



HELON SANTOS NETO

RESISTÊNCIA EM CAFEIEIRO A
Colletotrichum gloeosporioides, **ISOLADO DA**
MANCHA MANTEIGOSA

LAVRAS-MG

2012

HELON SANTOS NETO

**RESISTÊNCIA EM CAFEIEIRO A *Colletotrichum gloeosporioides*,
ISOLADO DA MANCHA MANTEIGOSA**

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

Orientador

Dr. Mario Sobral de Abreu

LAVRAS - MG

2012

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

Santos Neto, Helon.

Resistência em cafeeiro a *Colletotrichum gloeosporioides*,
isolado da mancha manteigosa / Helon Santos Neto. – Lavras :
UFLA, 2012.

69 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Mário Sobral de Abreu.

Bibliografia.

1. Café. 2. Genótipos. 3. Fungos fitopatogênicos. 4. Cultivares
resistentes. 5. Doenças fúngicas. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD – 632.44

HELON SANTOS NETO

**RESISTÊNCIA EM CAFEIEIRO A *Colletotrichum gloeosporioides*,
ISOLADO DA MANCHA MANTEIGOSA**

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

APROVADA em 27 de fevereiro de 2012

Dr. Eduardo Alves UFLA

Dr. Samuel Pereira de Carvalho UFLA

Dr. Mario Sobral de Abreu
Orientador

LAVRAS – MG

2012

*Aos meus pais José Horácio e Teresinha pela luta para que eu pudesse realizar
este sonho e, aos quais me orgulho muito,*

A minha irmã Iala e sobrinha Isabel pelo amor, carinho e incentivo aos estudos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade.

Ao meu orientador, Dr. Mario Sobral de Abreu pela confiança, orientação, conhecimentos transmitidos e bons exemplos profissionais durante toda a minha formação na Universidade. MUITO OBRIGADO!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq pela concessão da bolsa de estudos para a realização do Mestrado.

Aos professores, Dr. Eduardo Alves e Dr. Samuel Pereira de Carvalho pela disposição e colaboração para o melhoramento do meu trabalho.

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

A Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais EPAMIG, pelo apoio, em especial aos pesquisadores Dra. Juliana Costa de Rezende e Dr. Antônio Alves Pereira pela disponibilidade e auxílio para realização deste trabalho.

Ao pesquisador Dr. Pedro Martins Ribeiro Júnior, pela disponibilidade e auxílio na realização das análises bioquímicas deste trabalho.

À Eloisa Leite pela disponibilidade e auxílio para a realização deste trabalho.

Ao Bruno Marques Silva e Cláudio Ogoshi pela amizade e apoio em todas as etapas deste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório Felipe Moretti, Felipe França, Marcelo, Fernanda, Cecília.

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

Ao Núcleo de Estudos em Fitopatologia pela oportunidade de contribuir com o grupo.

Aos amigos de república, Matheus, Álvaro e Raul pelo convívio e apoio.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela amizade e apoio.

A minha família pelos conselhos e apoio constante.

A todos os amigos nesses anos de Universidade.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Fungos do gênero *Colletotrichum* vêm ganhando destaque na cafeicultura nos últimos anos, desse modo, este trabalho teve como objetivo avaliar a resistência de diferentes genótipos de cafeeiro utilizados no Estado de Minas Gerais ao *Colletotrichum gloeosporioides* isolado da mancha manteigosa. Primeiramente, oito genótipos de cafeeiro foram classificados quanto à resistência ao patógeno. Dois grupos diferiram quanto à resistência. No primeiro grupo as cultivares Paraíso MG h419-1, Catiguá MG-2, Oeiras MG-6851 e Sacramento MG-1 apresentaram uma maior resistência, diferindo das cultivares Catuaí Vermelho IAC 144, Mundo Novo IAC 376/4, Pau-Brasil MG-1 e Araçuaia MG-1 que foram menos resistentes e não diferiram entre si. Posteriormente foi realizada a avaliação da resposta de defesa de cafeeiro contra *Colletotrichum gloeosporioides* das cultivares Paraíso MG h419-1 e Catuaí Vermelho IAC 144, classificadas anteriormente como mais resistente e menos resistente respectivamente. Foram avaliadas as atividades das enzimas Peroxidase (POX), Polifenoloxidase (POL) e Fenilalanina Amônia Liase (FAL). Foi verificado que essas enzimas estão relacionadas à defesa do cafeeiro ao *Colletotrichum gloeosporioides* e que a cultivar Paraíso MG h419-1 apresenta uma maior atividade da POX e da POL em relação a cultivar Catuaí Vermelho IAC 144.

Palavras-chave: Enzimas. Resposta de defesa. Cafeicultura.

