancha angular e a murcha bacteriana, causadas por *P. syringae* pv. *lachrymans* e *Erwinia tracheiphila* e o mosaico do pepino e a necrose local, causadas pelo vírus do mosaico do pepino (CMV) e por TNV, respectivamente.

### **2.3 Mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na indução de resistência**

A estratégia para o controle de doenças através da ativação dos mecanismos de defesa inerentes das plantas, através da utilização de produtos bióticos ou abióticos tem estimulado vasta pesquisa, visando ao esclarecimento dos aspectos bioquímicos e moleculares envolvidos na resistência induzida.

Entre os mecanismos de resistência ativados, têm sido observadas alterações estruturais que fortalecem a parede celular vegetal pelo depósito de calose e de lignina ou pela formação de papila junto à parede celular no sítio de penetração do patógeno e a resposta de hipersensibilidade (HR), resultando na

morte localizada de células do hospedeiro no sítio de infecção (BENHAMOU; BELANGER, 1998).

A HR é caracterizada pela morte programada das células em torno do local de infecção e atua contra patógenos biotróficos, pois restringe seu acesso à água e nutrientes, podendo ser ativada pelo ácido salicílico (DURRANT; DONG, 2004; GLAZEBROOK, 2005; LEE; LEON; RASKIN, 1995).

O processo de lignificação é um importante mecanismo de defesa relacionado à SAR. A lignina é formada pela polimerização de precursores produzidos na rota dos fenilpropanóides, sendo iniciada pela deaminação da fenilalanina para ácido cinâmico e catalizada pela enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997).

A lignina pode desempenhar um papel importante na resistência através de diferentes mecanismos como, por exemplo, no estabelecimento de barreiras mecânicas ao avanço e ao crescimento do patógeno, na modificação da parede celular -- tornando-a mais resistente ao ataque por enzimas hidrolíticas secretadas pelos patógenos, no aumento da resistência das paredes à difusão de toxinas produzidas por patógenos e impedindo que nutrientes do tecido hospedeiro sejam utilizados pelo invasor. Foi detectado, também, o acúmulo de peróxido de hidrogênio, de fitoalexinas (IRITI; FAORO, 2003; LATUNDE-DADA; LUCAS, 2001) e de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) como, por exemplo,  $\beta$ -1,3-glucanases e quitinases (GUZZO et al., 2004; QUERINO et al., 2005; SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007), que podem se constituir em excelentes marcadores moleculares de resposta de defesa (RESENDE et al., 2006; SHULAEV; LEON; RASKIN, 1995) e, também, em um aumento na atividade de várias enzimas, tais como lipoxigenase, fenilalanina amônia-liase (FAL), chalcona isomerase, peroxidases e polifenoloxidasas (KOHLENER; SCHWINDLING; CONRATH, 2002; RESENDE, 2002).

Estudos realizados especialmente com *Arabidopsis* permitiram uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na indução de resistência. Em várias interações hospedeiro-patógeno, ficou demonstrado que a expressão de diferentes genes de defesa está associada à indução de resistência sistêmica (HAMMERSCHMIDT; MÉTRAUX; VAN LOON, 2001). Alguns dos genes induzidos codificam proteínas envolvidas no metabolismo de compostos fenólicos e fitoalexinas, tais como fenilalanina amônia liase (FAL), chalcona sintase e peroxidases (KOHLER; SCHWINDLING; CONRATH, 2002) ou proteínas com propriedades antimicrobianas, como as PR-proteínas, quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases e defensinas. Outros genes correspondem a proteínas relacionadas ao fortalecimento da parede celular, como glicoproteínas ricas em hidroxiprolina. Também foi observada a expressão de genes codificadores de proteínas envolvidas nas vias de transdução de sinal que levam à ativação do estado de resistência, como a proteína quinase da família MAP-quinase, induzida em plantas de fumo por ácido salicílico (HAMMERSCHMIDT; MÉTRAUX; VAN LOON, 2001).

Ainda, genes envolvidos na degradação controlada de proteínas têm sido associados à regulação da expressão da resistência induzida, como aqueles codificadores das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  do proteassomo 20S, ativados em plantas de fumo após o tratamento com ácido salicílico ou elicitoras (ETIENNE et al., 2000; LEQUEU et al., 2005).

Em cafeeiro, genes relacionados à indução de resistência foram isolados e identificados através da técnica de hibridização subtrativa por supressão (HSS), método baseado na amplificação preferencial, pela reação em cadeia da polimerase (PCR), de sequências diferencialmente representadas em duas populações de cDNA, enquanto o fenômeno da supressão impede a amplificação das sequências comuns, que resulta em uma mini biblioteca enriquecida destes genes, fornecendo amplo material para a comparação de populações de RNAs

mensageiros. Foram encontrados genes envolvidos em diversos processos relacionados à resistência de plantas contra fitopatógenos, como: formação de espécies de oxigênio reativas, resposta de hipersensibilidade, morte celular programada, síntese e transporte de metabólitos antimicrobianos, percepção e transdução de sinal, síntese de proteínas relacionadas à patogênese, metabolismo de lipídeos e degradação controlada de proteínas (GUZZO et al., 2009; GUZZO; HARAKAVA, 2007).

Os estudos realizados possibilitaram obter um perfil dos mecanismos de respostas de defesa associados à SAR. Dentre os genes isolados de cafeeiro, foram identificados aqueles codificadores da aleno óxido sintase (AOS), arginina descarboxilase, ascorbato peroxidase, ubiquitina ligase tipo “Ring Finger”, de PR-proteínas, como quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase, da proteína transportadora ABC e da proteína de resistência com domínio de repetições ricas em leucina (LRR).

A aleno óxido sintase é uma enzima chave na síntese do regulador vegetal ácido jasmônico (AJ). AJ é uma molécula sinalizadora que desempenha um importante papel na resistência contra insetos e doenças, podendo ativar a expressão de proteínas antifúngicas tais como, osmotina e tionina ou induzir acúmulo de enzimas relacionadas à síntese de fitoalexinas e possui também efeito direto antimicrobiano (PROST et al., 2005; VELLOSILO et al., 2007).

As PR-proteínas são proteínas de plantas que se acumulam rapidamente nos tecidos vegetais após o contato com patógenos ou ataque por insetos herbívoros ou, também, em resposta ao tratamento com determinados compostos químicos ou a outros tipos de estresse (GUZZO, 2003; VAN LOON et al., 1994). As PR-proteínas têm sido particularmente associadas à resistência induzida, acumulando-se nos tecidos vegetais, no local da aplicação de indutores bióticos ou abióticos da SAR e, sistemicamente, estando associadas à expressão

e à manutenção da resistência sistêmica induzida (CONRATH et al., 2002; PIETERSE et al., 2001; RYALS et al., 1996).

As TLPs (*thaumatin-like proteins*), proteínas tipo taumatinas, pertencem à família PR-5 de proteínas relacionadas à patogênese (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). A família PR-5 é uma das 17 famílias de PR proteínas, que também inclui as permeatinas e osmotinas. PR proteínas normalmente se acumulam em altos níveis após estresse causado por patógeno, mas muitas são também induzidas por outras condições de estresse ou sinais de desenvolvimento. Em algumas espécies, TLPs são expressas constitutivamente nas flores e frutos, órgãos reprodutivos importantes, suscetíveis à infecção pelo patógeno e especula-se sobre a hipótese de que estas proteínas funcionem como defesas pré-formadas contra as infecções (CLENDENNEN; MAY, 1997; SASSA; HIRANO, 1998).

Tem sido também observado que TLPs podem ser induzidas em resposta a ferimentos e à alimentação de insetos, especificamente por insetos que se alimentam do floema (FRENO et al., 1992; GAO et al., 2007).

As  $\beta$ -1,3-glucanases pertencem à família PR-2 e participam de vários processos fisiológicos dos vegetais. As  $\beta$ -1,3-glucanases de classe II apresentam atividade antifúngica, estas clivam glucana, um componente estrutural da parede celular de fungos e oomicetos. Segundo Theis e Stahl (2004),  $\beta$ -1,3-glucanases de classe II apresentam atividade antifúngica quando atuam sinergicamente com quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases de classe I.

#### **2.4 Indutores de resistência**

Demonstrada em diversas espécies vegetais, a indução de resistência pode ser ativada por agentes bióticos e abióticos. Existem vários relatos na literatura de diversas substâncias de origem biológica que agem como indutores

de resistência (KUC, 2001) como, por exemplo, frações de parede celular de plantas, de fungos (DOKE; RAMIREZ; TOMIYAMA, 1987) e de bactérias, como lipopolissacarídeos de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PIETERSE et al., 2001; VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998); fluído intercelular de plantas (KUC, 2001); extratos vegetais (FOUGHT; KUC, 1996) e de microrganismos não patogênicos, como *S. cerevisiae* (PASCHOLATI, 1998) e substâncias de natureza protéica, provenientes de fitopatógenos, como *Phytophthora* spp., *Pyricularia oryzae* e *Erwinia amylovora* (KELLER et al., 1996; SCHAFFRATH; SCHEINPFLUG; REISENER, 1995; WEI et al., 1992; YU, 1995).

