



JOYCE ALVES GOULART DA SILVA

**INDUTORES DE RESISTÊNCIA E DEMAIS ASSOCIAÇÕES
NO MANEJO DA FERRUGEM E CERCOSPORIOSE DO
CAFEEIRO (*Coffea arabica*): ANÁLISES BIOQUÍMICAS E
FISIOLÓGICAS**

**LAVRAS – MG
2018**

JOYCE ALVES GOULART DA SILVA

**INDUTORES DE RESISTÊNCIA E DEMAIS ASSOCIAÇÕES NO MANEJO DA
FERRUGEM E CERCOSPORIOSE DO CAFEIEIRO (*Coffea arabica*):
ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS**

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

Ph.D. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

**LAVRAS - MG
2018**

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

Silva, Joyce Alves Goulart da.

Indutores de resistência e demais associações no manejo da ferrugem e cercosporiose do cafeeiro (*Coffea arabica*): análises bioquímicas e fisiológicas / Joyce Alves Goulart da Silva. – 2018.
131 p. : il.

Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. *Hemileia vastatrix*. 2. *Cercospora coffeicola*. 3. Controle alternativo. I. Resende, Mário Lúcio Vilela de. II. Título.

JOYCE ALVES GOULART DA SILVA

**INDUTORES DE RESISTÊNCIA E DEMAIS ASSOCIAÇÕES NO MANEJO DA
FERRUGEM E CERCOSPORIOSE DO CAFEIEIRO (*Coffea arabica*):
ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS**

**RESISTANCE INDUCTORS AND OTHER ASSOCIATIONS IN THE
MANAGEMENT OF COFFEE (*Coffea arabica*) RUST AND CERCOSPORIOSIS:
BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL ANALYZES**

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

APROVADA em 27 de março de 2018.

Ph.D. Leonor Guerra-Guimarães

Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho

Dra. Fernanda Carvalho Lopes de Medeiros

Dr. Mário Sobral de Abreu

Universidade de Lisboa, Portugal

EMBRAPA-CAFÉ

UFLA

UFLA

Ph.D. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

**LAVRAS - MG
2018**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde e força para realizar mais esta etapa em minha vida.

À Nossa Senhora, minha protetora, que sempre intercede a Deus por mim.

À Universidade Federal de Lavras, em especial, ao programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela oportunidade de realização do doutorado, à CAPES e ao CNPq pela concessão de bolsa de estudos e ao INCT-Café por financiar a realização deste trabalho.

Ao professor Mário Lúcio Vilela de Resende, pela orientação, amizade e confiança.

À pesquisadora Leonor Guerra-Guimarães, pessoa fundamental na realização deste trabalho, com suas orientações, ensinamentos, apoio e pela amizade construída.

À pesquisadora Milene Alves de Figueiredo Carvalho, pela valiosa colaboração com os experimentos de fisiologia e essencial contribuição com a estatística.

À pesquisadora Fernanda Carvalho Lopes de Medeiros, pelas valorosas contribuições nas correções deste trabalho.

À minha mãe, sempre um porto.

À minha irmã pela amizade sincera.

À minha família pelas constantes orações.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite para participar e pelas relevantes sugestões.

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

A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela agradável convivência e momentos compartilhados.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo: Eliane, Stefanny, Tharyn, Bruno Costa, Manoel, Dário, Moisés, Camila Carvalho, Victor, Alexandre, Túlio, Evandro, Mariana, Bruno e José Diogo pela convivência e auxílio nos ensaios. Meu agradecimento especial à Ana Cristina, pelas orientações e paciência. À Deila por sua fundamental contribuição com a estatística e pelo carinho.

Aos amigos do INCT-café Marluce, Alexandre Rezende e Wilder pelo agradável convívio e disponibilidade em ajudar.

Aos amigos do setor de cafeicultura Sr. José Maurício, Alexandre, Felipe e David pela convivência e colaboração do experimento de campo.

Ao amigo Marcelo Loran por ter me incentivado, na época da graduação, a enveredar pela área da Fitopatologia.

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

Muito obrigada!

RESUMO GERAL

A ferrugem e a cercosporiose são as principais doenças fúngicas do cafeeiro no Brasil, causadas por *Hemileia vastatrix* e *Cercospora coffeicola*, respectivamente. A utilização de indutores de resistência (IRs), no manejo de doenças de plantas, é uma medida promissora, visto que esses produtos ativam os mecanismos de defesa contra um amplo espectro de patógenos. Assim, foi proposto, no presente trabalho, avaliar o efeito destes compostos IRs no manejo de doenças em diferentes condições de crescimento das plantas; no campo, em câmara de crescimento (Fitotron) e em casa de vegetação. Em condições de campo, foram avaliadas fontes de fosfonatos, formulação à base de cobre e formulação à base de subprodutos da lavoura cafeeira, aplicados isoladamente ou em associação com fungicida, no manejo da ferrugem e da cercosporiose. Observou-se que todas as associações e o fungicida aplicado isoladamente apresentaram um comportamento melhor que os demais tratamentos. De todos os produtos alternativos testados isoladamente, o fosfonato de K (2) se destacou dos demais para o controle da ferrugem, assemelhando-se aos tratamentos com fungicida. Dos tratamentos aplicados isoladamente, o Greenforce CuCa (formulação à base de subproduto da indústria cafeeira adicionada de cobre e cálcio) e óxido cuproso proporcionaram menor porcentagem de desfolha. Para a produtividade, dentre os tratamentos sem associação com fungicida, o Greenforce CuCa e o fosfonato de K (2) se destacaram significativamente. Com relação à composição química dos grãos, o tratamento fosfonato de Mn apresentou os valores mais elevados para trigonelina, cafeína, ácido clorogênico e sólidos solúveis. Para o ensaio em Fitotron, foi selecionado o Greenforce CuCa para estudar seus efeitos bioquímicos e fisiológicos, na interação de mudas de cafeeiro com *H. vastatrix*, comparado com o indutor de resistência padrão acibenzolar-S-metil (ASM). Foram realizadas análises da atividade das enzimas peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD), fenilalanina amônia liase (PAL) e polifenol oxidase (PPO), além da quantificação de peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica, fenol e lignina. Ademais, foram avaliados parâmetros relacionados às trocas gasosas: taxa fotossintética líquida, condutância estomática, taxa transpiratória, concentração intercelular de CO₂ no mesófilo (Ci), concentração intercelular de CO₂ no mesófilo/concentração de CO₂ externa atual (Ci/Ca), eficiência no uso da água, eficiência instantânea de carboxilação. Foi observado que a aplicação foliar de Greenforce CuCa, em mudas de cafeeiro, induziu resistência em plantas e proporcionou melhor preservação do aparelho fotossintético. O sistema antioxidante (SOD, POX e APX) foi eficiente, na eliminação do excesso de espécies reativas de oxigênio, de modo a impedir os danos celulares causados pela *H. vastatrix*. Nas plantas tratadas com ASM, as modificações bioquímicas foram mais evidentes ao nível das enzimas PAL e PPO o que sugere alterações relacionadas ao metabolismo dos compostos fenólicos. E, por fim, as plantas mantidas em casa de vegetação foram utilizadas, para avaliar a eficácia do Greenforce CuCa, comparando com o ASM no controle da ferrugem. O Greenforce CuCa mostrou um maior controle da doença do que o ASM. Por outro lado, verificou-se uma diminuição dos parâmetros fisiológicos (trocas gasosas e determinação da clorofila) estudados após a inoculação com *H. vastatrix*. No entanto, nas plantas tratadas com IRs (Greenforce CuCa e ASM), essa diminuição não foi tão drástica quanto nas plantas testemunha. Por fim, foram avaliados compostos do metabolismo secundário, trigonelina, cafeína e ácido clorogênico acumulados ao longo tempo. A aplicação de indutores de resistência e a inoculação com *H. vastatrix* alteraram as variáveis analisadas, indicando a influência dos tratamentos testados no conteúdo desses metabólitos. A aplicação de IRs contribuiu de forma favorável para integridade da planta.

Palavras-chave: *Hemileia vastatrix*. *Cercospora coffeicola*. Controle alternativo. Atividade enzimática. Trocas gasosas.

GENERAL ABSTRACT

Coffee leaf rust (CLR) and Brown eye spot are the main fungal diseases of coffee plants in Brazil, caused by *Hemileia vastatrix* and *Cercospora coffeicola*, respectively. The use of resistance inducers (RIs) in the management of plant diseases is a promising measure, since these products activate the mechanisms of defense against a broad spectrum of pathogens. Thus, this study aims at evaluating the effect of resistance inducers in the management of those diseases in different plant growth conditions: field, growth chamber (Fitotron) and greenhouse. Under field conditions, sources of phosphonates and copper - basic formulation and formulation based on products of the coffee crop industry, were applied alone or in association with fungicide. It was observed that all the associations and the fungicide applied alone showed a better behavior than the other treatments. Among all the alternative products tested alone, K phosphonate (2) stood out from the others for rust control, which was similar to the fungicide. Of the treatments applied in isolation, the Greenforce CuCa (by-product formulation of the coffee industry added copper and calcium) and cuprous oxide provided less percentage of defoliation. For productivity, among the treatments without association with fungicide, Greenforce CuCa and K phosphonate (2) were significantly better than the others. Regarding the chemical composition of the grains, the treatment with Mn phosphonate presented the highest values for trigonelline, caffeine, and chlorogenic acid. For plants kept in Fitotron, Greenforce CuCa was selected to study its biochemical and physiological effects on the interaction of coffee plants with *H. vastatrix* compared to the standard resistance inducer acibenzolar-S-methyl (ASM). The activity of peroxidase (POX), ascorbate peroxidase (APX), superoxide dismutase (SOD), phenylalanine ammonia lyase (PAL) and polyphenol oxidase (PPO) enzymes was evaluated, as well as quantification of hydrogen peroxide, lipid peroxidation, phenol and lignin. In addition, parameters related to leaf gas-exchange were evaluated: liquid photosynthesis rate, stomatal conductance, transpiratory rate, intercellular CO₂ concentration in the mesophyll (C_i), intercellular CO₂ concentration in the mesophyll/current external CO₂ concentration (C_i/C_a), water use efficiency, and instantaneous carboxylation efficiency. It was observed that the foliar application of Greenforce CuCa in coffee seedlings induced resistance in plants, providing better preservation of the photosynthetic apparatus. The anti-oxidant system (SOD, POX and APX) was efficient in eliminating excess reactive oxygen species in order to prevent the cellular damages caused by *H. vastatrix*. In plants treated with ASM, biochemical modifications were more evident at the level of PAL and PPO enzymes, which suggests alterations related to the metabolism of phenolic compounds. Finally, greenhouse plants were used to evaluate the efficacy of Greenforce CuCa compared to ASM in rust control. Greenforce CuCa showed greater disease control than ASM. On the other hand, there was a decrease in the physiological parameters (leaf gas - exchange and determination of chlorophyll) after the inoculation with *H. vastatrix*. However, in the IRs (Greenforce CuCa and ASM) treated plants, this decrease was not as drastic as in the control plants. The content in secondary metabolites, chlorogenic acid, trigonelline and caffeine was also analyzed throughout the infection process. The application of resistance inducers and the inoculation with *H. vastatrix* altered the analyzed variables, indicating the influence of the treatments on both the physiological parameters and the content of the secondary metabolic compounds. The application of IRs contributed in a favorable way to plant integrity.

Keywords: *Hemileia vastatrix*. *Cercospora coffeicola*. Alternative control. Enzymatic activity. Gas exchange.

LISTA DE FIGURAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 2

- Figura 1 - Atividade das enzimas PAL e POX em mudas de *Coffea arabica* submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) e inoculadas com *Hemileia vastatrix* (Hv).....77
- Figura 2 - Atividade da SOD e H₂O₂ em mudas de *Coffea arabica* submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) e inoculadas com *Hemileia vastatrix* (Hv).....79
- Figura 3 - Atividade da enzima APX e Peroxidação lipídica em mudas de *Coffea arabica* submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) e inoculadas com *Hemileia vastatrix* (Hv).81
- Figura 4 - Atividade da enzima PPO em mudas de *Coffea arabica* submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) e inoculadas com *Hemileia vastatrix* (Hv).....82
- Figura 5 - Lignina e compostos fenólicos solúveis em mudas de *Coffea arabica* submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) e inoculadas com *Hemileia vastatrix* (Hv)83
- Figura 6 - Avaliação da taxa fotossintética líquida (A) e condutância estomática (gs) em mudas de *Coffea arabica* submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) e inoculadas com *Hemileia vastatrix* (Hv).....85
- Figura 7 - Avaliação da concentração intercelular de CO₂ no mesófilo (Ci) e taxa transpiratória (E) em mudas de *Coffea arabica* submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) e inoculadas com *Hemileia vastatrix* (Hv).86
- Figura 8 - Avaliação do Ci/Ca e EUA em mudas de *Coffea arabica* submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) e inoculadas com *Hemileia vastatrix* (Hv).....87
- Figura 9 - Avaliação do EiC em mudas de *Coffea arabica* submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) e inoculadas com *Hemileia vastatrix* (Hv).88
- Figura 10 - Análise em componentes principais (ACP) realizada com as variáveis fisiológicas e atividades enzimáticas em mudas de *Coffea arabica* aos 3 dias após aplicação dos tratamentos.....89

Figura 11 - Análise em componentes principais (ACP) realizada com as variáveis fisiológicas e atividades enzimáticas em mudas de <i>Coffea arabica</i> nos tempos 4 e 5 dias após aplicação (daa) dos tratamentos.....	90
--	----

ARTIGO 3

Figura 1 - Efeito do Greenforce CuCa e do acibenzolar-S-metil (ASM) na área abaixo da curva de progresso da severidade da ferrugem (AACPSF) em mudas de cafeeiro e porcentagem de controle da doença em relação ao controle pulverizado com água.	116
Figura 2 - Cromatogramas dos padrões de trigonelina, ácido clorogênico e cafeína e do perfil do extrato de plantas inoculadas com <i>Hemileia vastatrix</i>	117
Figura 3 - Avaliação da trigonelina (A), cafeína (B) e ácido clorogênico (C) em mudas de <i>Coffea arabica</i>	118
Figura 4 - Avaliação da taxa fotossintética líquida e condutância estomática em mudas de <i>Coffea arabica</i>	119
Figura 5 - Avaliação da concentração intercelular de CO ₂ no mesofilo e taxa transpiratória em mudas de <i>Coffea arabica</i>	120
Figura 6 - Avaliação do Ci/Ca (A), EUA (B) e EiC (C) em mudas de <i>Coffea arabica</i>	121
Figura 7 - Avaliação do índice de clorofila a, clorofila b e clorofila total em mudas de <i>Coffea arabica</i>	122

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Table 1	List of treatments, products and doses used in the field experiments	58
Table 2	Effect of treatments on the area under the disease severity– progress curve (AUDsPC) and percentage of control on the coffee rust disease in 2015 and 2016 field experiments	59
Table 3	Effect of treatments on the area under the disease severity progress curve (AUDsPC) and percentage of control on the brown eye spot disease of coffee in 2015 and 2016 field experiments.....	60
Table 4	Effect of treatments on defoliation (2015) and yield (2016) for the cultivar Mundo Novo IAC 376/4 field experiments	61
Table 5	Pearson correlation coefficients for variables; disease, defoliation (2015) and yield (2016).....	62
Table 6	Mean squares for contrast between treatments for the variables: area under the rust severity progress curve (AUDsPC), area under the brown eye spot severity progression curve (AUDsPC) and productivity	63
Table 7	Effect of treatments on the chemical composition of coffee beans of the crop season 2015/2016.....	64

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	12
1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 A cultura do cafeeiro	14
2.2 Ferrugem alaranjada da folha do cafeeiro	14
2.3 Cercosporiose do cafeeiro	16
2.4 Estratégias da planta contra o patógeno	18
2.5 Indutores de resistência	22
REFERÊNCIAS	26
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	39
ARTIGO 1 - RESISTANCE INDUCERS APPLIED ALONE OR IN ASSOCIATION WITH FUNGICIDE FOR THE MANAGEMENT OF LEAF RUST AND BROWN EYE SPOT OF COFFEE DISEASES UNDER FIELD CONDITIONS	39
ARTIGO 2 - FORMULAÇÃO À BASE DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DO CAFÉ NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DO CAFEIEIRO À FERRUGEM: ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS	65
ARTIGO 3 - MANEJO DA FERRUGEM EM MUDAS DE CAFEIEIRO POR INDUTORES DE RESISTÊNCIA: FISIOLOGIA E METABOLISMO SECUNDÁRIO	108

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A cafeicultura é uma importante atividade agrícola no Brasil. Em dezembro de 2016, o café representou cerca de 9,8% das exportações brasileiras, ficando entre os 10 principais setores exportadores. A estimativa de produtividade de café (Arábica e Conilon), para a safra 2018, variou entre 28,41 e 30,54 sacas por hectare, equivalendo a um acréscimo de 17,7% a 26,5%, em relação à safra passada (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2018). No entanto a produtividade e o rendimento dos cafezais é dependente das condições climáticas e do manejo de pragas e doenças (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010). A ferrugem e a cercosporiose estão entre as principais doenças que acometem a cultura do cafeeiro no Brasil.

A ferrugem alaranjada é causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., um parasita biotrófico exclusivo do gênero *Coffea*. Estima-se que as perdas na produção de café, em virtude desta doença, variem de 30 a 50%, dependendo do nível de resistência do genótipo (CAPUCHO et al., 2013). A cercosporiose ou "mancha-de-olho-pardo" é causada pelo fungo necrotrófico *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke. É uma das doenças mais antigas do cafeeiro e sua ocorrência é endêmica, estando presente em todas as regiões cafeeiras do Brasil, constituindo-se numa doença de grande importância econômica, pois ocorre tanto em mudas no viveiro quanto em plantios no campo (CARVALHO; CHALFOUN, 1998; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

Até os dias de hoje, nunca foram encontradas cultivares de cafeeiro com resistência à *C. coffeicola*. Com relação a *H. vastatrix*, há cultivares com resistência, no entanto essa resistência tem sido quebrada pelo aparecimento e/ou alternância de novas raças do patógeno (MAIA et al., 2013). Diante disso, o controle químico tem sido a medida mais usada até o momento. Entretanto a utilização de agrotóxicos é, a cada dia, mais contestada pelos danos causados ao homem e ao ambiente, sem contar que pode vir a gerar resistência de fitopatógenos a fungicidas (CIA; PASCHOLATI; BENATO, 2007). Visando evitar estes problemas, formas alternativas de controle despertam interesse cada vez maior, levando à pesquisa e ao desenvolvimento de produtos eficazes e sustentáveis para o controle de fitopatógenos (DELIOPOULUS; KETTLEWELL; HARE, 2010).

Uma alternativa promissora é a utilização de indutores de resistência os quais vão ativar mecanismos de defesa latentes da planta (FERNANDES et al., 2013), por meio de

eliciadores contidos em agentes bióticos ou abióticos (UCHÔA et al., 2014). Entre os indutores de resistência, encontram-se o acibenzolar-S-Metil (ASM, Bion), Biopiról (CRUZ et al., 2011), fosfitos (DALIO et al., 2012), silicatos (RODRIGUES et al., 2009), formulações à base de subprodutos da cadeia produtiva do café (COSTA et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2016) e Agro-Mos (COSTA et al., 2010; GOMES et al., 2016).

A utilização de fertilizantes foliares, como os fosfitos e fosfonatos, tem ganhado importância no controle de doenças de plantas. Estes compostos que funcionam como nutrientes de plantas são também constituintes de vários produtos usados, no controle de fitopatógenos, podendo agir diretamente sobre o patógeno (SPOLTI et al., 2015) ou de forma indireta, induzindo a resistência sistêmica pela síntese de fitoalexinas, compostos fenólicos e proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) (CARMONA; SAUTUA, 2011; SAUTTER et al., 2008). Uma alternativa que pode ser utilizada, no manejo de doenças de plantas, que vem causando o interesse de pesquisadores, é o uso de formulações à base de extratos vegetais, os quais possuem substâncias bioativas, com propriedades para atuar como indutores de resistência (SANTOS et al., 2007).

A ativação da indução de resistência pode ocorrer por um número vasto de substâncias, que funcionam de forma a evitar ou atrasar a entrada e/ou a subsequente atividade do patógeno (OLIVEIRA; VARANDA; FELIX, 2016). Diversos mecanismos de defesa têm sua atividade aumentada, quando a célula vegetal está sob invasão, envolvendo a ativação de um conjunto de genes que codificam diversas proteínas. Estes estresses induzem alterações bioquímicas e fisiológicas nas plantas (GRANT; LAMB, 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes produtos: fontes de fosfonatos, formulação à base de cobre e formulação à base de subprodutos da lavoura cafeeira, no manejo da ferrugem e cercosporiose do cafeeiro, em condições de campo. Em seguida, foi avaliado em fitotron a formulação à base de subprodutos da lavoura cafeeira comparado ao indutor de resistência comercial ASM, com intuito de estudar o seu efeito na ativação de mecanismos enzimáticos e fisiológicos envolvidos nas respostas de defesa. E, por fim, estes produtos foram testados, em casa de vegetação, avaliando a severidade da doença, trocas gasosas e metabólitos secundários acumulados ao longo do tempo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do cafeeiro

O cafeeiro (*Coffea* spp.) é um arbusto da família Rubiaceae, pertencente ao gênero *Coffea*, da qual se conhecem 103 espécies (DAVIS et al., 2006). É uma das culturas tradicionais, no Brasil, que se destaca como o maior produtor e exportador desta “commodity”. Entre as espécies de cafeeiro cultivadas, *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex. A. Froehner são as mais importantes economicamente (ABRAHAO et al., 2010), responsáveis, respectivamente, por 80% e 20% da produção brasileira de café (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2017). Segundo dados da CONAB (2018), a estimativa, para a produção nacional de café beneficiado (arábica e conilon), está entre 54,4 e 58,5 milhões de sacas de 60 quilos, na safra de 2018. O estado de Minas Gerais representa o maior produtor nacional de café arábica. Este concentra a maior área plantada dessa espécie, com 964.654,0 hectares. Para a safra 2017, a produtividade média foi de, aproximadamente, 24,92 sacas/hectare e produção em torno de 24,04 milhões de sacas (CONAB, 2017).

Existem numerosas causas que afetam diretamente a produtividade do cafeeiro levando a perdas expressivas e, dentre as mais relevantes, estão: condições climáticas adversas, deficiências nutricionais e presença de pragas e doenças (OESTREICH-JANZEN, 2010). São importantes enfermidades do cafeeiro a ferrugem alaranjada, causada por *Hemileia vastatrix* Berk. & Br; cercosporiose, causada por *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke; antracnose dos frutos, causada por *Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge, considerada praga quarentenária ausente (A1) no Brasil; *Meloidogyne* spp.; mancha de Phoma, causada por *Phoma tarda* (Stewart) Boerema & Bollen, a mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* Young, Dye & Wilkie, entre outras (PATRÍCIO et al., 2008; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

2.2 Ferrugem alaranjada da folha do cafeeiro

A ferrugem-alaranjada da folha do cafeeiro é a principal doença que acomete as lavouras cafeeiras em abrangência e danos. Considerando a altitude, as condições climáticas e o estado nutricional da planta, a ferrugem pode causar perdas de até 50% na produção (CAPUCHO et al., 2013; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005). O fungo *H. vastatrix* Berkeley & Broome, agente etiológico dessa doença, interage de forma biotrófica com o

hospedeiro e depende de células vivas das plantas para crescer e se reproduzir (AZINHEIRA et al., 2010; NUNES et al., 2009; RAMIRO et al., 2009).

O desenvolvimento de *H. vastatrix* acontece, na superfície abaxial da folha e, para a realização deste evento, é necessário que haja condições de temperatura e umidade favorável para a germinação dos urediniósporos (SILVA; GUERRA-GUIMARÃES; NICOLE, 2005). No estágio inicial de desenvolvimento, os urediniósporos de *H. vastatrix* germinam e formam o tubo germinativo na extremidade do qual se vai formar o apressório, que dá origem à hifa de penetração (hifa intercelular) e, mais tarde, aos haustórios (hifas intracelulares) (DINIZ et al., 2012; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005). A disseminação do fungo ocorre mais eficientemente pela ação do vento, respingos de chuva, escorrimento de água pelas margens do limbo foliar para a superfície abaxial e pela ação do homem durante os tratamentos culturais (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

A ferrugem alaranjada do cafeeiro é uma doença foliar, os sintomas são iniciados por manchas cloróticas translúcidas com 1-3 mm de diâmetro, observadas na face abaxial do limbo foliar, podendo atingir de 1 a 2 cm de diâmetro, posteriormente, há o aparecimento de massas pulverulentas de coloração amarelo-alaranjada, constituídas por urediniósporos do patógeno. Na face adaxial das folhas, aparecem áreas de tonalidade amarelada, correspondente às regiões infectadas. Com o tempo, há uma progressão das lesões, que aumentam de tamanho e ocorre uma necrose central, em que a esporulação é reduzida (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

Dentre os danos causados pela ferrugem, a desfolha das plantas é o mais evidente (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997). A queda precoce das folhas resulta numa redução na capacidade fotossintética da planta que vai provocar um menor vingamento da florada, baixo vingamento dos chumbinhos, além de seca dos ramos plagiotrópicos (GREE, 1993; ZAMBOLIM et al., 1997). A perda das folhas, durante o desenvolvimento dos frutos, resulta na formação de grãos irregulares e frutos com lojas vazias, comprometendo a produção (MATIELLO et al., 2002). A desfolha provoca o superbrotamento do caule (ramos ladrões) e o acinturamento dos cafeeiros, levando-os às desbrotas e necessidade de podas corretivas para arquitetar as plantas dentro de um padrão (CARVALHO; CHALFOUN, 1998).

A ferrugem é controlada, principalmente, pelo uso de fungicidas (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010), porém observações sobre a utilização de fungicidas na agricultura, como aumento do custo de produção, atenuação dos recursos naturais, problemas

de intoxicação de aplicadores de defensivos agrícolas, aumento dos riscos da presença de resíduos nos produtos colhidos, tal qual o aparecimento de raças resistentes do patógeno têm levado a uma busca crescente por práticas de manejo de doenças mais racionais e por fungicidas de menores custos e toxicidade (ZAMBOLIM; VALE, 1999), como também métodos alternativos de controle de doenças em plantas (RESENDE et al., 2002).

2.3 Cercosporiose do cafeeiro

A cercosporiose causada pelo fungo *Cercospora coffeicola* (Berk. & Cooke) é uma das doenças mais importantes e antigas do cafeeiro (CARVALHO; CHALFOUN, 1998; SOUZA et al., 2011). Conhecida também por mancha circular, mancha parda ou olho de pombo, é uma doença que tem aumentado sua incidência, no cafeeiro, nos últimos anos e encontra-se disseminada em todas as regiões cafeeiras do Brasil (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997; MARTINS; MAFFIA; MIZUBUTI, 2008).

Os sintomas da cercosporiose são caracterizados por manchas circulares, de coloração castanho claro a escuro, com centro branco-acinzentado, quase sempre envolvidas por halo amarelo, dando à lesão um aspecto de olho. No centro cinza das lesões, notam-se pontuações escuras que constituem as frutificações do fungo (esporodóquios) (CHALFOUN, 1997; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005). Podem ocorrer variações nos sintomas descritos, por ausência do halo amarelado e, logo a doença é denominada, em algumas regiões, de cercospora-negra. Os frutos, quando infectados por *C. coffeicola*, suas lesões se tornam mais frequentes próximas da maturação. A infecção nos frutos inicia-se quatro meses, após a floração, com lesões deprimidas, castanho-claro, dispostas no sentido do pedúnculo-coroa do fruto. As manchas mais velhas são caracterizadas por coloração escura e com aspecto ressecado, nas quais a polpa correspondente ao local da lesão fica aderente ao pergaminho. Os frutos, quando submetidos ao ataque no estágio ainda verde e verde-cana, amadurecem, precocemente, com avermelhamento a partir da lesão. Em decorrência da maturação acelerada do fruto, ocorre aumento do número de grãos chochos e sua queda prematura (CHALFOUN, 1997; LIMA; POZZA; SANTOS, 2012; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

A cercosporiose constitui-se um problema desde as mudas no viveiro até os plantios no campo (LIMA; POZZA; SANTOS, 2012; POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010). Nos viveiros, a doença causa desfolha, interfere no crescimento das mudas, tornando-as raquíticas e inadequadas para o plantio. Já em plantios novos, comumente, ocorrem intensos ataques com desfolha acentuada, prejudicando o crescimento das mudas, principalmente, em

lavouras implantadas em terrenos de baixa fertilidade e/ou com adubações desequilibradas. Além disso, podem ocorrer ataques severos da doença, levando à queda de folhas e frutos após as produções iniciais. Em lavouras adultas, sem contar a queda de folhas, a doença promove, também, a queda prematura e chochamento dos frutos atacados, podendo funcionar ainda como porta de entrada para outros fungos que interferem na qualidade do café. Isso implica a redução da produção, o rendimento e depreciação da bebida (CHALFOUN, 1997).

A doença se desenvolve, em condições de umidade relativa alta, temperatura amena e excesso de insolação ou alta luminosidade. A intensidade de luz é significativa, no desenvolvimento da doença, pois, na presença de alta luminosidade, a cercosporina, toxina produzida por espécies do gênero *Cercospora*, é ativada e capaz de reagir com outras moléculas, em particular com o oxigênio, que é convertido em espécies reativas de oxigênio (EROs) altamente tóxicas para a célula do hospedeiro (BERESTETSKIY, 2008; DAUB; HERRERO; CHUNG, 2005). Não foi encontrado um alvo celular direto da cercosporina, mas acredita-se que sua toxicidade seja inteiramente atribuída ao dano indiscriminante por EROs (NEWMAN; TOWNSEND, 2016).

Em lavouras desenvolvidas, a nutrição deficiente e desequilibrada, solos com alto teor de argila, areia ou compactados, sistema radicular deficiente e pião torto são fatores que também contribuem para o desenvolvimento da doença (CHALFOUN, 1997; ZAMBOLIM et al., 1997). A nutrição mineral equilibrada está associada ao menor progresso de doenças, acumulação de compostos inibidores, ao redor do sítio de infecção, como também a barreiras mecânicas que impedem a penetração e a infecção por patógenos (POZZA; POZZA, 2003). Os prejuízos com a cercosporiose tiveram maior destaque econômico com a implantação de lavouras, na região dos cerrados ou em terras altas e com solos pouco férteis, em virtude da grande relação entre o ataque do fungo e a nutrição mineral das plantas (POZZA et al., 2000).

Para o controle da cercosporiose, além de fungicidas, são recomendados produtos à base de cobre, possuidores de amplo espectro de ação, que apresentam reduzido risco de indução de resistência ao patógeno, reduzida fitotoxicidade e toxicidade aos inimigos naturais e reduzido risco de dano ao meio ambiente (CHALFOUN, 1999). Porém os fungicidas sintéticos ainda são os mais usados pela sua alta eficiência no controle do patógeno. No entanto os altos custos, o aumento da resistência dos fitopatógenos, como também o impacto ambiental têm levado mundialmente os fitopatologistas a intensificarem os estudos na área de controle alternativo, como a indução de resistência ou o controle biológico, visando desenvolver processos mais naturais e menos comprometedores de controle de doenças (RODRIGUES et al., 2001).

2.4 Estratégias da planta contra o patógeno

Diversas estratégias de defesa são ativadas quando a célula vegetal está sob invasão de patógenos. Algumas dessas estratégias são expressas de forma constitutiva (barreiras físicas e químicas), ao passo que outras são induzidas, após o ataque do patógeno, formando uma complexa rede de transdução de sinal que vai reprogramar todo o metabolismo celular, ativando uma resposta de defesa multicomponente (DIXON; LAMB, 1990; MONTESINOS et al., 2002).

As defesas expressas, constitutivamente, são caracterizadas por estruturas como ceras, cutícula, parede celular espessa, tricomas, adaptações em estômatos e fibras vasculares, bem como substâncias químicas pré-formadas, como fenóis, alcaloides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, inibidores proteicos e enzimas hidrolíticas (HANKS; NELSON, 2016; PASCHOLATI; LEITE, 1995). Por outro lado, dentre os mecanismos induzidos, podem ser citados a produção de fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas), espécies reativas de oxigênio (EROs), formação de papila, halos, lignificação, camada de cortiça, formação de tiloses e deposição de goma, entre outros (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Entender a maneira pela qual o fitopatógeno altera a fisiologia e bioquímica da célula vegetal pode auxiliar no controle de doenças, bem como na diminuição dos danos causados às culturas.

Moléculas do patógeno, conhecidas como eliciadores ou efetores, atualmente denominados de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) ou a microorganismos (MAMPs), são reconhecidos por receptores localizados na membrana plasmática da célula vegetal PRRs (PAMP-recognition receptor), indo desencadear uma resposta de imunidade (PAMP-triggered immunity-PTI) (HOGENHOUT et al., 2009). Este tipo de sistema de defesa faz com que as plantas tenham uma resposta rápida e eficiente a uma ampla gama de patógenos (ROUX et al., 2014).

Por outro lado, patógenos bem adaptados são capazes de secretar uma gama de proteínas (efetores) que vão suprimir a PTI, resultando na resposta de suscetibilidade (Effector-triggered susceptibility - ETS) (BIRCH et al., 2008), posto que as plantas podem apresentar proteínas de resistência (R) que reconhecem estes efetores induzindo uma segunda resposta de defesa (Effector-triggered immunity-ETI) (HOWDEN; HUITEMA, 2012). A interação efetores e proteínas R pode acontecer de forma direta (gene a gene) (OßWALD et al., 2014) ou indireta (guarda) (JONES; DANGL, 2006). Ao mesmo tempo em que patógenos apresentam novos efetores, para alterar as defesas das plantas, elas avançam com novas

proteínas R, o que sugere uma imutável e indefinida “corrida armamentista” na interação planta-patógeno (COLL; EPPLÉ; DANGL, 2011).

Numa situação de resistência, logo após o reconhecimento e a transdução do sinal, que podem ser feitos por mensageiros secundários, alterações na fosforilação de proteínas e, por meio de proteínas-G, é induzida uma cascata de resposta de defesa que vai impedir a progressão do patógeno e o estabelecimento da doença (CÔTÉ et al., 1995).

A explosão oxidativa é uma das primeiras respostas de defesa da planta, correspondente à geração de EROs, incluindo o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (OH) e o oxigênio singlete (1O_2). As EROs são normalmente geradas no metabolismo celular, porém o seu acúmulo leva à toxidez das células (THAKUR; SOHAL, 2013). Quando não são rapidamente eliminadas do metabolismo, os radicais livres podem reagir com os ácidos graxos insaturados, na membrana plasmática, nas membranas das organelas e endomembranas, causando a peroxidação dos lipídeos e a ruptura da membrana (GILL; TUTEJA, 2010). Além disso, as EROs podem danificar os pigmentos fotossintéticos, os lipídios, as proteínas e os ácidos nucleicos (MOLLER, 2001). As plantas, quando submetidas a uma situação de estresse, desenvolvem um complexo sistema de defesa constituído de antioxidantes e um diversificado leque de enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), glutathione-redutase (GLU) e a ascorbato peroxidase (APX), entre outras. Estas enzimas são responsáveis pela proteção das células contra os danos oxidativos e estabilização do potencial redox da célula (HOSSAIN; UDDIN 2011; RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

As enzimas responsáveis pela transformação dos íons superóxido, em peróxido de hidrogênio, são as SODs, (FORTUNATO et al., 2015). A partir daí, o H_2O_2 pode ser degradado pelas POXs, nomeadamente a APX, utilizando o ascorbato como substrato da reação, constituindo-se em um dos mais importantes mecanismos oxidativos das plantas. As POXs representam um conjunto de dezenas de isoenzimas aptas a catalisar a oxidação de vários substratos, como substâncias aromáticas e diversos compostos fenólicos. Além de oxidar os compostos fenólicos (que são por si só tóxicos para os patógenos), as POXs elevam a sua velocidade de polimerização, em substâncias semelhantes à lignina, que se depositam na parede celular e influenciam no porvindouro crescimento e desenvolvimento do patógeno (FOYER; NOCTOR, 2011). Os produtos gerados pela ação das POXs estão envolvidos na formação da parede celular vegetal, na suberização e na lignificação (KUHN; PASCHOLATI, 2010). Em plantas tratadas com indutores de resistência, as respostas de defesa estão também

relacionadas à oxidação de compostos fenólicos, que são tóxicos a patógenos (ELSHARKAWY et al., 2013).