ABSTRACT

Fungi of the genus *Colletotrichum* has been gaining attention in recent years in the coffee growing, therefore, this study had as objective to evaluate the resistance of different coffee genotypes used in Minas Gerais State to *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from blister spot. First, eight coffee genotypes were classified as pathogen resistance. Two groups differed in resistance. In the first one the cultivars Paraíso MG h419-1, Catiguá MG-2, Oeiras MG-6851 and Sacramento MG-1 showed a greater resistance. The cultivars Catuaí Vermelho IAC 144, Mundo Novo IAC 376/4, Pau-Brasil MG-1 and Araponga MG-1 were less resistant and did not differ to each other. Subsequently was performed evaluation the defense response of coffee against *Colletotrichum gloeosporioides* from cultivars Paraíso MG h419-1 and Catuaí Vermelho IAC 144, previously classified as more resistant and less resistant respectively. It was evaluated the activities of the enzymes Peroxidase (POX), Polyphenoloxidase (POL) and Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL). It was found that these enzymes are related to the defense of the *Colletotrichum gloeosporioides* coffee and to cultivate Paraíso MG h419-1 has a higher activity of POX and POL in relation to Catuaí Vermelho IAC 144.

Keywords: Enzymes. Defense response. Coffee growing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Sintomatologia da mancha manteigosa em campo. **A**: sintoma em folha; **B**: em flores; **C**, **D**: em frutos; **E** a **G**: seca de ramos e ponteiros; **H**: mumificação de frutos chumbinhos. 21
- Figura 2 Sintomatologia da mancha manteigosa em campo. **A**: recepas e sintomas nas brotações; **B**, **E**: em plântulas sob copa; **C**: em mudas; **D**: perda de ramos plagiotrópicos; **F**: seca da parte apical. . 22
- Gráfico 1 Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), para oito cultivares de cafeeiro. Valores seguidos da mesma letra pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$). CV 28,69%..... 40
- Gráfico 2 Área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) para oito cultivares de cafeeiro. Valores seguidos da mesma letra pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$). CV 29,23%..... 41
- Gráfico 3 Atividade específica da Peroxidase em mudas de café determinada em diferentes épocas após a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides*. Mudas da cultivar Paraíso inoculadas com Cg (PA Inoc), mudas cultivar Paraíso não inoculadas (PA Test), mudas da cultivar Catuaí Vermelho inoculadas com Cg (CV Inoc) e mudas da cultivar Catuaí Vermelho inoculadas não inoculadas (CV Test). Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada período pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade 43

Gráfico 4 Atividade específica da Polifenoloxidase em mudas de café determinada em diferentes épocas após a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides*. Mudas da cultivar Paraíso inoculadas com Cg (PA Inoc), mudas da cultivar Paraíso inoculadas não inoculadas (PA Test), mudas da cultivar Catuaí Vermelho inoculadas com Cg (CV Inoc) e mudas da cultivar Catuaí Vermelho não inoculadas (CV Test). Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada época pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.... 45

Gráfico 5 Atividade específica de fenilalanina amônia-liases em mudas de café determinada em diferentes épocas após a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides*. Mudas da cultivar Paraíso inoculadas com Cg (PA Inoc), mudas da cultivar Paraíso não inoculadas (PA Test), mudas da cultivar Catuaí Vermelho inoculadas com Cg (CV Inoc) e mudas da cultivar Catuaí Vermelho não inoculadas (CV Test). Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada época pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade 47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	<i>Colletotrichum</i> spp. em cafeeiro	14
2.2	Estudos de patogenicidade de <i>Colletotrichum</i> spp. em cafeeiro	15
2.3	Taxonomia de <i>Colletotrichum</i> spp. associada ao cafeeiro	17
2.4	Mancha Manteigosa	19
2.4.1	Sintomas e sinais da mancha manteigosa	20
2.4.2	Importância da mancha manteigosa	22
2.4.3	Transmissibilidade de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , agente etiológico da mancha manteigosa	23
2.5	Mecanismos de resistência das plantas a patógenos	24
2.6	Cultivares de cafeeiro resistentes a <i>Colletotrichum</i> spp.	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Avaliação da resistência de genótipos de cafeeiro a <i>C. gloeosporioides</i>	30
3.1.1	Obtenção do isolado de <i>C. gloeosporioides</i>	30
3.1.2	Obtenção das plântulas de cafeeiro	31
3.1.3	Inoculação e avaliação	32
3.2	Avaliação da resposta de defesa de cafeeiro contra <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	35
3.2.1	Obtenção das mudas de café	35
3.2.2	Inoculação	35
3.2.3	Coleta de material para análise	36
3.2.4	Determinação de proteínas totais	37
3.2.5	Peroxidase de guaiacol	37
3.2.6	Polifenoloxidase	37
3.2.7	Fenilalanina amônia-liase	38
3.2.8	Delineamento experimental e análise dos dados	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Avaliação de genótipos de cafeeiro quanto à resistência a <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	39
4.2	Atividade Peroxidase (POX)	42
4.3	Atividade Polifenoloxidase (POL)	44
4.4	Atividade da Fenilalanina amônia-liase (FAL)	46
5	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXOS	59