Quanto aos agentes abióticos, foi demonstrado que diferentes compostos inorgânicos ou orgânicos induzem à resistência em plantas em relação ao ataque por insetos herbívoros e contra doenças causadas por nematoides, bactérias, fungos e vírus (BOSTOCK et al., 2001; HAMMERSCHMIDT; MÉTRAUX; VAN LOON, 2001; KESSMANN et al., 1994; OOSTENDORP et al., 2001). Entre os compostos inorgânicos, foi verificado que sais de fosfato induziram resistência sistêmica em plantas de pepino e milho contra os fungos fitopatogênicos *C. lagenarium* e *Puccinia sorghi*, respectivamente (GOTTSTEIN; KUC, 1989; OROBER; SIEGRIST; BUCHENAUER, 2002; REUVENI; AGAPOV; REUVENI, 1994). Entre os compostos orgânicos, os ácidos graxos araquidônico, linoléico, linolênico e oléico induziram à resistência em batata contra *Phytophthora infestans* (COHEN; GISI; MOSINGER, 1991; COQUOZ et al., 1995) e as quitosanas, em tomateiro contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (BENHAMOU; THERIAULT, 1992).

Além destes, podem ser mencionados o ácido  $\beta$ -aminobutírico (ABA), o ácido salicílico e seus análogos funcionais, como o ácido-dicloroisonicotínico (INA) e o ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7 carbotióico (acibenzolar-S-metil - ASM) (GUZZO et al., 2001; PEREIRA, 2006).

Alguns indutores de resistência estão disponíveis comercialmente como, por exemplo, o composto ASM do grupo benzotriazolozol, primeiro representante de uma nova geração de protetores de plantas eficientes na indução de resistência, sendo comercializado sob as marcas Actigard<sup>®</sup> ou Bion<sup>®</sup> (CAVALCANTI et al., 2006). A ação do Bion<sup>®</sup> (ASM), como um agente ativador dos mecanismos de defesa de plantas, conferindo proteção sistêmica contra diferentes patógenos, foi observada em diversas culturas como, por exemplo, fumo, trigo, feijoeiro e cacauero (RESENDE et al., 2002), tomateiro (SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007) e em cafeeiro (AMARAL, 2005; GUZZO et al., 2001; NOJOSA, 2003; PATRÍCIO et al., 2007). Podem ainda ser mencionados, entre outros, os produtos Elexa<sup>®</sup>, Oxycom<sup>®</sup>, Iodus<sup>®</sup> 40, Milsana<sup>®</sup>, Agromos<sup>®</sup> e Messenger<sup>®</sup> (CAVALCANTI; RESENDE, 2004).

Em algumas interações hospedeiro-patógeno, foi também demonstrado que o tratamento das plantas com determinados indutores de resistência leva à ativação direta de um conjunto de respostas de defesa. Entretanto, alguns mecanismos de resistência são ativados apenas após a inoculação subsequente das plantas com agentes patogênicos. Nesse caso, o tratamento prévio com indutores de resistência predispõe as plantas suscetíveis a ativarem respostas de defesa mais rapidamente e intensamente do que as plantas não induzidas, quando em contato com agentes patogênicos. Os indutores de resistência possuem, dessa forma, um papel duplo na ativação de respostas de defesa, sendo este mecanismo denominado preparo ou sensibilização (“*priming*”), o que foi demonstrado em *Arabidopsis thaliana* (CONRATH et al., 2006; KOHLER; SCHWINDLING; CONRATH, 2002).

Os indutores de resistência não apresentam normalmente ação antimicrobiana direta sobre patógenos (DURRANT; DONG, 2004; GUZZO et al., 2001), mas atuam como moléculas sinalizadoras de respostas de defesa. Ao serem reconhecidas pelas células vegetais, induzem a expressão de genes que

codificam a síntese de compostos de resistência (DANTAS et al., 2004; MÉTRAUX, 2001; RYALS et al., 1996; SCHENK et al., 2000), impedindo ou dificultando o estabelecimento e/ou desenvolvimento do patógeno e, conseqüentemente, reduzindo os sintomas da doença.

#### **2.4.1 Reforce<sup>®</sup> - fertilizante foliar à base de fosfito**

Reforce<sup>®</sup> é um fertilizante foliar que induz a produção de fitoalexinas, proteínas PR (proteínas de resistência) e outras enzimas de resistência e/ou defesa conferindo às plantas maior tolerância às adversidades (AGRICHEM FERTILIZANTES AGRÍCOLAS, 2011).

A utilização de fertilizantes foliares comerciais, como os fosfitos, tem ganhado importância no controle de doenças. O fosfito é comercializado há algum tempo sob a forma de etil fosfonato (Fosety-Al) e, recentemente, como sal de potássio, sendo indicado para o controle de *Phytophthora* e de fungos agentes da podridão do colo, raiz, tronco e frutos. Sob a forma de sal de potássio, o fosfito parece ter o mesmo efeito que o Fosety-Al, fungicida recomendado para o controle de oomicetos como *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp. Alguns autores acreditam que, além da ação direta sobre o patógeno, o fosfito também apresenta ação indireta, induzindo uma resposta de defesa na planta (JACKSON et al., 2000; SMILLIE; GRANT; GUEST, 1989).

A aplicação de fosfito foi utilizada na proteção de plantas de cacau (GUEST et al., 1994), abacate (EL-HAMALAWI; MENGE; ADAMS, 1995), citros (SCHUTTE; BEZUIDENHOUT; KOTZE, 1991), eucalipto (SHEARER; FAIRMAN; GRANT, 2006) e castanha (LIM, 1993) contra doenças causadas por espécies do gênero *Phytophthora*. Estudos recentes demonstram a sua eficácia contra outros patógenos. Eles foram eficientes no controle da mancha-foliar-da-gala (*Colletotrichum gloeosporioides*) (ARAÚJO et al., 2008) e da

sarna-da-macieira (*Venturia inaequalis*) (BONETI; KATSURAYAMA, 2005), além de podridões pós-colheita, causadas por *Alternaria alternata* (REUVENI; AGAPOV; REUVENI, 2003) e *Penicillium digitatum* (BLUM et al., 2007). Fosetyl-AI, fungicida análogo ao fosfito, foi eficiente no controle da necrose apical da mangueira causada por *Pseudomonas syringae* pv *syringae* (CAZORLA et al., 2006) e no controle da sarna (*Elsinoe fawcettii*), melanose (*Diaporthe citri*) e da mancha-de-alternária (*Alternaria alternata*), em mudas de citros (AGOSTINI; BUSHONG; TIMMER, 2003).

Em mudas de cafeeiro, produtos contendo fosfitos foram eficazes na indução de resistência contra *Phoma costarricensis* e *Hemileia vastatrix*, reduzindo a severidade da mancha de Phoma, sem diferenças em relação ao tebuconazole e fosetyl-AI (NOJOSA, 2003). Este mesmo autor observou que a aplicação de fosfitos nas mudas de cafeeiro proporcionou acúmulo de lignina e de fenóis solúveis, típicos compostos de defesa do cafeeiro. Também foram observados efeitos diretos de fosfito, inibindo o crescimento micelial e o desenvolvimento do tubo germinativo de esporos de *P. costarricensis*. No campo, a aplicação de fosfitos apresentou efeito protetor em cafeeiro, diminuindo a intensidade da mancha de Phoma (BARGUIL, 2004).

RIBEIRO JÚNIOR (2008) observou que a pulverização em cafeeiro cv. Topázio, em condição de campo, com fosfito de potássio (500mL/100L), fosfito de manganês (333mL/100L), fosfito de zinco (200mL/100L) em quatro aplicações, em dois anos de avaliação (dezembro de 2005; fevereiro, abril, julho e dezembro de 2006 e fevereiro, abril e julho de 2007), proporcionou, em média, menores índices de ferrugem, se comparados aos da testemunha e superiores àqueles proporcionados pelo fungicida (epoxiconazole + piraclostrobina), nos dois anos de avaliação (2006 e 2007). No ano de alta produtividade (2006), aplicações com fosfitos proporcionaram uma redução média na severidade da ferrugem de 30% e de 53% no ano de baixa produtividade (2007).

Também, em experimento de campo, com a cultivar Rubi, a pulverização com fosfito de cobre (1000mL/100L) reduziu a severidade da ferrugem em 81%, quando comparada à testemunha e apresentou controle semelhante ao do fungicida (epoxiconazole + piraclostrobina). Este mesmo produto, aplicado na dose de 500mL/100L, obteve controle inferior ao do fungicida, mas superior à testemunha (TOYOTA, 2008).

Diversos estudos foram realizados para elucidar as vias de sinalização de defesa de plantas que levam à resistência e são desencadeadas após o reconhecimento de um patógeno potencial ou pelo tratamento com elicitores de respostas de defesa. Neste sentido, a análise dos perfis de expressão de genes em resposta à infecção e tratamento com moléculas sinalizadoras fornecem uma base para identificar características comuns e / ou antagônicas entre vias de defesa (SCHENK et al., 2000).

#### **2.4.2 Soloflex® - fertilizante foliar à base de ácido húmico e fúlvico**

O Soloflex® é um fertilizante foliar com alto nível de ácidos húmicos e ácidos fúlvicos que aumenta a capacidade de troca de cátions e assegura rapidez e eficiência na absorção dos nutrientes. Pode ser usado via solo ou por aplicação foliar (PEPITA FERTILIZANTES, 2011).