Conhecidas como oxidoredutases, as polifenol oxidases (PPO) fazem parte de uma família de “*multi-copper*” oxidases que oxidam monofenóis em *o*-quinonas, na presença de oxigênio molecular, com formação de EROs como produto secundário (MATHEIS, 1983). Esta enzima é muito estudada, em diversos vegetais, pela sua importância tanto na fisiologia quanto na bioquímica (CLEMENTE, 1998; MAYER, 1987; MAYER; HAREL, 1991; VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981). As *o*-quinonas são moléculas muito reativas que podem se ligar a lipídeos, ácidos nucleicos ou proteínas, formando estruturas complexas que vão diminuir o valor nutricional dos tecidos vegetais para os patógenos. A PPO é responsável pelo acastanhamento e degradação da cor de muitos frutos e vegetais, durante o processamento de pós-colheita, reconhecidamente uma importante questão para a manutenção da qualidade dos produtos (BOECKX et al., 2015).

Depois da celulose, a lignina é a substância orgânica mais abundante nas plantas, sendo uma significativa molécula induzida em situações de estresse. A lignina exerce funções protetoras importantes nos vegetais, além de possibilitar suporte e resistência mecânica à parede celular. A lignificação impede o desenvolvimento de patógenos e corresponde a uma resposta frequente nos locais de infecção ou de lesão (TAIZ; ZEIGER, 2004). A biossíntese da lignina é feita, por meio da via dos fenilpropanoides, envolvendo uma série de enzimas. A primeira dessas enzimas é a fenilalanina amônia-liase (PAL), que catalisa a conversão da fenilalanina em ácido transcinâmico, resultando, também, em compostos como fitoalexinas e flavonoides (MANDAL; CHAKRABORTY; DEY, 2010). A lignificação pode evitar o desenvolvimento do fungo nos tecidos vegetais de diversas formas, como: formação de barreira mecânica ao progresso e desenvolvimento do patógeno; modificação da parede celular, tornando-a mais resistente ao ataque de enzimas hidrolíticas do patógeno e aumento da resistência das paredes à difusão de toxinas produzidas pelos patógenos, que impossibilitam que os nutrientes do hospedeiro sejam aproveitados pelo agente invasor (CAVALCANTI et al., 2005).

A ativação da complexa rede de respostas de defesa (em particular, a resistência induzida) resulta em custos metabólicos para a planta. A reserva de recursos da planta para o crescimento e/ou defesas é definido pela competição por substrato comum e energia, porquanto a planta precisa balancear os investimentos nesses processos (GAYLER et al., 2004). Gayler et al. (2004) exemplificaram esse balanço energético na planta, em que assimilados são fornecidos por meio da fotossíntese e usados para o crescimento, formando

biomassa estrutural. Parte dos assimilados é direcionado para geração de defesas constitutivas e o excedente é dirigido para tecidos de reserva. Dependendo da necessidade da planta, o carreamento de fotoassimilados é destinado à defesa induzível e, se o seu fornecimento for baixo, pode acontecer o fornecimento por meio das reservas os quais voltam a ser disponíveis.

Por causa do papel primordial do cloroplasto no metabolismo primário, existem ligações entre fotossíntese e a imunidade nas plantas (GOHRE, 2015). Sob outra perspectiva, os cloroplastos produzem EROs que, são potencialmente prejudiciais (atuando diretamente sobre o patógeno), mas também podem atuar como moléculas de sinalização. Considerando a importância das EROs e do equilíbrio hormonal, para as interações planta-patógeno, o cloroplasto representa um alvo principal para a manipulação por agentes patogênicos (ZABALA et al., 2015). Em trabalhos recentes, em folhas de café tratadas com os indutores de resistência Bion[®] e GreenForce CuCa, observou-se um aumento de resistência à *H. vastatrix* e grandes ajustes ao nível das proteínas do metabolismo primário (POSSA et al., 2015, 2016). Em contrapartida, os patógenos produzem toxinas que podem alterar a permeabilidade das membranas celulares (por ex. atuando ao nível das ATPases), o que afeta a eletrofisiologia da célula, resultando no mal funcionamento dos cloroplastos e mitocôndrias, o que vai comprometer o metabolismo celular (OLIVEIRA, 2005). A fotossíntese é fundamental no fornecimento de carbono, para o crescimento e desenvolvimento das células vegetais, estando estritamente relacionada com a sobrevivência das plantas. Visando a uma maior eficiência fotossintética, as plantas desenvolveram diversos mecanismos de foto resposta, tais como a movimentação dos cloroplastos para locais cuja intensidade de luz é apropriada e a abertura dos estômatos para absorver CO₂ (KAWAI et al., 2003). No entanto a regulação da abertura estomática permite controlar as perdas de água (dependente do potencial hídrico da folha/transpiração) e as trocas de gases entre os tecidos foliares e a atmosfera, sendo um parâmetro fisiológico importante para a produtividade (PAIVA et al., 2005).

A avaliação de parâmetros fisiológicos foliares, em resposta à aplicação de indutores de resistência, por meio de técnicas de fluorescência da clorofila e de trocas gasosas, constitui um ponto de partida para o estudo de interações entre diversos processos metabólicos. Estudos dessa natureza possibilitam esclarecer os sistemas de regulação das plantas face às condições de perturbação, entender o padrão de organização dos processos que levam à manutenção e ou à capacidade de reorganização da planta diante de condições adversas e sua capacidade de retornar às condições próximas ao seu estado inicial após a retirada da

perturbação externa (CAMARGO-BORTOLIN et al., 2008; SOUZA; OLIVEIRA; CARDOSO, 2004).

Na literatura, são encontrados muitos trabalhos que relatam estratégias de defesa de cafeeiro contra patógenos. Uma das principais respostas de defesa do cafeeiro contra patógenos nomeadamente *H. vastatrix* é a reação de hipersensibilidade (HR), que se caracteriza pela morte rápida das células no local de infecção. Tem sido também observado, citologicamente, a acumulação de calose, deposição de compostos fenólicos e lignificação da parede celular na zona de infecção, que vai limitar o crescimento do fungo (SILVA et al., 2002). O aumento de atividade de enzimas como as POX, SOD, lipoxigenase, PAL, quitinase, glucanase, proteases e *germin-like-protein* tem sido correlacionada com plantas de cafeeiro resistentes. Foram observadas algumas dessas respostas, no processo de infecção em plantas susceptíveis, porém essas respostas não foram eficientes para inibirem a ação do patógeno (GUERRA-GUIMARÃES et al., 2008, 2009, 2015; MAXEMIUC-NACCACHE; BRAGA; DIETRICH, 1992; ROJAS; GÓMEZ; OCAMPO, 1993; SILVA et al., 2002, 2008).

Técnicas moleculares de SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*), pirosequenciamento 454 e qRT-PCR têm possibilitado a identificação de genes putativamente implicados na resistência do cafeeiro. A análise de ESTs (Expressed Sequence Tags) permitiu identificar potenciais *PR-like proteins*: proteínas relacionadas com a resistência, estresse, defesa e componentes de vias de transdução de sinal (por exemplo, quitinases, beta-1,3-glucanases, PR10, lipoxigenase, tipo-AP2 e fatores de transcrição WRKY) (DINIZ et al., 2012; FERNANDEZ et al., 2004, 2012; GANESH et al., 2006).

2.5 Indutores de resistência

Compostos indutores de resistência representam uma importante ferramenta para o manejo fitossanitário sustentável e integrado das lavouras. Os indutores de resistência ativam/induzem os mecanismos de defesa das plantas pelo tratamento com agentes bióticos ou abióticos, aumentando, assim, a resistência da planta (BARROS et al., 2010; CAVALCANTI et al., 2005; RESENDE et al., 2004). A proteção no combate de determinado patógeno pode ser local ou sistêmica e decorre do tempo entre o tratamento inicial (indutor) e a inoculação do patógeno (desafiador) (PASCHOLATI; LEITE, 1995). A sua duração pode acontecer por um período de poucos dias a algumas semanas ou permanecer todo o ciclo de vida da planta (PASCHOLATI; LEITE, 1995), tornando-se, dessa maneira, um mecanismo de defesa constitutivo.

A resistência sistêmica adquirida (systemic acquired resistance – SAR) e a resistência sistêmica induzida (induced systemic resistance – ISR) são fenômenos de indução de resistência com caráter sistêmico. Após tratamento com um indutor de resistência, as plantas ficam com os seus mecanismos de defesa ativados, não apenas no local tratado, mas também em outros mais distantes, de modo mais ou menos generalizado por toda a planta (ELSHARKAWY et al., 2013). Contudo o modo de indução da SAR e da ISR parece ser distinto, os mecanismos bioquímicos e moleculares que são ativados são outros. Na SAR a resistência expressa parece ser induzida pelo ácido salicílico estando relacionada com a produção de PR proteínas. Muitas delas possuem atividade antimicrobiana e são excelentes marcadores moleculares para a resposta de resistência (GAO, et al., 2015). Na ISR, a molécula responsável pela sinalização é mediada pelo ácido jasmônico e o etileno (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998).

As defesas das plantas podem ser ativadas, a partir da elicitação por compostos presentes em extratos de plantas (BETTIOL; STADNIK, 2001; DAAYF; SCHMITT; BELANGER, 1995; KONSTANTINIDOU-DOLTSINIS; SCHMITT, 1998; SINGH; PRITHIVIRAJ, 1997; STANGARLIN et al., 1999), formulação à base de subprodutos da lavoura cafeeira, formulação à base de subprodutos da indústria cítrica e fosfito de manganês (COSTA et al., 2014). Podem-se, ainda, utilizar eliciadores químicos, como o acibenzolar-S-metil (ASM) (BESSER et al., 2000; BOKSHI; MORRIS; DEVERALL, 2003; COLE, 1999; COOLS; ISHII, 2002; DANN et al., 1998; DIETRICH; PLOSS; HEIL, 2004, 2005; GEETHA; SHETTY, 2002; GODARD et al., 1999; HEIL et al., 2000; IRITI; FAORO, 2003a, 2003b; KATZ; THULKE; CONRATH, 1998; LATUNDE-DADA; LUCAS, 2001; LOUWS et al., 2001; SOARES; MARINGONI, 2002).

O acibenzolar-S-metil (ASM, Bion®) é um ativador de plantas e não atua direta contra os patógenos. Aplicado na parte aérea das plantas, ASM vai ativar os mecanismos naturais de defesa da planta e aumentar a resistência às doenças. A aplicação do produto deve ser feita, antes da entrada dos patógenos, tendo uma ação preventiva, devendo ser, preferencialmente, associado a fungicida(s). O produto é absorvido de forma rápida pelos tecidos foliares e transloca, sistemicamente, em direção às folhas e raízes, ativando, assim, a planta de forma generalizada (BION..., 2002).

No trabalho de Guzzo et al. (2001), plantas de café da cultivar Mundo Novo suscetíveis à ferrugem apresentaram proteção contra a doença, quando tratadas com diferentes concentrações do ASM, 72 horas antes da inoculação com *H. vastatrix*. Fernandes et al. (2009), em experimento de campo com cafeeiro x *H. vastatrix*, puderam constatar que o ASM

promoveu certo controle da doença, havendo possibilidade de se tornar uma eficiente alternativa, no manejo da ferrugem do cafeeiro, desde que ajustado na dose e época ideal de aplicação. O ASM, na dose de $0,05 \text{ g.L}^{-1}$, foi efetivo no controle da cercosporiose do cafeeiro em mudas de café Mundo Novo (GUIMARÃES et al., 2016). Por meio da técnica de hibridização subtrativa por supressão, foram identificados genes ligados à SAR em plantas de cafeeiro suscetíveis à ferrugem e tratadas com ASM. Os genes identificados estão envolvidos em processos de resistência a fitopatógenos como: formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), metabolismo de lipídios, entre outros (GUZZO; HARAKAVA; TSAI, 2009).

Os fosfitos e fosfonatos têm ganhado importância no controle de doenças de plantas. Estes produtos são capazes de atuar, estimulando a formação de substâncias naturais de defesa da planta, como as fitoalexinas, proteger do ataque de fungos e, também, apresentar efeito fungicida, com função diretamente sobre o patógeno (FENN; COFFEY, 1984). Alguns trabalhos mostraram a eficiência de fosfitos, no manejo de doenças de plantas, em diversas culturas, entre elas: feijão pepino, cacau e batata (GADAGA et al., 2017; LOBATO et al., 2011; MOFIDNAKHAEL et al., 2016; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2006). Costa et al. (2014) verificaram que formulações à base de subprodutos das indústrias de café e citros e formulações de fosfitos, Fortaleza, Reforce Mn e Fitoforce Full proporcionaram o controle da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro, com decorrente redução da desfolha. Fernandes et al. (2014), estudando a eficiência de fosfito de potássio combinado com subproduto da agroindústria cítrica, observaram que o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e taxas fotossintéticas está associado ao aumento da resistência das plantas de café aos agentes patogênicos. No trabalho de Monteiro et al. (2016), fosfito de Mn apresentou 63% controle da severidade da ferrugem nas mudas de café. Além de induzir a transcrição de genes que codificam enzimas (POX, CAT, GLU e PAL) e aumentar a atividade de enzimas oxidativas (APX, SOD e PPO), sugere-se que os fosfitos tem se tornado uma alternativa promissora para o manejo de doenças do café.

Os extratos vegetais e óleos extraídos de plantas têm se tornado uma nova alternativa de controle de doenças de plantas que demonstram potencial para induzir resistência (CARVALHO; CUNHA; SILVA, 2012). Os extratos de casca de frutos de café (ECC) e de folhas de café, infectadas com *H. vastatrix* (EFID), são uma alternativa promissora, visto que aumentam a resistência do cafeeiro à ferrugem, cercosporiose e mancha-de-Phoma. Estudos comprovam que a utilização de ECC e de EFID indica bons resultados na proteção de cafeeiro contra *Phoma* sp. e *Cercospora coffeicola*. Resende et al. (2004) constataram uma redução na percentagem da mancha-de-phoma de 20% para ECC e 38% para EFID. Amaral (2005)

percebeu redução na cercosporiose de 40% e 37% em plantas tratadas com ECC e EFIF. Em experimentos de campo, foi observado que o tratamento com extrato de folhas de café diminuiu a área abaixo da curva de progresso da mancha-de-Phoma, comparado à testemunha. Para cercosporiose, foi possível observar uma diminuição na percentagem da doença em 40% e para ferrugem 37% em plantas tratadas com extratos feitos a partir de casca e folhas de café (SANTOS et al., 2007). Pereira et al. (2008), estudando o óleo essencial de tomilho e extrato de casca de café sobre folhas de cafeeiro infectadas com *Cercospora coffeicola*, observaram diminuição na germinação de conídios 48 horas após a inoculação. No trabalho de Costa et al. (2014), a formulação à base de subprodutos da lavoura cafeeira apresentou 50% de controle da ferrugem e 60% de controle da cercosporiose em cafeeiro adulto. O Greenforce CuCa, formulação à base de subprodutos da indústria do café, acrescido de cobre e cálcio, na dose de $0,05 \text{ g.L}^{-1}$, conseguiu controlar a cercosporiose do cafeeiro (GUIMARÃES et al., 2016).

Métodos alternativos que induzem resistência têm sido desenvolvidos, para controlar as doenças de plantas e se constituem em estratégias viáveis e desejáveis em relação ao controle químico tradicional, principalmente, por não deixarem resíduos tóxicos. Ainda, o emprego desses métodos aparece como mais uma opção ao uso dos fungicidas sintéticos, em termos de eficiência de controle (BULHÕES et al., 2012; WILSON; WISNIEWSKI, 1994). Quanto ao uso de indutores de resistência, como formulações à base de extratos vegetais possuidores de substâncias bioativas, fosfitos e fosfonatos, pode representar uma alternativa sustentável para o controle de doenças que afetam diversas culturas.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.) **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 414-420, mar./abr. 2010.
- 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.
- AZINHEIRA, H. G. et al. Non-host resistance responses of *Arabidopsis thaliana* to the coffee leaf rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Botany**, Ottawa, v. 88, n. 7, p. 621-629, July 2010.
- BARROS, F. C. et al. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 231-239, mar./apr. 2010.
- BERESTETSKIY, A. O. A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 44, p. 453-465, Sept. 2008.
- BESSER, K. et al. Analysis of gene induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 1, n. 5, p. 277-286, Sept. 2000.
- BETTIOL, W.; STADNIK, M. J. Controle alternativo. In: STADNIK, M. J.; RIVERA, M. C. (Ed.). **Oídios**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. p. 165-192.
- BION 500 WG. [S.l.: s.n.], 2002. Disponível em: <https://www.extrapratrica.com.br/BR_Docs/English/Instructions/12.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2017.
- BIRCH, P. R. J. et al. Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 11, n. 4, p. 373-379, Aug. 2008.
- BOECKX, T. et al. Polyphenol oxidase in leaves: is there any significance to the chloroplastic localization? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, n. 12, p. 3571-3579, June 2015.
- BOKSHI, A. I.; MORRIS, S. C.; DEVERALL, B. J. Effects of benzotriazole and acetylsalicylic acid on β -1,3-glucanase activity and disease resistance in potato. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, n. 1, p. 22-27, Feb. 2003.
- BUSAM, G.; KASSEMAYER, H. H.; MATTERN, U. Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators of fungal challenge. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 115, n. 3, p. 1029-1038, Nov. 1997.
- BULHÕES, C. C. et al. Produtos alternativos no controle de antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), cladosporiose (*Cladosporium herbarum*) e bacteriose (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) em maracujazeiro no norte de Mato Grosso. **Campo Digital: revista ciências exatas e da terra e ciências agrárias**, Campo Mourão, v. 7, n. 1, p. 12-19, dez. 2012.

BUTT, V. S. Direct oxidases and related enzymes. In: DAVES, D. D. (Ed.). **The Biochemistry of plants: metabolism and respiration**. New York: Academic Press, 1980. v. 2, p. 81-123.

BUTT, V. S.; LAMB, C. J. Oxygenase and the metabolism of plant products. In: CONN, E. E. (Ed.). **The Biochemistry of plants: secondary products**. New York: Academic Press, 1980. v. 7, p. 627-665.

CAMARGO-BORTOLIN, L. H. G. et al. Autonomy and network modulation of photosynthesis and water relations of *Coffea arabica* in the field. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 20, n. 2, p. 141-151, abr./jun. 2008.

CAPUCHO, A. S. et al. Climate favorability to leaf rust in Conilon coffee. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 42, n. 5, p. 511-514, Sept. 2013.

CARMONA, M.; SAUTUA, F. Os fosfitos no manejo de doenças nas culturas extensivas. **Revista Plantio Direto & Tecnologia Agrícola**, Brasília, v. 126, p. 19-22, 2011.

CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. Manejo integrado das principais doenças do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 193, p. 27-35, 1998.

CARVALHO, V. L.; CUNHA, R. L.; SILVA, N. R. N. Alternativas de controle de doenças do cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 42-49, jan./abr. 2012.

CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.). **Indução de resistência em plantas contra patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 263 p.

CHALFOUN, S. M. **Aspectos da utilização de fungicidas cúpricos na cultura do cafeeiro: revisão de literatura**. 2. ed. Lavras: Griffin, 1999. 88 p.

_____. **Doenças do cafeeiro: importância, identificação e métodos de controle**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 96 p.

CHEN, C. T.; SU, Y.-S.; KAO, C. H. Changes in soluble sugar content and respiration rate in methyl jasmonate-treated rice leaves. **Botanical Bulletin Academic Sinica**, Taipei, v. 45, p. 197-202, 2004.

CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; BENATO, E. A. Indução de resistência no manejo de doenças pós-colheita. In: RODRIGUES, F. A.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Ed. da UFV, 2007. p. 245-280.

CLEMENTE, E. Purification and thermo stability of isoperoxidase from oranges. **Phytochemistry**, New York, v. 49, n. 1, p. 29-36, Sept. 1998.

COLE, D. L. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. **Crop Protection**, Guildford, v. 18, n. 4, p. 267-273, May 1999.

COLL, N. S.; EPPLE, P.; DANGL, J. L. Programmed cell death in the plant immune system. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 18, n. 8, p. 1247-1256, Aug. 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de café: terceiro levantamento, setembro/2017.** Brasília: CONAB, 2017. 106 p.

_____. **Acompanhamento da safra brasileira de café: primeiro levantamento, janeiro/2018.** Brasília: CONAB, 2018. 88 p.

COOLS, H. J.; ISHII, H. Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (PAL1) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 61, n. 5, p. 273-282, Nov. 2002.

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

COSTA, J. de C. B. et al. Indução de resistência em mudas de cacaueteiro contra *Moniliophthora perniciosa* por produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 5, p. 285-294, 2010.

CÔTÉ, F. et al. Characterization of binding proteins that recognize oligoglucoside elicitors of phytoalexins in soybean. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 93, p. 401-10, 1995.

CRUZ, S. M. da C. et al. Ação indutora de produtos abióticos na resistência de tomateiro e efeito sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. **Idesia**, Arica, v. 29, n. 2, p. 111-118, ago. 2011.

DAAYF, F.; SCHMITT, A.; BÉLANGER, R. R. The effect of plant extracts of *Reynoutria sachalinensis* on powdery mildew development and leaf physiology of long English cucumber. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, p. 577-580, 1995.

DALIO, R. J. D. et al. O triplo modo de ação dos fosfitos no controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 206-243, 2012.

DANN, E. et al. Effect of treating soybean with 2,6-dicloroisonicotinic acid (INA) and benzothiadiazole (BTH) on seed yields and the level of disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in field and greenhouse studies. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, p. 271-278, 1998.

DAUB, M. E.; HERRERO, S.; CHUNG, K. R. Photoactive perylene quinone toxins in fungal pathogenesis of plants. **FEMS Microbiology Letter**, Oxford, v. 252, p. 197-206, 2005.

DAVIS, A. P. et al. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of The Linnean Society**, London, v. 152, n. 4, p. 465-512, Dec. 2006.

DELIOPOULUS, T.; KETTLEWELL, P. S.; HARE, M. C. Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 10, p. 1059-1075, Oct. 2010.

DIETRICH, R.; PLOSS, K.; HEIL, M. Constitutive and induced resistance to pathogens in *Arabidopsis thaliana* depends on nitrogen supply. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 27, n. 7, p. 896-906, July 2004.

_____. Growth responses and fitness cost after induction of pathogen resistance depend on environmental condition. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, n. 2, p. 211-222, Feb. 2005.

DINIZ, I. et al. Cellular and molecular analyses of coffee resistance to *Hemileia vastatrix* and nonhost resistance to *Uromyces vignae* in the resistance-donor genotype HDT832/2. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 133, n. 1, p. 141–157, May 2012.

DIXON, R. A.; LAMB, C. J. Molecular communication in interactions between plant and microbial pathogens. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 339-367, June 1990.

DORNHOFF, G. M.; SHIBLES, R. M. Varietal differences in net photosynthesis of soybean leaves. **Crop Science**, Madison, v. 10, n. 1, p. 42-45, June 1970.

EBRAHIM, S.; SINGH, K. U. Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. In: MÉNDEZVILAS, A. (Ed.). **Science against microbial pathogens: advances**. Extremadura: Formatex Research Center, 2011. v. 1, p. 1043-1054.

ELSHARKAWY, M. M. et al. Induction of systemic resistance against Cucumber mosaic virus in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum*. **The Plant Pathology Journal**, Seoul, v. 29, n. 2, p. 193–200, June 2013.

FENN, M. E.; COFFEY, M. D. Quantification of phosphonate and ethyl phosphate in tobacco and tomato tissues and significance for the mode of action of two phosphonate fungicides. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, n. 1, p. 76-82, Jan. 1989.

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

_____. Ativador de resistência ASM (Bion®) no controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.) na cultura do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em campo. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 6., 2009, Vitória. **Anais...** Brasília: Embrapa Café, 2009. p. 1-6.

_____. Inductors of resistance and their role in photosynthesis and antioxidant system activity of coffee seedlings. **American Journal of Plant Science**, New York, v. 5, n. 25, p. 3710–3716, Dec. 2014.

FERNANDEZ, D. et al. 454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals in planta-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions in a late compatible plant-rust interaction. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 17–37, Jan. 2012.

_____. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 5, n. 6, p. 527–536, Nov. 2004.

FLOR, H. H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 32, p. 653-669, 1942.

- FORTUNATO, A. A. et al. Changes in the antioxidant system in soybean leaves infected by *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 105, n. 8, p. 1050–1058, Aug. 2015.
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox. **Plant Physiology**, Lancaster, v.155, n. 1, p. 2-18, Jan. 2011.
- FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 247, n. 1, p. 1-11, May 1986.
- GADAGA, S. J. C. et al. Phosphites for the control of anthracnose in common bean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 52, n. 1, p. 36-44, jan. 2017.
- GANESH, D. et al. Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. **Plant Science**, Limerick, v. 170, n. 6, p. 1045–1051, June 2006.
- GAO, Q., et al. Signal regulators of systemic acquired resistance. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 228-231, Apr. 2015.
- GAYLER, S. et al. Modelling the effect of environmental factors on the “trade off” between growth and defensive compounds in young apple trees. **Trees**, Berlin, v. 18, n. 3, p. 363-371, May 2004.
- GEETHA, H. M.; SHETTY, H. S. Induction of resistance in pearl millet against downy mildew disease caused by *Sclerosporagraminicola* using benzothiadiazole, calcium chloride and hydrogen peroxide – a comparative evaluation. **Crop Protection**, Guildford, v. 21, n. 8, p. 601-610, Sept. 2002.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 12, p. 909-930, Dec. 2010.
- GODARD, J.-F. et al. Benzothiadiazole (BTH) induces resistance in cauliflower (*Brassica oleraceavar botrytis*) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. **Crop Protection**, Guildford, v. 18, n. 6, p. 397-405, July 1999.
- GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia, doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. Viçosa: Agrônômica Ceres, 1997. v. 2, p. 184-200.
- GÖHRE, V. Immune responses: photosynthetic defence. **Nature Plants**, London, v. 1, p. 15079, June 2015.
- GOMES, R. dos S. S. et al. Bioatividade de indutores de resistência no manejo da antracnose da goiabeira (*Psidium guajava* L.). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, n. 2, p. 149-154, abr./jun. 2016.
- GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, n. 4, p. 414-420, Aug. 2006.

GREE, G. Epidemiology of coffee leaf rust in the Eastern Highlands. **Coffee Research Institute**, Kainantu, v. 2, p. 16-20, 1993.

GUERRA-GUIMARÃES, L. et al. Proteomic analysis of apoplastic fluid of *Coffea Arabica* leaves highlights novel biomarkers for resistance against *Hemileia vastatrix*. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 478, June 2015.

_____. Chitinases of *Coffea arabica* genotypes resistant to Orange rust *Hemileia vastatrix*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 53, p. 702-706, Dec. 2009.

_____. Differential induction of superoxide dismutase in *Coffea arabica*– *Hemileia vastatrix* interactions. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 22., 2008, Campinas. **Proceedings...** Campinas: ASIC, 2008. p. 14-19.

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

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

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

HANKS, T.; NELSON, R. Multiple disease resistance in plantas. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 54, p. 229-252, Aug. 2016.

HEIL, M. Ecological costs of induced resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, n. 4, p. 1-6, Aug. 2002.

HEIL, M. et al. Different strategies for studying ecological aspects of systemic acquired resistance (SAR). **Journal of Ecology**, Oxford, v. 88, n. 4, p. 707-708, Aug. 2000.

HOGENHOUT, S. A. et al. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, n. 2, p. 115-122, Feb. 2009.

HOSSAIN, M. A.; UDDIN, S. N. Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat: Morphological and metabolic adaptations under hypoxia or anoxia. **Australian Journal of Crop Science**, Khulna, v. 5, n. 9, p. 1094-1101, 2011.

HOWDEN, A. J.; HUITEMA, E. Effector-triggered post-translational modifications and their role in suppression of plant immunity. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 3, p. 160, July 2012.

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, Mar. 2003a.

_____. Does benzothiadiazole-induced resistance increase fitness cost in bean? **Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 85, n. 4, p. 265-270, Dec. 2003b.

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

KATZ, V. A.; THULKE, O. U.; CONRATH, U. A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 117, n. 4, p. 1333-1339, Aug. 1998.

KAWAY, H. et al. Responses of ferns to red light are mediated by an unconventional photoreceptor. **Nature**, London, v. 421, p. 287-290, Jan. 2003.

KONSTANTINIDOU-DOLTSINIS, S.; SCHMITT, A. Impact of treatment with plant extracts from *Reynoutria sachalinensis* Nakai on intensity of powdery mildew severity and yield in cucumber under high disease pressure. **Crop Protection**, Guildford, v. 17, n. 8, p. 649-656, Nov. 1998.

KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus cereus* ou acibenzolar-S-metil: atividade de enzimas, síntese de fenóis e lignina e biomassa. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 2, p. 107-114, June 2010.

_____. Custo adaptativo da resistência induzida no controle de fitopatógenos. In: RODRIGUES, F.; ROMEIRO, R. da S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. v. 1, cap. 4, p. 67-90.

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, n. 5, p. 199-208, May 2001.

LIMA, L. M.; POZZA, E. A.; SANTOS, F. S. Relationship between incidence of brown eye spot of coffee cherries and the chemical composition of coffee beans. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 160, n. 4, p. 209-211, Apr. 2012.

LOBATO, M.C. et al. Phosphite compounds reduce disease severity in potato seed tubers and foliage. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 130, n. 2, p. 155-163, 2011.

LOGEMANN, E. et al. Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle-related genes. **Plant Journal**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 865-878, Dec. 1995.

LOUWS, F. J. et al. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 5, p.481-488, May 2001.

MAIA, T. A. et al. ZambolimThe population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 42, n. 5, p. 533-542, 2013.

- MANDAL, S. M.; CHAKRABORTY, D.; DEY, S. Phenolic acids act as signalling molecules in plant-microbe symbioses. **Plant Signaling & Behaviour**, Georgetown, v. 5, n. 4, p. 359–368, Apr. 2010.
- MANDAL, S. M. Induction of phenolics, lignin and Key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. **African Journal of Biotechnology**, Jenya, v. 9, n. 47, p. 8038-8047, Dec. 2011.
- MARTINEZ, C. A. et al. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. **Plant Science**, Limerick, v. 160, n. 3, p. 505-515, Feb. 2001.
- MARTINS, R. B.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Genetic variability of *Cercosporacoffeicola* from organic and conventional coffee plantings, characterized by vegetative compatibility. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 11, p. 1205–1211, Nov. 2008.
- MATHEIS, G. Enzymatic browning of foods. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, Berlin, p. 176- 454, 1983.
- MATIELLO, J. B. et al. **Cultura de café no Brasil: novo manual de recomendações**. Rio de Janeiro: MAPA/PROCAFÉ, 2002. 387 p.
- MAXEMIUC-NACCACHE, V.; BRAGA, M. R.; DIETRICH, S. M. C. Chitinase -1,3-glucanase changes in compatible and incompatible combinations between and coffee leaf disks and coffee rust (*Hemileia vastatrix*). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 15, p. 145-150, 1992.
- MAYER, A. M.; HAREL, E. Polyphenol oxidase and their significance in fruit and vegetables. In: FOX, P. F. (Ed.). **Food enzymology**. London: Elsevier, 1991. p. 373-379.
- _____. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, New York, v. 18, n. 2, p. 193-215, 1979.
- _____. Polyphenol oxidase in plants - recent progress. **Phytochemistry**, New York, v. 26, n. 1, p. 11-20, Dec. 1987.
- MOFIDNAKHAEL, M. et al. Potassium phosphite affects growth, antioxidant enzymes activity and alleviates disease damage in cucumber plants inoculated with *Pythium ultimum*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Oxford, v. 49, n. 9/10, p. 207–221, May 2016.
- MOLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 561-591, June 2001.
- MONTEIRO, A. C. A. et al. Manganese phosphite in coffee defence against *Hemileia vastatrix*, the coffee rust fungus: biochemical and molecular analyses. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 164, p. 1043–1053, 2016.

- MONTESINOS, E. et al. Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. **International Microbiology**, Barcelona, v. 5, n. 4, p. 169-175, Dec. 2002.
- NEWMAN, A. G.; TOWNSEND, C. A. Molecular characterization of the cercosporin biosynthetic pathway in the fungal plant pathogen *cercospora nicotianae*. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 138, n. 12, p. 4219–4228, Mar. 2016.
- NUNES, C. C. et al. Genetic diversity of populations of *Hemileiavastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 38, n. 5, p. 445-452, Aug. 2009.
- OESTREICH-JANZEN. Chemistry of coffee in comprehensive Natural Products II: chemistry and biology. **The Science of Coffee**, Illy, 2010. Disponível em: <<http://www2.illy.com/wps/wcm/connect/us/illy/>>. Acesso em: 22 nov. 2017.
- OLIVEIRA, M. D. M.; VARANDA, C. M. R.; FÉLIX, M. R. F. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v. 15, p. 152-158, Mar. 2016.
- OLIVEIRA, R. F. Membrana plasmática e papéis na resistência contra doenças de plantas. In: SIMPÓSIO SOBRE RELAÇÃO ENTRE NUTRIÇÃO MINERAL E INCIDÊNCIA DE DOENÇA DE PLANTAS, 2004, **Anais...** Piracicaba: Potafos, 2005.
- OLIVEIRA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Papilla formation and peroxidase activity in *Mimosa scabrella* hypocotyls inoculated with the non- pathogen *Colletotrichum graminicola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 195-197, jun. 1997.
- ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ – OIC. Disponível em: <<http://www.ico.org>>. Acesso em: 28 jan. 2018.
- OBWALD, W. et al. Strategies of attack and defence in woody plant–Phytophthora interactions. **Forest Pathology**, Hamburg, v. 44, n. 3, p. 169-190, June 2014.
- PAIVA, A. S. et al. Condutância estomática em folhas de feijoeiro submetido a diferentes regimes de irrigação. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 161-169, jan./abr. 2005.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 417-453.
- 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**, Warwick, v. 152, n. 1, p. 29-39, Feb. 2008.
- PENG, M.; KUC, J. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, n. 6, p. 696-698, June 1992.

PEREIRA, R. B. et al. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1287-1296, out. 2008.

PINHEIRO, M. M. et al. A defesa das plantas contra as doenças. **Revista Ciência Hoje**, São Paulo, v. 147, p. 25-31, 1999.

POSSA, K. et al. An overview of protein changes in *Coffea arabica* leaves upon treatment with inducers of resistance to coffee rust". In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 25., 2014, Armenia. **Proceedings...** Armenia: ASIC, 2015. p. 42-46.

_____. Two resistance inducers relevant in coffee plant protection show distinct metabolic adjustments. In: INPPO WORLD IN BRATISLAVA, 2., 2016, Bratislava. **Book of abstracts...** Bratislava: Institute of Plants Genetics and Biotechnology, 2016. p. 1-95.

POZZA, A. A. A. et al. Intensidade da mancha de olho pardo em mudas de cafeeiro em função de doses de N e K em solução nutritiva. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 26, n. 1, p. 29-33, jan./mar. 2000.

POZZA, E. A.; CARVALHO, L. C.; CHALFOUN, S. M. Sintomas de injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. (Ed.). **Semiologia do cafeeiro: sintomas de deosrdens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas**. Lavras: Editora UFLA, 2010. p. 68-106.

POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A. Manejo de doenças de plantas com macro e micronutrientes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, supl., p. 52-54, 2003.

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

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

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, Oct. 2002.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 123-130, jan./fev. 2003.

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

RODRIGUES, F. A. et al. Foliar application of potassium silicate on the control of soybean rust. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 38, n. 4, p. 366-372, July 2009.

_____. Effect of silicon and host resistance on sheath blight development in rice. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 8, p. 827–832, Aug. 2001.

ROJAS, C. M. et al. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 17, Feb. 2014.

ROJAS, M. L.; GÓMEZ, V. M.; OCAMPO, C. A. Stimulation of lipoxygenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting hypersensitively to the coffee leaf rust. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 43, n. 3, p. 209-219, Sept. 1993.