1 INTRODUÇÃO

O café representa uma das principais fontes de divisas para o Brasil, que se destaca como o maior produtor e exportador mundial. Possuindo área cultivada estimada de 2.278.103 hectares, com uma produção de 43,48 milhões de sacas de café beneficiado na safra 2010/2011, da qual 74,0% (32,19 milhões de sacas) foi representada por café arábica. O Estado de Minas Gerais é responsável por mais da metade da produção nacional de café, com uma produção estimada em 21,88 milhões de sacas de café arábica na safra 2010/2011, correspondendo por 68% da produção brasileira de café arábica (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2012).

Nos países produtores, a cultura do café é afetada por diversos problemas de ordem fitossanitária, que causam perdas substanciais de produção quando não tomadas medidas eficazes de controle. Dentre os principais problemas fitossanitários enfrentados na cultura do café está o manejo das doenças, com destaque àquelas enfermidades fúngicas causadas por fungos do gênero *Colletotrichum* spp., que incluem espécies fitopatogênicas de grande importância para o mundo e estão presentes em todos os estádios de desenvolvimento dos órgãos do cafeeiro, como folhas, frutos, flores e ramos.

No Brasil não é diferente, atualmente cafezais vêm sendo acometidos por doenças causadas por *Colletotrichum* spp., como por exemplo, as antracnoses em folhas e frutos, mancha manteigosa e a seca de ponteiros. Dentre essas, a mais grave é a mancha manteigosa, pois os cafeeiros doentes têm sua capacidade produtiva totalmente afetada, o que pode ser observado pela morte de hipocótilos, mumificação e abscisão de folhas e frutos, murcha e seca descendente de ramos plagiotrópicos. Nesse cenário, pesquisas orientadas para o desenvolvimento de estratégias de manejo para essas enfermidades do cafeeiro

são necessárias, pois problemas econômicos sérios podem advir caso a doença venha a tornar-se epidêmica no país.

Como medida de controle, o químico embora possa ser eficiente no manejo de doenças causadas por *Colletotrichum* spp. é pouco utilizado no Brasil, pois, os períodos críticos de controle são da floração até o estágio de fruto expandido. Portanto, o controle químico não coincide com o período de controle de outras doenças importantes como a ferrugem (*Hemileia vastatrix*), onerando deste modo o custo de produção.

Atualmente, o processo produtivo agrícola sofre pressão da sociedade pela produção de alimentos de forma sustentável e sem resíduos de produtos químicos. Com isso, existe uma busca contínua por opções que sejam capazes de auxiliar no controle de doenças, mas que não representem risco ao homem e ao meio ambiente. Nesse contexto, o uso de cultivares resistentes é a alternativa preferencial por ser o método mais barato, mais fácil, mais eficaz e mais seguro para o controle dessa doença. Entretanto, são escassas as informações sobre cultivares portadoras de mecanismos de resistência eficientes a *Colletotrichum* spp. no Brasil.

Objetivou-se assim neste trabalho avaliar a resistência de oito genótipos de cafeeiro, utilizados no Estado de Minas Gerais, a *Colletotrichum gloeosporioides* agente etiológico da mancha manteigosa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Colletotrichum* spp. em cafeeiro

As espécies do gênero *Colletotrichum* estão entre os fungos fitopatogênicos com maior capacidade na indução da antracnose e são responsáveis por prejuízos significativos num vasto leque de culturas e plantas ornamentais importantes. A primeira descrição de *Colletotrichum* em cafeeiro foi feita por Noack, em 1901, referente a um isolado do Brasil, denominado de *C. coffeanum* (NOACK, 1902). No Kenya, em 1926 foi relatado a variante “*virulans*” de *Colletotrichum* em café, associada a “*Coffee Berry Disease*” (MC DONALD, 1926). No Brasil, em 1958, foi descrita uma enfermidade em folhas de *Coffea arabica* L. como sendo a mancha manteigosa (BITANCOURT, 1958). Posteriormente, essa doença foi caracterizada como sendo causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (OROZCO, 2003). Essa doença nos últimos anos tem gerado perdas de produção e se encontra disseminada na maioria dos estados brasileiros produtores de café (COSTA; VENTURA; FERRÃO, 2003; FERREIRA et al., 2004; OROZCO, 2003; PARESQUI, 2003.)