A presença dessas substâncias húmicas (SH) vem sendo observada há muito tempo no meio ambiente (BERZELIUS, 1839; FRIMMEL; CHRISTMAN, 1988; KONONOVA, 1958; ORLOV, 1985). Sua definição não é simples e reflete bem a complexidade do material orgânico. Substâncias húmicas podem ser definidas como uma série de polímeros amorfos, de coloração amarelo-marrom a preta, de peso molecular relativamente alto e formados por reações de sínteses secundárias, bióticas e abióticas (STEVENSON, 1994).

O ácido húmico é uma suspensão baseada em humato de potássio que pode ser aplicada com sucesso em muitas áreas de produção vegetal como estimulante do crescimento de plantas ou condicionador do solo para aumentar a resistência natural contra doenças e pragas de plantas (SCHEUERELL; MAHAFFEE, 2004, 2006) a fim de estimular o crescimento de plantas através do aumento da divisão celular, bem como otimizar a absorção de nutrientes e água, (ATIYEH et al., 2002; CHEN; NOBILI; AVIAD, 2004). Além disso, Scheuerell e Mahaffee (2004, 2006) relataram que o tratamento mais eficaz para a supressão de tombamento em muitas plantas e mofo cinzento em geranium foi um chá composto por extrato de algas e ácidos húmicos.

Os ácidos fúlvicos são os compostos húmicos de maior solubilidade por apresentarem maior polaridade e menor peso molecular. Estes compostos são os principais responsáveis por mecanismos de transporte de cátions dentro do solo, por meio de complexos organo-metálicos, o que caracteriza o processo de queluviação (DUCHAUFOR, 1982). O estudo de substâncias húmicas no solo desenvolveu-se bastante nas últimas três décadas graças ao desenvolvimento de novas metodologias e equipamentos (HATCHER et al., 2001).

Diversos estudos relatam que a preparação de ácidos húmicos e fúlvicos teve como objetivo aumentar a absorção de elementos minerais (DE KREIJ; BASAR, 1995; MACKOWIAK; GROSSL; BUGBEE, 2001; MAGGIONI et al., 1987), promover o crescimento de raiz (CANELLAS et al., 2002; VAUGHAN; MALCOLM, 1979) e aumentar o peso fresco e seco de plantas cultivadas (CHEN; NOBILI; AVIAD, 2004; KAUSER; MALIK; AZAM, 1985).

### **3 MATERIAL E MÉTODO**

#### **3.1 Planta e patógeno**

No experimento, foram utilizadas plantas de cafeeiro produzidas a partir de sementes da cultivar “Mundo Novo (seleção MG-379-19)”, cedidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. Quando as mudas apresentaram seis pares de folhas, foram pulverizadas com os tratamentos. As mudas foram produzidas e mantidas em casa de vegetação, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), visando fornecer material vegetal para a análise da expressão gênica.

Urediniósporos de *Hemileia vastatrix* foram coletados a partir de pústulas presentes em folhas de plantas de café arábica cv. Mundo Novo, em campo experimental da UFLA. A coleta foi realizada por meio de raspagem, utilizando pincel n° 1.

#### **3.2 Obtenção e inoculação do patógeno**

Logo após coletados, os urediniósporos foram peneirados para eliminação de impurezas. Em seguida, foi preparada uma suspensão de urediniósporos em ágar-água 0,2% (v/v), a qual foi ajustada em hemocítmetro para 15.000 urediniósporos por mL.

O processo de inoculação das mudas foi feito por meio de pulverização da suspensão até o ponto de escorrimento nas plantas, quando estas apresentaram os três primeiros pares de folhas completamente expandidos (cerca de quatro meses de idade). As plantas foram mantidas no escuro por 48 horas, com umidade relativa de 100% e temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , condições favoráveis

para a germinação dos urediniósporos. Nas plantas controle, ou seja, não inoculadas, aplicou-se somente solução ágar-água 0,2% (v/v), sem inóculo.

### **3.3 Avaliação da indução de resistência em plantas de café suscetíveis**

O bioensaio de indução de resistência em cafeeiro foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFLA, em delineamento, em blocos casualizados (DBC), com 6 tratamentos (Tabela 1) e 3 repetições, sendo a parcela experimental constituída por 6 mudas, com cerca de 4 meses de idade. A resistência foi induzida por meio de pulverizações com Soloflex<sup>®</sup>, a 5 mL p.c./L ou com Reforce<sup>®</sup> a 5 mL p.c./L, seguidos ou não pela inoculação com *H. vastatrix*. Além destes tratamentos, foram utilizadas também testemunhas pulverizadas apenas com água, seguidas ou não de inoculação.

A pulverização com os indutores foi realizada sete dias antes da inoculação das mudas com o fungo. Após a pulverização com os indutores, o material vegetal (folha) foi coletado nos seguintes tempos: 0, 24, 48, 168 e 192 horas, equivalentes a 0; 1; 2; 7 e 8 dias (Tabela 1). As plantas inoculadas foram coletadas nos tempos de 0, 24 e 48 horas após a inoculação com o fungo, correspondendo a 168, 192 e 216 horas após a pulverização com os indutores, devido ao fato de a pulverização ter sido realizada sete dias antes da inoculação das mudas com o fungo.

Foram coletadas seis mudas por tempo de coleta por tratamento, sendo que, imediatamente após coletadas, as mudas foram envoltas em folhas de papel alumínio, previamente identificadas e então congeladas em nitrogênio líquido (-196°C). Ao final de cada coleta, o material congelado foi armazenado em freezer, a -80°C, até o momento da extração de RNA.

Tabela 1 Tratamentos utilizados no bioensaio de indução de resistência e tempos de coleta após a aplicação dos indutores

Tratamentos com indutores de resistência*	Tempos de coleta (HAP) <sup>1</sup> ou (HAI) <sup>2</sup>
REFORCE	0; 24; 48; 168 e 192 (HAP)
REFORCE COM INOCULAÇÃO	0; 24 e 48 (HAI)
SOLOFLEX	0; 24; 48; 168 e 192 (HAP)
SOLOFLEX COM INOCULAÇÃO	0; 24 e 48 (HAI)

\*Tratamentos acompanhados de inoculação apresentam número de tempos de coleta reduzidos, comparados aos tratamentos sem inoculação, porque a inoculação com o patógeno ocorreu às 168 HAP, tempo este correspondente a 0 HAI

<sup>1</sup> HAP (horas após pulverização)

<sup>2</sup> HAI (horas após inoculação)

Os produtos à base de nutrientes utilizados no bioensaio de indução de resistência estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 Produtos utilizados no bioensaio, nomes comerciais, composição e dose utilizada

Nome comercial	Composição	Empresa	Dose (mL/L)
Soloflex <sup>®</sup>	Nitrogênio 1% p/p - 12 g/L p/v; K <sub>2</sub> O 4% p/p - 48 g/L p/v; P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 4% p/p - 48 g/L p/v; Carbono Orgânico Total 6% p/p	Pepita Fertilizantes Ltda.	5
Reforce <sup>®</sup>	25,0% K <sub>2</sub> O ; 35,0% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> p/v	Agrichem do Brasil Ltda.	5

### 3.4 Extração do RNA

Foi extraído o RNA total do tecido vegetal (folha) das plantas com os diferentes tratamentos citados, utilizando-se TRI Reagent TM Solution (Applied Biosystems, USA). Inicialmente, quatro plantas representativas da mesma amostra foram maceradas em nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, 100 mg de tecido macerado foram colocados em microtubos de

1,5 mL, tipo eppendorf aos quais foi adicionado 1 mL do TRI Reagent TM. Em seguida, realizou-se homogeneização em vórtex e a mistura foi incubada por 5 minutos, à temperatura de 25°C. Após esse período, o material foi submetido à centrifugação por 10 minutos, à temperatura de 4°C, a 12.000 x g. O sobrenadante foi, então, transferido para um novo tubo, ao qual se adicionou 200 µL de clorofórmio, homogeneizado por 15 segundos e, em seguida, incubado por 20 minutos, à temperatura ambiente. Realizou-se uma centrifugação durante 15 minutos, à temperatura de 4°C, a 12.000 x g. Após a centrifugação, a fase superior, contendo RNA foi transferida para um novo tubo e adicionou-se 500µL de isopropanol. Fez-se rápida homogeneização por inversão, seguida por incubação mínima de 1 hora, à temperatura de -20°C. Após a incubação, a amostra foi centrifugada por 10 minutos, à temperatura de 4°C a 12.000 x g. O sobrenadante descartado e o *pellet* lavado duas vezes, com 1 mL de etanol 75% (v/v) gelado, seguido de uma centrifugação por 5 minutos, à temperatura de 4°C, a 7.500 x g. Após a lavagem, realizou-se a solubilização do RNA. O *pellet* foi ressuspenso em 30µL de água milli-Q autoclavada.

### **3.5 Quantificação do RNA total e tratamento com DNase I**

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop™ Espectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies™). A integridade do RNA foi visualizada em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta.

As amostras de RNA total foram tratadas com DNase I (New England BioLabs™), segundo especificações do fabricante, para a eliminação de eventual DNA presente. Posteriormente foi realizada PCR convencional para confirmar a ausência total de DNA.

### 3.6 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada a partir dos RNAs totais extraídos de folhas de cafeeiro com os devidos tratamentos, utilizando-se o kit Reverse Transcriptase SuperScript III™ (Invitrogen).