ROMERO, G. G. et al. Partial resistance to leaf rust (*Hemileiavastatrix*) in coffee (*Coffea Arabica* L.): genetic analysis and molecular characterization of putative candidate genes. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 25, n. 4, p. 685-697, Apr. 2010.

ROUX, F. et al. Resistance to phytopathogens e tutti quanti: placing plant quantitative disease resistance on the map. **Molecular Plant Pathology** Oxford, v. 15, n. 5, p. 427-432, June 2014.

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

SAUTTER, C. K. et al. Síntese de trans-resveratrol e controle de podridão em maçãs com uso de elicitores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 9, p. 1097-1103, set. 2008.

SCHWAN-ESTRADA, K.; STANGARLIN, J.; CRUZ, M. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, Curitiba, v. 30, n. 12, p. 8-12, 2004.

SILVA, M. C. et al. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence resposts arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, p. 169-183, 2002.

_____. Involvement of peroxidases in the hypersensitive reaction of coffee (*Coffea arabica*) plants to orange rust (*Hemileia vastatrix*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 72, p. 29-38, 2008.

SILVA, M. C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; NICOLE, M. Cytological and biochemical mechanisms involved in coffee leaf rust resistance. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E.; VÁRZEA, V. M. P. (Ed.). **Durable resistance to coffee leave rust**. Viçosa: Editora UFV, 2005. p. 249-283.

SING, U. P.; PRITHIVIRAJ, B. Neemazal, a product of neem (*Azadirachta indica*), induces resistance in pea (*Pisum sativum*) against *Erysiphe pisi*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 51, p. 181-194, 1997.

SOARES, R. M.; MARINGONI, A. C. Efeito de acibenzolar-S-metil sobre a germinação e desempenho de sementes de feijoeiro e na indução de resistência à murcha-decurtobacterium. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, p. 41-45, 2002.

SOMSSICH, I. E.; HAHLBROCK, K. Pathogen defense in plants: a paradigm of biological complexity. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 86-90, Mar. 1998.

SOUZA, A. G. C. et al. Infection process of *Cercospora coffeicola* on coffee leaf. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, n. 1, p. 6–11, Jan. 2011.

SOUZA, G. M.; OLIVEIRA, R. F.; CARDOSO, V. J. M. Temporal dynamics of stomatal conductance of plants under water deficit: can homeostasis be improved by more complex dynamics? **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 3, p. 423-431, jul. 2004.

SPOLTI, P. et al. Modo de ação de fosfitos de potássio no controle da podridão olho de boi em maçã. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 41, n. 1, p. 42-48, 2015.

STADNIK, M. J.; BETTIOL, W. Controle biológico de oídios. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 2, p. 95-116.

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 11, p. 16-21, 1999.

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

THAKUR, M.; SOHAL, B. S. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 2013, p. 1–11, Dec. 2013.

UCHÔA, C. do N. et al. Acibenzolar-S-Metil e silício como indutores de resistência à Sigatoka-negra em bananeira cultivar Grand Naine (AAA). **Agrarian**, Dourados, v. 7, n. 24, p. 189-196, 2014.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. **Coffee**: world markets and trade. Washington: Foreign Agricultural Service/USDA, 2017. 8 p.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 15, n. 1, p. 49-127, 1981.

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.

WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E. **Biological control of postharvest plant diseases of fruits and vegetables**: theory and practice. Boca Raton: CRC Press, 1994. 465 p.

WIT, P. J. de. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Live Science**, Basel, v. 64, n. 21, p. 2726-2732, Nov. 2007.

ZABALA, M. T. de et al. Chloroplasts play a central role in plant defence and are targeted by pathogen effectors. **Nature Plants**, London, v. 1, p. 1-11, June 2015.

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

ZAMBOLIM, L. et al. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa: Suprema, 1997. p. 83-180.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. **Princípios de fitopatologia**. Brasília: ABEAS, 1999. Curso de Proteção de Plantas - Módulo 5.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Doenças do cafeeiro. In: KIMATI, A. et al. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 165-180.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

**ARTIGO 1 - RESISTANCE INDUCERS APPLIED ALONE OR IN ASSOCIATION
WITH FUNGICIDE FOR THE MANAGEMENT OF LEAF RUST AND BROWN EYE
SPOT OF COFFEE DISEASES UNDER FIELD CONDITIONS**

(VERSÃO PRELIMINAR)

Elaborado nas normas do periódico *Journal of Phytopathology*.

ABSTRACT

The use of resistance inducers is promising for the management of plant diseases, since it assures broad spectrum of pathogens and can also improve the efficacy of presently used fungicides. Therefore, it was proposed in the present work to evaluate sources of phosphonates and formulations prepared from by-products of coffee industry, applied alone or in association with fungicide, in the management of the two main coffee fungal diseases in Brazil, leaf rust and brown eye spot, caused by *Hemileia vastatrix* and *Cercospora coffeicola*, respectively. In addition, the effect of these products on the defoliation, productivity and chemical composition of coffee beans (trigonelline, chlorogenic acid, caffeine and total soluble solids) was evaluated. On behalf of the management of the diseases addressed in this study, all the combinations and the fungicide applied alone presented a better performance than the other treatments. Among all the alternative products tested alone, potassium phosphonate (2) distinguishes from the others, for rust control, similar to fungicide treatments. Treatments with fungicide, Greenforce CuCa and cuprous oxide alone provided a lower percentage of defoliation. For yield, among the treatments without association with fungicide, Greenforce CuCa and potassium phosphonate (2) significantly differed from the control. Regarding the chemical composition of the beans, the manganese phosphonate treatment showed the highest values for trigonelline, chlorogenic acid, caffeine and soluble solids. Therefore, resistance inducers have a role not only in the plant protection, eventually replacing the traditionally used fungicides but also contribute to beverage quality, as measured by the chemical compounds related to such variable.

Keywords: *Hemileia vastatrix*; *Cercospora coffeicola*; defoliation; yield; coffee grain; chemical analysis.

1 INTRODUCTION

Coffee (*Coffea* sp.) is widely cultivated in tropical countries and is one of the most economically important crops in the world (Nishijima et al. 2012). Brazil occupies a visible position in the international market, being considered the main producer and exporter of this commodity, presenting a cultivated area of approximately 2.2 million hectares (Companhia Nacional de Abastecimento, 2018). Coffee cultivation in Brazil occurs mainly in the Southeast, where Minas Gerais is the main producer state, accounting for more than 50% of the national production, followed by Espírito Santo and São Paulo respectively (Companhia Nacional de Abastecimento, 2018).

Several factors have limited coffee productivity and among these factors, diseases are one of the most important. Coffee leaf rust (CLR), caused by *Hemileia vastatrix* Berk. &

Br., and Brown eye spot (BYS), caused by *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke, are the most important fungal diseases affecting every year coffee crops in Brazil (Rozo et al. 2012). The main damages of both diseases are the reduction of leaf area and intense defoliation, which decrease the photosynthetic capacity of the plant compromising the production of the next year (Zambolim et al. 2005). Its control is mainly achieved by the use of protective and systemic fungicides including copper, triazoles and strobilurins (Zambolim, 2016). Nevertheless, fungicides must be used in a rational way, as they can cause selection of resistant pathogens, contaminate the environment, and also overtax the production costs (Singh et al. 2011; Pimentel and Burgess, 2014).

To overcome this problem, growers have been looking for alternative and effective measures for disease control. Therefore, the use of products that induce resistance (IR) of the plant against pathogens represents a promising method to be integrated in the crop management system. Induced resistance can be activated in plants by a series of substances, biotic agents (plant extracts, microorganisms or part of them, Resende et al. 2004) or abiotic (chemicals, Cavalcanti et al. 2005); which can delay the entry and/or the activity of the pathogen in plant tissues.

The use of formulations based on plant extracts, which have bioactive substances, capable of behave as resistance inducers has been subject of intense research (Costa et al. 2017). Guimarães et al. (2016) verified that the application of Greenforce CuCa (formulation based on by-products of coffee industry) and acibenzolar-S-methyl (ASM) provided reduction of 38 and 35% in the area under the disease incidence progression curve (AUDsPC) of brown eye spot of coffee. Costa et al. (2014) had used formulations of plant industry by-product combined with phosphates and phosphites for the control of leaf rust and brown eye spot diseases in coffee field conditions. The terms phosphite and phosphonate include salts of phosphorous acid (H_3PO_3). The phosphonate is used to designate compounds containing a C-P

(5) bond, and the term phosphite is used to entitle alkali metal salts of phosphorous acid (McDonald et al. 2001). The use of these compounds has been achieving significant control of plant diseases, once; in addition of being a nutrient source for plants, they can cause direct toxicity to the pathogen or even activate plants natural defenses (Jackson and Colquhoun, 2000; Nojosa et al. 2009; Dalio et al. 2012). Gene transcripts associated with defense, wounding, and oxidative stress, seems to constitute the core of the phosphite plant responses. Furthermore, changes in primary metabolism and cell wall-related processes were also observed (Burra et al. 2014). Liljeroth et al. (2016) found that treating potato with phosphite in combination with reduced doses of fungicides gave good protection against potato late blight caused by the oomycete *Phytophthora infestans*. In coffee plants a significant reduction on the mycelia growth of *P. costarricensis* and severity of Phoma leaf spot with the use of phosphites was observed (Nojosa et al. 2009). Moreover, the foliar sprayings of coffee seedlings with manganese phosphite (MnPhi) provided 63% control of rust severity (*H. vastatrix*) (Monteiro et al. 2016).

The quality of coffee is closely related to a set of chemical, physical and sensory attributes responsible for the flavor and aroma of the beverage (Tavares, 2012), and can be influenced by genetic factors, cultural practices, cultivation environment, processing type, drying, storage and industrialization (Toledo et al. 2016). The phenolic compounds, like the chlorogenics acids are responsible for the fruits astringency and contribute to the characteristic flavor and aroma of coffee (Moreira et al. 2000; Nogueira and Trugo, 2003). The levels of trigonelline, chlorogenic acids and caffeine in coffee beans have been studied both for species discrimination and for evaluating the degree of roasting, quality and functional properties of coffee (Bicchi et al. 1995).

The objective of this work was to evaluate different sources of phosphonates and formulations prepared from by-products of coffee industry), applied alone or in association

with fungicide in the CLR and BYB of coffee management, in field conditions. The work purposed also to verify the effect of these treatments on the grain chemical composition (percentage of trigonelline, chlorogenic acid, caffeine and soluble solids).

2 MATERIAL AND METHODS

Genetic material and treatments

The experiment was conducted in the Universidade Federal de Lavras (UFLA) experimental area, with history of CLR and BYB outbreaks every year. Six-year old *Coffea arabica* cultivar Mundo Novo IAC 376/4, susceptible to these diseases, planted in a spatial distribution of 3.5 m X 0.8 m were used in this study. The experiment was conducted in two consecutive years, beginning in the season 2014/2015 and finishing in the 2015/2016. During the experimental period, the crop received cultural treatments and fertilization appropriate to the conventional management system. The amount of fertilizer applied was based on the analysis of the soil after harvest and on the fertility levels interpretation criteria proposed by Guimarães et al. (1999).

Treatments, products and doses of spraying are presented in Table 1. The doses were set according to the manufacturer's recommendations. Spraying initiated in January with the onset of the first rust and brown eye spot of coffee symptoms, and a second application was made in March. Spraying was performed using a motorized costal sprayer, with a volume of 400 L ha⁻¹.

Assessment of disease severity

Coffee leaf rust and brown eye spot of coffee severities were evaluated according to previously published diagrammatic scales (Cunha et al. 2001; Custódio et al. 2011). A total of 5 evaluations were carried out and the observed indexes of severity were transformed in the

area under the disease (rust and brown eye spot) severity progress curves (AUDsPC) as proposed by Shaner and Finney (1977).

Defoliation and yield evaluation

The defoliation was determined from the evaluation of the coffee percentage of leaves, in the pre-harvest period of the 2014/2015 season, according to Boldini (2001).

Yield was quantified in the season 2015/2016 due to the maximum effectiveness of the products. A portable skid was used to harvest the grains. The yield determination provided by each treatment was established based on the weight of the fruits harvested in the plants (bags of 60 kg of beneficiated coffee per hectare). The formula described by Carvalho et al. (2006): $\text{Productivity} = [(\text{kg/plant} \times 0.2) \times \text{number of plants/ha}] / 60 \text{ kg}$, was used to calculate yield, i.e., if 10 kg of fresh coffee berry were harvest, it will be considered 2 kg of processed coffee resulting an yield of 20% by weigh.

Coffee grain analysis

After harvesting (crop season 2015/2016), the coffee fruits were dried on the paved ground, and grains were analyzed for total soluble solids content and chemical composition. The water content of the raw grains was quantified in the oven at 105°C for 16 hours, according to the standard method of ISO 6673 (International Organization for Standardization, 2003).

Total soluble solids content

Soluble solids were quantified by the methodology of Helrich (1990) adapted for coffee grains. In order to obtain finely powdered samples, the grains were submitted to the electric mill with the use of liquid nitrogen, followed by filtration to obtain an homogeneous

granulation. Five grams of those powdered samples were filtered in a vacuum filtration system, placed in a Buchner funnel with cotton, under burette continuous dripping with 170 ml of boiling water. The extract was filtered on a kitasato flask by vacuum pump and the volume of the extracts and the ° Brix were evaluated in triplicate. The instrument used for °Brix measuring was the portable digital refractometer HI 96801 (Hanna Instruments®). The soluble solids content was obtained from a standard curve based on °Brix.

Chemical composition using high performance liquid chromatography (HPLC)

Preparation of samples and standards

The research was carried out at the National Institute of Coffee Science and Technology (INCT-Café) of the Universidade Federal de Lavras (UFLA). The analyzer used was UFLC Shimadzu, equipped with high-pressure sensor model LC-20AT, diagnostic model DGU-20A5, relation model CBM-20A, automatic model injector SIL-20A-HT and UV-Vis detector (SPD-20A). The column used was a Supelcosil LC-C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm) connected to a Supelcosil C18 pre-column (4.6 x 12.5 mm, 5 µm).

Trigonelline, chlorogenic acid (5-CQA) and caffeine purchased from Sigma-Aldrich, were used to prepare aqueous standard stock solutions (1 mg mL⁻¹). The standard analytical curves were constructed by triplicate injections of dilutions of the standard stock solutions in water, over the concentration range from 0,001 to 0,8 mg mL⁻¹. The analytical curves were obtained by linear regression considering the minimum correlation coefficient of 0.997. The sample quantification was performed by external standardization.

Samples of raw ground coffee (0.5g) were extracted with 50 ml boiling distilled water for 3 min. The extract was filtered first by a filter paper and then on a 0.45 µm membrane; the samples were analyzed on the chromatograph according to Malta and Chagas (2009). The

identity of the metabolites contained in the extracts was confirmed by the retention time and by the sample peaks compared to standards, according to Vitorino et al. (2001).

Experimental design and statistical analysis

The experimental design was a randomized complete block (RCB), with fifteen treatments and four replicates. Ten plants were used per plot, six of those plants were considered for evaluations, located in the center of the plot. The data were submitted to the Shapiro-Wilk test (Shapiro and Wilk, 1965) to verify the variance analysis assumptions (Anova). As the variables analyzed followed the Anova assumptions, the F-test was performed using the Sisvar software without transformation of the data. Significant variables in the F test ($p \leq 0.05$) were submitted to the Scott-Knott test at 5% probability using the Sisvar version 5.1 program (Ferreira, 2011). For the statistical analyzes of the correlation and the orthogonal contrast, data collected from two years were combined and the mean value was calculated. The correlation was performed between the variables (disease and productivity). According to the comparison parameters, Pearson's correlation coefficient (P) with values ranging from 0.7 to 0.9; indicates a strong correlation for the analyzed variables. In addition, orthogonal contrast (Scheffé test, $P \leq 0.05$) was used to analyze the differences between treatments.

3 RESULTS

All treatments caused a significant reduction of the area under the rust severity curve (AUDsPC) when compared to the control, (Table 2). All the combinations of resistance inducers and fungicide had similar effect on AUDsPC compared to the fungicide alone, providing disease control ranging from 87 to 99%, considering both years. The treatment with potassium phosphonate (2) alone had also a similar effect to the fungicide, reaching 77%

(2015) and 71% (2016) of disease control. The other resistance inducers and the standard foliar fertilizer used alone controlled the disease from 41% to 71% in 2015 and from 34% to 61% in 2016.

Regarding brown eye spot, all the combinations of resistance inducers and fungicide, or the fungicide alone, had similar effect on disease control (AUDsPC) when compared to the other treatments in the year 2015 (Table 3). The combinations resulted in 79 to 96% (2015) and 64 to 87% (2016) of disease control, while for fungicide alone only 87.91% (2015) and 46.75% (2016) of control was obtained. The treatments with Greenforce CuCa and Mn phosphonate alone presented a similar control of BYS to the fungicide in 2015. However, in 2016 the treatments with the resistance inducers and the standard foliar fertilizer, used alone provided only 4 to 35 % of BYS control.

Regarding defoliation (2015), all the treatments with the resistance inducers in combination with the fungicide, the fungicide, Greenforce CuCa and cuprous oxide alone provided a lower percentage of defoliation with similar effect amongst, differing from the other treatments (Table 4). Regarding productivity assessment in 2016 (Yield) the treatments: K phosphonate 1 + fungicide, Mn phosphonate + fungicide, Greenforce CuCa + fungicide, K phosphonate 2 + fungicide, fungicide, Greenforce CuCa and K phosphonate 2 presented the highest yields, differing from the other treatments. The treatment Greenforce CuCa used alone provided productivity and defoliation similar to the fungicide (Table 4).

The correlation analysis (Table 5) between disease severity and yield revealed a negative association ($P < 0.05$) for both diseases, rust (71.6%) and brown eye spot (69.4%), i.e., the lower the disease, the higher the yield. Regarding disease and defoliation, a positive correlation ($P < 0.01$) was observed for both rust (73.8%) and brown eye spot (90.3%), which means that the lower the disease, the lower the defoliation. Defoliation and yield had a

negative correlation (82.4%), as the coffee defoliation decreased, harvested grain yield increased.

The contrast analyzes (Table 6) between resistance inducers (phosphonates, Greenforce CuCa and cuprous oxide) applied alone and the associations of those with fungicide (C1), for both, diseases and for yield, showed that the combinations (RIs + fungicides) were more effective, resulting in a lower AUDPC and an increased yield. When control was compared by contrast with the all the other treatments (C2), it was possible to observe that all products tested provided diseases reduction and higher yield. Comparison between the fungicide alone and in combinations with the resistance inducers (C3), showed that only for brown eye spot, the resistance inducers could improve the fungicide performance. For the contrast (C4): control compared to the phosphonates, cuprous oxide, Greenforce CuCa and standard leaf fertilizer applied alone, for both rust and brown eye spot, the products decreased both diseases and also contributed to a higher productivity. Comparison of control and the fungicide treatment (C5 contrast), the fungicide resulted in a reduction of both diseases (rust e brown eye spot) and productivity) when compared to the control treatment.

The composition of the coffee beans in; trigonelline, chlorogenic acid, caffeine and soluble solids content was determined (Table 7). The highest value for trigonelline was obtained for the combination of Mn phosphonate with fungicide. The treatments with fungicide and cuprous oxide applied alone and the control showed also high levels of trigonelline. All the other treatments did not differ amongst showing the lower content of trigonelline.

The analysis of chlorogenic acid content revealed that the treatment with K Phosphonate 1 applied alone obtained the lowest percentage, standing out when compared to

the other treatments. The control and the standard leaf fertilizer had their values around 6.67%. For all the other treatments values of chlorogenic acid were at 7.20% or higher.

Regarding caffeine, the treatments associated with the fungicide: Mn phosphonate, Cu phosphonate, K phosphonate 2, and the treatments applied alone: Mn phosphonate, Cu phosphonate, Greenforce CuCa, cuprous oxide and K phosphonate 2, resulted in the highest levels of this compound. For the analysis of soluble solids there was no effect of treatments, values did not differ significantly from each other.

The best results for the chemical characteristics analyzed in coffee beans were obtained with Mn phosphonate in association with the fungicide. This treatment showed the highest values for trigonelline, caffeine and soluble solids and the lowest for chlorogenic acid.

4 DISCUSSION

The results presented above indicated that the combinations of resistance inducers with fungicide resulted in better management of the coffee rust and brown eye spot. Among all the products tested, the K phosphonate 2 is the only product only product that applied isolated had a similar result the combinations (resistance inducers plus fungicide) and the fungicide (sprayed alone) in the control of rust in the year 2016. According Ogoshi et al. (2013), the potassium phosphite at a dose of 10.0 mL.L⁻¹ provided a greater reduction in disease severity, around 62.5% to the *Colletotrichum* complex in coffee plants. Silva et al. (2011) reported that the application of K phosphite to soybean significantly reduced rust and mildew (*Peronospora manshurica*). Phosphite application reduces the severity of anthracnose in common bean, caused by *Colletotrichum lindemuthianum*, and can enhance enzymatic activity (Gadaga et al. 2017).

Some studies have already demonstrated the efficacy of plant extracts in the control of phytopathogens, such as *Phoma costarricensis* (Barguil et al. 2005), *Hemileia vastatrix*, *Cercospora coffeicola* and *Phoma tarda* (Santos et al. 2007), and possible induction of

resistance mechanisms in the host this extract (Barguil et al. 2005; Santos et al. 2007; Medeiros et al. 2009).

Studies with cuprous oxides showed 94.9% control of coffee rust within 60 days after inoculation (Oliveira et al. 2002). Many studies have demonstrated the efficiency of phosphites in the inhibition of pathogen growth, such as *Alternaria alternata* (Reuveni et al. 2003), *Penicillium expansum* (Amiri and Bompeix, 2011), *Venturia pirina* (Percival et al. 2009), *Monilinia fructicola* (Moreira and May-de-Mio, 2009), and mainly in the case of oomycetes in different crops (Guest and Grant, 1991; McDonald et al. 2001; Silva et al. 2011). The control provided by phosphites is a result of the resistance induced by these products (Daniel and Guest, 2006; Eshraghi et al. 2011; Dalio et al. 2012) and by direct effect on pathogens (Nojosa et al. 2005; King et al. 2010; Dalio et al. 2012).

Resistance of coffee crops is generally compromised in years of high yield, probably due to a nutritional imbalance caused by a greater drain of nutrients by the fruits, increasing the incidence of diseases and defoliation and, consequently the next year's productivity decrease (Costa et al. 2007). The results of the present study corroborate those found by Costa et al. (2014), in which all the alternative treatments associated to the fungicide reduced the defoliation.

The phosphites provided beneficial effects in other crops: in a single foliar application of phosphite, in the pre-flowering, orange trees cultivar Valencia, presented a greater number of flowers, fruits yield and increase of the total soluble solids, compared to plants untreated (Albrigo, 1999); in plants of passion fruit, potassium phosphite was considered an effective alternative product for the control of crop diseases, also providing a significant increase in yield, quantity of fruits per plant and an increase in soluble solids content (Junqueira et al. 2011). In our case, Greenforce CuCa treatment applied alone, highlighted from the others treatments since it provided high yield and low defoliation.

Trigonelline is an alkaloid (1-methylpyridinium-3-carboxylate) precursor of B-complex with nutraceutical properties (vitamin B₃), being a caffeine related compound. The degradation of trigonelline by heat results in niacin, nicotinamide and a wide range of volatile compounds such as, pyridines and N-methylpyrrole, are responsible for the coffee aroma (Clifford and Wilson, 1985). According to Farah et al. (2006), for the raw beans, there is a strong correlation between trigonelline content and coffee quality. Caffeine is a trimethylxanthine, related to bitter taste and is important for the "flavor" of coffee. The concentrations of caffeine and trigonelline in raw and roasted grains have been positively associated with coffee quality (Franca et al. 2005; Farah et al. 2006). The coffee classified as soft drink has 1.26 g of caffeine, while the classified as hard has 0.96 g of caffeine per 100 g of coffee (Farah et al. 2006). The main non-volatile phenolic compounds found in coffee are chlorogenic acids, which represent 6 to 12% of their dry weight. Among them, the main subgroup corresponds to the caffeoylquinic acids (CQA), dicaffeoylquinic (di-CQA) and feruloylquinic acids (Franca et al. 2005). There are in the literature, several studies associating low coffee quality with total concentrations of chlorogenic acids (Carvalho et al. 1994; Franca et al. 2005; Farah et al. 2006), especially with respect to the concentration of 5-CQA. However, Farah et al. (2006) found that the concentrations of 3,4-dicaffeoylquinic acid in raw and roasted coffee were positively correlated with quality, whereas defective grains (green, burnt and damaged) and other caffeoyl quinic acid, mainly the 5-caffeoylquinic acid, correlated negatively with quality. According to Pinto et al. (2002), the best classified coffee drink, with strictly soft, soft, barely soft and hard beverage presented higher content of total soluble solids, which is desirable both from the point of view of industrial yield and contribution to ensuring "body" which is important for espresso coffee drink. Alves (2009) verified a strong correlation between beverage quality and brix degree of ripe fruits, 95% of the coffees that reached a mark above 80 had a brix degree higher than 20 upon harvest; in

this study all treatments presented values higher than 20. Regarding to the chemical characteristics analyzed in the coffee beans, the Mn phosphonate in association with the fungicide was the most outstanding treatment, presenting the best values for 3 out of 4 compounds evaluated.

Among the products tested the K phosphonate 2 sprayed alone distinguished from the other products mainly for the rust control. However, all associations of phosphonates and formulations prepared from by-products of coffee industry with the fungicide resulted in a better control of both diseases (rust and brown eye spot) and a reduction in defoliation. The Mn phosphonate in combination with fungicide was the one that obtained the best values for the chemical characteristics evaluated. The phosphites and Greenforce CuCa are a possible tool to assist the coffee grower in the coffee rust and brown eye spot management.

5 LITERATURE

Albrigo LG. (1999) Effects of foliar applications of urea or nutriphite on flowering and yields of Valencia orange trees. Proc Flo State Hort Soc 112: 1-4.

Alves E. (2009). Variabilidade espacial e temporal da qualidade do café cereja produzido na região das Serras de Minas. Viçosa, MG, Brasil, Universidade Federal de Viçosa, Doutorado.

Amiri A, Bompeix G. (2011) Control of *Penicillium expansum* with potassium phosphite and heat treatment. Crop Prot 1: 222-227.

Barguil BM, Resende MLV, Resende RS, Beserra Júnior JEA, Salgado SML. (2005) Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costaricensis* of coffee plants. Fitopal Bras 30: 535-537.

Bicchi CP, Panero OM, Pellegrino GM, Vanni AC. (1995) Characterization of green and roasted coffees through the chlorogenic acid fraction by HPLC-UV and principal component analysis. J Agric Food Chem 43: 1549-1555.

Boldini JM. (2001) Epidemiologia da ferrugem e da cercosporiose em cafeeiro irrigado e fertirrigado. Lavras, MG, Brasil, Universidade Federal de Lavras, Mestrado.

Burra DO, Berkowitz PE, Hedley J, Morris S, Resjö F, Levande E, Liljeroth E, Andreasson E, Alexandersson E. (2014) Phosphite-induced changes of the transcriptome and secretome in *Solanum tuberosum* leading to resistance against *Phytophthora infestans*. BMC Plant Biol. 14: 254.

Carvalho GR, Mendes ANG, Bartholo GF, Amaral MA. (2006) Avaliação e seleção de progênies resultantes do cruzamento de cultivares de café Catuaí com Mundo Novo. *Ciênc Agrotec* 30: 844-852.

Carvalho VD, Chagas SJR, Chalfoun SM, Botrel N, Juste Junior ESG. (1994) Relação entre a composição físico-química e química do grão beneficiado e a qualidade de bebida do café. I. Atividades de polifenoloxidase e peroxidase, índice de coloração de acidez. *Pesq Agropec Bras* 29: 449-454.

Cavalcanti LS, Di Piero R, Cia P, Pascholati SF, Resende MLV, Romeiro RS. (eds) (2005) *Indução de resistência em plantas contra patógenos e insetos*. Piracicaba, SP, Brasil, FEALQ.

Clifford MN, Wilson KC. (1985) *Coffee: botany, biochemistry and production of beans beverage*. London, New York, Croom Helm.

Companhia Nacional de Abastecimento - Conab. (2018) *Acompanhamento da safra brasileira de café: primeiro levantamento, janeiro 2018*. Brasília, DF, Conab.

Costa BHG, Resende MLV, Ribeiro Júnior PM, Mathioni SM, Pádua MA, Silva Júnior, MB. (2014) Suppression of rust and brown eye spot diseases on coffee by phosphites and by-products of coffee and citrus industries. *J Phytopathol* 162: 635–642.

Costa MJN, Zambolim L, Rodrigues FR. (2007) Avaliação de produtos alternativos no controle da ferrugem do cafeeiro. *Fitopatol Bras* 32: 147–152.

Costa RC, Ishida AKN, Miranda VS, Damasceno Filho AS, Silva CTB, Resende MLV, Oliveira LC. (2017) Extratos vegetais, formulações a base de extrato vegetal e produtos químicos no controle da mancha bacteriana do maracujazeiro. *Rev Bras Agropecu Sustent* 7: 26-33.

Cunha RL, Pozza EA, Dias WP, Barretti PB. (2001). Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para avaliar a severidade da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro. In: *Anais 2º Simpósio Brasileiro de Pesquisa dos Cafés do Brasil, setembro de 2001*. Brasília, Embrapa Café, pp 1001-1008.

Custódio AAP, Pozza EA, Guimarães SSC, Koshikumo ESM, Hoyos JMA, Souza PE. (2011) Comparison and validation of diagrammatic scales for brown eye spots in coffee tree leaves. *Ciênc Agrotec* 35: 1067-1076.

Dalio RJD, Fleischmann F, Humez M, Osswald W. (2014) Phosphite protects *Fagussylvatica* seedlings towards *Phytophthora plurivora* via local toxicity, priming and facilitation of pathogen recognition. *PLoS One* 9: e87860.

Dalio RJD, Ribeiro Júnior PM, Resende MLV, Silva AC, Blumer S, Pereira VF, Osswald W, Pascholati SF. (2012) O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. *Rev Anu Patol Plantas* 20: 206-242.

- Daniel R, Guest D. (2006) Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Mol Plant Pathol* 67: 194-201.
- Eshraghi L, Anderson J, Aryamanesh N, Shearer B, McComb J, Hardy GE, O'Brien P A. (2011) Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathol* 60: 1086–1095.
- Farah A, Monteiro MC, Calado V, Franca AS, Trugo LC. (2006) Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chem* 98: 373-380.
- Ferreira DF. (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciênc Agrotec* 35: 1039-1042.
- Franca AS, Oliveira LS, Mendonça JCF, Silva XA. (2005) Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans. *Food Chem* 90: 84-89.
- Gadaga SJG, Abreu MS, Resende MLV, Ribeiro Júnior PM. (2017) Phosphites for the control of anthracnose in common bean. *Pesq Agropec Bras* 52: 36-44.
- Guest D, Grant B. (1991) The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biol Rev* 66: 159–187.
- Guimarães PTG, Garcia AWR, Venegas VHA, Prezotti LC, Viana AS, Miguel A S, Oliveira JA. (1999) Sugestões de adubação para as diferentes culturas em Minas Gerais. Em: Ribeiro AC, Guimarães PTG, Venega VHA. (eds) *Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação*. Viçosa, MG, CFSEMG, pp 289-302.
- Guimarães S, Resende M, Santos D, Monteiro A, Vasconcelos V, Batista Júnior M. (2016) Indutores de resistência no controle da cercosporiose do cafeeiro: análise de genes relacionados à defesa. *Coffee Sci* 11: 308-317.
- Helrich K. (1990). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15. ed. Arlington, Texas, AOAC.
- International Organization for Standardization. (2003) *ISO 6673:2003: green coffee: determination of loss mass at 105°C*. 2. ed. Genebra, Suíça, ISO.
- Jackson B, Colquhoun H. (2000) Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathol* 49: 147–154.
- Junqueira KP, Faleiro FG, Uesugi CH, Junqueira NTV, Bellon G, Santos EC, Ramos LN. (2011) Desempenho agrônômico de maracujazeiros tratados com produtos alternativos e fertilizantes foliares. *Rev Bras Frutic* 33: 40-47.
- King M, Reeve W, Van der Hoek M, Williams, N, McComb JA, O'Brien P, Hardy G. (2010) Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Mol Genet and Genomics* 284: 425-435.

- Liljeroth E, Lankinen Å, Wiik L, Burra DD, Alexandersson E, Andreasson E. (2016) Potassium phosphite combined with reduced doses of fungicides provides efficient protection against potato late blight in large-scale field trials. *Crop Prot* 86: 42–55.
- Malta MR, Chagas SJR. (2009) Avaliação de compostos não-voláteis em diferentes cultivares de cafeeiro produzidas na região sul de Minas Gerais. *Acta Sci Agron* 31: 57-61.
- McDonald AE, Grant B, Plaxton WC. (2001) Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. *J Plant Nutr* 24: 1505-1519.
- Medeiros FCL, Resende MLV, Medeiros FHV, Zhang HM, Pará PW. (2009) Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. *Physiol Mol Plant Pathol* 74: 175-183.
- Monteiro ACA, Resende MLV, Valente TCT, Ribeiro Junior PM, Pereira VF, Costa J R, Silva JAG. (2016) Manganese phosphite in coffee defence against hemileia vastatrix, the coffee rust fungus: biochemical and molecular analyses. *J Phytopathol* 164: 1043–1053.
- Moreira LM, May-de-Mio LL. (2009) Controle da podridão parda do pessegueiro com fungicidas e fosfitos avaliados em pré e pós-colheita. *Ciênc Agrotec* 33: 405-411.
- Moreira RFA, Trugo LC, Maria CAB. (2000) Componentes voláteis do café torrado. Parte II. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. *Quím Nova* 23: 195-203.
- Nishijima M, Saes MS, Postali FAS. (2012) Análise de concorrência no mercado mundial de café verde. *Rev. Econ. Sociol. Rural* 50: 69-82.
- Nogueira M., Trugo LC. (2003) Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. *Food Sci Technol* 23: 296-299.
- Nojosa GBA, Resende MLV, Barguil BM, Moraes SRG, Vilas Boas CH. (2009) Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de Phoma. *Summa Phytopathol* 35: 60-62.
- Nojosa GBA, Resende MLV, Resende AV. (2005) Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. Em: Cavalcanti LS, Di Piero RM, Cia P, Pascholati SF, ResendeMLV, Romeiro RS. (eds.) *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba, SP, FEALQ, v. 1, pp 139-153.
- Ogoshi C, Abreu MS, Silva BM, Santos Neto H, Ribeiro Júnior PM, Resende MLV. (2013) Potassium phosphite: a promising product in the management of diseases caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in coffee plants. *Biosci J* 29: 1558-1565.
- Oliveira SHF, Santos JMF, Guzzo SD. (2002) Efeito da chuva sobre a tenacidade e eficiência de fungicidas cúpricos associados ao óleo vegetal no controle da ferrugem do cafeeiro. *Fitopatol Bras* 27: 581-585.
- Pabis S, Jayas DS, Cenkowski S. (1998) *Grain drying: theory and practice*. New York, John Wiley & Sons.

Percival G, Noviss K, Haynes I. (2009) Field evaluation of systemic inducing resistance chemicals at different growth stages for the control of apple (*Venturiainaequalis*) and pear (*Venturiapirina*) scab. *Crop Prot* 28: 629-633.

Pimentel D, Burgess M. (2014) Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. Em: Pimentel D, Peshin R. *Integrated pest management: pesticide problems*. New York, Springer, v. 3, pp 47-71.

Pinto NAVD, Fernandes SM, Giranda RN, Pereira RRGF, Carvalho VD. (2002) Avaliação de componentes químicos de padrões de bebida para o preparo de café expresso. *Ciênc Agrotec* 26: 826-829.

Resende ML, Barguil BM, Resende RS, Beserra Júnior JEA, Salgado SML. (2004) Induction of resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. In: *Proc 1th International Joint Workshop on PR-Proteins and Induced Resistance*, 6-10 de setembro de 2004. Helsingor, Danish, pp 79.

Reuveni M, Sheglov D, Cohen Y. (2003) Control of moldy-core decay in apple fruits by aminobutyric acids and potassium phosphates. *Plant Disease* 87: 933-936.

Rozo Y, Escobar C, Gaitán Á, Cristancho M. (2012) Aggressiveness and genetic diversity of hemileia vastatrix during an epidemic in Colombia. *J Phytopathol* 160: 732-740.