Dentre as doenças causadas por *Colletotrichum* spp. em cafeeiro, destacam-se duas: a CBD (*Colletotrichum kahawae* J. M. Waller e P. D. Bridge), restrita ao continente africano e a mancha manteigosa (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz). A CBD ataca os frutos em todos os estádios de formação (FIRMAN; WALLER, 1977) e pode provocar redução da produtividade de até 80% (CHEN; LIANG; RODRIGUES, 2005; VÁRZEA et al., 2002), devido à queda prematura dos frutos ou à sua mumificação na planta (CHEN, 2002). Diversos estudos foram realizados tentando verificar a ocorrência da CBD nos cafezais brasileiros, mas tal fato não foi observado, mostrando que essa doença é

restrita ao continente africano (CHALFOUN, 1997; OROZCO, 2003; VARZEA; RODRIGUES JÚNIOR; SILVA, 2002; WALLER et al., 1993).

O patossistema cafeeiro x *Colletotrichum* é muito complexo, pois se trata de populações de espécies de *Colletotrichum* associadas ao café, ocasionando diversos sintomas ou colonizando as plantas de forma invasiva “sistêmica”, sem manifestação dos sintomas (OROZCO, 2003; PEREIRA, 2005). Os isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de vários órgãos de cafeeiro de lavouras brasileiras são pertencentes às espécies de *C. acutatum* Simmonds e *C. gloeosporioides* Penz, fato observado após estudos sobre a caracterização molecular, bioquímica e morfológica desses isolados (CHEN, 2002; OROZCO, 2003; WALLER et al., 1993).

2.2 Estudos de patogenicidade de *Colletotrichum* spp. em cafeeiro

Testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* causadores da mancha manteigosa têm sido realizado com êxito. No cafeeiro, esses testes feitos em hipocótilos, plântulas e em frutos têm revelado variáveis graus de suscetibilidade em função do genótipo estudado (DORIZZOTTO; ABREU, 1993; NECHET, 1999; OROZCO, 2003). No Brasil, estudos realizados para caracterizar a patogenicidade de *Colletotrichum* spp. em hipocótilos de cafeeiros, mostraram sintomas característicos da doença em torno de 15 a 30 dias após a inoculação do patógeno (DIAS, 2002; DORIZZOTTO; ABREU, 1993; NECHET, 1999; OROZCO, 2003).

Silva et al. (1998) estudaram a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. em mudas de cafeeiro e concluíram que as cultivares Mundo Novo e Catuaí Vermelho foram as mais suscetíveis. Em testes de patogenicidade com 10 isolados de *C. gloeosporioides* e 12 cultivares de *Coffea arabica* L., Orozco (2003), confirmou a patogenicidade desses isolados nas cultivares

Catucaí Vermelho e Catucaí Amarelo que foram obtidas de sementes de plantas com sintomas foliares da mancha manteigosa, mostrando que existe um fator de suscetibilidade nessas plantas.

Nechet e Abreu (2002) realizaram testes de patogenicidade em plântulas e em frutos verdes com oito isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de café. Segundo os autores, os isolados foram patogênicos às plântulas de café, mas não foi verificada morte das mesmas até os 30 dias após a inoculação. Os sintomas que ocorreram com frequência foram lesões superficiais castanhas e lesões mais profundas e escuras que, em alguns casos, evoluíram para lesões com início de estrangulamento de caules. Nos frutos, observaram sintomas de necrose com lesões escuras, em alguns casos com presença de acérvulos aos 30 dias após inoculação. Sintomas de infecção em plântulas de café e frutos verdes foram observados a partir dos 10 dias após inoculação, obtendo-se infecção máxima de 51,27% e 24,55%, aos 30 dias, respectivamente.

Dorizzotto e Abreu (1993) estudaram a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. em plântulas de café dos genótipos Sarchimor e Catimor. De acordo com resultados, todas as progênies e a linhagem testadas mostraram-se suscetíveis, tanto em plântulas como em frutos verdes. Segundo o autor, aqueles isolados considerados patogênicos foram associados ao agente da mancha manteigosa.

Nguyen et al. (2009) determinaram a capacidade patogênica dos isolados responsáveis pela antracnose do café no Vietnã e observaram que essa enfermidade é causada principalmente por *C. gloeosporioides*, entretanto, o autor ressalta que outras espécies também podem estar envolvidas para agilizar o processo de infecção, especialmente sob deficiência de nutrientes e estresse fisiológico.

Testes de patogenicidade de *Colletotrichum* spp. em frutos de café têm demonstrado que frutos inoculados pelo método de fermento apresentam maior

incidência da doença quando comparados a frutos inoculados pelo método sem ferimentos (NGUYEN et al., 2009; PRIHASTUTI et al., 2009). Segundo Nguyen et al. (2009) a camada de cera cuticular pode inibir o processo de infecção dos patógenos.

Isolados que ocasionam o sintoma de mancha manteigosa em cafeeiros no Brasil, causam sintomas de necrose similares àqueles que ocasionam a CBD (OROZCO, 2003).