### 3.7 Busca *in silico* para escolha de genes relacionados à SAR

Para a escolha dos genes, foi realizada revisão bibliográfica e busca em bancos de dados genômicos, de onde foram selecionados sete genes potencialmente envolvidos com a resistência e quatro genes constitutivos.

As sequências dos genes *NPRI*, *PR5* e *PR10*, relacionados à indução de resistência, foram obtidas tendo como fonte de dados o banco de ESTs (*Expressed Sequence Tags*), gerado pelo projeto Genoma Brasileiro Café CAFEST (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>).

Os genes *AOS2*, *RING*, *GLU1* e *GLU2*, também relacionados à indução de resistência, foram escolhidos tendo por base as sequências de genes isolados de plantas de café cv. Mundo Novo tratadas com ASM, através da técnica de hibridização subtrativa por supressão (HSS) e depositadas no GenBank por Guzzo et al. (2009).

Os genes *GAPDH2*, *RPL7* e 14-3-3 foram escolhidos com base no trabalho realizado por Barsalobres-Cavallari et al. (2009), que observaram que estes genes são expressos de forma homogênea, apresentando níveis de transcritos equivalentes em diferentes amostras de tecidos e órgãos de *Coffea arabica* sendo, portanto, recomendados como genes de referência. Por fim, *UBI9*, descrito no trabalho de Cruz et al. (2009).

### 3.8 Desenho e síntese de *primers*

Os primers utilizados para amplificação dos genes foram desenhados com o auxílio do programa *Primer 3 Plus* (UNTERGASSER et al., 2007), utilizando a amplificação de produtos com tamanho entre 50-200 nucleotídeos e temperatura de anelamento de aproximadamente 60°C como critérios. Análises da curva de dissociação dos produtos amplificados e corridas em gel de agarose 1% para os genes: *AOS2* (aleno óxido sintase), *GLU1* ( $\beta$ -1,3-glucanase), *PR5* (osmotina) e *GAPDH2* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foram realizadas para a confirmação da amplificação de um único produto de PCR (Gráfico 1) e os demais *primers* resultaram em dois amplicons, assim, estes foram excluídos das análises (Gráfico 2). O gene *GAPDH2*, que codifica a proteína Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, foi utilizado como controle endógeno.

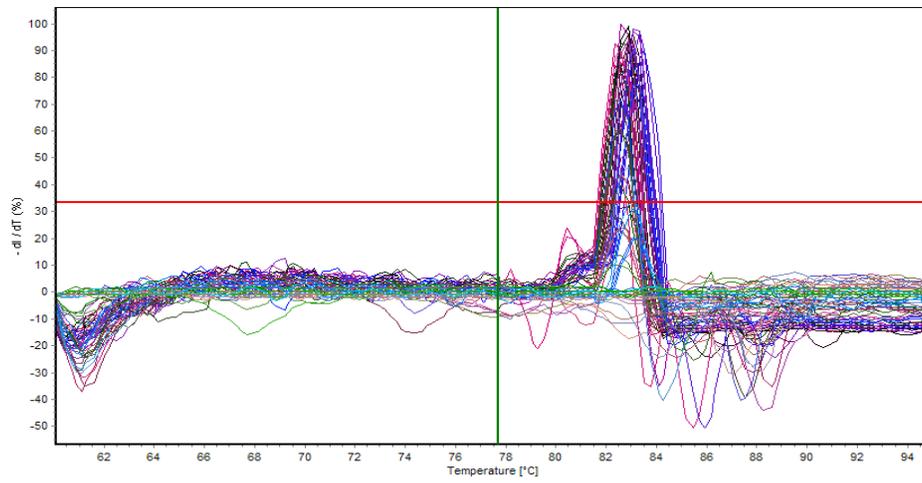


Gráfico 1 Análise da curva de *melting*. *Primer* resultando em um único amplicon

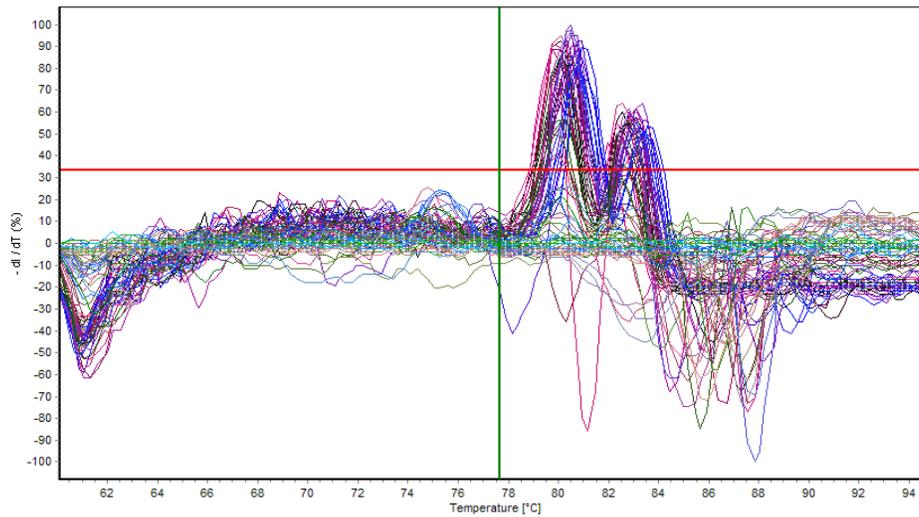


Gráfico 2 Análise da curva de *melting*. *Primer* resultando em dois amplicons

Tabela 3 Sequências dos *primers* de genes de cafeeiro utilizadas na análise da expressão gênica quantitativa por PCR em tempo real

Gene	Número de acesso GenBank	Designação dos primers	Sequência dos primers (5'-3')	Tamanho (bp)	T <sub>m</sub> (°C)
Aleno óxido sintase	DQ124045	AOS2-F	TACGAAGCCCTGAGGATTGA	197	64.5
		AOS2-R	ACCCACGAACCTGTCCG		
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	SGN-U347734	GAPDH2-F	TTGAAGGGCGGTGCAAA	59	60
		GAPDH2-R	AACATGGGTGCATCCTTGCT		
Proteína realacionada à patogênese 5	EU196031	PR5-F	G TTCAGTAACCTGGACTTCTTCG	190	59
		PR5-R	CTGATCAGTCTTGAAAACAGTGC		
$\beta$ -1,3-glucanase	AY389812	GLU1-F	CAGCCCTTCAGAACATACAAAAC	194	60
		GLU1-R	AGGTGCATTATTTTGGTTCAAGA		

### 3.9 RT-qPCR

A reação de amplificação foi realizada em equipamento Mastercycler<sup>®</sup> ep realplex da Eppendorf com o seguinte ciclo de amplificação: 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, finalizando com 15 segundos a 95°C.

Os dados gerados foram armazenados no programa Realplex e analisados no qbasePLUS (Versão 1.5), software de análise de dados de PCR em tempo real. Para cada reação, foram utilizados aproximadamente 100ng de

cDNA, 1,5µL de cada *primer* (10µM) e 25µL de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™). A reação foi completada com 19,5µL de água livre de nuclease (Ambion™), para um volume final de 50µL/amostra. As amostras foram processadas em triplicatas.

Para verificar o efeito dos indutores sobre a expressão de cada gene, foi feita uma curva de tempo para comparar os resultados após pulverização com Reforce® e Soloflex®. Para verificar o efeito do patógeno sobre a expressão de cada gene em plantas induzidas, estes resultados foram comparados aos dados obtidos a partir das amostras não inoculadas com o patógeno.

A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão do gene *GAPDH2*, utilizado como controle endógeno para compensar variações internas na PCR. Os resultados foram normalizados utilizando  $C_T$  (Ciclo *Threshold*), obtidos para controles endógenos presentes na mesma reação.

## 4 RESULTADOS

O padrão de expressão dos genes *AOS2*, *GLU1* e *PR5* relacionado com a resposta após aplicação de Soloflex<sup>®</sup> e Reforce<sup>®</sup> e inoculação com *Hemileia vastarix* em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica*) foi obtido através de RT-qPCR. O padrão de expressão foi comparado em mudas de café após pulverização com Soloflex<sup>®</sup> e Reforce<sup>®</sup> nos tempos 0, 24, 48, 168 e 192 horas e após a inoculação com o patógeno nos tempos 0, 24 e 48 horas (Tabela 4).

Tabela 4 Tempos (em dias e horas) utilizados em cada tratamento, sendo indicados pelo X

Dias	0	1	2	7	8	9
Horas	0	24	48	168	192	216
Tratamentos:						
Reforce 4ml/l	x	x	x	x	x	
Reforce 4ml/l + Hv				x	x	x
Soloflex 4ml/l	x	x	x	x	x	
Soloflex 4ml/l + Hv				x	x	x

### 4.1 Quantificação do nível de expressão dos genes *AOS2*, *GLU1* e *PR5* por PCR em tempo real, avaliado em mudas de cafeeiro após tratamento com Reforce<sup>®</sup> e Soloflex<sup>®</sup>

Os genes *AOS2*, *GLU1* e *PR5* apresentaram um perfil similar quando as mudas de café foram pulverizadas com Reforce<sup>®</sup>, atingindo o maior nível de expressão na fase inicial do tratamento (24h). Além disso, os genes *AOS2*, *GLU1* e *PR5* foram reprimidos quando aumentou o tempo de exposição com o mesmo produto (Gráfico 3).