Santos FS, Souza PE, Resende MLV, Pozza EA, Miranda JC, Ribeiro Júnior PM, Manerba SC. (2007) Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. *Fitopal Bras* 32: 59-63.

Shaner G, Finney RF. (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathol* 67: 1051-1056.

Shapiro SS, Wilk, MB. (1965) An analysis of variance test for normality (Complete Samples). *Biometrika* 52: 591-611.

Silva OC, Santos HAA, Dalla Pria, M, May-de-Mio, LL. (2011) Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. *Crop Prot* 30: 598-604.

Singh JS, Pandey VC, Singh DP. (2011) Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agricult Ecosyst Environment* 140: 339-353.

Tavares KM. (2012) Detecção de adulteração em café riado torrado e moído por espectroscopia no infravermelho e análise sensorial. Lavras, MG, Brasil, Universidade Federal de Lavras, Dissertação.

Toledo PRAB, Pezza L, Pezza HR, Toci AT. (2016) Relationship between the different aspects related to coffee quality and their volatile compounds. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 15: 705-719.

Vitorino MD, França AS, Oliveira LS, Borges MLA. (2001) Metodologia de obtenção de extrato de café visando a dosagem de compostos não voláteis. *Rev Bras Armaz* 26: 17-24.

Zambolim L, Vale FXR, Zambolim EM. (2005) Doenças do cafeeiro (*C. arabica* e *C. canephora*). Em: Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM. (eds) Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo, SP, Agronômica Ceres, v. 2, pp 165-180.

Zambolim L. (2016) Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. Trop Plant Pathol. 41: 1-8.

Table 1 List of treatments, products and doses used in the field experiments

Treatments	Products*	Doses
1. Control		
2. Fungicide	epoziconazole + pyraclostrobin	1.0 l/ha
3. K phosphonate 1 + fungicide	P ₂ O ₅ (35%) and K ₂ O (25%) + epoziconazole + pyraclostrobin	1.0 l/ha + 1.0 l/ha
4. K phosphonate1	P ₂ O ₅ (35%) + K ₂ O (25%)	2.0 l/ha
5. Mn phosphonate + fungicide	P ₂ O ₅ (51%) + Mn (9.7%) + epoziconazole + pyraclostrobin	1.0 l/ha + 1.0 l/ha
6. Mn phosphonate	P ₂ O ₅ (51%) + Mn (9.7%)	2.0 l/ha
7. Cu phosphonate + fungicide	P ₂ O ₅ (20.3%) + Cu (4%) + epoziconazole + pyraclostrobin	1.0 l/ha + 1.0 l/ha
8. Cu phosphonate	P ₂ O ₅ (20.3%) + Cu (4%)	2.0 l/ha
9. Greenforce CuCa + fungicide	Formulations based on by-products of coffee industry supplemented with copper and calcium + epoziconazole + pyraclostrobin	2.0 l/ha + 1.0 l/ha
10. Greenforce CuCa	Formulations prepared from products of coffee industry supplemented with Cu and Ca	4.0 l/ha
11. Cuprous oxide + fungicide	Cu (50%) + epoziconazole + pyraclostrobin	1.0 l/ha + 1.0 l/ha
12. Cuprous oxide	Cu (50%)	
13. K phosphonate 2 + fungicide	P ₂ O ₅ (33.6%) + K ₂ O (29%) + epoziconazole + pyraclostrobin	1.0 l/ha + 1.0 l/ha
14. K phosphonate2	P ₂ O ₅ (33.6%) + K ₂ O (29%)	2.0 l/ha
15. Standard leaf fertilizer	K ₂ O (10%) + Mg (1%) + S (10%) + B (3%) + Cu (10%) + Mn (2%) + Zn (6%)	4.0 kg/ha

*Products were applied twice in January and Mach.

Table 2 Effect of treatments on the area under the disease severity– progress curve (AUDsPC) and percentage of control on the coffee rust disease in 2015 and 2016 field experiments

Rust	2015		2016	
	AUDsPC	Control (%)	AUDsPC	Control (%)
Control	83.93 d	0	84.92 c	0
Fungicide	3.77 a	96.60	4.10 a	95.17
K phosphonate 1 +Fungicide	3.66 a	95.42	5.08 a	94.02
K phosphonate 1	40.33 c	47.99	45.90 b	45.95
Mn phosphonate + Fungicide	1.39 a	98.42	1.20 a	98.59
Mn phosphonate	26.23 b	70.57	39.58 b	53.39
Cu phosphonate + Fungicide	2.87 a	97.12	1.72 a	97.98
Cu phosphonate	44.40 c	41.12	55.78 b	34.31
Greenforce CuCa + Fungicide	6.05 a	92.77	9.08 a	89.31
Greenforce Cuca	32.01 c	60.49	53.63 b	36.85
Cuprous oxide + Fungicide	6.02 a	91.96	10.99 a	87.06
Cuprous oxide	40.36 c	46.85	55.80 b	34.29
K phosphonate 2 +Fungicide	2.84 a	96.77	3.52 a	95.86
K phosphonate 2	18.80 b	77.42	24.79 a	70.81
Standard leaf fertilizer	48.30 c	45.69	33.50 b	60.55

Treatments: Fungicide:(epoziconazole + pyraclostrobin); K phosphonate 1: P₂O₅ (35%) and K₂O (25%); Mn phosphonate: P₂O₅ (51.0%) and Mn (9.7%); Cu phosphonate: P₂O₅ (20.3%) and Cu (4.0%); Greenforce CuCa: formulations prepared from by-products of coffee industry supplemented with Cu and Ca; cuprous oxide: Cu (50.0%); K phosphonate 2: P₂O₅ (33.6%) and K₂O (29.0%); standard leaf fertilizer K₂O (10.0%), Mg (1.0%), S (10.0%), B (3.0%), Cu (10.0%), Mn (2.0%) and Zn (6.0%). A bag of coffee contains 60 Kg. Any two means followed by the same letter in the column were not significantly different at the 0.05 probability level according to the Scott-Knott test.

Table 3 Effect of treatments on the area under the disease severity progress curve (AUDsPC) and percentage of control on the brown eye spot disease of coffee in 2015 and 2016 field experiments

Brown eye spot	2015		2016	
	AUDsPC	Control (%)	AUDsPC	Control (%)
Control	23.73 c	0	23.90 c	0
Fungicide	2.87 a	87.91	12.73 b	46.75
K phosphonate 1 + Fungicide	2.67 a	88.74	8.16 b	65.87
K phosphonate 1	21.38 c	9.93	15.45 c	35.37
Mn phosphonate + Fungicide	4.82 a	79.68	3.21 a	86.58
Mn phosphonate	5.56 a	76.57	22.61 c	5.42
Cu phosphonate + Fungicide	2.09 a	91.18	4.66 a	80.51
Cu phosphonate	20.53 c	13.48	21.17 c	11.45
Greenforce CuCa + Fungicide	2.50 a	89.49	8.70 b	63.59
Greenforce Cuca	3.83 a	83.87	21.37 c	10.59
Cuprous oxide + Fungicide	0.96 a	95.96	3.97 a	83.38
Cuprous oxide	13.67 b	42.41	21.90 c	8.37
K phosphonate 2 + Fungicide	2.94 a	87.61	3.38 a	85.86
K phosphonate 2	6.39 a	73.08	22.96 c	3.94
Standard leaf fertilizer	20.99 c	11.58	20.68 c	13.50

Treatments: Fungicide:(epoziconazole + pyraclostrobin); K phosphonate 1: P₂O₅ (35%) and K₂O (25%); Mn phosphonate: P₂O₅ (51.0%) and Mn (9.7%); Cu phosphonate: P₂O₅ (20.3%) and Cu (4.0%); Greenforce CuCa: formulations prepared from by-products of coffee industry supplemented with Cu and Ca; cuprous oxide: Cu (50.0%); K phosphonate 2: P₂O₅ (33.6 %) and K₂O (29.0%); standard leaf fertilizer K₂O (10.0%), Mg (1.0%), S (10.0%), B (3.0%), Cu (10.0%), Mn (2.0%) and Zn (6.0%). A bag of coffee contains 60 Kg. Any two means followed by the same letter in the column were not significantly different at the 0.05 probability level according to the Scott-Knott test.

Table 4 Effect of treatments on defoliation (2015) and yield (2016) for the cultivar Mundo Novo IAC 376/4 field experiments

Treatments	Defoliation (%)		Yield (bag/ha)	
	2015	2016	2015	2016
Control	31 b	10 d		
Fungicide	19 a	53 a		
K phosphonate 1 + fungicide	20 a	52 a		
K phosphonate 1	28 b	25 c		
Mn phosphonate + fungicide	22 a	47 a		
Mn phosphonate	25 b	34 b		
Cu phosphonate + fungicide	19 a	40 b		
Cu phosphonate	29 b	23 c		
Greenforce CuCa + fungicide	17 a	58 a		
Greenforce CuCa	18 a	46 a		
Cuprous oxide + fungicide	17 a	43 b		
Cuprous oxide	21 a	35 b		
K phosphonate 2 + fungicide	16 a	50 a		
K phosphonate 2	29 b	51 a		
Standard leaf fertilizer	27 b	11 d		

Treatments: Fungicide:(epoziconazole + pyraclostrobin); K phosphonate 1: P₂O₅ (35%) and K₂O (25%); Mn phosphonate: P₂O₅ (51.0%) and Mn (9.7%); Cu phosphonate: P₂O₅ (20.3%) and Cu (4.0%); Greenforce CuCa: formulations prepared from by-products of coffee industry supplemented with Cu and Ca; cuprous oxide: Cu (50.0%); K phosphonate 2: P₂O₅ (33.6 %) and K₂O (29.0%); standard leaf fertilizer K₂O (10.0%), Mg (1.0%), S (10.0%), B (3.0%), Cu (10.0%), Mn (2.0%) and Zn (6.0%). A bag of coffee contains 60 Kg. Any two means followed by the same letter in the column were not significantly different at the 0.05 probability level according to the Scott-Knott test

Table 5 Pearson correlation coefficients for variables; disease, defoliation (2015) and yield (2016)

Variables	Rust	Brown eye spot	Defoliation
Yield	-0.716 ^{*z}	-0.694*	-0.824**
Defoliation	0.738**	0.903**	

^z Significant according to the Pearson correlation coefficient; *P≤ 0.5; **P≤ 0.01.

Table 6 Mean squares for contrast between treatments for the variables: area under the rust severity progress curve (AUDsPC), area under the brown eye spot severity progression curve (AUDsPC) and productivity

Contrast ⁽¹⁾	Rust	Brown eye spot	Productivity
C1	18354.93**	2345.13**	1922.16**
C2	13904.42**	506.37*	3446.91**
C3	1.22 ns	107.04*	71.82 ns
C4	6196.460**	84.23*	1692.35**
C5	12957.73**	369.77**	3647.43**
Residue	242.53	15.83	37.92

Orthogonal contrast according to the Scheffé test: ns – non significant; * $P \leq 0.5$; ** $P \leq 0.01$.

C1 = Contrast between phosphonates, cuprous oxide and Greenforce CuCa applied alone vs. the associations with fungicide; C2 = Contrast between control vs. other treatments tested; C3= Contrast between fungicide applied alone vs. phosphonates, cuprous oxide and Greenforce CuCa with fungicide; C4= Contrast between control vs. phosphonates, cuprous oxide, Greenforce CuCa and standard leaf fertilizer applied alone; C5= Contrast between control vs. fungicide.

Table 7 Effect of treatments on the chemical composition of coffee beans of the crop season 2015/2016

Treatments	Chemical composition			
	Chlorogenic			
	Trigonelline	Acid	Caffeine	Soluble
	(%)	(5-CQA) (%)	(%)	solids (%)
Control	1.14 b	6.67 b	1.63 b	26.17 a
Fungicide	1.16 b	7.27 c	1.54 b	26.47 a
K phosphonate 1 + fungicide	1.10 c	7.27 c	1.65 b	26.98 a
K phosphonate 1	1.02 c	6.25 a	1.47 b	26.27 a
Mn phosphonate + fungicide	1.28 a	7.56 c	1.81 a	31.27 a
Mn phosphonate	1.07 c	7.25 c	1.68 a	28.06 a
Cu phosphonate + fungicide	1.09 c	7.50 c	1.75 a	26.78 a
Cu phosphonate	1.07 c	7.20 c	1.75 a	26.07 a
Greenforce CuCa + fungicide	1.10 c	7.58 c	1.54 b	26.99 a
Greenforce CuCa	1.02 c	7.23 c	1.70 a	26.97 a
Cuprous oxide + fungicide	1.07 c	7.25 c	1.62 b	28.38 a
Cuprous oxide	1.14 b	7.54 c	1.74 a	27.38 a
K phosphonate 2 + fungicide	1.05 c	7.76 c	1.74 a	23.38 a
K phosphonate2	1.04 c	7.43 c	1.74 a	27.79 a
Standard leaf fertilizer	0.96 c	6.67 b	1.62 b	27.37 a

Treatments: Fungicide:(epoziconazole + pyraclostrobin); K phosphonate 1: P₂O₅ (35%) and K₂O (25%); Mn phosphonate: P₂O₅ (51.0%) and Mn (9.7%); Cu phosphonate: P₂O₅ (20.3%) and Cu (4.0%); Greenforce CuCa: formulations prepared from by-products of coffee industry supplemented with Cu and Ca; cuprous oxide: Cu (50.0%); K phosphonate 2: P₂O₅ (33.6 %) and K₂O (29.0%); standard leaf fertilizer K₂O (10.0%), Mg (1.0%), S (10.0%), B (3.0%), Cu (10.0%), Mn (2.0%) and Zn (6.0%). A bag of coffee contains 60 Kg. Any two means followed by the same letter in the column were not significantly different at the 0.05 probability level according to the Scott-Knott test.

**ARTIGO 2 - FORMULAÇÃO À BASE DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DO
CAFÉ NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DO CAFEIRO À FERRUGEM:
ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS**

**Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2003) e formatado de acordo com o
Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações.**

RESUMO

Produtos alternativos, como formulação à base de subprodutos da indústria cafeeira, para o controle de doenças, podem ter o efeito de induzir a resistência das plantas contra um amplo espectro de patógenos. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito da formulação à base de subproduto da indústria cafeeira adicionada de cobre e cálcio (Greenforce CuCa), em mudas de cafeeiro, comparado com o indutor de resistência padrão acibenzolar-S-metil (ASM), na fisiologia da planta e como o sistema antioxidante do cafeeiro atua para mitigar os danos causados por *H. vastatrix*. Para isso, foram realizadas análises da atividade das enzimas peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD), fenilalanina amônia-liase (PAL) e polifenol oxidase (PPO) e quantificados o peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica, fenol e lignina. Ademais, foram avaliados parâmetros relacionados às trocas gasosas: taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (gs), taxa transpiratória (E), concentração intercelular de CO₂ no mesofilo (Ci), concentração intercelular de CO₂ no mesofilo/concentração de CO₂ externa atual, (Ci/Ca), eficiência no uso da água (EUA - A/E) e a eficiência instantânea de carboxilação (EiC - A/Ci). Foi observado que a aplicação foliar de Greenforce CuCa, em mudas de cafeeiro, induziu resistência em plantas, proporcionando melhor preservação do aparelho fotossintético. O sistema antioxidante (SOD, POX e APX) foi eficiente na eliminação do excesso de espécies reativas de oxigênio, de modo a impedir os danos celulares causados pela *H. vastatrix*. Nas plantas tratadas com ASM, as modificações bioquímicas foram mais evidentes ao nível das enzimas PAL e PPO o que sugere alterações relacionadas ao metabolismo dos compostos fenólicos.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. *Hemileia vastatrix*. Indutor de resistência. Fotossíntese. Atividade enzimática.

ABSTRACT

Alternative products as formulation based on sub-products of the coffee industry for the control of diseases, and the effect of inducing a resistance of the plants against a broad spectrum of pathogens. Thus, the objective of the present work was to verify the effect of the by-product formulation of the coffee and coffee industry added with copper and calcium (Greenforce CuCa) in coffee seedlings, compared to the standard resistance inducer acibenzolar-S- methyl (ASM) in plant physiology and how the antioxidant system of the coffee plant acts to mitigate the damages caused by *H. vastatrix*. (POX), ascorbate peroxidase (APX), superoxide dismutase (SOD), phenylalanine ammonia lyase (PAL) and polyphenol oxidase (PPO), and quantified hydrogen peroxide, lipid peroxidation, phenol and lignin. (A), stomatal conductance (gs), transpiratory taxons (E), intercellular concentration of non-mesophyll CO₂ (CO₂), intercellular CO₂ concentration without mesophyll / current external CO₂ concentration, W/E (A/E) and instantaneous carboxylation efficiency (EiC- A/Ci). It was observed that the foliar application of Greenforce CuCa in coffee seedlings, induced resistance in plants, providing better preservation of the photosynthetic apparatus. The antioxidant system (SOD, POX and APX) was efficient in eliminating excess reactive oxygen species in order to prevent damages caused by *H. vastatrix*. In plants treated with ASM as biochemical modifications were more evident at the level of PAL and PPO enzymes or it is suggested to be related to the metabolism of phenolic compounds.

Keywords: *Coffea arabica*. *Hemileia vastatrix*. Resistance inducer. Photosynthesis. Enzymatic activity.

1 INTRODUÇÃO

A atividade cafeeira tem grande importância econômica para o Brasil. Além de propiciar valorosa receita cambial para o país, tem alta relevância social na geração de empregos e distribuição de renda nos setores de produção e comercialização do café (DURÁN et al., 2017). As cultivares de *Coffea arabica* mais comercializadas em Minas Gerais são Catuaí e Mundo Novo, que são suscetíveis aos agentes causais da ferrugem alaranjada (*Hemileia vastatrix*), do bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e dos nematoides das galhas (*Meloidogyne exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*). Esses parasitas do cafeeiro constituem um grave problema fitossanitário nas lavouras e, algumas vezes, ocorrem em simultâneo, causando severos danos à produção de café (CARVALHO, 2008).

A ferrugem alaranjada é a doença mais importante da cultura do cafeeiro, pois é encontrada na maioria das lavouras de café cultivadas no Brasil (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005). A ferrugem provoca a queda prematura das folhas, morte de ramos e diminuição das taxas de fotossíntese, podendo causar até 50% de perdas na produção do ano seguinte (ZAMBOLIM et al., 1992). A aplicação de fungicidas é a principal medida de controle desta doença. No entanto preocupações com a saúde e o ambiente, problemas de fitotoxidez, efeitos residuais nos alimentos e a evolução da resistência aos fungicidas pelos patógenos começam a desencadear uma inclinação a substituir esses produtos por outras práticas de controle (GADELHA et al., 2003; KUCK; GISI, 2007). A implantação de lavouras com cultivares resistentes seria, assim, a primordial alternativa de diminuir a quantidade de fungicidas aplicados no cafeeiro, se não fosse o surgimento de novas raças fisiológicas do fungo nessas cultivares, complicando, assim, o manejo da doença por meios autenticamente genéticos (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005). Dessa maneira, o uso de indutores de resistência é uma metodologia promissora, para o controle de doenças, sendo considerada como uma estratégia para a redução do uso de defensivos agrícolas tóxicos (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992; TERRY; JOYCE, 2004).

A indução de resistência se embasa na ativação de respostas de defesa da planta, com o intuito de evitar o estabelecimento do fitopatógeno (SENHOR et al., 2009). Por meio do tratamento com indutores, que podem ser bióticos (microorganismos viáveis ou inativados) ou abióticos (acibenzolar-S-metil - ASM ou etileno), dá-se a ativação de genes, proteínas e/ou metabólitos da planta, conduzindo ao fenômeno da indução de resistência (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

O ASM (Bion[®]) é um indutor de resistência comercial, com funcionamento análogo ao ácido salicílico, que interfere nos processos fisiológicos e bioquímicos das plantas, ativando a resistência sistêmica aos agentes patogênicos (RESENDE et al., 2007b). Tem rápida absorção pelos tecidos foliares (FURTADO et al., 2010), atuando na ativação e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PR proteínas) (GAO et al., 2015), regulando rotas do metabolismo secundário, como fitoalexinas ou compostos de defesa estruturais (GLAZEBROOK, 2005). Reações não específicas e a ativação de diversos mecanismos de defesa podem ser incitadas por ASM (IRITI; FAORO, 2003). A aplicação de ASM, em cafeeiros em condições de campo, controlou satisfatoriamente a ferrugem e a cercosporiose (FERNANDES et al., 2013). Genes relacionados à resistência sistêmica adquirida em plantas de cafeeiro suscetíveis à ferrugem submetidas ao tratamento com ASM foram identificados (GUZZO; HARAKAVA; TSAI, 2009). Os genes identificados estão envolvidos em diversos processos como: percepção e transdução de sinal, formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), reação de hipersensibilidade (HR), síntese e transporte de metabólitos antimicrobianos, síntese de PR proteínas e metabolismo de lipídeos.

Produtos naturais, como formulações à base de subprodutos da indústria cafeeira, vêm sendo muito estudados, pois eliciadores presentes nestes produtos parecem ativar o sistema de defesa das plantas (RESENDE et al., 2004; PESSOA et al., 2007). A utilização dessas formulações vem ganhando cada vez mais espaço, no âmbito do controle de doenças de planta, em diversas culturas como: cafeeiro, cacauzeiro, algodoeiro, tomateiro e em eucalipto (COSTA et al., 2014; MEDEIROS et al., 2009; RESENDE et al., 2007a; SILVA et al., 2013). Foi verificado que formulação à base de subproduto da indústria cafeeira induziu a expressão de genes de defesa e proporcionou maior atividade das enzimas peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase em tomateiros (MEDEIROS et al., 2009).

Mais recentemente, utilizando uma abordagem proteômica, em folhas de cafeeiro tratadas com Greenforce CuCa (formulação à base de subproduto da indústria cafeeira adicionada de cobre e cálcio) e ASM, resultou em diferenças na abundância relativa das proteínas, com especial enfoque nas envolvidas no metabolismo energético (POSSA, 2015). Os dois indutores de resistência parecem operar de maneiras diferentes e os resultados sugerem que modificações, ao nível do metabolismo primário, poderão ter um papel importante nas respostas de defesa do cafeeiro à *H. vastatrix*.

Diante do exposto, este trabalho foi desenvolvido com o propósito de avaliar o potencial da formulação Greenforce CuCa (formulação à base de subproduto da indústria cafeeira adicionada de cobre e cálcio), em mudas de cafeeiro inoculadas com *Hemileia*

vastatrix, comparado com o indutor de resistência padrão acibenzolar-S-metil (ASM), na fisiologia da planta e como o sistema antioxidante do cafeeiro atua para mitigar os danos causados por *H. vastatrix*. Para isso, foram avaliados parâmetros relacionados às trocas gasosas: taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (gs), taxa transpiratória (E), concentração intercelular de CO₂ no mesofilo (C_i), concentração intercelular de CO₂ no mesofilo/concentração de CO₂ externa atual, (C_i/C_a), eficiência no uso da água (EUA - A/E) e a eficiência instantânea de carboxilação (E_{iC} - A/C_i). Ademais, foram realizadas análises da atividade das enzimas peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD), fenilalanina amônia-liase (PAL) e polifenol oxidase (PPO) e quantificados o peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica, fenol e lignina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram utilizadas mudas de *Coffea arabica* cultivar Mundo Novo 379/19, adquiridas em um viveiro, no município de Santana da Vargem, MG. Todos os experimentos foram realizados no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brasil. As mudas com quatro pares de folhas foram transferidas para câmara tipo Fitotron (Eletrolab – São Paulo/Brasil), em condições controladas de temperatura (24°C) e fotoperíodo de 12 horas sob luz fluorescente, 30 dias antes do início do experimento, para aclimação às condições ambientais e mantidas durante todo o período experimental. Foram irrigadas periodicamente e adubadas conforme a recomendação de Ribeiro et al. (1999).

2.2 Aplicação dos produtos

Os produtos utilizados foram Greenforce CuCa (formulação à base de subproduto da indústria cafeeira adicionada de cobre e cálcio), produzido pela empresa Agrofiness Tecnologia Agrícola Ltda., na dose de 5 mL L⁻¹ e o indutor de resistência padrão acibenzolar-S-metil - ASM (Bion[®]), produzido pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., na dose 0,2 g L⁻¹. A testemunha foi tratada com água.

As mudas de cafeeiro com quatro pares de folhas foram pulverizadas com os produtos Greenforce CuCa, ASM e água até o ponto de escorrimento, utilizando-se um pulverizador manual.

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

Os esporos de *H. vastatrix* foram conseguidos, a partir de folhas naturalmente infectadas de plantas de cafeeiro, os quais foram coletados, por meio de raspagem das pústulas e mantidos em microtubos.

A inoculação das folhas com *H. vastatrix* ocorreu três dias após a aplicação dos produtos (item 2.2) e foi realizada por pulverização com uma suspensão de urediniósporos na concentração de 1×10^5 mL⁻¹ em ágar-água (0,2% p/v), contendo Tween 20 (0,05% v/v) (SALUSTIANO et al., 2008). Após a inoculação, as mudas foram mantidas em câmara úmida, no escuro, por um período de 24 horas.

2.4 Análises bioquímicas

O material vegetal para a análise bioquímica foi coletado nos tempos: 0, 3, 4, 5, 6 e 7 dias após a aplicação dos tratamentos (daa). Foram coletados o primeiro e o segundo par de folhas completamente expandidas, do ápice para a base, nos tempos de coleta determinados, as quais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Subsequentemente, as amostras foram armazenadas em deepfreezer a -80°C para posterior análise. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, composto por três repetições e seis plantas por parcela para cada tempo de coleta.

2.4.1 Atividade enzimática

Foram utilizados 200 mg de tecido foliar para determinação da atividade das enzimas POX, APX e SOD, as amostras foram maceradas com nitrogênio líquido em almofariz, com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/p), até o alcance de um pó fino. O material obtido foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,8, EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. Em seguida, foram centrifugados a 13.000 g, por 15 minutos, a 4°C ; para as análises enzimáticas, foram utilizados os sobrenadantes (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

A atividade da POX foi estimada, por meio da oxidação do guaiacol, conforme a metodologia de Urbanek, Kuzniakgebarowska e Herka (1991). Foram adicionados 40 μL do extrato enzimático, ajustado para 200 μL de solução tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, contendo guaiacol 7,5 mM e peróxido de hidrogênio 18,75 mM. Após incubação a 30°C , por 2 minutos, a absorbância foi medida a 480nm. O coeficiente de extinção molar de $1,235 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi empregado para calcular a atividade da POX ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$) (CHANCE; MAEHLEY, 1955).

A atividade da APX foi estabelecida pelo método de Nakano e Asada (1981). Para isso, foram adicionados 20 μL do extrato enzimático, ajustado para 200 μL de solução tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, contendo ácido ascórbico 0,5 mM e peróxido de hidrogênio (0,1) mM. A atividade desta enzima foi determinada pelo consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a 290 nm, no período de 1 minuto a 25°C . O coeficiente de extinção molar de $1,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi empregado para calcular a atividade da APX ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$).

A atividade da SOD foi pré-determinada pela competência da enzima em coibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977), em um meio

de incubação composto por tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1 μ M, NBT 75 μ M, riboflavina 2 μ M e 30 μ L extrato enzimático. A mistura foi incubada por 7 minutos, em uma câmara fechada com lâmpada fluorescente de 30 W e, em seguida, a absorbância foi determinada a 560 nm. Uma unidade da SOD equivale à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio. A atividade da SOD foi apresentada em U/min/mg prot.

Para a caracterização da enzima fenilalanina amônia liase (PAL), um grama de tecido vegetal macerado foi homogeneizado com 3 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5, adicionado de 1 mM de PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonilo) e 1% de PVPP. A solução foi centrifugada a 13.000 g, por 25 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi utilizado como fonte enzimática. A atividade da PAL foi determinada de acordo metodologia descrita por Zucker (1965). Foram adicionados 5 μ L do extrato enzimático, ajustado para 200 μ L de solução tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,8, contendo fenilalanina 50 mM. A mistura foi incubada a 37°C, por 20 minutos, a absorbância foi medida a 280nm. O coeficiente de extinção molar de 5000 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ foi utilizado para o cálculo da atividade enzimática da PAL ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot).

Para a obtenção do extrato para definição enzimática da polifenol oxidase (PPO), foi usado 1 g de material foliar macerado homogeneizado em 4 mL tampão fosfato de potássio 30 mM, pH 7,0, EDTA 0,1 mM. O extrato foi centrifugado a 13.000 g, por 25 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi usado para definição da atividade enzimática. A atividade da PPO foi estabelecida conforme metodologia descrita por Kar e Mishra (1976). Foram adicionados 20 μ L do extrato enzimático, ajustado para 200 μ L de solução tampão fosfato de potássio 70 mM pH 7,0, contendo catecol 20 mM. Após incubação a 30°C, por 10 minutos, a absorbância foi medida a 410nm. O coeficiente de extinção molar de 1,235 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ foi utilizado para calcular a atividade da PPO ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot).

A proteína total de cada extrato enzimático foi determinada, segundo a metodologia de Bradford (1976), usando uma curva padrão de albumina sérica bovina.

2.4.2 Estresse oxidativo

Para a quantificação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), foram macerados 200 mg de matéria fresca de folhas em N_2 líquido, homogeneizados em 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1 % e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4 °C. O H_2O_2 foi definido medindo-se a absorbância a 390 nm, em um meio de reação com tampão fosfato de potássio

10 mM, pH 7,0, 500 μ L do extrato e 1 M de iodeto de potássio, a unidade de quantificação do H_2O_2 é dada em μ mol H_2O_2 /mL (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000).

A peroxidação lipídica foi estabelecida, de acordo com metodologia proposta por Buege e Aust (1978). Duzentos miligramas de folhas foram macerados em N_2 líquido, acrescido de PVPP (p/p) e homogeneizado em ácido tricloroacético (TCA) 0,1 % (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos. Alíquotas (250 μ L) do sobrenadante foram acrescentadas ao meio de reação [0,5% (m/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10 % (m/v) de TCA], incubando-se, posteriormente, a 95 °C, por 30 minutos. Para parar a reação, as amostras foram colocadas em gelo e as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O TBA resulta em complexos de cor avermelhada, com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela equação: $[MDA] = (A_{535} - A_{600}) / (\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1). A quantificação da peroxidação lipídica é apresentada em nmol MDA.gMF⁻¹.

2.5 Lignina e compostos fenólicos solúveis

Para estas análises, utilizou-se o material vegetal coletado, aos 7 dias após a aplicação dos tratamentos (daa), que foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em ultrafreezer a -80°C para posterior análise. O material coletado foi macerado em nitrogênio líquido, com auxílio de almofariz e pistilo até obter um pó fino. Em seguida, as amostras foram liofilizadas por 12 horas. Do material liofilizado, uma alíquota de 30mg foi transferida para microtubo de 2mL, homogeneizada com 1,5mL de metanol a 80% e sob agitação por 15 horas, em agitador rotativo, mantida sob proteção da luz à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 12.000g, por 5 minutos. O sobrenadante (extrato metanólico) foi transferido para novo microtubo, com o qual se realizou a determinação de compostos fenólicos solúveis, enquanto o resíduo sólido foi usado para determinação de lignina solúvel, como relatado a seguir.

2.5.1 Lignina solúvel

Foram adicionados ao resíduo sólido 1,5mL de metanol a 80%, homogeneizado e centrifugado, a 12.000 rpm, por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o resíduo

foi seco a 65°C, por 15 horas. O resíduo foi hidratado com 1,5mL de solução de ácido tioglicólico:HCl (Ácido clorídrico) 2M (1:10), com agitação suave e colocado em banho-maria em fervura por 4 horas. A seguir, as amostras foram centrifugadas, a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C; o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,5mL de água ultrapura e novamente centrifugado, a 12.000rpm, por 10 minutos, a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspense em 1,5mL de NaOH (Hidróxido de sódio) 0,5M e mantido, em agitador rotativo, por 15 horas, à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 12.000rpm, por 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante vertido em um novo microtubo, ao qual foram adicionados 200 µL de HCl concentrado. A suspensão obtida foi conservada em câmara fria (4°C), por 4 horas, para possibilitar a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico. A seguir, a mistura foi centrifugada a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspense em 2mL de NaOH 0,5M. A absorbância desta solução foi determinada por espectrofotometria, a 280nm e os valores calculados com base na curva da lignina e expressos em µg de lignina solúvel por miligrama de massa seca ($\mu\text{g (mg MS)}^{-1}$) (adaptado de DOSTER; BOSTOCK, 1988).

2.5.2 Compostos fenólicos solúveis

Alíquotas de 150µL do extrato metanólico foram misturadas a 150µL do reagente de Folin-Ciocalteau 0,25N, por 5 minutos. Ao homogeneizado, foram adicionados mais 150µL de Na₂CO₃ (Carbonato de sódio) 1M, por 10 minutos, em seguida, a mistura foi diluída com 1 mL de água ultrapura e deixada à temperatura ambiente, por uma hora. Os valores de absorbância desta reação foram estabelecidos a 725nm, em espectrofotômetro e calculados com base na curva do catecol. Os compostos fenólicos foram definidos em equivalente µg de catecol por miligrama de massa seca ($\mu\text{g (mg MS)}^{-1}$) (SPANOS; WROLSTAD, 1990).

2.6 Avaliações Fisiológicas

As características fisiológicas de trocas gasosas foram realizadas nos mesmos tempos das avaliações bioquímicas.

As avaliações fisiológicas foram realizadas, utilizando-se o analisador de gás por infravermelho (LI-6400XT Portable Photosynthesis System, LI-COR, Lincoln, USA), em folhas completamente expandidas, no terceiro par de folhas. As características avaliadas foram: taxa fotossintética líquida (A; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), condutância estomática (gs; mol

$\text{H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), taxa transpiratória (E; $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), concentração intercelular de CO_2 no mesofilo (C_i), relação concentração intercelular de CO_2 no mesofilo/concentração de CO_2 externa atual (C_i/C_a), eficiência no uso da água (EUA) calculada, relacionando-a à taxa fotossintética líquida com a taxa transpiratória (A/E), e a eficiência instantânea de carboxilação (E_iC) calculada, a partir da relação entre a taxa fotossintética líquida e a concentração intercelular de CO_2 no mesofilo (A/ C_i). Todas as avaliações foram realizadas entre 8h30min e 11h30min (horário solar) com utilização de fonte artificial de radiação, fotossinteticamente ativa (PAR), em câmara fechada fixada em $1000 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Blue + Red LED LI-6400-02B, LI-COR, Lincoln, USA).

2.7 An\u00e1lise estat\u00edstica

A an\u00e1lise estat\u00edstica foi realizada, utilizando-se o programa Genes, vers\u00e3o 1990.2017.26 (CRUZ, 2013, 2016). Quando as fontes de varia\u00e7\u00e3o foram significativas pelo teste F, as m\u00e9dias foram agrupadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$) (SCOTT; KNOTT, 1974). A fim de facilitar a interpreta\u00e7\u00e3o do conjunto de dados, foi tamb\u00e9m realizada a an\u00e1lise multivariada por an\u00e1lise de componentes principais (ACP).