2.3 Taxonomia de *Colletotrichum* spp. associada ao cafeeiro

A classificação taxonômica de *Colletotrichum* spp. em cafeeiro tem sido confusa desde a descrição original, realizada por Noack em 1901 (MASABA; WALLER, 1992.; VÁRZEA et al., 2002). Noack designou por *Colletotrichum coffeanum* uma forma do fungo não patogênica dos frutos verdes do cafeeiro encontrada no Brasil. Porém, desde essa época e durante 70 anos, o nome *C. coffeanum* foi utilizado para denominar todos os isolados de *Colletotrichum* spp. em cafeeiro (FIRMAN; WALLER, 1977; MASABA; WALLER, 1992; VARZEA et al., 2002).

Em 1926, no Quênia, Mc Donald classificou *C. coffeanum* em três formas distintas: uma forma saprofítica; uma forma medianamente parasítica; e uma fortemente parasítica, responsável pela CBD em cafeeiro. A forma patogênica podia ser distinguida por características morfológicas e meio de cultura, fato confirmado por Rayner (1952), que passou a designar a forma *C. coffeanum* Noack por *C. coffeanum* Noack var. “*virulans*”. Gibbs (1969), baseado em características culturais do micélio e na capacidade patogênicas dos isolados provenientes de *Coffea arabica* L., classificou o gênero *Colletotrichum* em quatro grupos principais: CCP (*C. coffeanum* “Pink”), CCA (*C. coffeanum* “acervulo”), CCM (*C. coffeanum* “micélio”) e CBD (*C. coffeanum* “var.

virulans”). Os três primeiros grupos incluíam formas saprofiticas e o último uma forma patogênica, que causava a CBD (FIRMAN; WALLER, 1977; GIBBS, 1969).

Hindorf (1970) realizou um estudo aprofundado sobre as diferentes espécies de *Colletotrichum* presentes no cafeeiro, identificando seis espécies: *C. coffeanum* Noack (*sensu stricto*); *C. acutatum* Simmonds; *C. gloeosporioides* Penz. “forma de micélio branco”; *C. gloeosporioides* Penz. “forma de micélio esverdeado”; *C. gloeosporioides* Penz. “forma de acérvulos” e *Glomerella cingulata*. Posteriormente, o agente causal da CBD passou a ser designado por todos os pesquisadores como *C. coffeanum sensu* Hindorf.

Algumas características que distinguem *C. coffeanum* das outras espécies saprofiticas foram verificadas em isolados provenientes de frutos de café arábica com sintomas da CBD. Os isolados desse agente patogênico, quando submetidos em cultura pura, após várias repicagens, se tornavam indistinguíveis na cor da colônia dos isolados de *C. acutatum* e de *C. gloeosporioides*. Com isso alguns pesquisadores decidiram rever essa classificação (WALLER, 1982). Waller et al.(1993) baseados em características morfológicas, patogênicas e bioquímicas (capacidade de utilizar citrato e tártaro com única fonte de carbono) propuseram a alteração do nome de *Colletotrichum coffeanum sensu* Hindorf para *Colletotrichum kahawae* J. M. Waller e P. D. Bridge. A validade do *C. kahawae* tem sido seguramente suportada em recentes estudos filogenéticos moleculares (BRIDGE et al., 2008; CAI et al., 2009; PRIHASTUTI et al., 2009).

Segundo Cai et al. (2009) o rápido progresso em filogenia molecular está tornando possível a identificação de clados estáveis e bem resolvidos dentro de *Colletotrichum*. Prihastuti et al. (2009) apresentaram três novas espécies de *Colletotrichum* associadas com grãos de café no Norte da Tailândia que foram denominadas *Colletotrichum asianum*, *Colletotrichum fruticola* e

Colletotrichum siamense. Essas espécies foram identificados com base na morfologia, características culturais e bioquímicas, testes de patogenicidade e análise filogenética.

Juliatti et al. (2006) avaliaram a agressividade e divergência genética por RAPD (amplificação aleatória de genomas polimórficos) de isolados de *C. gloeosporioides* coletados em lavouras cafeeiras no Estado de Minas Gerais e sugeriram a existência de novos variantes, onde os marcadores moleculares analisados mostraram certa associação com os níveis de agressividade apresentados pelos isolados quando inoculados em plântulas de café, sugerindo a existência de diferentes patótipos (raças) associados ao cafeeiro em Minas Gerais.

2.4 Mancha Manteigosa

Dentre as doenças provocadas pelo *Colletotrichum* em cafeeiro no Brasil a mancha manteigosa é considerada a mais grave. Sua primeira descrição foi feita na Costa Rica, acreditando que era uma doença de natureza virótica (WELLMAN, 1957). Em 1972 a etiologia da doença foi elucidada como sendo de origem fúngica, cujo patógeno *Colletotrichum* sp. (VARGAS; GONZALES, 1972). Esses autores iniciaram o estudo da doença, mas como não conseguiram reproduzir os sintomas inoculando o patógeno, sugeriram então que provavelmente essa doença era condicionada por um caráter genético, o qual refletia na suscetibilidade da planta.