O estudo do efeito da aplicação de Soloflex<sup>®</sup> em mudas de cafeeiro sobre a expressão dos genes *AOS2*, *GLU1* e *PR5* revelou que o maior nível da expressão gênica das plantas tratadas com Soloflex<sup>®</sup> foi observado 24 horas após a pulverização para o gene *PR5*, seguido pelo gene *GLU1*, que apresentou uma indução 192 horas após a pulverização. Enquanto o gene *AOS2* foi reprimido.

O perfil de expressão do gene *PR5* foi semelhante para os dois indutores (Reforce<sup>®</sup> e Soloflex<sup>®</sup>), onde houve indução 24 horas após a pulverização com Reforce<sup>®</sup>, seguido de supressão. Já para o gene *AOS2* houve indução 24 horas após o tratamento com Reforce<sup>®</sup> e uma repressão, após o tratamento com Soloflex<sup>®</sup>. Para o gene *GLU1*, o maior nível de expressão foi observado 24 horas após a pulverização com Reforce<sup>®</sup>, enquanto para Soloflex<sup>®</sup>, o maior nível de expressão foi observado 192 horas após a pulverização.

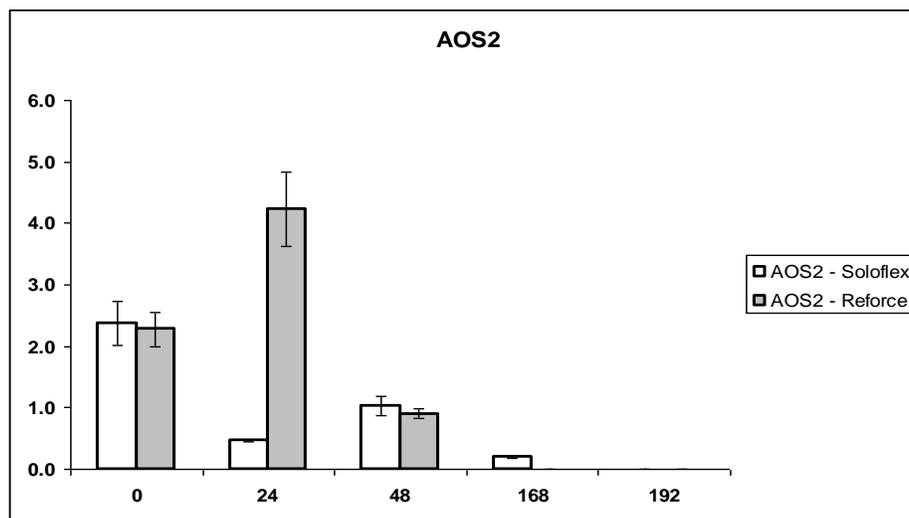
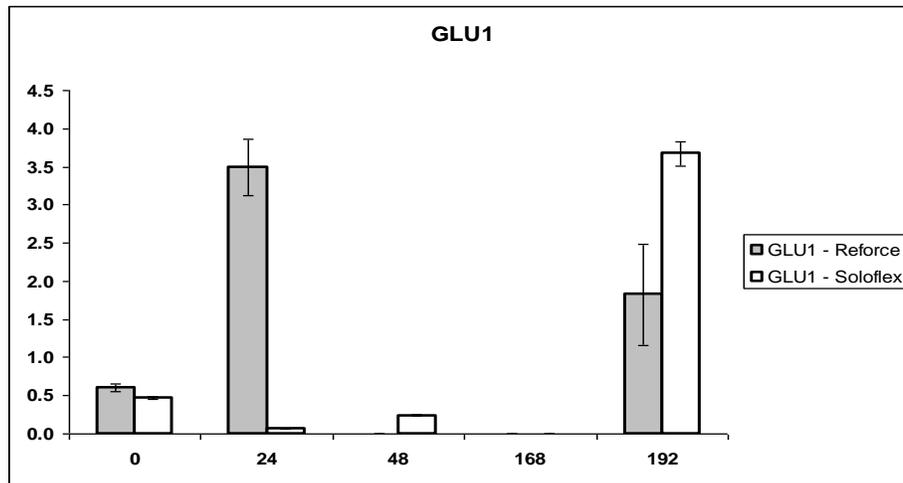
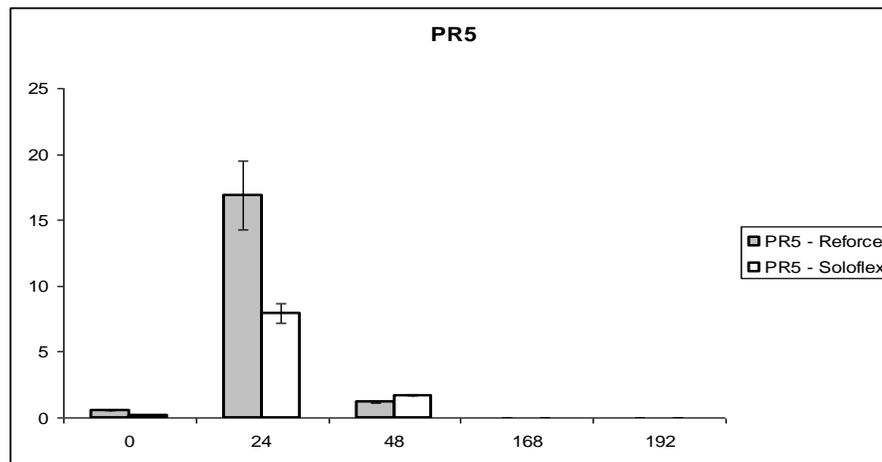


Gráfico 3 Perfil da expressão quantitativa por PCR em tempo real dos genes *AOS2* (aleno óxido sintase), *GLU1* ( $\beta$ -3-glucanase) e *PR5* (osmotina), nos tempos 0, 24, 48, 168 e 192 horas após a pulverização de mudas de cafeeiro com Reforce<sup>®</sup> e Soloflex<sup>®</sup>, sem inoculação do patógeno. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão do gene *GAPDH2* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)

(...continua...)



"Gráfico 3, continua"



"Gráfico 3, conclusão"

#### **4.2 Quantificação do nível de expressão dos genes *AOS2*, *GLU1* e *PR5* por PCR em tempo real avaliado em mudas de café inoculadas com *Hemileia vastatrix* após terem sido tratadas com Reforce<sup>®</sup> e Soloflex<sup>®</sup>**

A análise da expressão dos genes *AOS*, *GLU1* e *PR5* em mudas pulverizadas com Reforce<sup>®</sup> e Soloflex<sup>®</sup> inoculadas com *Hemileia vastatrix* foi feita nos tempos 0, 24 e 48 horas após a inoculação com o patógeno, a qual ocorreu 168, 192 e 216 horas, respectivamente, após a pulverização com os indutores.

O maior nível de expressão foi observado para o gene *GLU1* 24 horas após a pulverização com Soloflex<sup>®</sup>, seguido pelo gene *PR5*, induzido 48 horas após a pulverização com o mesmo indutor. Para o gene *AOS2*, houve uma pequena indução (Gráfico 4).

O perfil de expressão do gene *GLU1* foi semelhante para os dois tratamentos (Reforce<sup>®</sup> e Soloflex<sup>®</sup>), aumentando sua expressão 24 horas após inoculação com *Hemileia vastatrix*. Já para o gene *AOS2*, houve uma pequena indução após a inoculação das plantas pulverizadas com Reforce<sup>®</sup>, enquanto para as plantas pulverizadas com Soloflex<sup>®</sup>, não foi detectada expressão deste gene. Para o gene *PR5*, as plantas inoculadas tratadas com Reforce<sup>®</sup> foram induzidas 24 horas após a inoculação, já as plantas inoculadas, tratadas com Soloflex<sup>®</sup>, foram induzidas 48 horas após a inoculação.