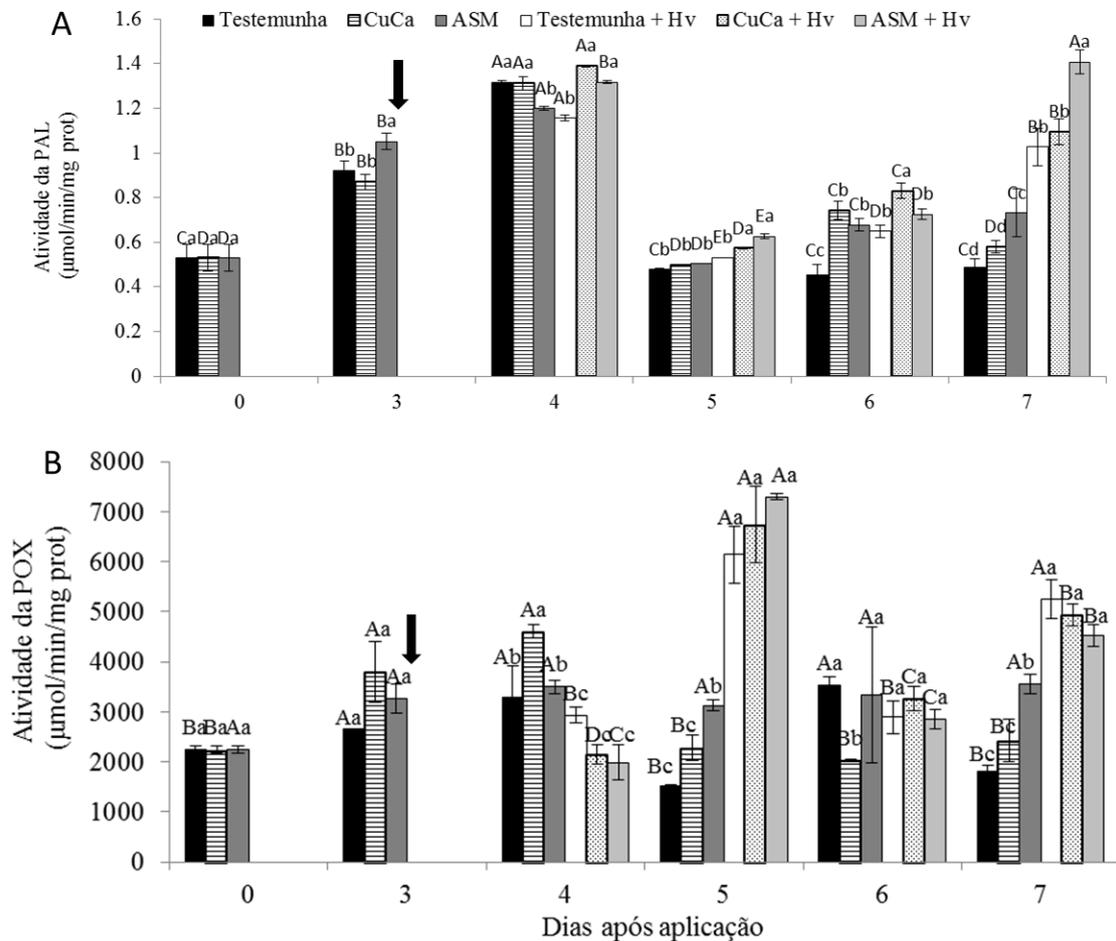
3 RESULTADOS

3.1 Análises bioquímicas

A análise da atividade da enzima PAL, ao longo do tempo, mostrou que as plantas tratadas com os dois IRs e com água apresentaram aumento aos 3 daa com a máxima atividade no 4º daa. No 3º dia após a pulverização com ASM, o valor da atividade enzimática foi maior diferindo, significativamente, de plantas pulverizadas com Greenforce CuCa e com água. Todas as plantas inoculadas, independentemente do tratamento, apresentaram picos de atividade da enzima no tempo 4 e 7 daa. Embora entre os tempos 4 daa e 7 daa tenha havido uma diminuição considerável da atividade da PAL, as plantas inoculadas apresentaram sempre uma atividade maior ou igual aos valores dos respectivos controles. Aos 7 daa, plantas inoculadas tiveram um aumento significativo, em relação às plantas sem inoculação, sendo o maior valor observado para as plantas tratadas com ASM (Figura 1A).

Analisando a atividade da POX, ao longo do tempo, verificou-se que plantas pulverizadas com água apresentaram maior atividade enzimática nos tempos 3, 4 e 6 daa (Figura 1B). Plantas tratadas com Greenforce CuCa tiveram um aumento de atividade entre os 3 e 4 daa, enquanto, para as plantas tratadas com ASM, os valores de atividade não diferiram significativamente ao longo do tempo. Aos 4 daa, houve um aumento na atividade da POX, nas plantas pulverizadas com Greenforce CuCa, que diferiu significativamente dos valores obtidos para todas os outros tratamentos (plantas pulverizadas com água e com ASM sem inoculação e plantas tratadas e inoculadas). Para todas as plantas inoculadas, independente do tratamento, o comportamento foi semelhante, apresentando uma diminuição de atividade da POX, aos 4 daa e um aumento aos 5 daa e 7 daa, que foi significativamente diferente dos respectivos controles (plantas tratadas e não inoculadas) (Figura 1B).

Figura 1 - Atividade das enzimas PAL e POX em mudas de *Coffea arabica* submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) e inoculadas com *Hemileia vastatrix* (Hv).



Legenda: Atividade das enzimas PAL (A) e POX (B) em mudas de *Coffea arabica*. As plantas foram submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) acibenzolar-S-metil (ASM) e Greenforce CuCa (CuCa) e água (Testemunha) e inoculadas. Inoculação com *Hemileia vastatrix* (Hv) ocorreu 3 dias após aplicação dos tratamentos (daa) (seta). Barras de erros representam o erro padrão da média de três blocos. Letras maiúsculas representam análise dos tratamentos, ao longo do tempo, letras minúsculas representam análise dos tratamentos em cada tempo de coleta. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Scott Knott ($P \leq 0,05$).

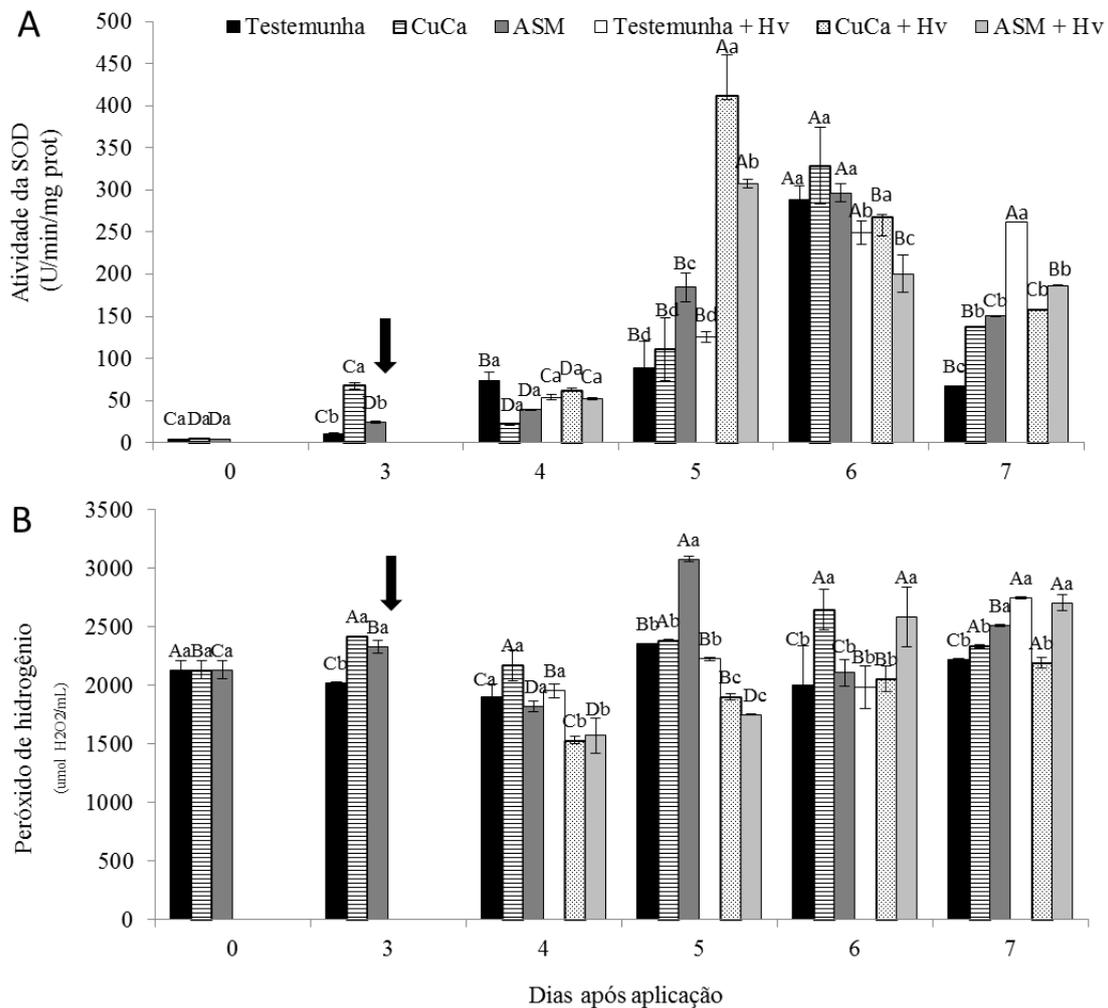
Fonte: Do autor (2018).

Ao analisar a atividade da SOD, ao longo do tempo, verificou-se que plantas tratadas (água e IRs) apresentaram maior atividade dessa enzima aos 6 daa (Figura 2A). Em plantas testemunha e inoculadas, os maiores valores de atividade enzimática foram obtidos aos 6 e 7 daa. Para plantas tratadas com IRs e inoculadas, a resposta foi antecipada, apresentando um pico da SOD aos 5 daa. Foi possível observar pela análise por tempo que plantas pulverizadas com o Greenforce CuCa se diferenciaram significativamente da testemunha e do ASM aos 3 daa. No 5º daa, plantas pulverizadas com IRs e inoculadas apresentaram maior atividade para

a SOD diferindo significativamente dos demais tratamentos. Os valores de atividade de plantas tratadas com Greenforce CuCa inoculadas foram ainda significativamente superiores aos do ASM inoculado, aos 5 daa. Para o tempo 7 daa, a testemunha inoculada foi o tratamento que apresentou maior atividade da SOD, significativamente diferente de todos os outros (Figura 2A).

Na quantificação do peróxido de hidrogênio, mediante a análise feita, ao longo do tempo, verificou-se que plantas sob pulverização com ASM apresentaram um pico de acúmulo de H_2O_2 aos 5 daa, enquanto as plantas tratadas com Greenforce CuCa não variaram ao longo do tempo. Plantas pulverizadas com água e inoculadas tiveram seu pico, no tempo de 7 daa, diferindo significativamente do seu controle (testemunha não inoculada). Por meio da análise feita entre os tempos avaliados, plantas tratadas com Greenforce CuCa e ASM apresentaram um aumento significativo, na formação de H_2O_2 , no 3º daa, em comparação ao tratamento controle. No 4º e 5º daa, plantas pulverizadas com ASM e Greenforce CuCa e inoculadas com *H. vastatrix* apresentaram menor quantidade de H_2O_2 , diferindo dos demais tratamentos. Ao 6º daa, plantas que haviam sido tratadas com Greenforce CuCa (sem inoculação) e plantas pulverizadas com ASM e inoculadas com *H. vastatrix* tiveram um aumento, na formação do peróxido, diferenciando dos demais tratamentos (Figura 2B).

Figura 2 - Atividade da SOD e H₂O₂ em mudas de *Coffea arabica* submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) e inoculadas com *Hemileia vastatrix* (Hv).



Legenda: Atividade da SOD (A) e H₂O₂ (B) em mudas de *Coffea arabica*. As plantas foram submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) acibenzolar-S-metil (ASM) e Greenforce CuCa (CuCa) e água (Testemunha) e inoculadas. Inoculação com *Hemileia vastatrix* (Hv) ocorreu 3 dias após aplicação dos tratamentos (daa) (seta). Barras de erros representam o erro padrão da média de três blocos. Letras maiúsculas representam análise, ao longo do tempo, letras minúsculas representam análise em cada tempo de coleta. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Scott Knott ($P \leq 0,05$).

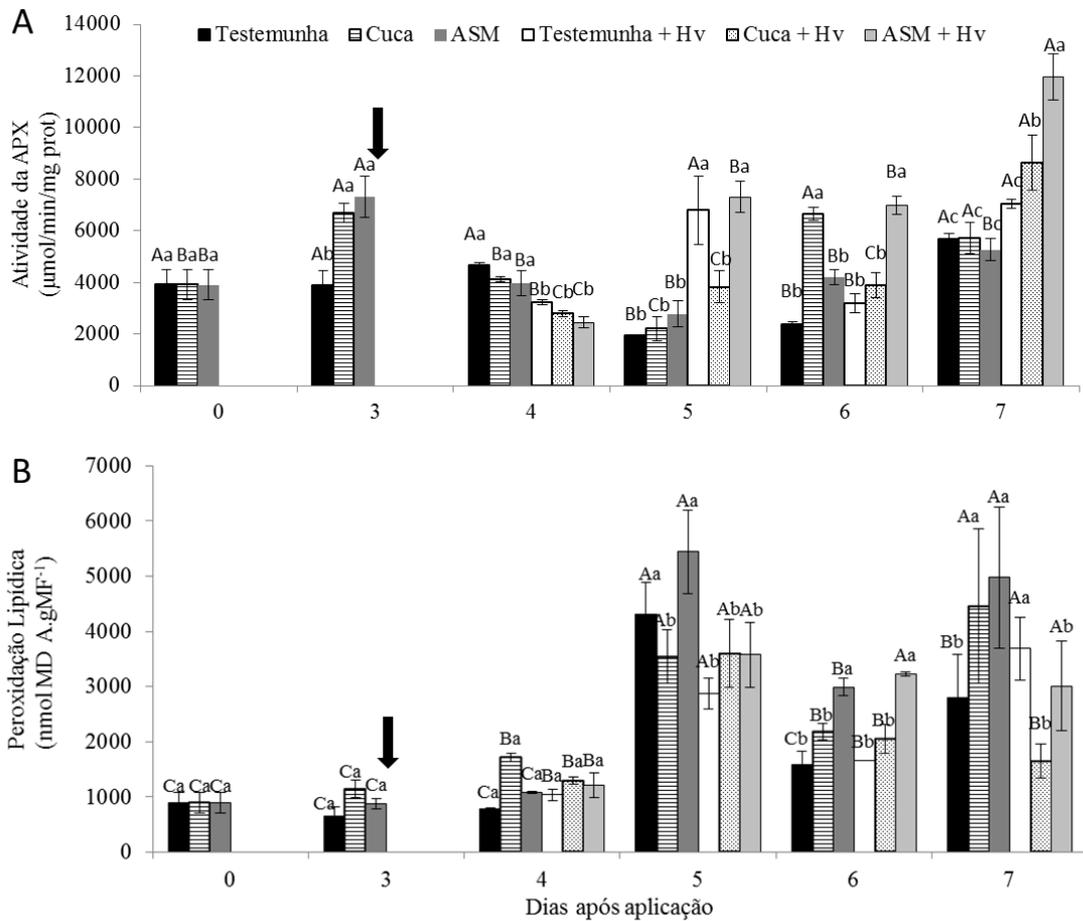
Fonte: Do autor (2018).

Na avaliação da atividade da APX, foi observado que a testemunha (pulverizada com água) apresentou uma atividade similar, ao longo do tempo, com exceção do 5º e 6º daa, tempo em que houve uma diminuição significativa da atividade enzimática (Figura 3A). As plantas tratadas com Greenforce CuCa tiveram um perfil semelhante ao da testemunha, mas o período de diminuição de atividade ocorreu ligeiramente mais cedo, no 4º e 5º daa. Nas plantas tratadas com ASM, os valores de atividade da APX foram constantes, exceto no 3º daa, no qual ocorreu um pico de atividade, também observado para as plantas tratadas com

Greenforce CuCa, que foi significativamente diferente da testemunha. Após a inoculação com *H. vastatrix*, todos os tratamentos apresentaram uma diminuição da atividade enzimática, aos 4 daa e um aumento, aos 5 daa, significativamente diferente dos respectivos controles (plantas não inoculadas). No caso das plantas tratadas com ASM e inoculadas, esse aumento de atividade foi sempre significativamente diferente do controle até aos 7 daa. No tempo de 7 daa, as plantas tratadas com os IRs (ASM e Greenforce CuCa) e inoculadas com *H. vastatrix* apresentaram valores de atividade da APX maiores e significativamente diferentes dos demais tratamentos (Figura 3A).

Da análise dos resultados da peroxidação lipídica, ao longo tempo, verificou-se que as plantas sem inoculação tiveram seus picos aos 5 e 7 daa. Isso foi também observado para as plantas testemunha inoculadas. Para as plantas tratadas com os IRs e inoculadas, os valores de peroxidação foram sempre iguais ou significativamente inferiores aos dos seus controles (Greenforce CuCa e ASM sem inoculação) (Figura 3B).

Figura 3 - Atividade da enzima APX e Peroxidação lipídica em mudas de *Coffea arabica* submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) e inoculadas com *Hemileia vastatrix* (Hv).

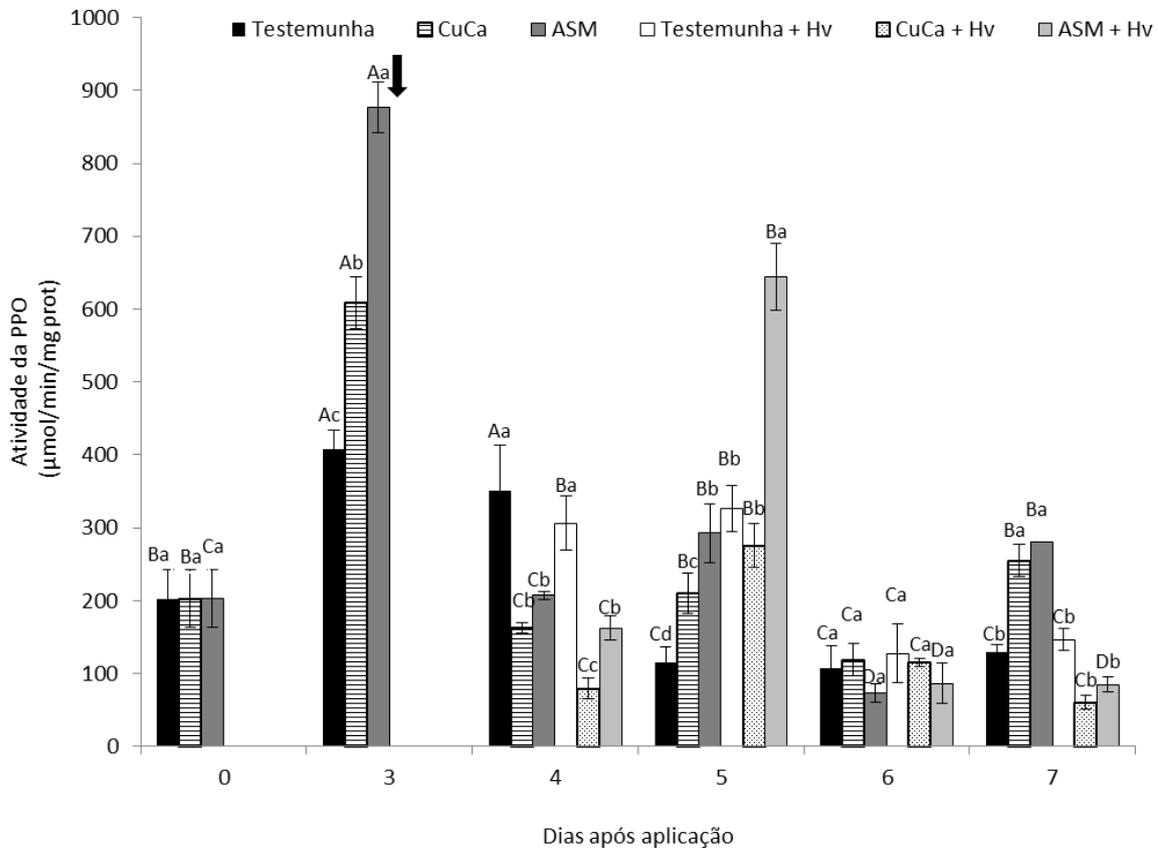


Legenda: Atividade da enzima APX (A) e Peroxidação lipídica (B) em mudas de *Coffea arabica*. As plantas foram submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) acibenzolar-S-metil (ASM) e Greenforce CuCa (CuCa) e água (Testemunha) e inoculadas. Inoculação com *Hemileia vastatrix* (Hv) ocorreu 3 dias após aplicação dos tratamentos (daa) (seta). Barras de erros representam o erro padrão da média de três blocos. Letras maiúsculas representam análise, ao longo do tempo, letras minúsculas representam análise em cada tempo de coleta. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Scott Knott ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018).

Para a enzima PPO, foi detectado um pico de atividade nas plantas pulverizadas com IRs, aos 3daa, que se diferenciou significativamente da testemunha (Figura 4). Todas as plantas inoculadas registraram um pico de atividade, aos 5daa, com valores significativamente diferentes dos respectivos controles (plantas tratadas sem inoculação), o contrário do que foi observado, aos 7daa, em que as plantas pulverizadas com os IRs e inoculadas apresentaram uma diminuição significativa da atividade da PPO relativamente aos seus controles (Figura 4).

Figura 4 - Atividade da enzima PPO em mudas de *Coffea arabica* submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) e inoculadas com *Hemileia vastatrix* (Hv).



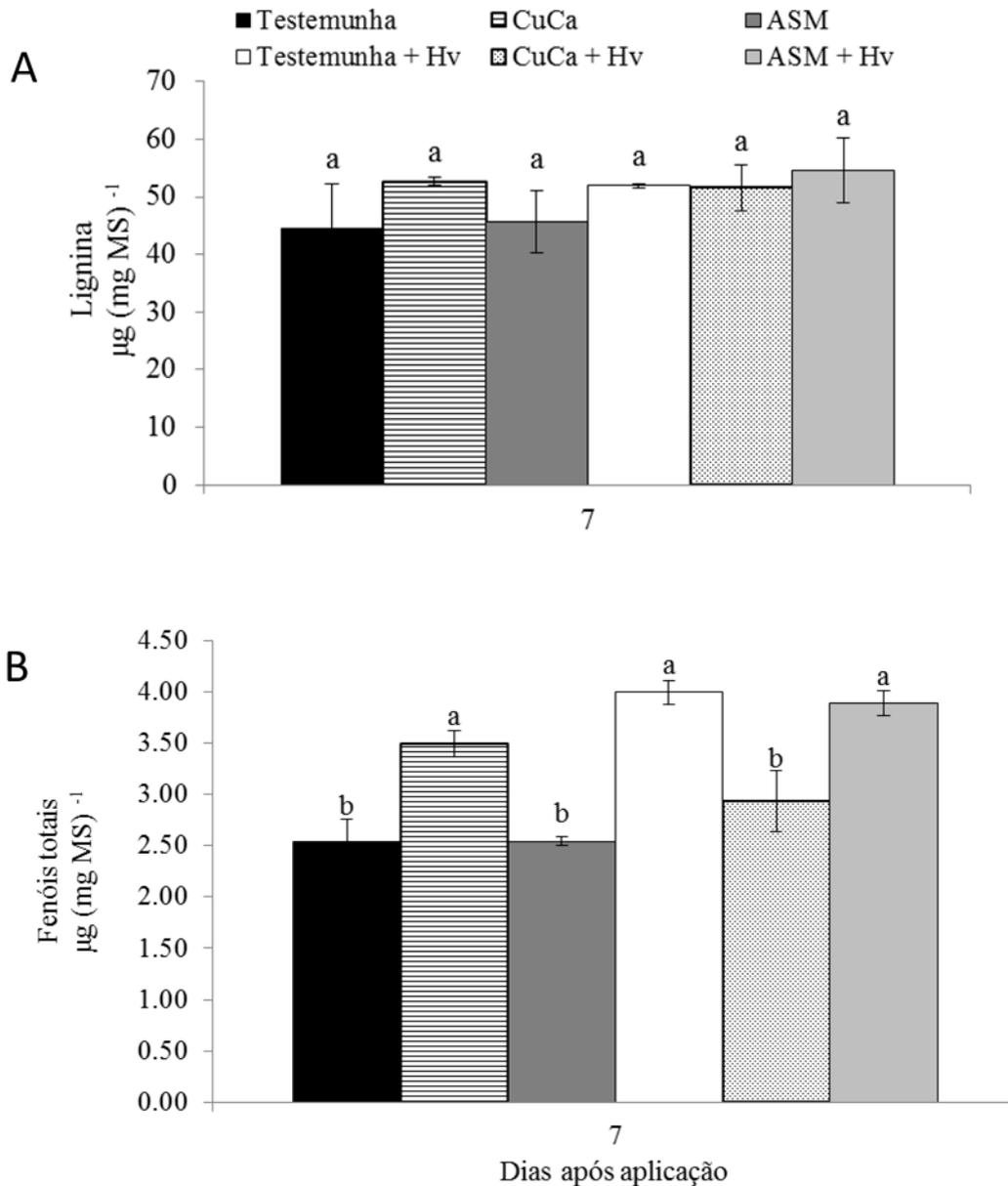
Legenda: Atividade da enzima PPO em mudas de *Coffea arabica*. As plantas foram submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) acibenzolar-S-metil (ASM) e Greenforce CuCa (CuCa) e água (Testemunha) e inoculadas. Inoculação com *Hemileia vastatrix* (Hv), ocorreu 3 dias após aplicação dos tratamentos (daa) (seta). Barras de erros representam o erro padrão da média de três blocos. Letras maiúsculas representam análise, ao longo do tempo, letras minúsculas representam análise em cada tempo de coleta. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Scott Knott ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018).

Para análise de lignina solúvel, não foi observada diferença entre os tratamentos testados (Figura 5A).

Por meio da determinação dos compostos fenólicos solúveis, observou-se diferença significativa entre os tratamentos (Figura 5B). As plantas tratadas com Grenforce CuCa, testemunha inoculada e plantas tratadas com ASM e inoculadas apresentaram teores de fenóis solúveis totais significativamente maiores do que os tratamentos restantes (Figura 5B).

Figura 5 - Lignina e compostos fenólicos solúveis em mudas de *Coffea arabica* submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) e inoculadas com *Hemileia vastatrix* (Hv)



Legenda: Lignina (A) e compostos fenólicos solúveis (B) em mudas de *Coffea arabica* 7 dias após a aplicação dos tratamentos. As plantas foram submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) acibenzolar-S-metil (ASM) e Greenforce CuCa (CuCa) e água (Testemunha) e inoculadas. Inoculação com *Hemileia vastatrix* (Hv) ocorreu 3 dias após aplicação dos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018).

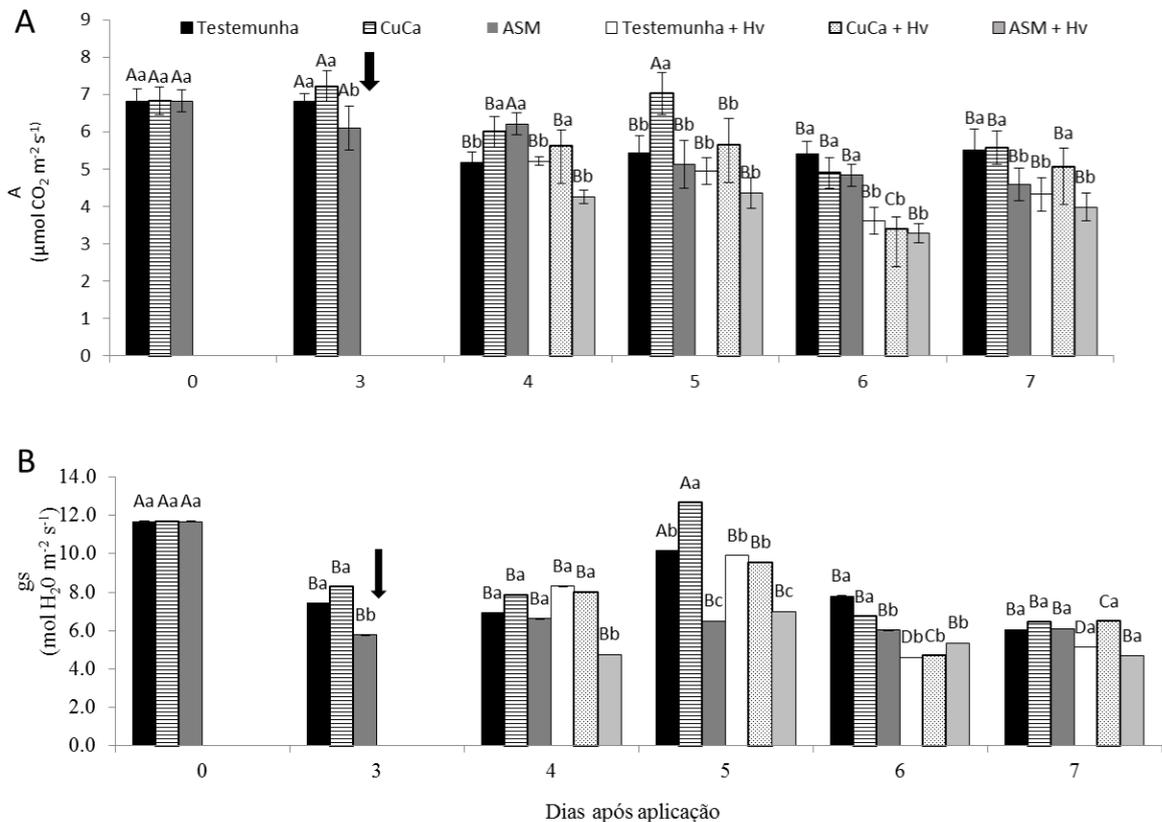
3.2 Avaliação das trocas gasosas

A avaliação da taxa fotossintética líquida (A), ao longo do tempo, mostrou que, para a testemunha, os maiores valores foram aos 0 e 3 daa, tendo apresentado uma redução nos

demais tempos avaliados. Para as plantas pulverizadas com ASM, o perfil da taxa fotossintética, ao longo do tempo, foi semelhante à testemunha, mas a redução foi a partir de 5 daa. Já plantas pulverizadas com Greenforce CuCa do tratamento sem inoculação apresentaram os maiores valores da taxa fotossintética, nos dias 0, 3 e 5 daa. Estes valores foram maiores que os obtidos para as plantas pulverizadas com ASM sem inoculação. As plantas inoculadas apresentaram sempre taxas fotossintéticas menores ou iguais comparativamente com as plantas não inoculadas (Figura 6A).

Para a condutância estomática, foram obtidos resultados semelhantes aos das taxas fotossintéticas (Figura 6B). As plantas pulverizadas com Greenforce CuCa apresentaram os maiores valores de condutância estomática, aos 3 e 5 daa, que foram significativamente diferentes dos obtidos para as plantas pulverizadas com ASM. As plantas inoculadas apresentaram sempre condutâncias estomáticas menores ou iguais às plantas não inoculadas. Tanto para taxa fotossintética quanto para condutância estomática, aos 7 daa, plantas pulverizadas com Greenforce Cuca e inoculadas apresentaram maiores valores dessas variáveis em comparação às plantas pulverizadas com ASM e inoculadas (Figuras 6 A e B).

Figura 6 - Avaliação da taxa fotossintética líquida (A) e condutância estomática (gs) em mudas de *Coffea arabica* submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) e inoculadas com *Hemileia vastatrix* (Hv).



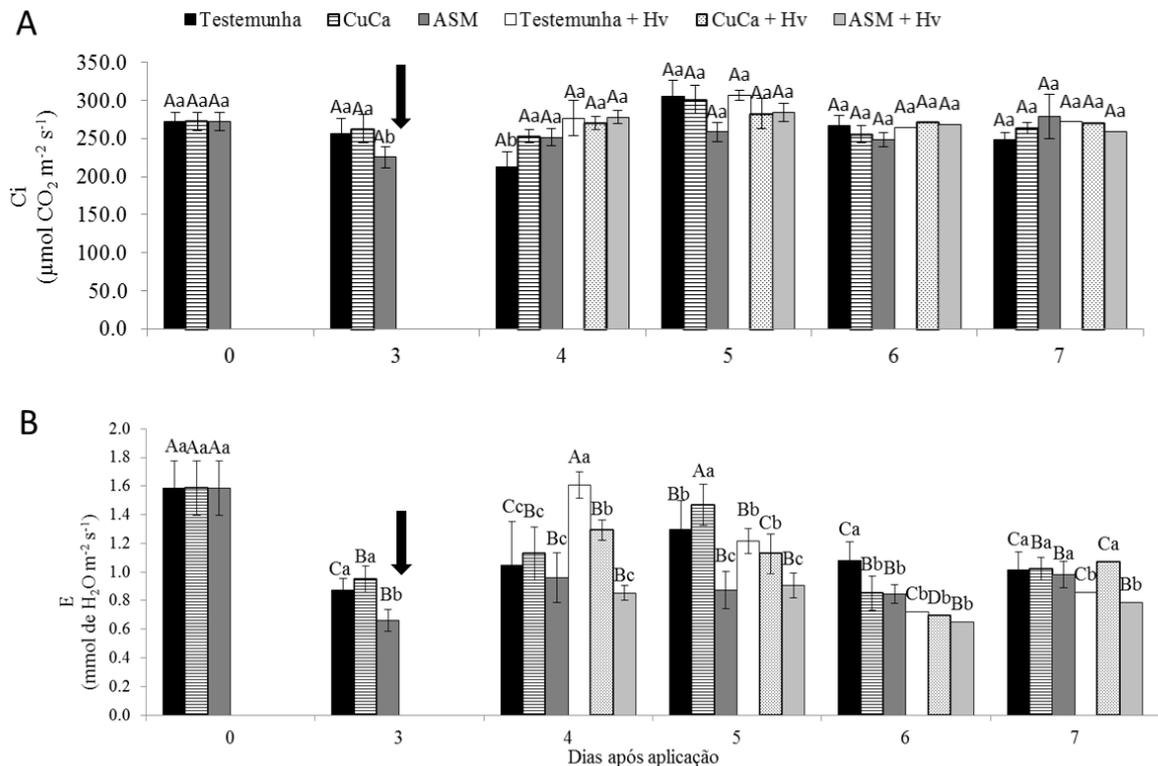
Legenda: Avaliação da taxa fotossintética líquida (A) e condutância estomática (B) em mudas de *Coffea arabica*. As plantas foram submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) acibenzolar-S-metil (ASM) e Greenforce CuCa (CuCa) e água (Testemunha) e inoculadas. Inoculação com *Hemileia vastatrix* (Hv) ocorreu 3 dias após aplicação dos tratamentos (daa) (seta). Barras de erros representam o erro padrão da média de três blocos. Letras maiúsculas representam análise, ao longo do tempo, letras minúsculas representam análise em cada tempo de coleta. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Scott Knott ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018).

A avaliação da concentração intercelular de CO_2 no mesofilo (C_i) mostrou uma grande semelhança entre aos diferentes tratamentos e para todos os tempos. Apenas as plantas pulverizadas com o indutor de resistência ASM, no 3º daa, apresentaram uma diminuição relativamente significativa ao tratamento com Greenforce CuCa e testemunha (Figura 7A).

A taxa transpiratória, aos 3 daa, foi significativamente menor nas plantas pulverizadas com o indutor de resistência ASM do que nas plantas tratadas com Greenforce CuCa e testemunha. As plantas inoculadas apresentaram sempre uma taxa transpiratória menor ou igual às plantas não inoculadas, exceto aos 4 daa. Para este tempo, as plantas inoculadas testemunha e tratadas com Greenforce CuCa obtiveram valores significativamente superiores aos seus controles (plantas não inoculadas) (Figura 7B).

Figura 7 - Avaliação da concentração intercelular de CO₂ no mesofilo (Ci) e taxa transpiratória (E) em mudas de *Coffea arabica* submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) e inoculadas com *Hemileia vastatrix* (Hv).



Legenda: Avaliação da concentração intercelular de CO₂ no mesofilo (A) e taxa transpiratória (B) em mudas de *Coffea arabica*. As plantas foram pulverizadas com indutores de resistência (IR) acibenzolar-S-metil (ASM) e Greenforce CuCa (CuCa) e água (Testemunha) e inoculadas. Inoculação com *Hemileia vastatrix* (Hv) ocorreu 3 dias após aplicação dos tratamentos (daa) (seta). Barras de erros representam o erro padrão da média de três blocos. Letras maiúsculas representam análise, ao longo do tempo, letras minúsculas representam análise em cada tempo de coleta. Linhas seguidas com letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste Scott Knott ($P \leq 0,05$).