No Brasil, a doença foi descrita primeiramente no Estado de São Paulo (BITANCOURT, 1958) e posteriormente, foram relatados novos focos em outros estados brasileiros. No Espírito Santo foi detectada a doença em *Coffea canephora* (MANSK; MATIELLO, 1977) e em Minas Gerais, no ano de 1999,

foi constatada perda total da produção em uma lavoura no município de Cristais (OROZCO, 2003).

Estudando a caracterização morfológica e a patogenicidade de *Colletotrichum* spp. obtidos de regiões cafeeiras do Estado de Minas Gerais, Dorizzotto e Abreu (1993) identificaram o isolado da mancha manteigosa como *Colletotrichum coffeanum* (*C. gloeosporioides*), com características morfológicas idênticas às do agente da CBD. Dias (2002) caracterizou morfológicamente e bioquimicamente os isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de folhas, ramos e frutos de cafeeiro com sintomas da mancha manteigosa e de seca de ponteiros, estudou os efeitos de diferentes temperaturas no comportamento dos isolados, bem como, realizou teste de patogenicidade em plântulas, obtidas por cultura de embrião. O autor verificou que o isolado proveniente da mancha manteigosa foi patogênico em hipocótilos e sugeriu que o agente causal da mancha manteigosa era *C. gloeosporioides*. Esse resultado foi reforçado por Orozco (2003), que ainda sugeriu a denominação de *C. gloeosporioides* raça mancha manteigosa, por tratar-se de uma nova raça patogênica.

2.4.1 Sintomas e sinais da mancha manteigosa

Inicialmente os sintomas da mancha manteigosa manifestam-se em folhas novas, com o aparecimento de mancha de cor verde-clara, de aspecto oleoso, menos brilhante que a superfície da folha, medindo de 2 a 10 mm de diâmetro. Em estádios avançados, as manchas apresentam coloração verde-pálida a amarela e bordas irregulares. Por fim, as manchas coalescem, determinando queda prematura das folhas (BITANCOURT, 1958; MANSK; MATIELLO, 1977; VARGAS; GONZÁLES, 1972; WELLMAN, 1957). Ataques intensos são observados em folhas e ramos novos em plantas adultas,

ocorrendo necrose e seca de ramos na parte apical, podendo levar a morte das plantas de forma descendente (Figuras 1 e 2) (FERREIRA et al., 2004).

Em estudos histopatológicos, por meio de microscopia eletrônica de varredura, em ramos de cafeeiros com sintomas da mancha manteigosa, observou-se, que nos tecidos doentes houve intensa colonização dos vasos do xilema e floema. Nessas partes ocorreu um intenso crescimento de hifas, responsáveis pela murcha e morte de ramos (PEREIRA, 2005).

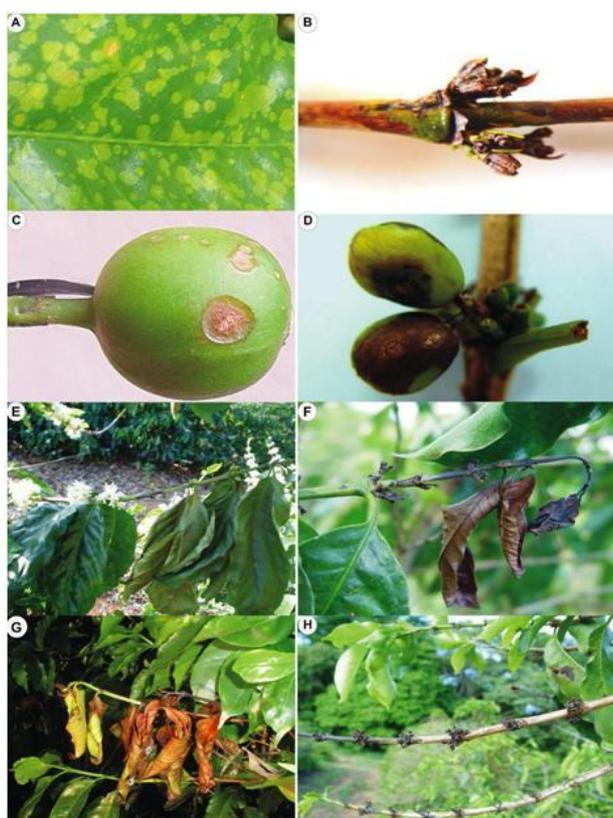


Figura 1 Sintomatologia da mancha manteigosa em campo. **A**: sintoma em folha; **B**: em flores; **C**, **D**: em frutos; **E** a **G**: seca de ramos e ponteiros; **H**: mumificação de frutos chumbinhos.

*Fotos - monitoramento da mancha manteigosa realizadas por Ferreira et al. (2005)



Figura 2 Sintomatologia da mancha manteigosa em campo. **A**: recepas e sintomas nas brotações; **B**, **E**: em plântulas sob copa; **C**: em mudas; **D**: perda de ramos plagiotrópicos; **F**: seca da parte apical.