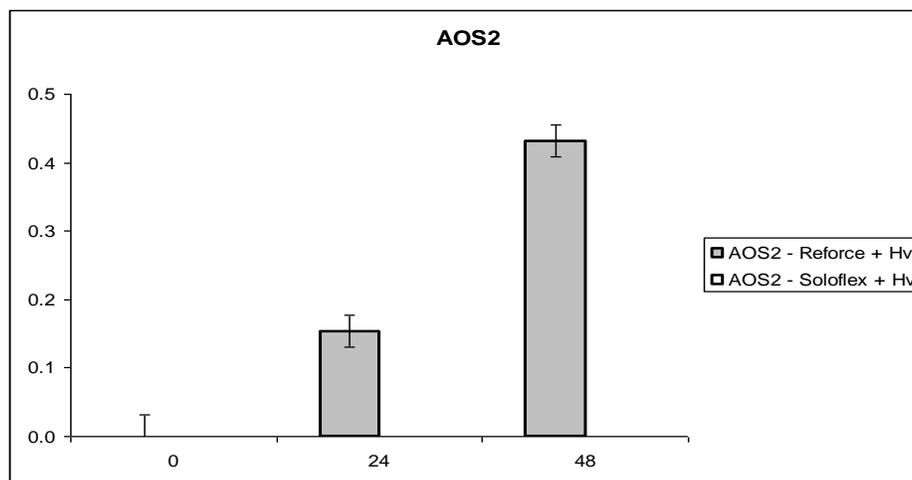
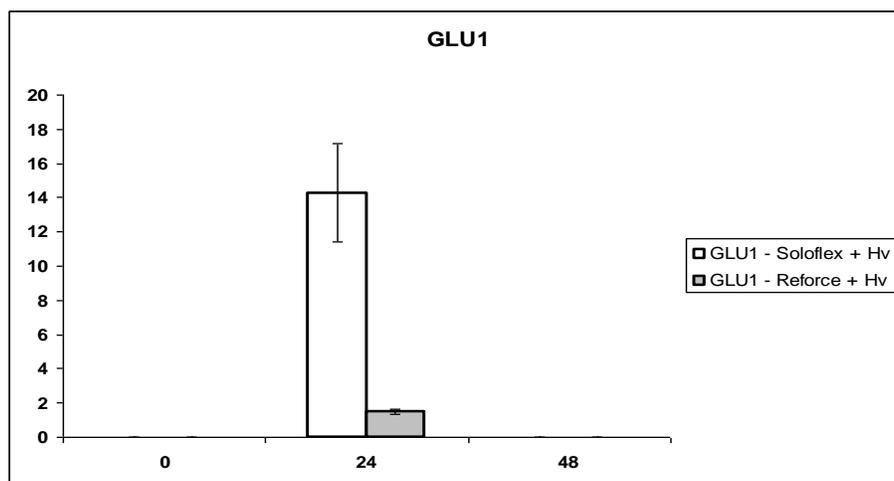
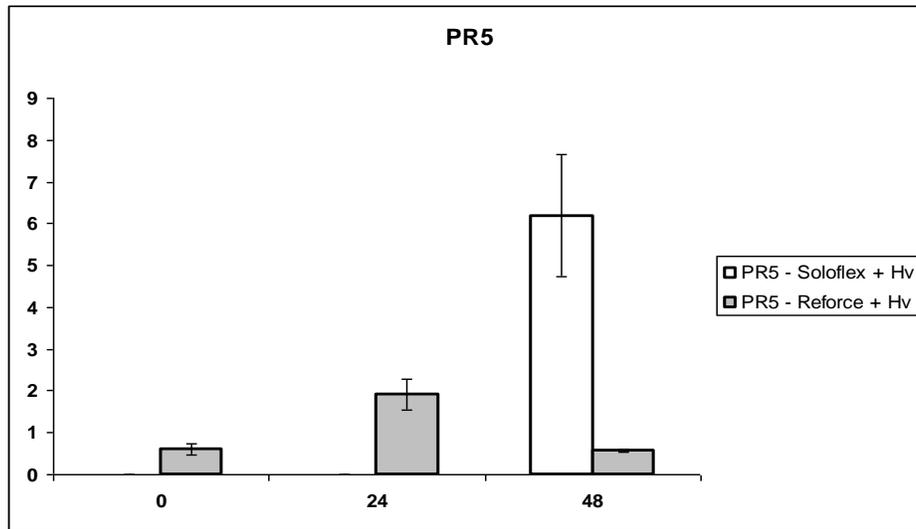


Gráfico 4 Perfil da expressão quantitativa por PCR em tempo real dos genes *AOS2* (aleno óxido sintase), *GLU1* ( $\beta$ -1,3-glucanase) e *PR5* (osmotina), nos tempos 0, 24 e 48 horas após a inoculação das mudas de cafeeiro com *H. vastatrix* equivalentes a 168, 192 e 216 horas após a pulverização com Reforce<sup>®</sup> e Soloflex<sup>®</sup>. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão do gene *GAPDH2* (gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase)

(...continua...)



“Gráfico, 4 continua”



“Gráfico 4, conclusão”

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho estudou, pela primeira vez, o perfil de expressão de três genes (*AOS2*, *GLU1* e *PR5*) marcadores de resistência das vias SAR e ISR, em mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo, suscetível ao fungo *Hemileia vastatrix*, em resposta aos tratamentos com os indutores Soloflex<sup>®</sup> e Reforce<sup>®</sup>. Diversos trabalhos confirmam que esses genes têm sua expressão induzida ou ocorre o acúmulo das proteínas por eles codificadas em resposta aos indutores de resistência e à presença de patógenos em cafeeiro (GUZZO; MARTINS, 1996).

Nas nossas análises, o gene *AOS2* (enzima que leva a biossíntese do ácido jasmônico) apresentou dinâmica de expressão distinta quando aplicados os indutores de resistência Soloflex<sup>®</sup> e Reforce<sup>®</sup>. Este gene apresentou o maior nível de indução em 24h após a pulverização com Reforce<sup>®</sup>. Interessante observar que depois das 24h, a expressão deste gene foi reprimida, sugerindo que a ação deste produto ocorre nas primeiras horas. Por outro lado, quando o fungo é aplicado na planta junto com Reforce<sup>®</sup>, houve um ligeiro aumento gradual de expressão à medida que aumentou o tempo de exposição, indicando que a aplicação de Reforce<sup>®</sup> mais o fungo não apresentou a resposta de resistência esperada.

Guzzo et al.(2009) observaram que, em plantas de café, o nível de expressão deste gene, apresentou maior indução em 72h após o tratamento com o indutor de resistência Bion<sup>®</sup>, seguido de uma repressão. Esses resultados indicam a importância da escolha dos produtos corretos, pois dependendo da gravidade da infestação, produtos com ação mais tardia podem prejudicar a recuperação da cultura. Por outro lado, quando a planta foi pulverizada com Soloflex<sup>®</sup>, observou-se uma repressão deste gene 24h após a pulverização, resultado oposto foi observado com a aplicação do produto Reforce<sup>®</sup>. Em 48h, o gene *AOS2* apresentou uma leve indução após a pulverização com Soloflex<sup>®</sup>,

enquanto que, para o mesmo indutor, *AOS2* não foi expresso quando o fungo estava presente. Estes resultados indicam que embora tenha havido uma leve indução, essa pode não ser suficiente para a planta apresentar resposta de defesa.

O gene *GLUI* ( $\beta$ -1,3-glucanase) apresentou um maior nível de expressão 24h após a pulverização com Reforce<sup>®</sup> e 192h após a pulverização com Soloflex<sup>®</sup>. Estudos prévios demonstraram que o *GLUI* foi reprimido 24 horas após o tratamento de café com Bion<sup>®</sup> e o maior nível de expressão foi observado 72h após o tratamento com o mesmo indutor de resistência (GUZZO et al., 2009) . O acúmulo de transcritos foi observado cerca de 24h após a inoculação com o patógeno para o gene *GLUI* (Reforce<sup>®</sup> e Soloflex<sup>®</sup>), indicando que estes produtos atuam como indutores de resistência, conferindo resposta de defesa em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*.

O Gene *PR5* apresentou maior indução 24h após a pulverização com Reforce<sup>®</sup> e Soloflex<sup>®</sup>, seguido por uma repressão ao longo do tempo de exposição. Este resultado foi similar ao observado após a inoculação do fungo com o indutor Reforce<sup>®</sup>, diferenciando-se quanto ao nível de expressão. Por outro lado, com o fungo, Soloflex<sup>®</sup> apresentou maior indução em 48h. Resultados complementares com estudos citológicos revelaram que a resposta da indução de resistência em células de folha de café provavelmente ocorre logo após a penetração da hifa dentro da câmara subestomática (SILVA et al., 2002).

Silva et al. (1999) verificaram que hifas intercelulares de *Hemileia vastatrix*, incluindo células-mãe do haustório, contêm  $\beta$ -1,3-glucano em suas paredes celulares, logo a indução de  $\beta$ -1,3-glucanases e osmotinas em plantas de café pulverizadas com Reforce<sup>®</sup> e Soloflex<sup>®</sup> poderiam contribuir para a restrição do desenvolvimento de fungos por hidrólise das estruturas de infecção do patógeno.

Desta forma, nossos dados sugerem que as vias de defesa induzidas por Soloflex<sup>®</sup> e Reforce<sup>®</sup> sejam compartilhadas por outros indutores previamente

descritos como o BION<sup>®</sup>, por exemplo. No entanto, algumas etapas de sinalização das vias podem ser distintas. Os dados apresentados devem ser interpretados com cuidado, pois picos de expressão ou repressão dos genes avaliados podem não coincidir com os tempos correspondentes aos das amostras avaliadas. Desta forma, estudos complementares serão necessários para confirmar nossos resultados.

## 6 CONCLUSÃO

De modo geral, as respostas de cafeeiro a indutores e fungos puderam ser analisadas pelo perfil de expressão característica de cada gene. Com base nos resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir que:

Os tratamentos com Soloflex<sup>®</sup> e Reforce<sup>®</sup> induziram a expressão do gene *GLU1* em mudas de cafeeiro suscetíveis à ferrugem alaranjada 192 e 24 horas respectivamente, após a pulverização. Para o gene *AOS2*, houve indução após 24 horas apenas para as plantas tratadas com Reforce<sup>®</sup>. O gene *PR5* apresentou aumento da expressão 24 horas após tratamento com os dois indutores, Soloflex<sup>®</sup> e Reforce<sup>®</sup>.

A expressão gênica foi potencializada pelo patógeno em mudas de cafeeiro pulverizadas com Soloflex<sup>®</sup> e Reforce<sup>®</sup> para os genes *GLU1* e *PR5*. Para o gene *GLU1*, a indução ocorreu 24 horas após a inoculação das plantas pulverizadas tanto com Reforce<sup>®</sup>, quanto com Soloflex<sup>®</sup> e, para o gene *PR5*, a indução ocorreu 24 horas após a inoculação para as plantas tratadas com Reforce<sup>®</sup> e 48 horas após a inoculação para as plantas tratadas com Soloflex<sup>®</sup>. Não foram observadas variações significativas de indução para o gene *AOS2*.