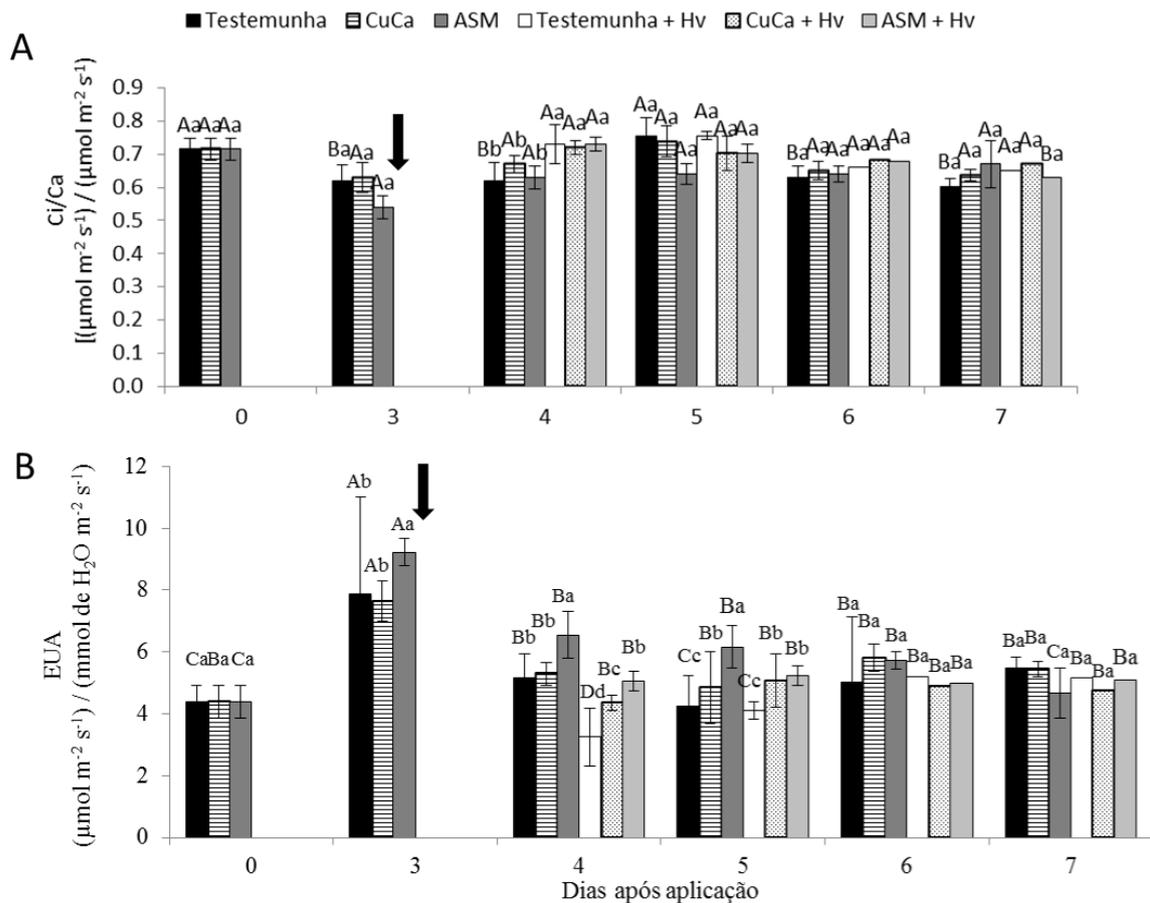
Fonte: Do autor (2018).

Para a relação concentração intercelular de CO₂ no mesofilo/concentração de CO₂ externa atual (Ci/Ca), o perfil foi muito semelhante ao obtido para a taxa transpiratória (Figura 8A). Aos 3 daa, o valor de Ci/Ca foi significativamente menor nas plantas pulverizadas com o indutor de resistência ASM do que nas plantas tratadas com Greenforce CuCa e testemunha. As plantas inoculadas apresentaram sempre uma Ci/Ca menor ou igual às plantas não inoculadas, exceto aos 4 daa. Neste tempo, as plantas inoculadas apresentaram valores de Ci/Ca significativamente maiores dos que os seus controles (plantas não inoculadas) (Figura 8A).

Para eficiência instantânea do uso da água (EUA), foi possível observar que, aos 3daa, as plantas pulverizadas com ASM obtiveram valores significativamente maiores do que as

plantas tratadas com Greenforce CuCa e testemunha. Plantas inoculadas apresentaram valores de EUA menor ou igual que as plantas não inoculadas (Figura 8B).

Figura 8 - Avaliação do Ci/Ca e EUA em mudas de *Coffea arabica* submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) e inoculadas com *Hemileia vastatrix* (Hv).

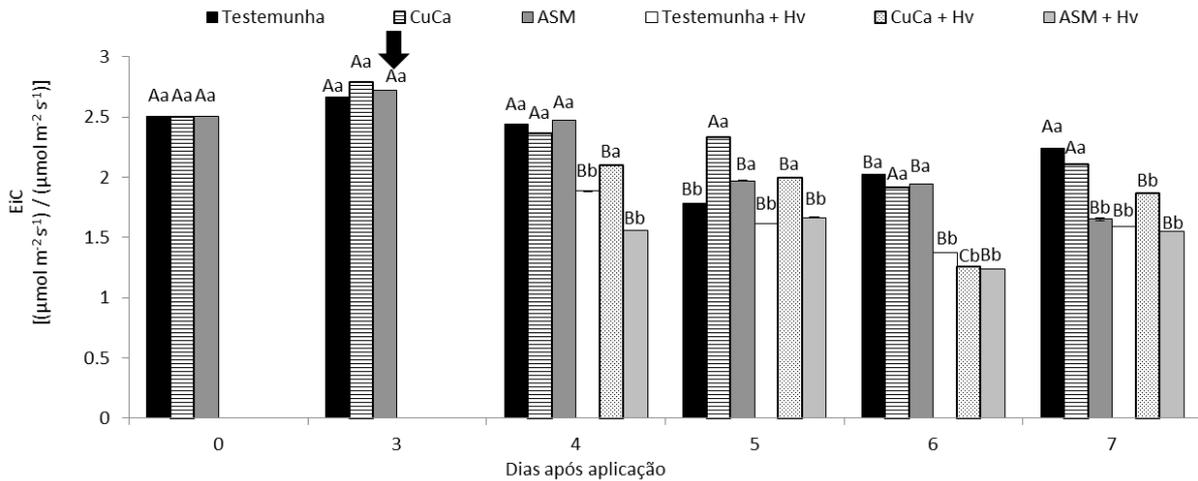


Legenda: Avaliação do Ci/Ca (A) e EUA (B) em mudas de *Coffea arabica*. As plantas foram submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) acibenzolar-S-metil (ASM) e Greenforce CuCa (CuCa) e água (Testemunha) e inoculadas. Inoculação com *Hemileia vastatrix* (Hv) ocorreu 3 dias após aplicação dos tratamentos (daa) (seta). Barras de erros representam o erro padrão da média de três blocos. Letras maiúsculas representam análise, ao longo do tempo, letras minúsculas representam análise em cada tempo de coleta. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Scott Knott ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018).

A eficiência instantânea da carboxilação (EiC) de plantas submetidas à pulverização com Greenforce CuCa e inoculadas, aos 5 daa, apresentaram maiores valores em comparação aos demais tratamentos inoculados. As plantas inoculadas apresentaram sempre uma EiC menor ou igual à das plantas não inoculadas (Figura 9).

Figura 9 - Avaliação do EiC em mudas de *Coffea arabica* submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) e inoculadas com *Hemileia vastatrix* (Hv).



Legenda: Avaliação do EiC em mudas de *Coffea arabica*. As plantas foram submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) acibenzolar-S-metil (ASM) e Greenforce CuCa (CuCa) e água (Testemunha) e inoculadas. Inoculação com *Hemileia vastatrix* (Hv) ocorreu 3 dias após aplicação dos tratamentos (daa) (seta). Barras de erros representam o erro padrão da média de três blocos. Letras maiúsculas representam análise, ao longo do tempo, letras minúsculas representam análise em cada tempo de coleta. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Scott Knott ($P \leq 0,05$).

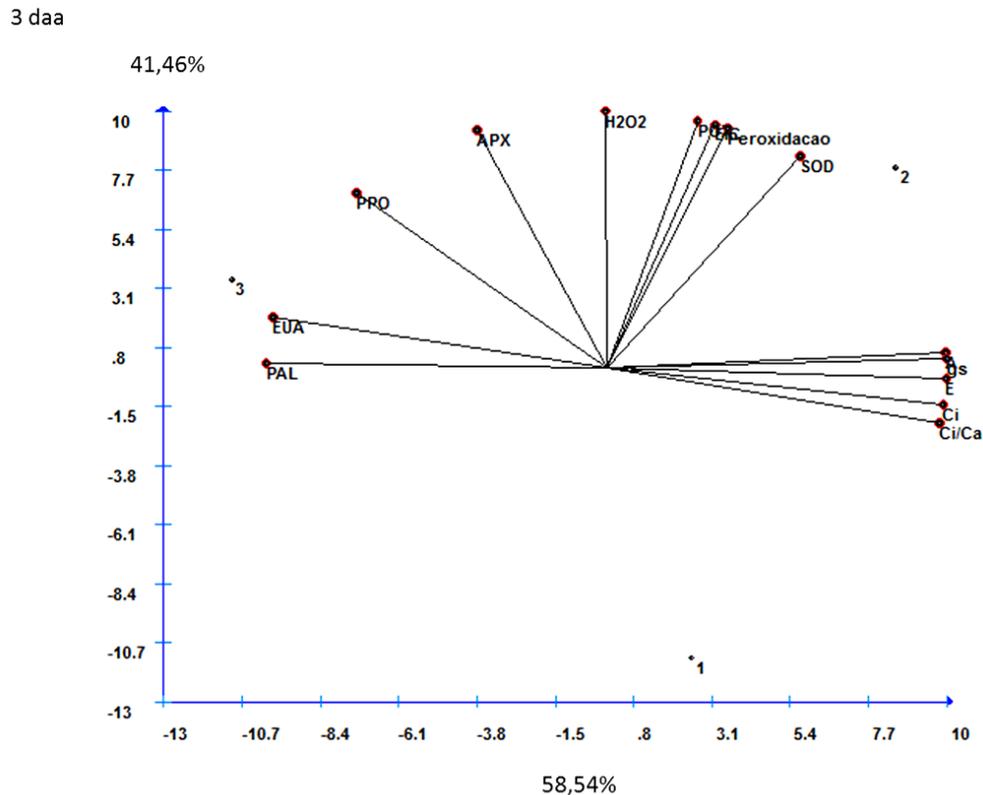
Fonte: Do autor (2018).

3.3 Análises PCA

Com o objetivo de identificar tendências/padrões das variáveis, para cada tratamento, ou seja, identificar as variáveis que mais contribuem, na diferenciação dos tratamentos, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (ACP) com as variáveis fisiológicas e atividades enzimáticas, individualmente, para cada um dos tempos do experimento (3-7 daa). Os gráficos da ACP (Figuras 10, 11 e 12) representam a variação das componentes principais 1 (CP1) e 2 (CP2) que explicam cerca de 80% da variação total encontrada neste estudo. A ACP correspondente, aos 3 daa (Figura 10), mostrou uma clara separação entre os três tratamentos analisados; plantas testemunha, plantas tratadas com Greenforce CuCa ou tratadas com ASM referidas na figura, respectivamente, como 1, 2 e 3. As plantas tratadas com Greenforce CuCa e ASM (2 e 3) separaram-se claramente da testemunha (1) com uma variação de 58,54% (CP1); sendo as variáveis SOD, peroxidação lipídica, APX, POX, H_2O_2 e A/Ci as que mais contribuíram para essa separação. As plantas tratadas com os IRs, Greenforce CuCa e ASM apresentaram uma variação entre si de 41,46% (CP2). No tratamento com Greenforce CuCa (2), as variáveis mais relevantes foram Ci, E, A, gs e SOD,

enquanto, para o tratamento com ASM (3) PAL, EUA e PPO, foram as variáveis que mais se destacaram.

Figura 10 - Análise em componentes principais (ACP) realizada com as variáveis fisiológicas e atividades enzimáticas em mudas de *Coffea arabica* aos 3 dias após aplicação dos tratamentos.



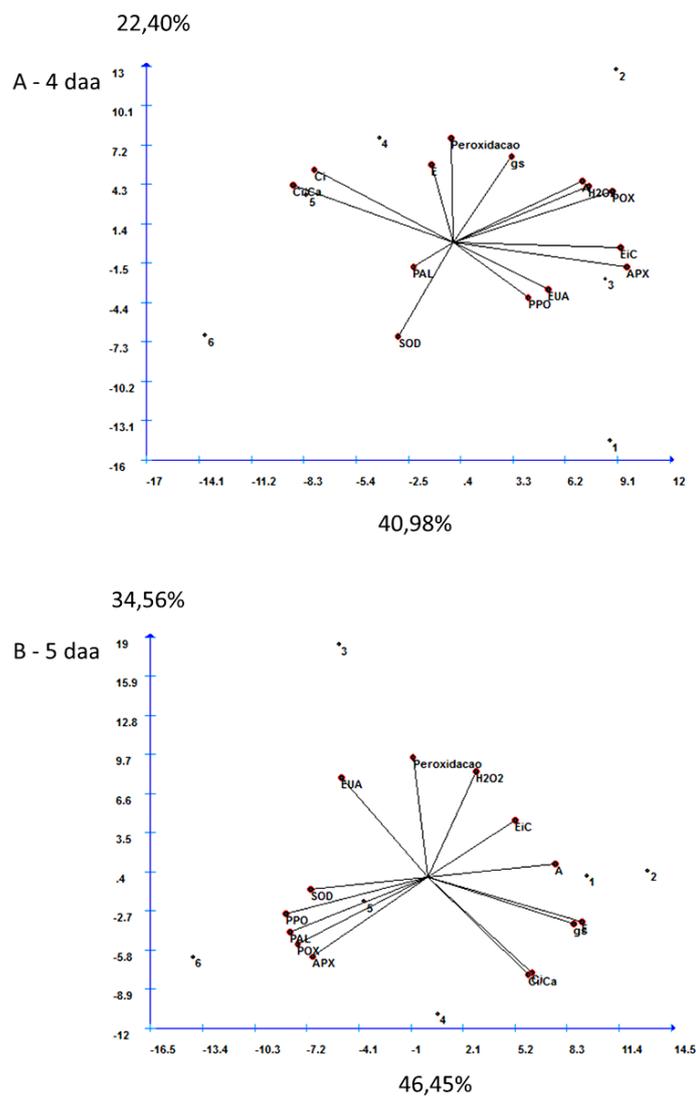
Legenda: Plantas tratadas com: água-testemunha (1), Greenforce CuCa (2), ASM (3). A variância total nos dois primeiros eixos CP1 (58,54%) e CP2 (41,46%) foi de 100%.

Fonte: Do autor (2018).

Ao analisar as ACPs referentes ao período entre 4 e 7 daa (Figuras 11 e 12), verificou-se uma clara separação entre as plantas não inoculadas (1, 2 e 3) e as plantas inoculadas (4, 5 e 6), independentemente do tratamento. As plantas tratadas com os IRs sem inoculação (2 e 3) e com inoculação (5 e 6) apresentaram, no geral, um padrão de distribuição bastante diferente entre si. A diferença entre as amostras foi particularmente evidente aos 5 daa (Figura 11B), com uma variação total de 81%. Ao considerar esse dia de avaliação (5 daa), pode-se inferir que, nas plantas tratadas com IRs sem inoculação (2 e 3), as variáveis que mais contribuíram para dispersão foram as fisiológicas A, gs e E, além das relacionadas ao estresse oxidativo (peróxido e peroxidação lipídica). Nas plantas tratadas com IRs com inoculação (5 e 6), as variáveis bioquímicas (APX, POX, PAL, PPO e SOD) foram as que mais contribuíram para

diferenciar as amostras. Considerando o período entre 4 e 7 daa, de maneira geral, observa-se que as variáveis que mais contribuíram, na diferenciação dos tratamentos com IRs e sem inoculação (2 e 3), foram as fisiológicas, em especial, A, gs e EUA. Já para os tratamentos com IRs e com inoculação (5 e 6), as variáveis mais relevantes foram as bioquímicas, principalmente, APX e SOD.

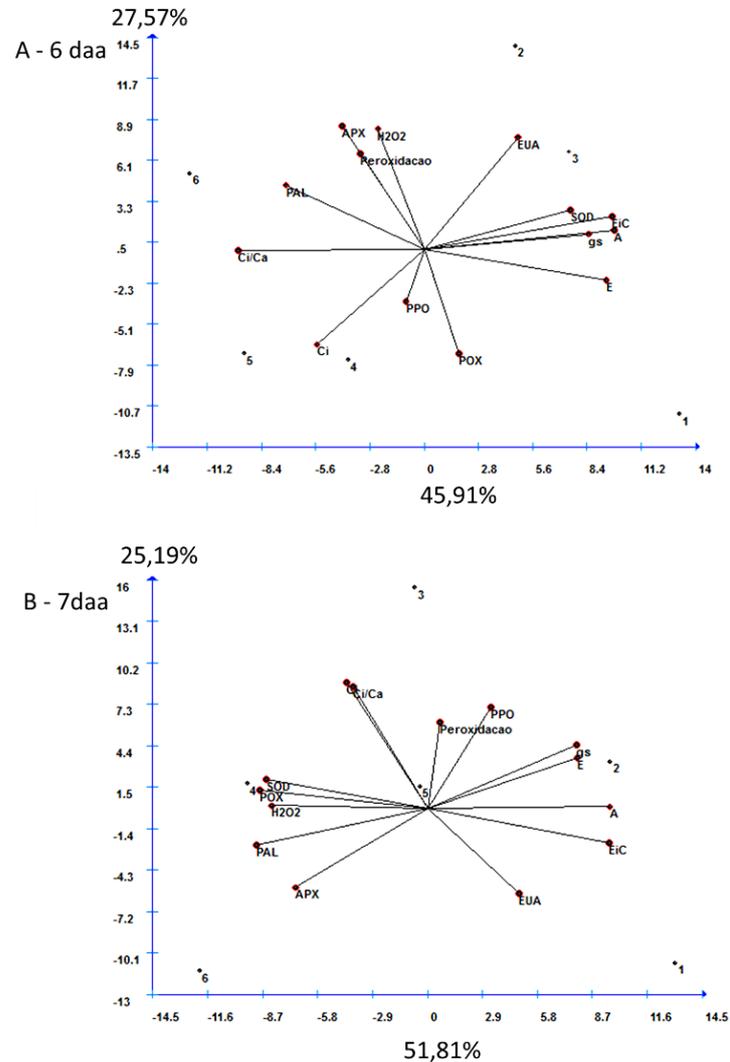
Figura 11 - Análise em componentes principais (ACP) realizada com as variáveis fisiológicas e atividades enzimáticas em mudas de *Coffea arabica* nos tempos 4 e 5 dias após aplicação (daa) dos tratamentos.



Legenda: Tempos 4 (A) e 5 (B) dias após aplicação (daa) dos tratamentos e inoculação com *Hemileia vastatrix* que ocorreu 3 daa dos tratamentos. Plantas tratadas com: água-testemunha (1), Greenforce CuCa (2), ASM (3), testemunha inoculada (4), GreenForce Cuca inoculado (5), ASM inoculado (6). Na ACP dos 4daa, a variância total nos dois primeiros eixos CP1 (40,98%) e CP2 (22,40%) foi de 63,38%. Na ACP dos 5daa, a variância total nos dois primeiros eixos CP1 (46,45%) e CP2 (34,56%) foi de 81,01%.

Fonte: Do autor (2018).

Figura 12 - Análise em componentes principais (ACP) realizada com as variáveis fisiológicas e atividades enzimáticas em mudas de *Coffea arabica* no tempos 6 e 7 dias após aplicação (daa) dos tratamentos.



Legenda: Tempos 6 (A) e 7 (B) dias após aplicação (daa) dos tratamentos e inoculação com *Hemileia vastatrix* que ocorreu 3 daa os tratamentos. Plantas tratadas com: água-testemunha (1), Greenforce CuCa (2), ASM (3), testemunha inoculada (4), GreenForce Cuca inoculado (5), ASM inoculado (6). Na ACP dos 6daa, a variância total nos dois primeiros eixos CP1 (45,91%) e CP2 (27,57%) foi de 73,48%. Na ACP dos 7daa, a variância total nos dois primeiros eixos CP1 (51,81%) e CP2 (25,19%) foi de 77%.

Fonte: Do Autor (2018).

4 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo comparar o efeito do Greenforce CuCa (formulação à base de subproduto da indústria cafeeira adicionada de cobre e cálcio) com o indutor de resistência padrão ASM (acibenzolar-S-metil) na interação cafeeiro-*H. vastatrix*. Em experimento anterior, desenvolvido em condições de campo, foi observado que a pulverização foliar do Greenforce CuCa, em plantas de cafeeiro, proporcionou uma redução na doença de cerca de 29% e uma menor desfolha do que as plantas testemunha. Assim foram avaliados diferentes parâmetros fisiológicos e bioquímicos, de modo a tentar esclarecer algumas das alterações metabólicas (trocas gasosas e metabolismo oxidativo) que ocorrem no cafeeiro durante o processo de infecção pela ferrugem.

De acordo com Oliveira, Varanda e Félix (2016), sempre que a planta é infectada por um patógeno ou pulverizada com indutores acontecem transformações metabólicas, bem como uma interação entre o metabolismo primário e secundário. A infecção por patógenos leva a alterações bioquímicas na planta hospedeira, envolvendo ativação de respostas de defesa (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000).

Neste trabalho, três dias após a aplicação dos IRs (Greenforce CuCa e ASM), foram observadas alterações nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos, que se diferenciaram significativamente da testemunha. A atividade das enzimas PPO, APX, PAL e SOD e o acúmulo de peróxido de hidrogênio foi significativamente maior nas plantas tratadas com os IRs do que na testemunha. Ressalta-se que as plantas tratadas com ASM apresentaram uma maior atividade das enzimas PAL e PPO significativamente diferente do tratamento com Greenforce CuCa. Enquanto a atividade da SOD foi significativamente maior no Greenforce CuCa do que nas plantas tratadas com ASM.

A PAL é a enzima que faz a conversão do aminoácido fenilalanina em ácido transcinâmico, início da via dos ácidos hidroxicinâmicos que estão na origem de vários tipos de compostos nomeadamente flavonoides, lignina, entre outros (TAHERIE; TARIGHI, 2010, 2011). Os nossos resultados mostraram um aumento progressivo nas épocas de coleta para a atividade da PAL nas plantas inoculadas. Silva et al. (2002) observaram aumento da atividade enzimática da PAL nas fases iniciais do processo de infecção em plantas de cafeeiro resistente inoculadas com *H. vastatrix*. De acordo com o descrito na literatura, o pico da atividade da enzima PAL ocorre entre 24 a 48 h, após a indução, podendo ser induzida por outros fatores, como ferimento (SALTVEIT, 2000) ou luz (CHEN; SHIN; LIU, 2002). A PPO tem função de catalisar a oxidação de mono e di-fenóis a *o*-quinonas, na presença de oxigênio. A PPO é uma

enzima ligada ao sistema de proteção antioxidante, o qual possibilita o incremento na síntese de lignina, também promove o fortalecimento da parede celular contra a ação de enzimas líticas produzidas por fungos, atuando como uma linha de defesa suplementária na proteção de plantas a ataques de patógenos e insetos (KVARATSKHELIA; WINKEL; THORNELEY, 1997; THIPYAPONG; HUNT; STEFFENS, 1995). Em tomateiro, o aumento na atividade da PPO foi detectado 24 horas após a pulverização com ASM e Ecolife® e continuando até 12 dias após o tratamento (CAVALCANTI et al., 2006). No presente estudo, plantas tratadas com ASM e Greenforce CuCa apresentaram maior atividade da PPO três dias após aplicação dos produtos. Resultado semelhante foi também obtido, aos 5 daa, para as plantas tratadas com os IRs e inoculadas, em particular, para o ASM. Estes resultados corroboram com Pereira et al. (2008), que verificaram aumento relativo da atividade da enzima PPO, quatro dias após tratamento com ASM e extrato natural de filtrado de micélio de *Rhizopus* sp., o que pode ter levado à redução da severidade da murcha de verticílio.

No trabalho de Silva et al. (2008), foi demonstrado que, numa interação incompatível cafeeiro-*H. vastatrix*, intercorre dois picos da atividade da POX. O primeiro pico acontece, antes ou no início da morte celular, indicando a ligação desta enzima em uma reação de hipersensibilidade (HR). O segundo pico pode estar envolvido com o processo de lignificação do tecido hospedeiro, que ocorreu por volta do quinto ao sétimo dia após a inoculação. Resultados semelhantes foram obtidos, no presente trabalho, em que plantas inoculadas apresentam dois picos desta enzima: 2 dias após inoculação (5 daa) e aos 4 dias após inoculação (7 daa). No entanto, aos 6 daa (3 dias após a inoculação), as plantas tratadas com Greenforce CuCa e inoculadas já apresentavam um aumento significativo em relação à testemunha. No caso da APX, a atividade desta enzima foi significativamente maior nas plantas tratadas com ASM e inoculadas do que no seu controle desde os 5 dias até os 7 daa. Segundo Kuhn e Pascholati (2010), a POX, que tem como substrato o H₂O₂, é uma enzima significativa para as plantas e é relacionada a muitas reações, ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa de patógenos, regulação da alongação de células e outras.

Outra enzima importante no balanço oxidativo da célula é a SOD que converte o ânion superóxido em H₂O₂, que, por sua vez, é considerado uma molécula sinal das mais variadas respostas e estímulos (FORTUNATO et al., 2015). A geração de H₂O₂ é ativada em resposta a muitas situações de estresse, indicando que esta molécula exerce papel significativo, no processo de aclimação e tolerância cruzada, em que uma exposição prévia a um estresse

específico pode levar à indução da tolerância a consecutivas exposições ao mesmo tipo de estresse ou a outro diferente (NEILL et al., 2002). Estímulos ambientais como estresse hídrico (YANG; POOVAIAH, 2002), radiação ultravioleta e ataque de patógenos podem induzir mudanças nos níveis de H_2O_2 , resultando em diversas respostas fisiológicas em plantas (YANG; POOVAIAH, 2002). Plazek e Zur (2003), ao estudar feijão inoculado com *Bipolaris sorokiniana*, relataram maior concentração de H_2O_2 , 24 horas após a inoculação e o acumulado permaneceu por semanas ao redor dos locais da infecção. Em elevadas concentrações, o H_2O_2 é tóxico para planta, por isso, a necessidade das enzimas de limpeza. Lima, Fernandes e Vieira Junior (2011) indicam atuação do peróxido de hidrogênio no mecanismo de defesa da bananeira contra o ataque do fungo *Mycosphaerella fijiensis*. Os nossos resultados mostraram, aos 5 daa, um aumento significativo de atividade da SOD nas plantas tratadas com os IRs e inoculadas, comparativamente com os respectivos controles. Nas plantas que compunham o tratamento da testemunha inoculada, esse aumento também foi observado, mas só aos 7 daa. Concomitantemente, aos 5 daa, a acumulação de H_2O_2 e a peroxidação lipídica foram menores nas plantas tratadas com IRs e inoculadas do que nos respectivos controles. Esta diminuição foi particularmente evidente para as plantas tratadas com Greenforce CuCa e inoculadas, que apresentaram o maior valor de atividade da SOD aos 5 daa.

O desenvolvimento de lipoperóxidos, que decorre da produção de EROs, é empregado para mensurar o nível de estresse oxidativo presente na planta (VERMA; DUBEY, 2003). Os lipoperóxidos são demonstrativos de estresse, visto que as EROs, quando produzidas em excesso, podem ser destrutivas para a célula, ao reagir com os ácidos graxos insaturados dos fosfolipídios das membranas e alterar a sua funcionalidade, promovendo a peroxidação de lipídios, causando alterações das membranas (ZOELLER et al., 2012). A falta de atuação efetiva das enzimas antioxidantes torna a peroxidação lipídica mais notória, sendo esta a crucial manifestação determinada ao dano oxidativo, constantemente indicada como dano às membranas celulares (MANDAL; MITRA; MALLICK, 2008). Segundo Bolwell e Wojtaszek (1997), os eliciadores bióticos podem elevar mais depressa os níveis celulares de EROs, ocasionando a peroxidação lipídica e a indução de mecanismos de defesa pela planta.

O acúmulo de fenóis e lignina tal como já foi referido anteriormente estão relacionados aos componentes estruturais das reações de defesa de plantas a patógenos (HANKS; NELSON, 2016). Não foi encontrado aumento no teor de lignina em plantas tratadas com indutores de resistência nem desafiadas por *H. vastatrix*. Alves et al. (2006), também, não identificaram diferenças entre teores de lignina em cafeeiros inoculados e não

inoculados, tratada com ASM ou extrato de casca de café. Resultado análogo foi alcançado por Costa et al. (2010), em mudas de cacaueteiro inoculadas e não inoculadas com *Moniliophthora perniciosa* e tratadas com ASM. A não identificação de diferença no teor de lignina pode ser pertinente ao tempo de coleta, não sendo suficiente para detectar o incremento destes compostos. Botelho et al. (2009) não observaram diferença no teor de lignina, em mudas de cafeeiro cultivar Catuaí Vermelho IAC 99, inoculadas com *Cercospora coffeicola*, avaliadas 40 dias após inoculação. Ademais, foi avaliada a concentração de lignina total, formada pela junção da lignina constitutiva e induzida (AGRIOS, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2004), impossibilitando detectar o que foi, de fato, incrementado pelos tratamentos testados, uma vez que a concentração de lignina induzida corresponde somente a uma pequena porção da lignina total.

Compostos fenólicos possuem ação fungitóxica e, quando acumulado nas células, podem ser oxidados em o-quinonas (pela PPO), sendo transformados em elementos de defesa do vegetal a fatores externos (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992). Ribeiro Júnior (2008), testando indutores de resistência, em mudas de cafeeiro, observou que os tratamentos com fosfito de K e fosfito de Mn apresentaram aumento no teor de fenóis aos 11 dias após pulverização. Também foi observado que folhas de café com aplicação de ASM, seguido de inoculação com *Cercospora coffeicola*, apresentaram teor de fenóis igual à testemunha com inoculação, enquanto folhas com aplicação de ASM sem inoculação foram pouco superiores ao da testemunha sem inoculação. No presente trabalho, foi observado resultado semelhante, plantas pulverizadas com ASM e a testemunha, ambas inoculadas, apresentaram os maiores teores de fenóis solúveis totais, juntamente com o tratamento Greenforce CuCa, sem inoculação do patógeno.

O papel do metabolismo primário, ao longo das interações planta-patógeno, é sustentar as exigências energéticas celulares para a resposta de defesa da planta (BOLTON, 2009; KANGASJARVI et al., 2012). O balanço energético positivo para a defesa é realizado, por meio da desativação de genes implicados em outras vias, como genes relacionados com a fotossíntese (ROJAS et al., 2014). Ainda que as reações de luz da fotossíntese sejam geradoras de EROs, que eventualmente poderiam atuar como uma resposta de defesa, a regulação negativa da fotossíntese não é clara, não havendo uma evidência experimental de por que este acontecimento. No entanto duas possibilidades têm sido apresentadas: a supressão da fotossíntese ser desencadeada por efetores do patógenos ou essa regulação ser mediada por moléculas de açúcares (ROJAS et al., 2014).

Segundo Holloway, Maclean e Scott (1992), em plantas submetidas à infecção por oídio, a taxa fotossintética decresceu à medida que a doença aumentou, decorrente da perda contínua de elementos dos fotossistemas e clorofila ao longo da infecção. Foi verificada redução no teor de clorofila em plantas de feijão desafiadas por *Erysiphe graminis* (COGHLAN; WALTERNS, 1992) e por *Blumeria graminis* (AKHKHA; CLARKE; DOMINY, 2000), em plantas de aveia submetidas à inoculação com *E. graminis* (SABRI; DOMINY; CLARKE, 1997) e em plantas de tomate inoculados com *Botrytis cinerea* (KUZNIAK; SKLODOWSKA, 2001). Diversos trabalhos têm mostrado que, em plantas sob estresse condicionado por patógenos, ocorre a diminuição na taxa fotossintética (EL OMARI et al., 2001; PSHIBYTKO; ZENEVICH; KABASHNIKOVA, 2006; SADRAS et al., 2000; TANG; ROLEE; SCHOLE, 1996) e na condutância estomática (EL OMARI et al., 2001; SADRAS et al., 2000). As plantas de café Arábica, em condições normais (sem estresse), possuem valores médios de $7,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fotossíntese líquida (A) e $10,8 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de condutância estomática (gs) (CAVATTE et al., 2008; CHAVES et al., 2008). Dados do presente trabalho corroboram com os encontrados na literatura, para o tempo 0 daa (dias após aplicação) no qual foi encontrado valor de $6,8 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para taxa fotossintética líquida e para condutância estomática (gs) de $11,7 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o que leva a crer que as plantas estavam sem nenhum agente estressante no início do experimento. No entanto, aos 3 daa a taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática e a concentração interna de CO_2 (C_i) apresentaram-se significativamente reduzidas nas plantas tratadas com ASM comparativamente com a testemunha ou Greenforce CuCa.

Segundo Alves et al. (2011), a redução da fotossíntese nas folhas de *Eucalyptus urophylla*, em resposta à infecção por *Puccinia psidii*, é por danos na área foliar verde. Contudo, mesmo havendo uma diminuição na abertura estomática, era previsto uma menor acumulação de CO_2 no mesófilo foliar, todavia ocorreu uma elevação considerável nos valores de CO_2 subestomático nas folhas infectadas. Outros trabalhos com trigo e *Bipolaris sorokiniana* (RIOS et al., 2017) e trigo - *Pyricularia oryzae* (AUCIQUE-PÉREZ et al., 2014) apresentaram resultados similares em que houve diminuição da fotossíntese e condutância estomática e elevação do CO_2 subestomático. Conforme os autores citados anteriormente, a diminuição da fotossíntese pode não estar relacionada com o menor influxo de CO_2 no interior das folhas, mas a uma restrição bioquímica na fixação de CO_2 em nível do cloroplasto. Tais modificações em nível bioquímico podem estar associadas à diminuição da atividade da ribulose biscofosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) e às mudanças na capacidade de regeneração desta enzima (AUCIQUE-PÉREZ et al., 2014; DEBONA et al.,

2014). Num estudo prévio, Pôssa (2015) identificaram alterações na abundância relativa de diferentes isoformas da RuBisCO e outras proteínas do complexo fotossintético, em plantas inoculadas com *H. vastatrix* tratadas com ASM ou com Greenforce CuCa. No presente trabalho, a avaliação dos parâmetros de trocas gasosas nas plantas inoculadas (independentemente do tratamento) apresentaram a redução na fotossíntese e na condutância estomática, mas em diferentes tempos após a inoculação. Nas plantas inoculadas e tratadas com ASM, essa diminuição foi observada, a partir dos 4 daa, enquanto, nas plantas tratadas com Greenforce CuCa, a diminuição só foi observada aos 5 daa. No caso das plantas testemunha, essa diminuição foi observada aos 6 e 7 daa. No entanto, para o CO_2 subestomático (C_i), não houve variação ao longo do tempo. Houve uma diminuição tanto da eficiência do uso da água quanto da eficiência da carboxilação, neste período, para ambos os tratamentos inoculados, porém a testemunha desafiada pelo patógeno apresentou uma queda mais acentuada para EUA. Contudo, aos 7 daa, para a maior parte dos parâmetros fisiológicos avaliados, não há diferenças significativas entre as amostras. O efeito transiente sob a fotossíntese e g_s observado, em algumas amostras (ex. plantas tratadas com Greenforce CuCa), parece ter sido superado aos 7 daa.

No trabalho de Resende et al. (2012), foi observada drástica diminuição da transpiração em folhas de sorgo inoculadas por *Colletotrichum sublineolum* como mecanismo para preservar os estômatos fechados e manter a concentração de água no interior das folhas infectadas. Outros trabalhos demonstram reduções simultâneas em transpiração e condutância estomática para outras interações hospedeiro-patógeno (ALVES et al., 2011; BISPO et al., 2016). Em cafeeiros, a condutância estomática tem apresentado uma diminuição linear com a redução do potencial hídrico foliar, indicando forte sensibilidade dos estômatos ao potencial hídrico (PINHEIRO et al., 2005). Geralmente, aumento, nos valores de g_s , leva a elevações na C_i , de forma que a limitação estomática seria o ponto chave da limitação do desempenho fotossintético, dado que quanto maior a abertura estomática mais plena a difusão de CO_2 para a câmara subestomática (SANTOS et al., 2010). Elevados valores de concentração interna de CO_2 relacionados à elevação na condutância estomática sugerem um suplemento, na eficiência instantânea de carboxilação, dado em função da disponibilidade de ATP e NADPH e do substrato da RuBisCO. Assim, a E_iC está relacionada à disponibilidade de CO_2 , no mesofilo foliar, quantidade de luz, temperatura e da atividade enzimática, a fim de que aconteça fotossíntese. Se as concentrações de CO_2 intercelulares são muito reduzidas, o influxo deste elemento nas células do mesofilo é restringido; deste modo, a planta utiliza o

CO₂ oriundo da respiração para manter um grau mínimo de taxa fotossintética, tornando-a limitada (TAIZ; ZEIGER, 2009).