*Fotos - monitoramento da mancha manteigosa realizadas por Ferreira et al. (2005)

2.4.2 Importância da mancha manteigosa

Nos últimos anos a mancha manteigosa vem ganhando destaque, pois as observações em campo têm revelado o aumento na sua incidência, e danos severos à planta quando o fitopatógeno ataca as flores e frutos em expansão. Nesse caso as plantas doentes não conseguem produzir frutos, mesmo com boa

brotação. À medida que começam a se desenvolver os frutos “chumbinhos”, mumificam e caem no solo, chegando a perdas totais das produções (COSTA; VENTURA; FERRÃO, 2003; FERREIRA et al., 2004).

2.4.3 Transmissibilidade de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da mancha manteigosa

Acredita-se que a transmissão de *C. gloeosporioides* seja via sementes infectadas (FERREIRA et al., 2004; OROZCO, 2003), pois em lavouras de café aparentemente sadias aparecem plantas isoladas ou pequenas reboleiras de plantas com sintomas foliares da mancha manteigosa. Além disso, abaixo dessas plantas, observa-se a presença de plântulas com sintomas característicos da doença (FERREIRA et al., 2004). Orozco (2003) colheu sementes de plantas com sintomas foliares de mancha manteigosa e semeou-as em areia estéril. O autor isolou dessas plântulas o fungo com as mesmas características daquelas observadas em isolados de plantas adultas sintomáticas, sugerindo que a doença é expressa somente em condições especiais de suscetibilidade da planta e ou modificação das condições ambientais.

Ferreira (2006) avaliou a transmissibilidade natural semente/planta da mancha manteigosa utilizando sementes de plantas doentes e plantas sadias da cultivar Catucaí, verificando que com o desenvolvimento das plântulas um grande número de hipocótilos de sementes de plantas com mancha manteigosa, enquanto sementes colhidas em plântulas sadias apresentaram plântulas vigorosas e em pleno desenvolvimento. Maia (2012) utilizando um isolado transformado com “*green fluorescent protein*” verificou que a transmissibilidade de *C. gloeosporioides* a partir de sementes de café é efetiva.

Vargas e Gonzalez (1972) conduziram um experimento enxertando plantas sadias sobre plantas com sintomas da doença, e após três anos, os ramos

provenientes dessa enxertia continuaram sadios, enquanto que plantas oriundas de sementes de plantas doentes apresentaram o sintoma característico da doença, fortalecendo a hipótese da transmissibilidade via sementes contaminadas.

2.5 Mecanismos de resistência das plantas a patógenos

A resistência de um hospedeiro, dentro do contexto da fisiologia do parasitismo, pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos (PASCHOLATI; LEITE, 1995). As plantas são expostas continuamente a um grande número de agentes patogênicos, o que torna necessária a formação de mecanismos de defesa para se proteger, através da montagem de barreiras que restringem a invasão do patógeno. Para um patógeno infectar a planta é necessário que o mesmo consiga penetrar e colonizar os tecidos do hospedeiro, retirar os nutrientes para sua sobrevivência, bem como neutralizar as reações de defesa das plantas (PASCHOLATI; LEITE, 1995; TAIZ; ZIEGER, 2004). Por sua vez, as plantas necessitam se defender dos microrganismos potencialmente invasores, utilizando diversos mecanismos de resistência. Esses podem ser subdivididos em pré e pós-formados, ou seja, existem antes da chegada do patógeno ou são ativados após a chegada do mesmo (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

No caso dos mecanismos de resistência pré-formados ou constitutivos, encontram-se fatores estruturais, tais como, a cutícula, tricomas, estômatos, vasos condutores ou fatores bioquímicos, os quais envolvem a presença de fenóis, alcaloides, fototoxinas, glicosídeos cianogênicos e fenólicos. Já para os pós-formados, as barreiras estruturais podem envolver a lignificação, suberificação, formação de papilas, camadas de abscisão e de cortiça e as tiloses.

Os fatores bioquímicos pós-formados englobam o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogenicidade (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

A interação planta/patógeno envolve mecanismos bioquímicos mediante os quais os genes de alerta são ativados, resultando na síntese de novos compostos e no aumento da atividade enzimática, fatores importantes para a defesa das plantas (SBALCHEIRO, 2006).