Nossos dados sugerem então que o tratamento das plantas de café com Soloflex<sup>®</sup> e Reforce<sup>®</sup> aumentam a expressão de genes relacionados à resposta de defesa, resposta esta mediada pelo ácido salicílico e pelo ácido jasmônico. Estudos mais detalhados deverão ser conduzidos futuramente para confirmar esta hipótese. Estudos mais detalhados deverão ser conduzidos futuramente para confirmar esta hipótese.

## REFERÊNCIAS

AGOSTINI, J. P.; BUSHONG, P. M.; TIMMER, L. W. Greenhouse evaluation of products that induce host resistance for control of scab, melanose, and alternaria brown spot of citrus. **Plant disease**, St. Paul, v. 87, n. 1, p. 69-74, Jan. 2003.

AGRICHEM FERTILIZANTES AGRÍCOLAS. Disponível em:  
<<http://agrichem.com.br/produtos2.asp?id=51>>. Acesso em: 5 fev. 2011.

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

ARAÚJO, L. et al. Fosfitos de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 2, p. 148-152, 2008.

ATIYEH, R. M. et al. The influence of humic acids derived from earthworm processed organic wastes on plant growth. **Bioresource Technology**, New York, v. 84, p. 7-14, 2002.

BARGUIL, M. B. **Indução de resistência e reação de cultivares de *Coffea arabica* L. a *Phoma costarricensis* ECHANDI**. 2004. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

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

BEAUVÉRIE, J. Le *Botrytis cinerea* et al maladie de la toile. **Les Comptes rendus de l'Académie des sciences**, Paris, v. 128, p. 846-849, 1251-1253, 1901.

BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R. R. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici* in tomato. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 118, p. 1203-1212, 1998.

BENHAMOU, N.; THERIAULT, G. Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, p. 33-52, 1992.

BERZELIUS, J. J. **Lehrbuch der Chemie**. Leipzig: Wöhler, 1839. 279 p.

BLUM, L. E. B. et al. Fosfitos aplicados em pós-colheita reduzem o mofo-azul em maçãs 'Fuji' e 'Gala'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 265-268, 2007.

BONETI, J. I. S.; KATSURAYAMA, Y. Viabilidade do uso de fosfitos no controle da sarna da macieira. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 18, n. 1, p. 51-54, jan./abr. 2005.

BOSTOCK, R. M. et al. Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 107, p. 103-111, 2001.

BRIDSON, D. M. Additional notes on *Coffea* (Rubiaceae) from Tropical East Africa. **Kew Bulletin**, New York, v. 49, p. 331-342, 1994.

BROWN, J. et al. The effect of coffee leaf rust on defoliation and yield of coffee in Papua New Guinea. **Crop Protection**, Lisboa, v. 14, p. 589-592, 1995.

CANELLAS, L. P. et al. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence and plasma membrane H-ATPase activity in maize roots. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 130, p. 1951-1957, 2002.

CARVALHO, V. L.; CUNHA, R. L.; CHALFOUN, S. M. Manejo ecológico das principais doenças do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 214/215, p. 101-114, 2002.

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

CAVALCANTI, L. S.; RESENDE, M. L. V. Efeito da época de aplicação e dosagem do acibenzolar-S-metil na indução de resistência à murcha-de-Verticillium em cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 67-71, 2004.

CAZORLA, F. M. et al. Field evaluation of treatments for the control of the bacterial apical necrosis of mango (*Mangifera indica*) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 116, n. 4, p. 279-288, Dec. 2006.

CHEN, Y.; NOBILI, M. D.; AVIAD, T. Stimulatory effect of humic substances on plant growth. In: MAGDOFT, F. AND RAY, R. (Ed.). **Soil organic matter in sustainable agricultural**. Washington: CRC, 2004. p. 103.

CHESTER, K. S. The problem of acquired physiological immunity in plants. **Quarterly Review of Biology**, Stony, v. 8, p. 275-324, 1933.

CLENDENNEN, S. K.; MAY, G. D. Differential gene expression in ripening banana fruit. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 115, n. 2, p. 463-469, 1997.

COHEN, Y.; GISI, U.; MOSINGER, E. Systemic resistance of potato plants against *Phytophthora infestans* induced by unsaturated fatty acids. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 38, p. 255-263, 1991.

CONRATH, U. et al. Priming: getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 19, n. 10, p. 1062-1071, 2006.

CONRATH, U. et al. Priming in plant pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, p. 210-216, 2002.

COQUOZ, J. L. et al. Arachidonic acid treatment of potato plants induces local synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. **Phytopathology**, Ithaca, v. 85, p. 1219-1224, 1995.

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

CRUIKSHANK, I.; MANDRYK, M. The effect of stem infestations of tobacco with *Peronospora tabacina* adam. on foliage reaction to blue mold. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, Sydney, v. 26, p. 369-372, 1960.

CRUZ, F. et al. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. **Molecular Breeding**, Lleida, v. 23, p. 607-616, 2009.

DA MATTA, F. M. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 16, p. 1-6, 2004.

DANTAS, S.A. F. et al. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 30, n. 4, p. 314-319, 2004.

DEAN, R.; KUC, J. Induced systemic protection in cucumber: The source of the "signal". **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 28, p. 227-233, 1986.

DE KREIJ, C.; BASAR, H. Effect of humic substances in nutrient film technique on nutrient uptake. **Journal of Plant Nutrition**, Oxford, v. 18, p. 793-802, 1995.

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

DOKE, N.; RAMIREZ, A. V.; TOMIYAMA, K. Systemic induction of resistance in potato plants against *Phytophthora infestans* by local treatment with hyphal wall components of the fungus. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 119, p. 232-239, 1987.

DUCHAUFOR, P. **Pedology**: pedogenesis and classification. London: George Allen & Unwin, 1982. 187 p.

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

EL-HAMALAWI, Z. A.; MENGE, J. A.; ADAMS, C. J. Methods of fosetyl-Al application and phosphonate levels in avocado tissue needed to control stem canker caused by *Phytophthora citricola*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n. 8, p. 770-778, Aug. 1995.

ETIENNE, P. et al. Induction of tcl 7, a gene encoding a  $\beta$ -subunit of proteasome, in tobacco plants treated with elicitors, salicylic acid or hydrogen peroxide. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v. 466, n. 2/3, p. 213-218, 2000.

FAZUOLI, L. C. et al. Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arábica obtidas no Instituto Agronômico de Campinas. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa, MG: UFV, 2002. cap. 5, p. 163-215.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <[http:// faostat. fao.org/](http://faostat.fao.org/)>. Acesso em: 7 dez. 2010.

FOUGHT, L.; KUC, J. Lack of specificity in plant extracts and chemicals as inducers of systemic resistance in cucumber plants to anthracnose. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, p. 1-6, 1996.

FRENDO, P. et al. Abiotic stresses induce a thaumatin-like protein in maize; cDNA isolation and sequence analysis. **Plant Science**, Limerick, v. 85, n. 1, p. 61-69, 1992.

FRIEDRICH, L. et al. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 10, n. 1, p. 61-70, 1996.

FRIMMEL, F. H.; CHRISTMAN, R. F. **Humic substances and their role in the environment**. Chichester: J. Wiley, 1988. 271 p.

FURLANI JÚNIOR, E. F. et al. Avaliação de cultivares de café arábica em região marginal. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 29, n. 2, p. 197-203, 2007.

GAO, L. L. et al. Involvement of the octadecanoid pathway in bluegreen aphid resistance in *Medicago truncatula*. **Mol Plant-Microbe Interact**, Columbia, v. 20, n. 1, p. 82-93, 2007.

GARÇON, C. L. P. et al. Controle da ferrugem do cafeeiro com base no valor de severidade. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 486-491, 2004.

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

- GORLACH, J. et al. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates expression and disease resistance in wheat. **The Plant Cell**, Norwich, v. 8, p. 629-643, 1996.
- GOTTSTEIN, H. D.; KUC, J. A. Induction of systemic resistance to anthracnose in cucumber by phosphates. **Phytopathology**, Ithaca, v. 79, p. 176-179, 1989.
- GUEST, D. et al. Long-term control of *Phytophthora* disease of cocoa using trunkinjected phosphonate. **Plant Pathology**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 479-492, June 1994.
- GUZZO, S. D. et al. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivos do Instituto Biológico de Defesa Agrícola e Animal**, São Paulo, v. 68, p. 89-94, 2001.
- GUZZO, S. D. et al. Resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* e indução local e sistêmica de quitinases e b-1,3-glucanases por acibenzolar-S-metil. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 30, n. 3, p. 376-381, 2004.
- GUZZO, S. D.; HARAKAVA, R.; TSAI, S. M. Identification of coffee genes expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with *Hemileia vastatrix*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, p. 625-638, mar. 2009.
- GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F. Local and systemic induction of  $\beta$ -1, 3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 9-10, p. 449-454, 1996.
- GUZZO, S. D. Proteínas relacionadas à patogênese. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, p. 283-332, 2003.
- HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J. P.; VAN LOON, L. C. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 107, p. 1-6, 2001.
- HATCHER, P. G. et al. Modern analytical studies of humic substances. **Soil Science**, Baltimore, v. 166, p. 770-794, 2001.

IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, n. 3, p. 171-180, 2003.

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

JAKAB, G. et al.  $\beta$ - Aminobutyric acid-induced resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 107, p. 29-37, 2001.

KAUSER, A.; MALIK, F.; AZAM, F. Effect of humic acid on wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling growth. **Environmental and experimental botany**, Elmsford, v. 25, p. 245-252, 1985.

KELLER, H. et al. Physiological and molecular characteristics of elicitor-induced systemic acquired resistance in tobacco. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 110, p. 365-376, 1996.

KESSMANN, H. et al. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 439-59, 1994.

KOHLER, A.; SCHWINDLING, S.; CONRATH, U. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 128, n. 3, p. 1046-1056, 2002.

KONONOVA, M. M. **Die humusstoffe des bodens:** ergebnisse und probleme de humusforschung. Berlin: VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, 1958. 341 p.

KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 107, p. 7-12, 2001.

KUC, J.; SHOCKLEY, G.; KEARNEY, K. Protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 7, p. 195-199, 1975.

LATUNDE-DADA, A. O.; LUCAS, J. A. The plant defense activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 58, p. 199-208, 2001.

LEE, H. I.; LEON, J.; RASKIN, I. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States American**, Bekerley, v. 92, p. 4076-4079, 1995.

LEQUEU, J. et al. Proteasome comprising a b 1 inducible subunit acts as a negative regulator of NADPH oxidase during elicitation of plant defense reactions. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 579, n. 21, p. 4879-4886, 2005

LIM, T. M. Trunk injection with phosphorous acid for controlling *Phytophthora* on chestnuts: early promising results. In: BIENNIAL CONFERENCE. AUSTRALASIAN PLANT PATHOLOGY SOCIETY, 9., 1993, Hobart. **Abstract...** Hohart: CSIRO, 1993. p. 25.

MACKOWIAK, C. L.; GROSSL, P. R.; BUGBEE, B. G. Beneficial effects of humic acid on micronutrient availability to wheat. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 56, p. 1744-1750, 2001.

MAGGIONI, A. et al. Action of soil humic matter on plant roots: Stimulation of íon uptake and effects on ( $Mg^{2+} + K^{+}$ ) ATPase activity. **Science of the Total Environment**, Ann Arbor, v. 62, p. 355-363, 1987.

MANSK, Z. Doenças do cafeeiro. In: CONGRESSO. BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 16., 1990, Espírito Santo do Pinhal. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1990. p. 61-77.

MARTINS, E. M. F. Controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) através da indução de resistência. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1991. cap. 24, p. 345-363.

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

MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. **Annals of Botany**, Oxford, v. 82, n. 5, p. 535-540, 1998.

- MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 107, p. 13-18, 2001.
- MIRANDA, E. M.; PEREIRA, R. C. A.; BERGO, C. L. Comportamento de seis linhagens de café (*Coffea arabica* L.) em condições de sombreamento e a pleno sol no estado do Acre. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 1, p. 62-69, 1999.
- MISHINA, T. E.; ZEIER, J. Pathogen associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 50, p. 500-513, 2007.
- MORAES, W. B. C. Controle alternativo de fitopatologia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 175-190, 1992.
- NOJOSA, G. B. A. **Efeito de indutores na resistência *Coffea arabica* L. a *Hemileia vastatrix* BERK & BR. e *Phoma costarricensis* ECHANDI**. 102 p. 2003. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- OOSTENDORP, M. et al. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 107, p. 19-28, 2001.
- ORLOV, D. S. **Humus acids of soils**. New Delhi: Oxonian, 1985. 378 p.
- 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. 345-354, 2002.
- PASCHOLATI, S. F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos**. 1998. 123 p. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.
- PATRÍCIO, F. R. A. et al. Effectiveness of acibenzolar-S-methyl, fungicides and antibiotics for the control of brown eye spot, bacterial blight, brown leaf spot and coffee rust in coffee. **Annals of Applied Biology**, London, v. 152, n. 1, p. 29-39, 2007.

PEPITA FERTILIZANTES. Disponível em:

<<http://www.pepitafertilizantes.com.br>>. Acesso em: 12 dez. 2010.

PEREIRA, R. B. **Extrato de casca de café e óleo de tomilho no controle de *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke em cafeeiro**. 2006. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

PIETERSE, C. M. J. et al. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signaling and expression. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 107, p. 51-61, 2001.

PROST, S. D. et al. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 139, p. 1902-1913, 2005.

QUERINO, C. M. B. et al. Efeito de dois indutores de resistência sobre a severidade do mal-do-Panamá. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 239-243, 2005.

RAY, J. Les maladies cryptogamiques des végétaux. **Revue Générale de Botanique**, Paris, v. 13, p. 145-151, 1901.

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

RESENDE, M. L. V. et al. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 621-628, 2002.

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, 1994.

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

RICCI, M. S. F.; ARAÚJO, M. C. F.; FRANCH, C. M. C. **Cultivo orgânico do café: recomendações técnicas**. Brasília: EMBRAPA, 2002. 101 p.

ROSS, F. A. Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. **Virology**, New York, v. 14, p. 340-358, 1961.

RYALS, J. A. et al. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Norwich, v. 8, p. 1809-1819, 1996.

SASSA, H.; HIRANO, H. Style-specific and developmentally regulated accumulation of a glycosylated thaumatin/PR5-like protein in Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). **Planta**, Berlin, v. 205, n. 4, p. 514-521, 1998.

SCHAFFRATH, U.; SCHEINPFLUG, H.; REISENER, H. J. An elicitor from *Pyricularia oryzae* induces resistance responses in rice: Isolation, characterization and physiological properties. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 46, p. 293-307, 1995.

SCHENK, P. M. et al. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of American**, Berkeley, v. 97, p. 11655-11660, 2000.

SCHEUERELL, S. J.; MAHAFFEE, W. H. Compost Tea as a Container Medium Drench for Suppressing Seedling Damping-Off Caused by *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, Ithaca, v. 94, p. 1156-1163, 2004.

SCHEUERELL, S. J.; MAHAFFEE, W. H. Variability Associated with Suppression of Gray Mold (*Botrytis cinerea*) on Geranium by Foliar Applications of Nonaerated and Aerated Compost Teas. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, p. 1201-1208, 2006.

SCHUTTE, G. C.; BEZUIDENHOUT, J. J.; KOTZE, J. M. Timing of application of phosphonate fungicides using different application methods as determined by means of gas liquid-chromatography for *Phytophthora* root rot control of citrus. **Phytophactica**, Pretoria, v. 23, n. 1, p. 69-71, 1991.

SHEARER, B. L.; FAIRMAN, R. G.; GRANT, M. J. Effective concentration of phosphite in controlling *Phytophthora cinnamomi* following stem injection of *Banksia* species and *Eucalyptus marginata*. **Forest Pathology**, Aberdeen, v. 36, n. 2, p. 119-135, Apr. 2006.

SHULAEV, V.; LEON, J.; RASKIN, I. Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? **The Plant Cell**, Norwich, v. 7, p. 1691-1701, 1995.

SILVA, M. C. et al. Cytochemical aspects of the plant–rust fungus interface during the compatible interaction *Coffea arabica* (cv. Caturra) - *Hemileia vastatrix* (race III). **International journal of plant sciences**, Chicago, v. 160, p. 79–91, 1999.

SILVA, M. C. et al. Hypersensitive cell death and post-haustorial defense responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*-race II) growth in resistant coffee leaves. **Physiological and molecular plant pathology**, London, v. 60, p. 169–183, 2002.

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 189-196, 2007.

SMILLIE, R.; GRANT, B. R.; GUEST, D. The mode of action of phosphate: evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp in plants. **Phytopathology**, Ithaca, v. 79, n. 9, p. 921-926, Sept. 1989.

STEVENSON, F. J. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions**. New York: J. Wiley, 1994. 496 p.

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

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

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, London, v. 35, p. 71-74, 2007.

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, p. 453-483, 1998.

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

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

VAUGHAN, D.; MALCOLM, R. E. Effect of humic acid on invertase synthesis in roots of higher plants. **Soil Biology & Biochemistry**, Brisbane, v. 11, p. 247-252, 1979.

VEGRO, C. L. R.; FERREIRA, C. R. R. P. T. Evolução das despesas com defensivos agrícolas e fertilizantes para a safra de café 2000/01 nos estados de São Paulo e Paraná. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 30, p. 53-59, 2000.

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

VERHAGEN, B. W. M.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, M. J. Induced Disease Resistance Signaling in plants. **Global Science Books**, Utrecht, v. 35, p. 334-343, 2006.

WEI, Z. M. et al. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. **Science**, Washington, v. 257, p. 85-88, 1992.

XIONG, L. et al. Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 14, n. 5, p. 685-692, 2001.

YU, L. M. Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States American**, Bekerley, v. 92, p. 4088-4094, 1995.

ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E. M.; VÁRZEA, V. M. P. **Durable resistance to coffee leaf rust**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 460 p.

ZAMBOLIM, L. et al. Epidemiologia e controle integrado da ferrugem-do-cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 369-450.

ZAMBOLIM, L. et al. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças. In: RIBEIRO DO VALE, F. X.; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa, MG: Departamento de Fitopatologia, 1997. v. 2, p. 83-179.