5 CONCLUSÕES

As plantas tratadas com Greenforce CuCa apresentaram uma melhor preservação do aparelho fotossintético, uma vez que os parâmetros fisiológicos, baseados nas trocas-gasosas (A e gs), foram menos afetados, ao longo do processo de infecção, contribuindo de forma favorável para a integridade da planta.

Nas plantas tratadas com Greenforce CuCa, o sistema antioxidante (SOD, POX e APX) foi eficiente, na eliminação do excesso de espécies reativas de oxigênio, podendo impedir danos celulares causados pela *H. vastatrix*.

Nas plantas tratadas com ASM, as modificações bioquímicas foram mais evidentes, ao nível das enzimas PAL e PPO, o que sugere alterações relacionadas ao metabolismo dos compostos fenólicos (ácidos hidroxicinâmicos, flavonoides e quinonas) e lignina na indução de resistência.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT-CAFÉ), por financiar este trabalho.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 922 p.
- AKHKHA, A.; CLARKE, D. D.; DOMINY, P. J. Relative tolerances of wild and cultivated barley to infection by *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (Syn. *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*). II- the effects of infection on photosynthesis and respiration. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 62, n. 6, p. 347-354, June 2000.
- ALVES, A. A. et al. Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. **Acta Physiologiae Plantarum**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 1831–1839, Sept. 2011.
- ALVES, E. et al. Inibição da germinação de conídios de *Cercospora coffeicola* sob diferentes doses do extrato de casca de café e óleo essencial de tomilho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, supl., p. 307, ago. 2006.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biotechnology**, Palo Alto, v. 55, 373-399, 2004.
- AUCIQUE-PÉREZ, C. E. et al. Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence in wheat plants supplied with silicon and infected with *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 104, n. 2, p. 143–149, Feb. 2014.
- BARBIERI JÚNIOR, E. et al. Um novo clorofilômetro para estimar os teores de clorofila em folhas do capim Tifton 85. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 12, p. 2242-2245, dez. 2012.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 116, n. 2, p. 651-658, Feb. 1998.
- BISPO, W. M. S. et al. Photosynthesis impairments precede noticeable changes in leaf water status of mango plants infected by *Ceratocystis fimbriata*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 146, p. 419-432, 2016.
- BOLTON, M. D. Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, n. 5, p. 487–497, May 2009.
- BOLWELL, G. P.; WOJTASZEK, P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence a broad perspective. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 51, n. 6, p. 347-366, Dec. 1997.
- BOTELHO, D. M. S. et al. Aspectos anatômicos e fisiológicos de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) com cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cook.) adubadas com ácido silícico. **Coffee Science**, Lavras, v. 4, n. 2, p. 93-99, jul./dez. 2009.
- BOWLER, C.; FLUHR, R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, n. 6, p. 241-246, June 2000.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, May 1976.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzimology**, New York, v. 52, p. 302-310, 1978.
- CARVALHO, C. H. S. **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, 2008. 334 p.
- 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, n. 4, p. 372-380, jul./ago. 2006.
- CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 81-124.
- CAVATTE, P. C. et al. Physiological responses of two coffee (*Coffea canephora*) genotypes to soil water deficit. In: SANCHEZ, J. M. (Ed.). **Droughts: causes, effects and predictions**. New York: Nova Science Publishers, 2008. p. 306–330.
- CHANCE, B.; MAEHLEY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, New York, v. 2, p. 764-775, 1955.
- CHAVES, A. R. M. et al. Seasonal changes in photoprotective mechanisms of leaves from shaded and unshaded field-grown coffee (*Coffea arabica* L.) trees. **Trees**, Berlin, v. 22, n. 3, p. 351-361, June 2008.
- CHEN, Y.; SHIN, J.; LIU, Z. Effect of light on peroxidase and lignin synthesis in mungbean hypocotyls. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, n. 1, p. 33-39, Jan. 2002.
- COGLAN, S. E.; WALTERS, D. R. Photosynthesis in green-islands on powdery mildew-infected barley leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 40, p. 31-38, 1992.
- COSTA, B. H. G. et al. Suppression of rust and brown eye spot diseases on coffee by phosphites and by-products of coffee and citrus industries. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 162, n. 10, p. 635-642, Oct. 2014.
- COSTA, J. C. B. et al. Indução de resistência em mudas de cacaueteiro contra *Moniliophthora perniciosa* por produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 5, p. 285-294, 2010.
- CRUZ, C. D. GENES - software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 35, n. 3, p. 271-276, jul./set. 2013.
- _____. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 38, n. 4, p. 547-552, out./dez. 2016.

- DEBONA, D. et al. Limitations to photosynthesis in leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 104, n. 1, p. 34–39, Jan. 2014.
- DELIOPOULOS, T.; KETTLEWELL, P. S.; HARE, M. C. Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 10, p. 1059-1075, Oct. 2010.
- DOSTER, M. A.; BOSTOCK, R. M. Quantification of lignin formation in almond bark in response to wounding and infection by *Phytophthora* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, n. 4, p. 473-477, Apr. 1988.
- DURÁN, C. A. A. et al. Café: aspectos gerais e seu aproveitamento para além da bebida. **Revista Virtual Química**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1, p. 107-134, jan./fev. 2017.
- EL OMARI, B. et al. Effect of fungal infection on leaf gas-exchange and chlorophyll fluorescence in *Quercus ilex*. **Annals of Science**, London, v. 58, n. 2, p. 165-174, Feb./Mar. 2001.
- FERNANDES, L. H. F. et al. Acibenzolar-s-methyl in rust and blotch control in field conditions. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 21-29, jan./mar. 2013.
- FORTUNATO, A. A. et al. Changes in the antioxidant system in soybean leaves infected by *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 105, n. 8, p. 1050–1058, Aug. 2015.
- FURTADO, L. M. et al. Utilização de Ecolife® e Acibenzolar – S – metil (ASM) no controle da Antracnose da banana em pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 3, p. 237-239, jul./set. 2010.
- GADELHA, J. C. et al. Defensivos naturais no tratamento pós-colheita do pedúnculo de melão. **Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 34, n. 1, p. 1-10, 2003.
- GAO, Q. et al. Signal regulators of systemic acquired resistance. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 228-231, Apr. 2015.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.
- GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 205-227, 2005.
- GUZZO, S. D.; HAKAKAVA, R.; TSAI, S. M. Identification of coffee genes expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with hemileia vastatrix. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 10, p. 625-638, Oct. 2009.
- HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1102-1156.
- HANKS, T.; NELSON, R. Multiple disease resistance in plantas. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 54, p. 229-252, Aug. 2016.

HOLLOWAY, P. J.; MACLEAN, D. J.; SCOTT, K. J. Electron transport in thylakoids isolated from barley leaves infected by powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* DC. ex Merat f. sp. hordei Marchal. **New Phytologist**, Cambridge, v. 120, n. 1, p. 145-151, Jan. 1992.

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, Mar. 2003.

KANGASJARVI, S. et al. Photosynthesis, photorespiration, and light signaling in defence responses. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 4, p. 619-1636, Feb. 2012.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 57, n. 2, p. 315-319, Feb. 1976.

KUCK, K. H.; GISI, U. FRAC mode of action classification and resistance risk of fungicides. In: KRÄMER, W.; SCHIRMER, U. (Ed. **Modern crop protection compounds**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2007. p. 415-432.

KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus cereus* ou acibenzolar-S-metil: atividade de enzimas, síntese de fenóis e lignina e biomassa. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 2, p. 107-114, jun. 2010.

KUŹNIAK, E.; SKŁODOWSKA, M. Ascorbate, glutathione and related enzymes in chloroplasts of tomato leaves infected by *Botrytis cinerea*. **Plant Science**, Shannon, v. 160, n. 4, p. 723-731, Mar. 2001.

KVARATSKHELIA, M.; WINKEL, C.; THORNELEY, R. N. Purification and characterization of a novel class of peroxidase isoenzyme from tea leaves. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 114, n. 4, p. 1237-1245, Aug. 1997.

LIBERATO, J. R. **Aplicações de técnicas de análise multivariada em fitopatologia**. 1995. 144 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.

LIMA, R. F.; FERNANDES, C. F.; VIEIRA JUNIOR, J. R. Teores de peróxido de hidrogênio em extratos de folhas de bananeira na presença do fungo *Mycosphaerella fijiensis*. **Revista Pesquisa e Criação**, Porto Velho, n. 10, p. 410-418, 2011.

MANDAL S.; MITRA, A.; MALLICK, N. Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between *Solanum lycopersicum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 72, n. 1/3, p. 56-61, Jan./Mar. 2008.

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

MITTLER, R. et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 10, p. 490-498, Oct. 2004.

MONTEIRO, A. C. A.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M. Acibenzolar-S-metil no controle da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro em condições de campo. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 24-32, jan./mar. 2013.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 5, p. 867-880, Aug. 1981.

NEIL, S. J. et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signal molecules in Planting. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1237-1247, May 2002.

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

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

PEREIRA, R. B. et al. Ativação de defesa em cacaueiro contra a murcha-de-verticílio por extratos naturais e acibenzolar-S-metil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 2, p. 171-178, fev. 2008.

PESSOA, W. S. et al. Efeito do tratamento hidrotérmico associado a indutores de resistência no manejo da antracnose da goiaba em pós-colheita. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 20, n. 3, p. 129-135, jul./set. 2007.

PINHEIRO, H. A. et al. Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n. 1, p. 101-108, July 2005.

PLAZEK, A.; ZUR, I. Cold-induced plant resistance to necrotrophic pathogens and antioxidant enzyme activities and cell membrane permeability. **Plant Science**, Limerick, v. 164, n. 6, p. 1019-1028, June 2003.

PÔSSA, K. F. **Abordagem proteômica das folhas da cultivar mundo novo (*Coffea arabica* L.) induzida para a resistência à ferrugem**. 2015. 132 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

PSHIBYTKO, N. L.; ZENEVICH, L. A.; KABASHNIKOVA, L. F. Changes in the Photosynthetic Apparatus during Fusarium Wilt of Tomato. **Russian Journal Plant Physiology**, Moscow, v. 53, n. 1, p. 25-31, Jan. 2006.

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

_____. Novos indutores de resistência contra doenças em cafeeiro, cacaueiro, algodoeiro e tomateiro: perspectivas de utilização. In: RODRIGUES, F. A.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Suprema, 2007a. p. 161-182.

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

_____. Leaf gas exchange and oxidative stress in sorghum plants supplied with silicon and infected by *Colletotrichum sublineolum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, n. 9, p. 892–898, Sept. 2012.

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

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. V. H. Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: **5ª aproximação**. Viçosa: CFSEMG, 1999. 359 p.

RIOS, J. A. et al. Changes in leaf gas exchange, chlorophyll a fluorescence and antioxidant metabolism within wheat leaves infected by *Bipolaris sorokiniana*. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 170, n. 2, p. 189–203, Mar. 2017.

ROJAS, C. M. et al. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 17, Feb. 2014.

SABRI, N.; DOMINY, N. J.; CLARKE, D. D. The relative tolerances of wild and cultivated oats to infection by *Erysiphe graminis* f.sp. *avenae*: II the effects of infection on photosynthesis and respiration. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 50, n. 5, p. 321-335, May 1997.

SADRAS, V. O. et al. Effect of *verticillium dahliae* on photosynthesis, leaf expansion and senescence of field-grown sunflower. **Annals of Botanic**, London, v. 86, n. 5, p. 1007-1015, Nov. 2000.

SALTVEIT, M. E. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 61-69, Dec. 2000.

SALUSTIANO, M. et al. Variability in ten populations of *Hemileia vastatrix* for germination and germinative tube length under four temperatures. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1651-1656, set./out. 2008.

SANTOS, C. M. et al. Photosynthetic measurements in lettuce submitted to different agroindustrial residue composting. **Applied Research & Agrotecnologia**, Guarapuava, v. 3, n. 3, p. 95-102, dez. 2010.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Arlington, v. 30, n. 3, p. 507–512, Sept. 1974.

SENHOR, R. F. et al. Eficiência de diferentes fungicidas no controle de *Alternaria alternata*, agente causal da podridão pós-colheita em frutos de meloeiro. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 4, p. 14-19, out./dez. 2009.

SILVA, A. C. et al. Coffee-leaf extract and phosphites on the curative control of powdery mildew in eucalyptus mini-stumps. **Forest Pathology**, Hamburg, v. 43, n. 4, p. 297-305, Aug. 2013.

SILVA, M. C. et al. Hypersensitive cell death and post-haustorial defense responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, n. 4, p. 169-183, Apr. 2002.

_____. Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 72, n. 1/3, p. 29-38, Jan./Mar. 2008.

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

TAHERI, P.; TARIGHI, S. A survey on basal resistance and riboflavin-induced defense responses of sugar beet against *Rhizoctonia solani*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 168, n. 10, p. 1114-1122, July 2011.

_____. Riboflavin induces resistance in rice against *Rhizoctonia solani* via jasmonate-mediated priming of phenylpropanoid pathway. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 167, n. 3, p. 201-208, Feb. 2010.

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

_____. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.

TANG, X.; ROLEE, S. A.; SCHOLES, S. D. The effect of *Albugo candida* (white blister rust) on the photosynthetic and carbohydrate metabolism of leaves of *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 19, n. 8, p. 967-975, Aug. 1996.

TERRY, L. A.; JOYCE, D. C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 1-13, Apr. 2004.

THIPYAPONG, P.; HUNT, M. D.; STEFFENS, J. C. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. **Phytochemistry**, New York, v. 40, n. 3, p. 673-676, Oct. 1995.

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

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, Limerick, v. 151, n. 1, p. 59-66, Feb. 2000.

VERMA, S.; DUBEY, R. S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, Limerick, v. 164, n. 4, p. 645-655, Apr. 2003.

YANG, R. W. P.; POOVAIAH, B. W. Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium calmodulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 99, n. 6, p. 4097-4102, Mar. 2002.

ZAMBOLIM, L. et al. Influência da produção do cafeeiro sobre o desenvolvimento da ferrugem (*Hemileia vastatrix*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 32-35, 1992.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Doenças do cafeeiro. In: KIMATI, A. et al. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 165-180.

ZOELLER, M. et al. Lipid profiling of the Arabidopsis hypersensitive response reveals specific lipid peroxidation and fragmentation processes: biogenesis of pimelic and azelaic acid. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 160, n. 1, p. 365-378, Sept. 2012.

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

**ARTIGO 3 - MANEJO DA FERRUGEM EM MUDAS DE CAFEIEIRO POR
INDUTORES DE RESISTÊNCIA: FISIOLOGIA E METABOLISMO SECUNDÁRIO**

**Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2003) e formatado de acordo com o
Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações.**

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito de formulação à base de subproduto da indústria cafeeira adicionada de cobre e cálcio (Greenforce CuCa), em mudas de cafeeiro, inoculadas com *Hemileia vastatrix*, comparado com o indutor de resistência padrão acibenzolar-S-metil (ASM) em casa de vegetação. Também, objetivou-se verificar o efeito desses produtos na fisiologia da planta (trocas gasosas e índice de clorofila) e no conteúdo de metabólitos secundários (trigonelina, cafeína e ácido clorogênico) aos 7 e 14 dias após a inoculação. Os parâmetros fisiológicos estudados foram: taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (gs), taxa transpiratória (E), concentração intercelular de CO₂ no mesófilo (Ci), concentração intercelular de CO₂ no mesófilo/concentração de CO₂ externa atual, (Ci/Ca), eficiência no uso da água (EUA - A/E) e índice de clorofila a, b e total. O produto Greenforce CuCa induziu resistência em plantas, controlando a ferrugem do cafeeiro em torno de 41% enquanto o acibenzolar-S-metil (ASM) proporcionou 23% de controle comparado à testemunha. Aplicação de indutores de resistência e inoculação com *H. vastatrix* alterou as variáveis analisadas, indicando a influência dos tratamentos testados tanto dos parâmetros fisiológicos, quanto do teor de compostos do metabolismo secundário.

Palavras-chave: *Hemileia vastatrix*. *Coffea arabica* cv Mundo Novo, clorofila, trocas gasosas, metabólitos secundários. Greenforce CuCa, acibenzolar-S-metil (ASM).

ABSTRACT

The objective of the present study was to study the resistance inducing effect of a formulation based on products of the coffee industry supplemented with copper and calcium (Greenforce CuCa) on coffee seedlings inoculated with *Hemileia vastatrix*, compared to the standard acibenzolar-S resistance inducer (ASM). The effect of these products on plant physiology (leaf gas-exchange and chlorophyll determination) and secondary metabolites (trigonellin, caffeine and chlorogenic acid) content were also performed at 7 and 14 days after inoculation. The physiological parameters studied were: photosynthesis rate (A), stomatal conductance (gs), transpiratory rate (E), intercellular CO₂ concentration in mesophyll (Ci), intercellular CO₂ concentration in the mesophyll / current external CO₂ concentration, water use efficiency (EUA - A / E), and total chlorophyll index, a and b. The Greenforce CuCa product induced plant resistance, controlling a coffee rust around 41% while acibenzolar-S-methyl (ASM) provided 23% control compared to control. The application of the resistance inducers and the inoculation with *H. vastatrix* modify the variables analyzed indicating the influence of the treatments on both the physiological parameters and the content of the secondary metabolites.

Keywords: *Hemileia vastatrix*. Gas exchange. *Coffea arabica* cv Mundo Novo. Chlorophyll. Greenforce CuCa. Acibenzolar-S-methyl (ASM).

1 INTRODUÇÃO

A atividade cafeeira tem importância econômica para o Brasil, uma vez que propicia grande receita cambial para o país, além da importância social na geração de empregos e distribuição de renda nos setores de produção e comercialização do café (TEIXEIRA et al., 2004). No ano de 2015, o café representou 7% das exportações do agronegócio brasileiro, com uma receita total de US\$ 6,66 bilhões, o que é equivalente a 37,1 milhões de sacas de 60 kg cada (REIS, 2015). As cultivares mais comercializadas em Minas Gerais são, basicamente, do grupo Catuaí e Mundo Novo, que são suscetíveis à ferrugem (*Hemileia vastatrix*), ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e aos nematoides das galhas (*Meloidogyne exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*) (CARVALHO, 2008). Esses parasitas do cafeeiro representam grandes problemas fitossanitários da lavoura de café e, muitas vezes, ocorrem em simultâneo nas áreas de produção. No manejo da lavoura, uma das dificuldades diz respeito ao controle eficaz das doenças e pragas que atacam e causam severos danos à produção dos cafeeiros.

A ferrugem, cujo agente etiológico é denominado *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome, ocorre em todas as regiões cafeeiras do Brasil. As perdas na produção podem chegar até 50%, em condições climáticas favoráveis para epidemias severas (POZZA et al., 2008; ZAMBOLIM et al., 2002). No Brasil, a aplicação foliar de fungicidas cúpricos e sistêmicos, para reduzir a intensidade da ferrugem, é utilizada majoritariamente (MATIELLO et al., 2002; ZAMBOLIM et al., 2002). No entanto a utilização continuada desses produtos pode ocasionar o aparecimento de populações do fungo resistentes a fungicidas.

Compostos naturais ou sintéticos estimuladores de respostas de defesa são denominados indutores de resistência (DANIEL; GUEST, 2006). Estes não devem apresentar toxidez direta sobre patógenos, atuando como moléculas sinais, que, após o reconhecimento pelas células vegetais, induzem a expressão de genes relacionados à resposta de resistência, impedindo ou dificultando o estabelecimento e/ou desenvolvimento do patógeno e, conseqüentemente, reduzindo os sintomas da doença (DURRANT; DONG, 2004).

O acibenzolar-S-metil (ASM) é um indutor de resistência abiótico, análogo ao ácido salicílico, disponível comercialmente (Syngenta Proteção de Cultivos Ltda). Tem como função ativar os mecanismos de defesa de plantas, atribuindo proteção sistêmica contra uma grande quantidade de patógenos, nas mais variadas culturas, dentre elas, em cafeeiro (GUZZO; HAKAKAVA; TSAI, 2009; MARCHI; BORGES; RESENDE, 2002; PATRÍCIO et al., 2008).

Os extratos vegetais são uma alternativa de manejo de doenças em plantas que mostram promissora competência para induzir resistência (CARVALHO; CUNHA; SILVA, 2012). Produtos naturais, como formulações à base de subprodutos da indústria cafeeira, têm sido motivo de diversas pesquisas, pois eliciadores presentes nestas fazem com que ocorram respostas de defesa nas plantas, gerando alterações bioquímicas e ativando o sistema de defesa (PESSOA et al., 2007; RESENDE et al., 2004).

Diante do exposto, o trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar a eficácia do Greenforce CuCa, comparado ao indutor de resistência padrão acibenzolar-S-metil (ASM), no controle da ferrugem em mudas de cafeeiro em casa de vegetação. Adicionalmente, verificaram-se efeitos desses produtos no potencial fotossintético (trocas gasosas e clorofila a, b e total) e no teor de metabólitos secundários (trigonelina, cafeína e ácido clorogênico) em fases mais avançadas do processo de colonização do fungo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

As mudas de cafeeiro utilizadas no experimento foram da cultivar Mundo Novo IAC 379/19, com quatro pares de folhas, adquiridas em um viveiro no município de Santana da Vargem - MG. As mudas foram mantidas em casa-de-vegetação, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brasil, durante todo o período experimental. Foram irrigadas periodicamente e adubadas conforme a recomendação de Ribeiro, Guimarães e Alvarez (1999).

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

Os esporos de *H. vastatrix* foram obtidos, por meio de folhas de plantas de cafeeiro naturalmente infectadas, os quais foram coletados, por meio de raspagem das pústulas e acondicionados em microtubos. Para a inoculação das folhas, foi preparada uma suspensão na concentração de 1×10^5 urediniósporos mL^{-1} de ágar-água (0,2% p/v) contendo Tween 20 (0,05% v/v) (SALUSTIANO et al., 2008). Após a inoculação (por pulverização das folhas), as mudas foram mantidas, em câmara úmida, no escuro, por um período de 24 horas.

2.3 Aplicação dos produtos e avaliação de doença

Os produtos utilizados foram: Greenforce CuCa (formulação à base de subproduto da indústria cafeeira adicionada de cobre e cálcio), produzido pela empresa Agrofittness Tecnologia Agrícola Ltda., na dose de 5 mL L^{-1} e o indutor de resistência padrão acibenzolar-S-metil - ASM (Bion[®]), produzido pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., na dose $0,2 \text{ g L}^{-1}$. A testemunha foi tratada com água.

As mudas de cafeeiro com quatro pares de folhas foram submetidas à pulverização com os produtos Greenforce CuCa, ASM e água até o ponto de escorrimento, utilizando-se um pulverizador manual. A inoculação com *H. vastatrix* ocorreu três dias após a aplicação dos produtos.

A partir do surgimento dos primeiros sintomas da doença, aproximadamente, 30 dias após a inoculação, iniciaram-se as avaliações de severidade da doença realizada, de acordo com escala diagramática, proposta por Cunha et al. (2001). Foram realizadas seis avaliações

com intervalo de sete dias. Posteriormente, efetuou-se o cálculo da área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD), conforme fórmula proposta por Shaner e Finney (1977).

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, com três repetições e seis tratamentos (Greenforce CuCa, ASM e água, com e sem inoculação), sendo cada parcela experimental composta por três plantas. Os dados de AACPSD foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa Sisvar (FERREIRA, 2011) e, quando significativo pelo teste F, foi realizado o teste Tukey ($P \leq 0,05$).

2.4 Avaliações Fisiológicas

As características fisiológicas foram avaliadas nos tempos 0, 7 e 14 dias após inoculação.

2.4.1 Trocas gasosas

As avaliações fisiológicas foram realizadas com a utilização do analisador de gás por infravermelho (LI-6400XT Portable Photosynthesis System, LI-COR, Lincoln, USA), em folhas completamente expandidas, no terceiro par de folhas. As características analisadas foram: taxa fotossintética líquida (A; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), condutância estomática (gs; $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), taxa transpiratória (E; $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), concentração intercelular de CO_2 no mesofilo (C_i), relação concentração intercelular de CO_2 no mesofilo/concentração de CO_2 externa atual (C_i/C_a), eficiência no uso da água (EUA) calculada, relacionando-a à taxa fotossintética líquida com a taxa transpiratória (A/E) e a eficiência instantânea de carboxilação (EiC), calculada a partir da relação entre a taxa fotossintética líquida e a concentração intercelular de CO_2 no mesofilo (A/ C_i). Todas as avaliações foram realizadas entre 8h30min e 11h30min (horário solar), com utilização de fonte artificial de radiação fotossinteticamente ativa (PAR), em câmara fechada fixada em $1000 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Blue + Red LED LI-6400-02B, LI-COR, Lincoln, USA).

2.4.2 Índice de clorofila a, b e total

Os índices de clorofilas a, b e total foram determinados mediante a utilização do medidor portátil de clorofila ClorofiLOG (Falker Automação Agrícola, Brasil). O índice

obtido pelo ClorofiLOG é equivalente à absorvância das clorofilas e equipara à determinação indireta dos teores relativos das clorofilas a, b e total (BARBIERI JÚNIOR et al., 2012). A medição foi realizada no terceiro par de folhas.

2.5 Obtenção e preparo do material vegetal para análises em CLAE

O material vegetal, para a análise dos metabólitos, foi coletado nos tempos de 7 e 14 dias após a inoculação (dai). Foram coletados o primeiro e o segundo par de folhas totalmente expandidas, do ápice para a base, em cada tempo de coleta, as quais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C para posterior análise. As amostras foram secas em estufa a 60° C, por três dias, para posteriores análises.

2.5.1 Determinação do perfil de metabólitos secundários por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os metabólitos secundários ácido clorogênico, cafeína e trigonelina foram quantificados nas amostras, utilizando como padrões de identificação o ácido clorogênico, cafeína e trigonelina, todos adquiridos da Sigma-Aldrich. Os solventes utilizados para cromatografia foram metanol (Merck) e ácido acético (J.T. Baker), ambos de grau analítico para CLAE (espectroscópico) e água ultra pura, obtida de um sistema Milli-Q (VITORINO et al., 2001).

2.5.2 Preparação das amostras e padrões

As análises foram realizadas no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do café (INCT-Café) da Universidade Federal de Lavras – UFLA. O cromatógrafo utilizado foi UFLC Shimadzu, equipado com bomba quaternária de alta pressão modelo LC-20AT, degaseificador modelo DGU-20A5, interface modelo CBM-20A, injetor automático modelo SIL-20A-HT e detector UV-Vis (SPD-20A). A coluna empregada foi uma Supelcosil LC-C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) conectada a uma pré-coluna Supelcosil C18 (4,6 x 12,5 mm, 5 µm).

A quantificação das amostras foi realizada por padronização externa. As curvas analíticas foram construídas pela injeção em triplicata das soluções-padrão, obtidas por diluições da solução-estoque, contendo 1mg mL⁻¹ de cada padrão diluído em água. A faixa de

construção da curva analítica foi de 0,001 a 0,8 mg mL⁻¹. As curvas analíticas foram obtidas por regressão linear, considerando o coeficiente de correlação mínimo de 0,997.

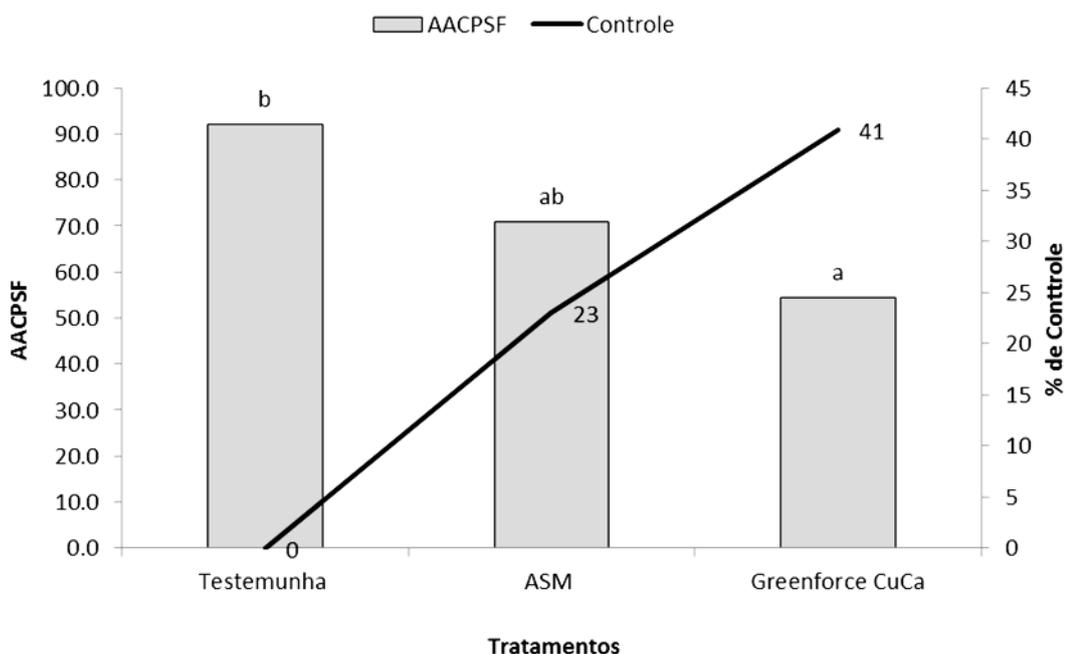
As amostras foram preparadas, a partir de 0,5 g de folhas moídas e a extração realizada com 50 mL de água destilada em ebulição e mantidas em banho-maria, por um período de 3 min. O extrato foi filtrado primeiro em papel de filtro comum e, em seguida, utilizando uma membrana de 0,45 µm. As amostras foram analisadas no cromatógrafo, de acordo com Malta e Chagas (2009). A identidade dos analitos contidos nos extratos foi confirmada pelo tempo de retenção e pelos picos da amostra comparados aos dos padrões (VITORINO et al., 2001).

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação dos indutores de resistência no controle da ferrugem em mudas de café

O tratamento Greenforce CuCa apresentou redução significativa da severidade da ferrugem em mudas de café, diferindo-se estatisticamente de plantas controle, pulverizadas com água (testemunha). A aplicação do indutor ASM proporcionou controle de, aproximadamente, 23% da ferrugem do café, ao passo que o Greenforce CuCa resultou em maior controle da doença, 41%, quando comparado à testemunha (Figura 1).

Figura 1 - Efeito do Greenforce CuCa e do acibenzolar-S-metil (ASM) na área abaixo da curva de progresso da severidade da ferrugem (AACPSF) em mudas de café e porcentagem de controle da doença em relação ao controle pulverizado com água.

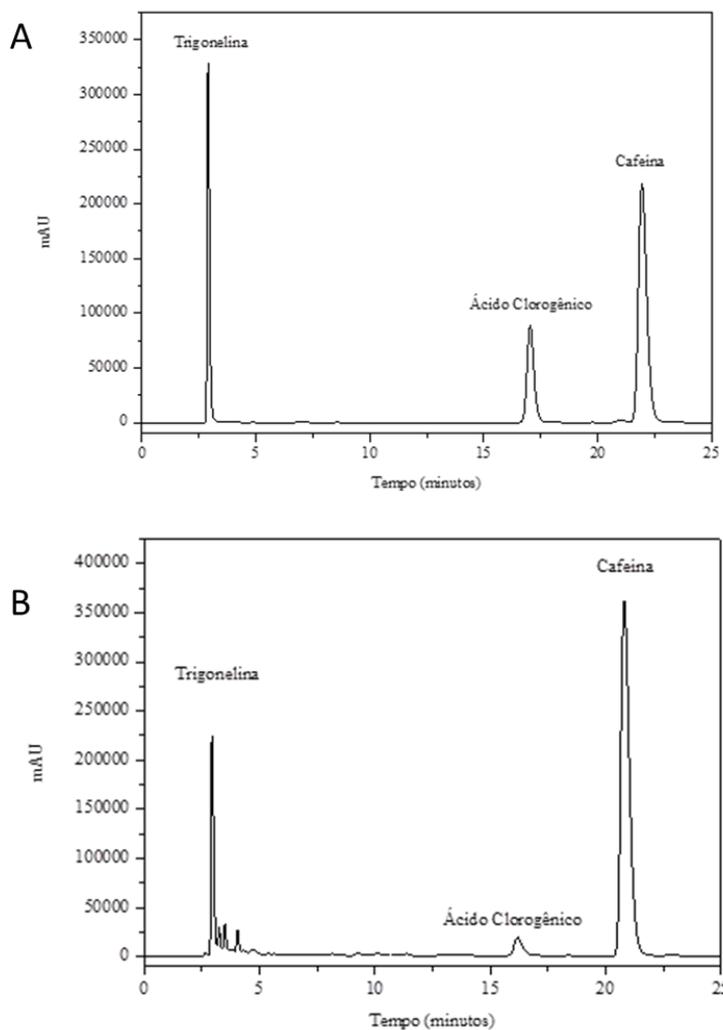


Legenda: Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

Fonte: Do autor (2018).

A partir da utilização dos padrões de trigonelina, ácido clorogênico e cafeína e seus respectivos tempos de retenção 2,96, 16,44 e 21,08 minutos, foi possível identificar e quantificar esses metabólitos secundários, nos tempos 7 e 14 dias após a inoculação (dai), nos tratamentos avaliados (Figura 2).

Figura 2 - Cromatogramas dos padrões de trigonelina, ácido clorogênico e cafeína e do perfil do extrato de plantas inoculadas com *Hemileia vastatrix*.



Legenda: Cromatograma dos padrões de trigonelina, ácido clorogênico e cafeína obtido por CLAE (A). Cromatograma obtido por CLAE do perfil do extrato de plantas inoculadas com *Hemileia vastatrix* (Testemunha inoculada) de acordo com metodologia proposta por Malta e Chagas (2009) (B).

Fonte: Do autor (2018).

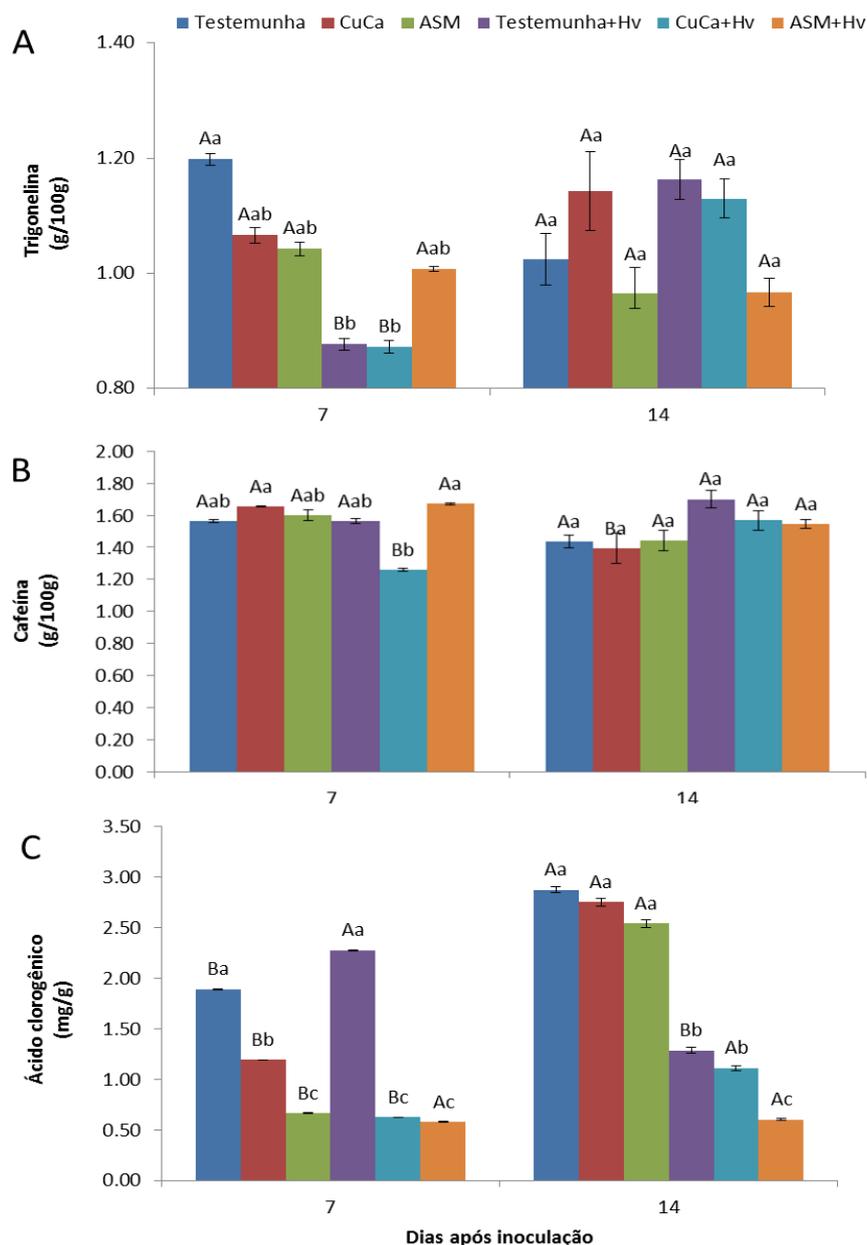
Observou-se aumento no teor de trigonelina nos tratamentos Testemunha e Greenforce Cuca, ambos inoculados aos 14 dai (Figura 3A).

Para avaliação do teor de cafeína, observou-se que, ao longo do tempo de coleta, o tratamento Greenforce CuCa inoculado apresentou aumento no teor desse alcaloide aos 14 dai (Figura 3B).

Para a avaliação do teor ácido clorogênico, aos 7 dias, após a aplicação dos produtos, observou-se que os IRs (com e sem inoculação) apresentaram menor acúmulo desse

metabólito comparado a testemunhas. Todos os tratamentos aumentaram ou mantiveram o teor de ácido clorogênico, ao longo do tempo, com exceção da testemunha inoculada (Figura 3C).

Figura 3 - Avaliação da trigonelina (A), cafeína (B) e ácido clorogênico (C) em mudas de *Coffea arabica*.



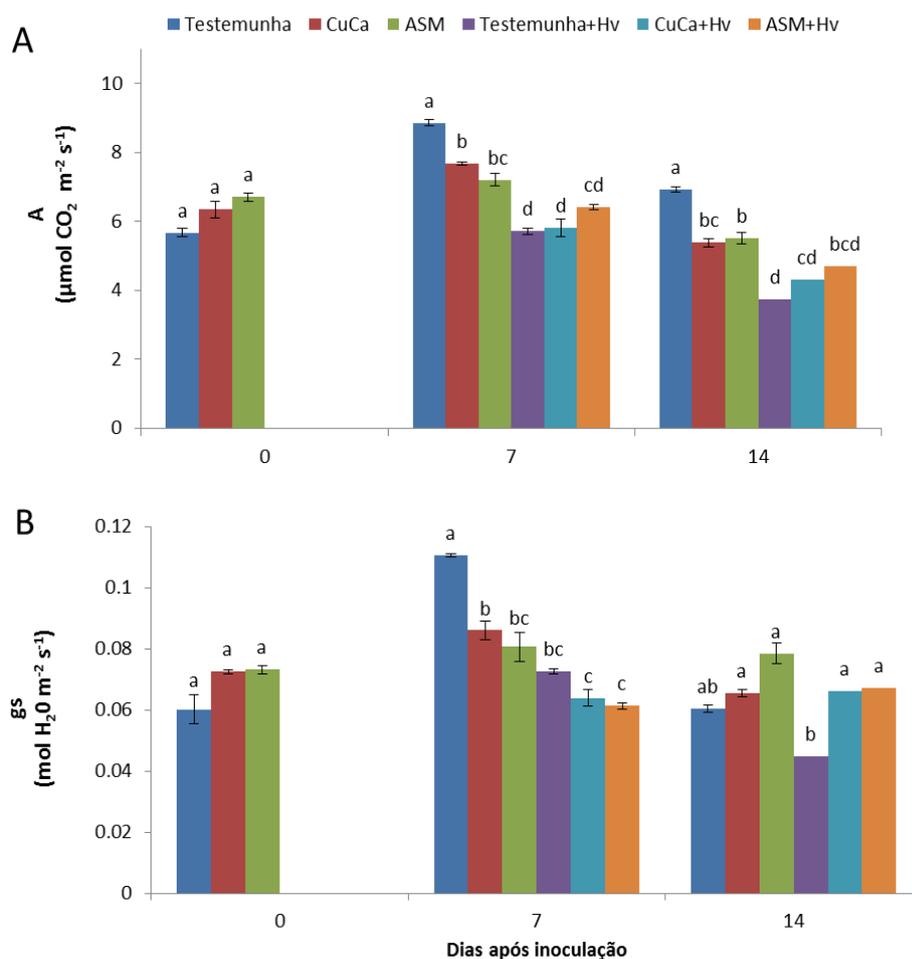
Legenda: Avaliação da trigonelina (A), cafeína (B) e ácido clorogênico (C) em mudas de *Coffea arabica*. As plantas foram submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) acibenzolar-S-metil (ASM) e Greenforce CuCa (CuCa) e água (Testemunha) e inoculadas. Inoculação com *Hemileia vastatrix* (Hv) ocorreu 3 dias após aplicação dos tratamentos. Barras de erros representam o erro padrão da média de três blocos. Letras maiúsculas representam análise, ao longo do tempo, letras minúsculas representam análise em cada tempo de coleta. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018).

Na avaliação da taxa fotossintética, plantas inoculadas apresentaram menor taxa fotossintética, aos 7 e 14 dai, comparado às plantas sem inoculação (Figura 4A).

Para a condutância estomática, verificou-se que, aos 7 dias, todos os tratamentos tiveram uma redução dessa variável em comparação à testemunha absoluta. Os IRs não se alteraram com a inoculação aos 14 dai (Figura 4B).

Figura 4 - Avaliação da taxa fotossintética líquida e condutância estomática em mudas de *Coffea arabica*.



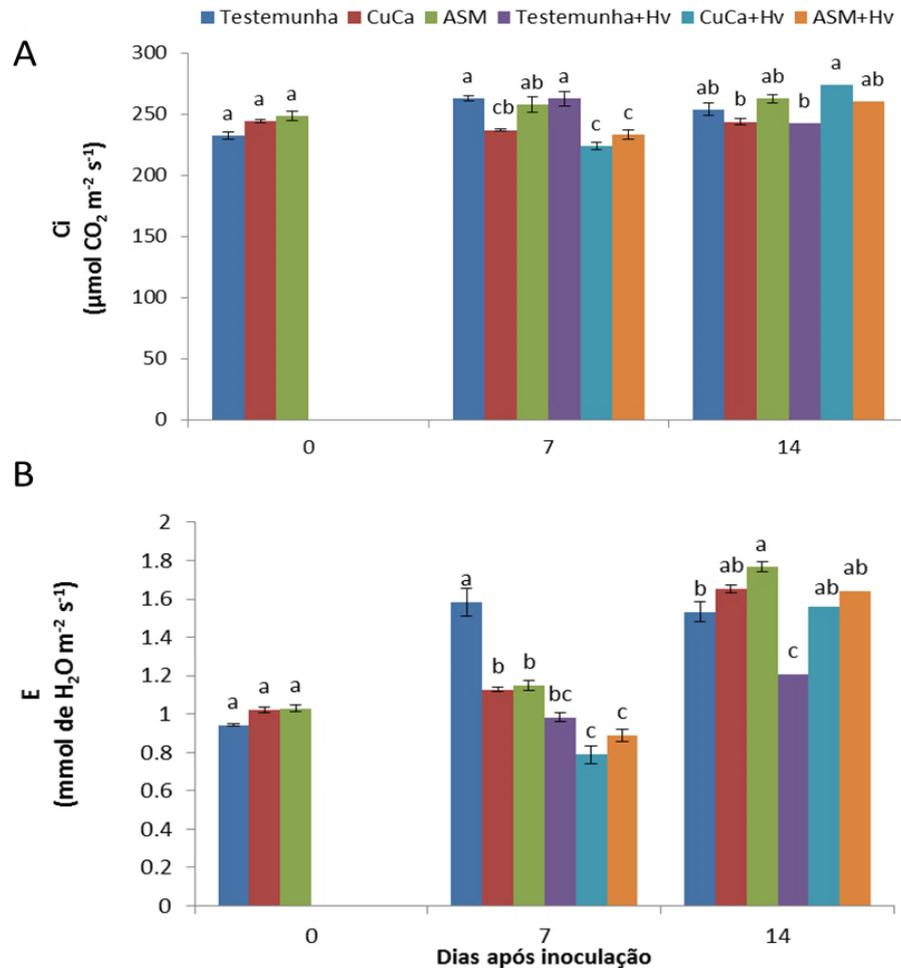
Legenda: Avaliação da taxa fotossintética líquida (A) e condutância estomática (B) em mudas de *Coffea arabica*. As plantas foram submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) acibenzolar-S-metil (ASM) e Greenforce CuCa (CuCa) e água (Testemunha) e inoculadas. Inoculação com *Hemileia vastatrix* (Hv) ocorreu 3 dias após aplicação dos tratamentos. Barras de erros representam o erro padrão da média de três blocos. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018).

Para avaliação da concentração intercelular de CO_2 no mesofilo, aos 14 dai entre os tratamentos inoculados, a testemunha foi o que apresentou menor valor para essa variável (Figura 5A).

Para quantificação da taxa transpiratória, observou-se que a inoculação contribuiu para redução dessa variável aos 7 dai. No tempo de 14 dai, a testemunha inoculada apresentou significativa redução à taxa transpiratória da planta (Figura 5B).

Figura 5 - Avaliação da concentração intercelular de CO₂ no mesofilo e taxa transpiratória em mudas de *Coffea arabica*.



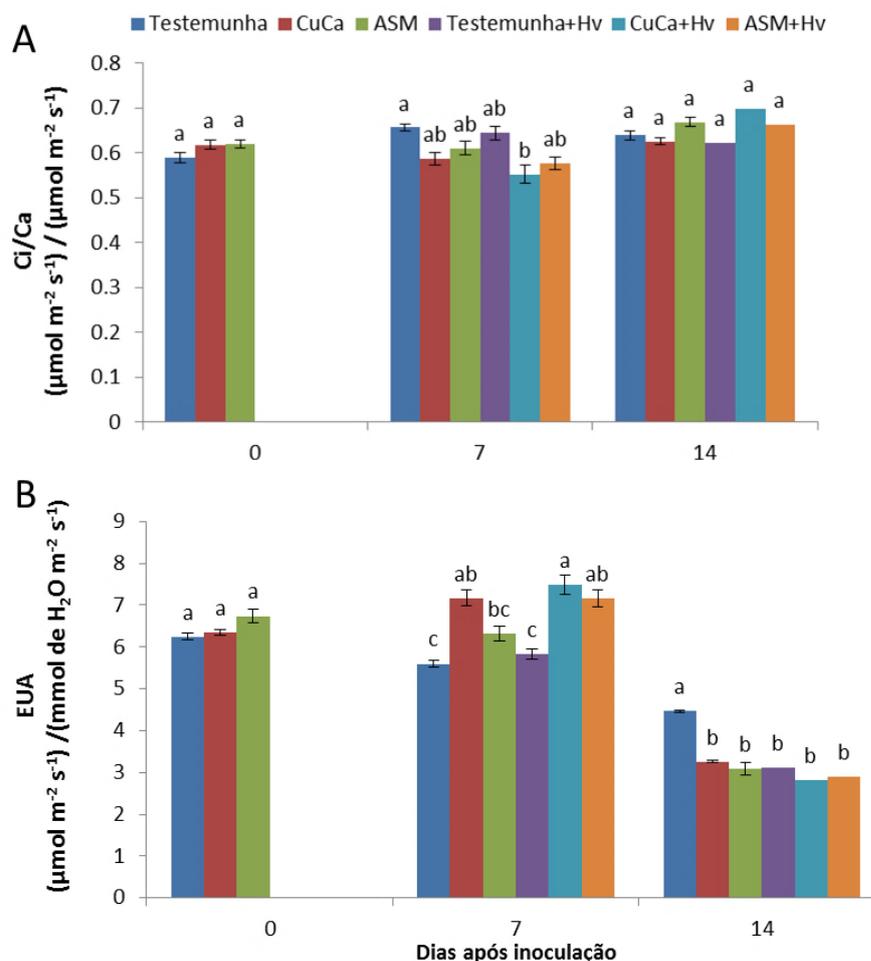
Legenda: Avaliação da concentração intercelular de CO₂ no mesofilo (A) e taxa transpiratória (B) em mudas de *Coffea arabica*. As plantas foram pulverizadas com indutores de resistência (IR) acibenzolar-S-metil (ASM) e Greenforce CuCa (CuCa) e água (Testemunha) e inoculadas. Inoculação com *Hemileia vastatrix* (Hv) ocorreu 3 dias após aplicação dos tratamentos (dai). Barras de erros representam o erro padrão da média de três blocos. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018).

Avaliando relação concentração intercelular de CO₂ no mesofilo/concentração de CO₂ externa atual (Ci/Ca), verificou-se, aos 7 dai, que a testemunha absoluta apresentou o maior valor desta variável, diferenciando apenas do Greenforce CuCa inoculado (Figura 6A).

Para eficiência no uso da água (EUA), aos 7 dai, os IRs (com e sem inoculação) apresentaram maior valor dessa variável, em comparação às testemunhas (Figura 6B).

Figura 6 - Avaliação do Ci/Ca (A), EUA (B) e EiC (C) em mudas de *Coffea arabica*.



Legenda: Avaliação do Ci/Ca (A) e EUA (B) em mudas de *Coffea arabica*. As plantas foram submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) acibenzolar-S-metil (ASM) e Greenforce CuCa (CuCa) e água (Testemunha) e inoculadas. Inoculação com *Hemileia vastatrix* (Hv), ocorreu 3 dias após aplicação dos tratamentos. Barras de erros representam o erro padrão da média de três blocos. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

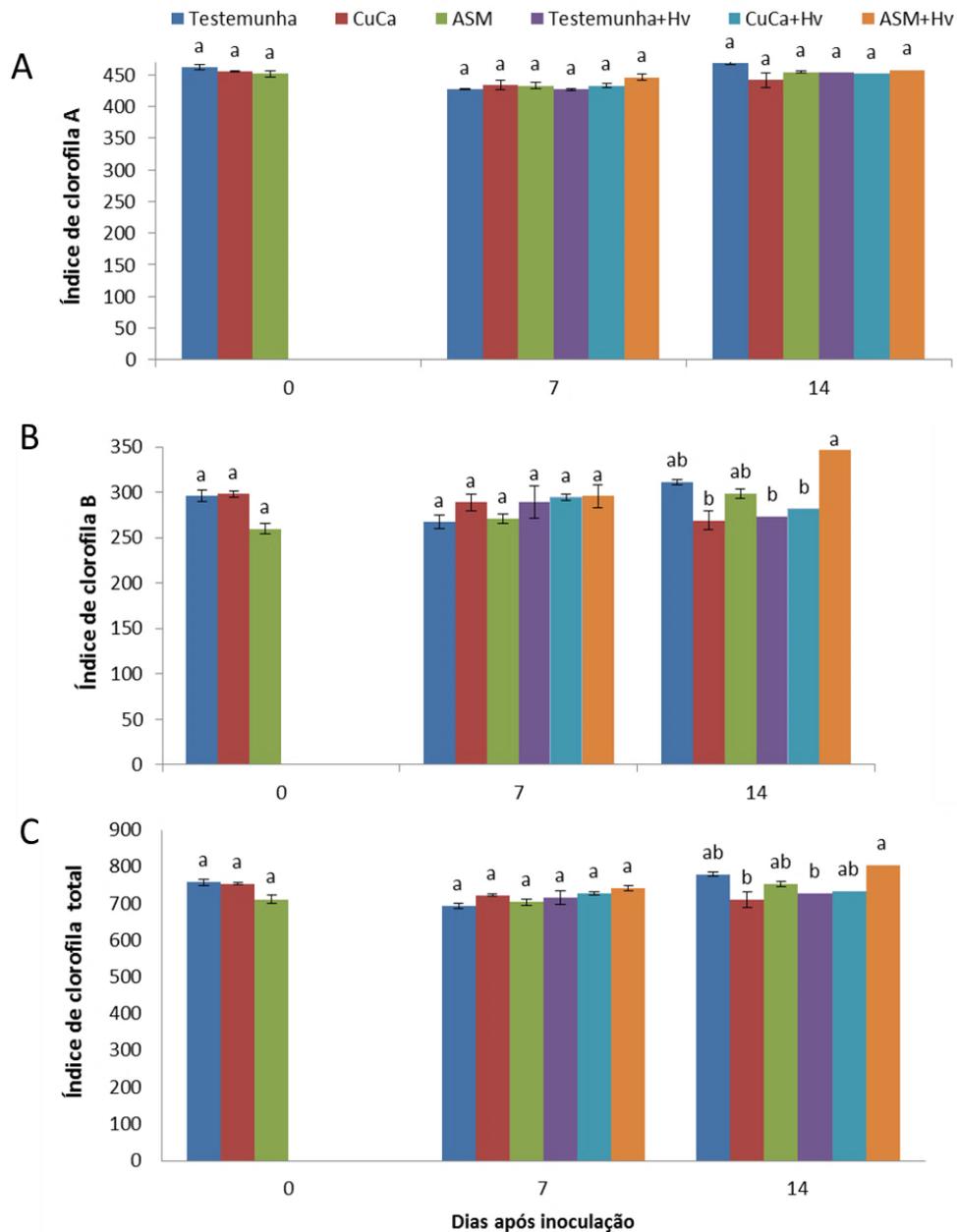
Fonte: Do autor (2018).

Para o índice de clorofila A, não foi encontrada diferença entre os tratamentos testados em nenhum tempo avaliado (Figura 7A).

Já para a quantificação do índice à clorofila b, verificou-se que o tratamento ASM inoculado apresentou aumento significativo, aos 14 dai, diferindo-se dos demais tratamentos inoculados (Figura 7B).

Avaliando o índice de clorofila total, observou-se que plantas submetidas à pulverização com o tratamento ASM e inoculadas apresentaram aumento significativo em relação à Testemunha desafiada pelo patógeno aos 14 dai (Figura 7C).

Figura 7 - Avaliação do índice de clorofila a, clorofila b e clorofila total em mudas de *Coffea arabica*.



Legenda: Avaliação da clorofila a (A), clorofila b (B) e clorofila total (C) em mudas de *Coffea arabica*. As plantas foram submetidas à pulverização com indutores de resistência (IR) acibenzolar-S-metil (ASM) e Greenforce CuCa (CuCa) e água (Testemunha) e inoculadas. Inoculação com *Hemileia vastatrix* (Hv), ocorreu 3 dias após aplicação dos tratamentos. Barras de erros representam o erro padrão da média de três blocos. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018).

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho verificou o efeito positivo da aplicação do indutor ASM e do GreenForce CuCa (subproduto da indústria cafeeira adicionada de cobre e cálcio) no manejo da ferrugem do cafeeiro em casa de vegetação. Outros estudos conduzidos, visando ao manejo desta doença (MONTEIRO; RIBEIRO JÚNIOR, 2013) e da cercosporiose (FERNANDES et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2016), comprovam a eficácia destes produtos, sendo uma opção para o controle de doenças que ocasionam grandes perdas para o agronegócio café. Costa et al. (2014), em experimento conduzido em lavouras de café, constataram que formulação à base de subprodutos da lavoura cafeeira (Fitoforce Full) controlou 50% a ferrugem e 60% a cercosporiose. Indutores de resistência benzotiadiazol (BTH) e quitosana, aplicados na pré-colheita de frutos de morangos, foram eficazes no controle de doenças, além de proteger o aparato fotossintético das plantas (LANDI et al., 2017). A ação dos indutores de resistência, no controle de doenças, aplicados, preventivamente, atuam na ativação de rotas de defesa da planta, resultando na menor intensidade de doenças (GALDEANO et al., 2010; RESENDE et al., 2014).

Os metabólitos secundários e/ou as suas vias biossintéticas são influenciadas por fatores bioquímicos, celulares e de desenvolvimento (BROUN et al., 2006). Suas concentrações podem ser afetadas por diversos fatores abióticos como temperatura, seca, salinidade, sazonalidade, ritmo circadiano, altitude, luz, radiação UV, íons metálicos, feridas, deficiências nutricionais, etc. (GOUVEA et al., 2012; RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011). Ao reconhecerem as moléculas efetoras dos patógenos, as plantas vão ativar várias vias metabólicas que resultam num conjunto de respostas de defesa entre as quais a síntese e aumento da concentração de diferentes metabólitos secundários para proteger a planta (WOJAKOWSKA et al., 2013).

Plantas inoculadas apresentaram os maiores teores de cafeína aos 14 dias após inoculação. O uso da cafeína como inseticida natural já foi relatado em alguns trabalhos, apresentando resultados promissores (HOLLINGSWORTH; ARMSTRONG; CAMPBELL, 2002; NATHANSON, 1984). Trabalhos posteriores verificaram o efeito da cafeína no controle de bactérias fitopatogênicas *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (KIM; SANO, 2008) e *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Dickeya solani*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Xanthomonas campestris* subsp. *campestris* (SLEDZ et al., 2015). A cafeína parece funcionar em dois níveis, atuando diretamente sobre os patógenos

(fungitóxica) e indiretamente como ativador do sistema de defesa (SUGIYAMA et al., 2016). Kim e Sano (2008) propuseram que a cafeína estimula os sistemas de defesa endógenos das plantas ativando direta ou indireta a expressão gênica.

A inoculação com *H. vastatrix* e aplicação dos indutores, assim como observado na cafeína, alterou tanto os teores de ácido clorogênico quanto da trigonelina, importantes metabólitos secundários encontrados no cafeeiro. O aumento no teor de ácido clorogênico observado em mudas de cafeeiro inoculadas com *H. vastatrix*, aos 14 dias após inoculação, pode ser explicada pela produção deste metabólito secundário pela planta, durante o processo de infecção, visando limitar a ação do patógeno.

Os ácidos clorogênicos apresentam importante papel nas respostas de defesa de plantas a doenças de etiologia fúngica (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992). Os compostos fenólicos, como os ácidos clorogênicos, desempenham muitos papéis fisiológicos em plantas, incluindo reprodução, crescimento e defesa contra diferentes estresses bióticos ou abióticos (ACHAKZAI et al., 2009). Eles também estão ligados a várias outras funções, como a fotossíntese, a síntese proteica, a atividade enzimática, a absorção de nutrientes, etc (SHARMA et al., 2012). Verificou-se que os fenóis também podem ser usados como indicadores de estresse, porque são aumentados pela exposição de substâncias químicas e tensões tóxicas nas plantas (ACHAKZAI et al., 2009; SIDDIQUI; ARIF-UZ-ZAMA, 2004).

A taxa fotossintética líquida, condutância estomática, concentração intercelular de CO₂ no mesófilo e taxa transpiratória foram afetadas negativamente em mudas de cafeeiro inoculadas e sem aplicação de indutores, aos 14 dias após inoculação. A fotossíntese é o ponto essencial do alto rendimento das culturas e, dentre os processos fisiológicos, é mais afetado pela infecção de vários agentes patológicos foliares (BASSANEZI et al., 2002; BASTIAANS, 1991; DALLAGNOL et al., 2011). As respostas de defesa, quando ativadas, exigem uma alta demanda metabólica, no local da infecção, em consequência ao requerimento de esqueletos carbônicos e de energia para a síntese de novas moléculas. As taxas respiratórias do hospedeiro são aumentadas, no decorrer da resposta de defesa, indicando elevação do metabolismo para fornecer energia (BOLTON, 2009). Bispo et al. (2016) constataram diminuições na taxa fotossintética líquida, condutância estomática, relação concentração intercelular de CO₂ no mesófilo/concentração de CO₂ externa atual (C_i/C_a) e da taxa transpiratória, em plantas de manga infectadas por *Ceratocystis fimbriata*, aos 20 dias após inoculação. Plantas de eucalipto inoculadas com *C. fimbriata* apresentaram redução da taxa fotossintética líquida, condutância estomática, taxa de transpiratória e aumento na taxa respiratória, quando comparadas a plantas saudáveis (SILVA et al., 2018). Plantas inoculadas

com *H. vastatrix*, porém, sem aplicação de indutores, apresentaram redução da clorofila total, aos 14 dias após inoculação. As diminuições nas concentrações de clorofila podem estar relacionadas não apenas com uma resposta inicial ao estresse oxidativo (BISPO et al., 2015), mas também à liberação de toxinas seletivas não hospedeiras produzidas durante o processo de infecção por fungos (BISPO et al., 2016). No trabalho de Guerra et al. (2014), ao estudar o efeito do Silício (Si) sobre o potencial fotossintético de plantas de algodoeiro inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* supridas (+Si) ou não (-Si) com Si, além de redução de taxa fotossintética líquida e condutância estomática, foi observada redução nas concentrações de clorofila a, clorofila b e elevação na transpiração e na eficiência do uso da água.

Há muito tempo se estuda sobre a regulação de respostas de defesa vegetal, porém existe um número limitado de abordagens sobre os efeitos da infecção pelo patógeno no metabolismo primário de plantas (BERGER; SINHA; ROITSCH, 2007). As investigações sobre diferentes interações planta-patógeno, relacionando a aspectos como fotossíntese, partição de carbono e regulação das relações fonte-dreno, vêm despertando interesse de pesquisadores (BERGER; SINHA; ROITSCH, 2007; CABELLO; LODEYRO; ZURBRIGGEN, 2014).

5 CONCLUSÕES

O produto Greenforce CuCa controlou a ferrugem do cafeeiro em torno de 41%, enquanto o acibenzolar-S-metil (ASM) proporcionou 23% de controle comparado à testemunha.

Os indutores de resistência protegeram as plantas desafiadas por *H. vastatrix* quanto às reduções nas variáveis fisiológicas: taxa fotossintética ativa, condutância estomática, concentração intercelular de CO₂ no mesófilo e taxa transpiratória, mantendo níveis semelhantes a plantas sem a presença do patógeno, aos 14 dias após inoculação.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT-CAFÉ), por financiar este trabalho.

REFERÊNCIAS

- ACHAKZAI, A. K. K. et al. Response of plant parts and age on the distribution of secondary metabolites on plants found in quetta. **Pakistan Journal of Botany**, Paquistão, v. 41, n. 5, p. 2129-2135, Oct. 2009.
- ASHIHARA, H.; SANO, H.; B.; CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry**, New York, v. 69, n. 4, p. 841–856, Feb. 2008.
- BARBIERI JÚNIOR, E. et al. Um novo clorofilômetro para estimar os teores de clorofila em folhas do capim Tifton 85. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 12, p. 2242-2245, dez. 2012.
- BASSANEZI, R. B. et al. Gas exchange and emission of chlorophyll fluorescence during the monocycle of rust, angular leaf spot and anthracnose on bean leaves as a function of their trophic characteristics. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, n. 1, p. 37–47, Jan. 2002.
- BASTIAANS, L. Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, p. 611–615, 1991.
- BERGER, S.; SINHA, A. K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 15/16, p. 4019-4026, 2007.
- BISPO, W. M. S. et al. *Ceratocystis fimbriata*-induced changes in the antioxidative system of mango cultivars. **Plant Pathology**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 627–637, June 2015.
- _____. Photosynthesis impairments precede noticeable changes in leaf water status of mango plants infected by *Ceratocystis fimbriata*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 146, p. 419-432, 2016.
- BOLTON, M. D. Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, n. 5, p. 487–497, May 2009.
- BROUN, P. et al. Importance of transcription factors in the regulation of plant secondary metabolism and their relevance to the control of terpenoid accumulation. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 5, n. 1, p. 27-38, Feb. 2006.
- CABELLO, J. V.; LODEYRO, A. F.; ZURBRIGGEN, M. D. Novel perspectives for the engineering of abiotic stress tolerance in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 26, p. 62-70, Apr. 2014.
- CARVALHO, C. H. S. **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, 2008. 334 p.
- CARVALHO, V. L.; CUNHA, R. L.; SILVA, N. R. N. Alternativas de controle de doenças do cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 42-49, jan./abr. 2012.

CHAVES, J. C. D. et al. Estimativa do teor de cafeína nas sementes de café baseada na sua concentração nas folhas de mudas e de plantas adultas. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 26, n. 3, p. 287-292, 2004.

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

CUNHA, R. L. et al. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para avaliar a severidade da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Resumos Expandidos...** Brasília: Embrapa Café, 2001. p. 1001-1008.

DALLAGNOL, L. J. et al. Alterations on rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae*. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 40, n. 4, p. 360–365, July 2011.

DANIEL, R.; GUEST, D. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 67, n. 3/5, p. 194-201, Sept. 2006.

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

FACCHINI, P. J. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation and metabolic engineering applications. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 29-66, June 2001.

FERNANDES, L. H. F. et al. Acibenzolar-s-methyl in rust and blotch control in field conditions. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 21-29, jan./mar. 2013.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, dez. 2011.

GALDEANO, D. M. et al. Proteção do cafeeiro contra cercosporiose por acibenzolar-S-metil e proteína harpina. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 7, p. 686-692, jul. 2010.

GOUVEA, D. R. et al. Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* less (*Asteraceae: Vernoniaeae*) leaves. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 35, n. 11, p. 2139-2145, 2012.

GUERRA, A. M. N. M. et al. Capacidade fotossintética de plantas de algodoeiro infectadas por ramulose e supridas com silício. **Bragantia**, Campinas, v. 73, n. 1, p. 50-64, jan./mar. 2014.

GUERRA-GUIMARÃES, L. Chitinases of *Coffea arabica* genotypes resistant to orange rust *Hemileia vastatrix*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 53, p. 702-706, Dec. 2009.

- GUIMARÃES, S. E. et al. Indutores de resistência no controle da cercosporiose do cafeeiro: análise de genes relacionados à defesa. **Coffee Science**, Lavras, v. 11, n. 3, p. 308-317, jul./set. 2016.
- GUZZO, S. D.; HARAKAVA, R.; TSAI, S. M. Identification of coffee genes expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with *Hemileia vastatrix*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 10, p. 625-638, Oct. 2009.
- HOLLINGSWORTH, R. G.; ARMSTRONG, J. W.; CAMPBELL, E. Pest control: caffeine as a repellent for slugs and snails. **Nature**, London, v. 417, p. 915–916, London, 2002.
- KIM, Y. S.; SANO, H. Pathogen resistance of transgenic tobacco plants producing caffeine. **Phytochemistry**, New York, v. 69, n. 4, p. 882–888, Feb. 2008.
- KRASENSKY, J.; JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 4, p. 1593–1608, Feb. 2012.
- LANDI, L. et al. Global transcriptome analysis and identification of differentially expressed genes in strawberry after preharvest application of benzothiadiazole and chitosan. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, p. 235, Feb. 2017.
- MALTA, M. R.; CHAGAS, S. J. R. Avaliação de compostos não-voláteis em diferentes cultivares de cafeeiro produzidas na região sul de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 1, p. 57-61, 2009.
- MARCHI, C. E.; BORGES, M. F.; RESENDE, M. L. V. Proteção induzida por benzotiadiazole contra a ferrugem-alaranjada (*Hemileia vastatrix*) em cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 1103-1106, set./out. 2002.
- MATIELLO, J. B. et al. **Cultura de café no Brasil: novo manual de recomendações**. Rio de Janeiro: MAPA/PROCAFÉ, 2002. 387 p.
- MONTEIRO, A. C. A.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M. Acibenzolar-S-metil no controle da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro em condições de campo. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 24-32, jan./mar. 2013.
- NATHANSON, J. A. Caffeine and related methylxanthines: possible naturally occurring pesticides. **Science**, New York, v. 226, n. 4671, p. 184–187, Oct. 1984.
- NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 369-389, Sept. 1992.
- 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**, Warwick, v. 152, n. 1, p. 29-39, Feb. 2008.
- PESSOA, W. S. et al. Efeito do tratamento hidrotérmico associado a indutores de resistência no manejo da antracnose da goiaba em pós-colheita. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 20, n. 3, p. 129-135, jul./set. 2007.

POZZA, E. A. A. et al. Importância das doenças foliares do cafeeiro. In: NÚCLEO DE ESTUDOS EM FITOPATOLOGIA. **Manejo fitossanitário da cultura do cafeeiro**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2008. v. 1, p. 81-94.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 6, n. 11, p. 1720-1731, Nov. 2011.

REIS, K. M. dos. Coffee: production and values payments to the producer in Brazil from 2001 to 2015. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA EM CAFEICULTURA IRRIGADA, 18., 2015, Araguari. **Anais...** Araguari: Embrapa informações Tecnológicas, 2015. p. 1-18.

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

_____. Evaluating the effect of Greenforce S and Greenforce CuCa products on the severity of bacterial spot and wilt, and powdery mildew diseases on tomato. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TOMATO DISEASES, 4., 2014, The Hague. **Proceedings...** The Hague: ISHS, 2014. p. 235-242.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. V. H. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa: CFSEMG, 1999. 359 p.

RODRIGUES, F. A. et al. Chlorogenic acid levels in leaves of coffee plants supplied with silicon and infected by *Hemileia vastatrix*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 6, p. 404-408, nov./dez. 2011.

ROJAS, C. M. et al. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 17, Feb. 2014.

SALUSTIANO, M. et al. Variability in ten populations of *Hemileia vastatrix* for germination and germinative tube length under four temperatures. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1651-1656, set./out. 2008.

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

SHARMA, A. K. et al. Comparative analysis of phenolic and flavonoid content of *Jatropha curcas* Linn. **Plant Archives**, New York, v. 12, n. 2, p. 823-826, Oct. 2012.

SIDDIQUI, Z.; ARIF-UZ-ZAMA, S.; Effects of benlate systemic fungicide on seed germination, seedling growth, biomass and phenolic contents in two cultivars of *Zea mays* L. **Pakistan Journal of Botany**, Paquistão, v. 36, n. 3, p. 577-582, Sept. 2004.

- SILVA, A. C. et al. Eucalypt plants are physiologically and metabolically affected by infection with *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 123, p. 170-179, Feb. 2018.
- SILVA, M. C. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, n. 4, p. 169-183, Apr. 2002.
- SILVA, O. C. et al. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, n. 6, p. 598-604, June 2011.
- SLEDZ, W. et al. Antibacterial activity of caffeine against plant pathogenic bacteria. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 62, n. 3, p. 605–612, 2015.
- SUGIYAMA, A. et al. Caffeine fostering of mycoparasitic fungi against phytopathogens. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 11, n. 1, p. e1113362, 2016.
- TEIXEIRA, M. M. et al. **Passo a passo para se obter café de qualidade**. Viçosa: CPT, 2004. 168 p.
- VITORINO, M. D. et al. Metodologias de obtenção de extrato de café visando a dosagem de compostos não voláteis. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 17-24, 2001.
- WOJAKOWSKA, A. et al. Structural characterization of flavonoid glycosides from leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) using LC/MS/MS profiling of the target compounds. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 48, n. 3, p. 329-339, Mar. 2013.
- WOLDEMARIAM, M. G. et al. NaMYC2 transcription factor regulates a subset of plant defense responses in *Nicotiana attenuate*. **BMC Plant Biology**, London, v. 13, p. 73, May 2013.
- ZAMBOLIM, L. et al. Epidemiologia e controle integrado da ferrugem-do-cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O Estado da arte de tecnologias de produção de café**. Viçosa: Editora UFV, 2002. p. 369-450.
- ZHENG, X. Q.; ASHIHARA, H. Distribution, biosynthesis and function of purine and pyridine alkaloids in *Coffea arabica* seedlings. **Plant Science**, Limerick, v. 166, n. 3, p. 807-813, Mar. 2004a.
- ZHENG, X. Q.; NAGAI, C.; ASHIHARA, H. Pyridine nucleotide cycle and trigonelline (N-methylnicotinic acid) synthesis in developing leaves and fruits of *Coffea arabica*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 122, n. 4, p. 404–411, Dec. 2004b.