A infecção por fitopatógenos é acompanhada pela síntese de várias proteínas, conhecidas como proteínas relacionadas com a patogenicidade (PRPs), codificadas pela planta hospedeira. Essas são produzidas por plantas hospedeiras como resposta à infecção por patógenos e participam ativamente no fenômeno de resistência induzida (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997). Os mecanismos moleculares envolvidos na resistência sistêmica adquirida (SAR) indicam que o início dela é acompanhado por aumento local e sistêmico de níveis endógenos de ácido salicílico (MÉTRAUX et al., 1990) e simultaneamente, um aumento da expressão de um grupo enorme de genes incluindo aqueles que traduzem para proteínas PRP's, as quais apresentam atividade antimicrobiana (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). Várias enzimas são fundamentais na defesa das plantas contra os fitopatógenos, como as peroxidases, polifenoloxidasas, fenilalanina amônia-liases, entre outras. O aumento ou decréscimo na atividade dessas enzimas, relacionadas com a resposta de defesa das plantas a patógenos detectadas durante todo o curso do processo infeccioso é um fenômeno normal diante de todas as possíveis mudanças citológicas decorrentes da íntima interação patógeno/planta (PEREIRA et al., 2009).

As peroxidases (POX) são glicoproteínas capazes de catalisar diversas reações, como a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), importante nas reações de defesa das plantas, pois agem como sinalizador para outras respostas de defesa (SBALCHEIRO, 2006). A peroxidase é uma importante enzima

presente em plantas e está envolvida em diversas reações, como ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético (IAA), oxidação de fenóis, cicatrização de ferimentos, defesa de patógenos e regulação da elongação de células (CAMPOS et al., 2004.; KAO, 2003). Também estão envolvidas na resposta de hipersensibilidade (HR), síntese de lignina e suberina para o espessamento da parede celular por adição de compostos fenólicos (QUIROGA et al., 2000).

A polifenoloxidase (POL) participa na oxidação de vários tipos de compostos fenólicos que levam a produção de quinonas que são extremamente tóxicas para vários patógenos. Li e Steffens (2002) observaram que plantas de tomate transgênicas com super expressão de POL têm uma alta capacidade de oxidação e exibem maior resistência para *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

A fenilalanina amônia-liase (FAL), está diretamente envolvida no processo de produção de compostos fenólicos e lignificação da parede celular (NAKAZAWA; NOZUE; YASUDA, 2001). FAL catalisa a reação de deaminação do aminoácido L-fenilalanina com a formação do ácido trans-cinâmico, o qual é precursor de vários tipos de compostos fenólicos na rota dos fenilpropanoides, sendo a lignina o produto final (CAMPBELL; SEDEROFF, 1996). Essa reação é de suma importância para a produção de compostos fenólicos com potencial antimicrobiano, além de certas classes de fitoalexinas (SCHUSTER; RÉTEY, 1995).

Recentemente estudos visando resistência à antracnose têm sido realizados em diferentes interações envolvendo *Colletotrichum* spp (ANAND et al., 2009; CAMPOS et al., 2004; MAIA, 2012; SILVA et al., 2010).

2.6 Cultivares de cafeeiro resistentes a *Colletotrichum* spp.

Tem-se observado que a interação entre *Colletotrichum* spp. e plântulas de café é muito variável, dependendo da suscetibilidade do material genético, da variabilidade genética dos isolados e do tempo após a inoculação para expressar sintomas (ABREU; FERREIRA; MARTINS, 2008). Entretanto, grande parte dos trabalhos relacionados à resistência do cafeeiro a *Colletotrichum* spp. tem sido realizada em países onde a CBD ocorre, visando resistência ao *Colletotrichum kahawae*. A rápida expansão do CBD na África Oriental fez com que países como o Quênia e a Tanzânia desenvolvessem programas de hibridação para a obtenção de progênies que combinassem bons rendimentos com a resistência ao CBD e à ferrugem alaranjada (SILVA et al., 2006).

Em 1989, no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), milhares de progênies (de diferentes genótipos de cafeeiro) foram testadas com isolados de *C. kahawae* provenientes de diferentes regiões geográficas. Algumas linhas como o Rume Sudan e alguns derivados do HDT (Híbrido de Timor) exibiram elevados níveis de resistência. Níveis intermédios de resistência podem ser encontrados em derivados de híbridos intraespecíficos tetraploides de diversas origens (SILVA et al., 2006). Na Zâmbia uma linha pura derivada da variedade Colômbia exibe um elevado nível de resistência comparativamente às variedades Caturra e Catuai (SILVA et al., 2006).

Segundo Sera et al. (2009), muitos trabalhos relatam a ocorrência da resistência parcial ao *Colletotrichum kahawae*, entretanto pouco se sabe sobre a resistência ao *Colletotrichum* spp. no Brasil. Os mesmos autores encontraram diferentes níveis de resistência parcial à necrose dos frutos associada à presença de *Colletotrichum* spp. em avaliações de campo em cultivares e seleções de *Coffea arabica* L. Sera et al. (2007), ao realizar trabalhos no campo relatam que

a necrose de frutos é mais intensa em cafeeiros com maior produção e com mais frutos por nó produtivo.

Dorizzotto e Abreu (1993) através de testes em plântulas e em frutos verdes destacados encontraram suscetibilidade a um isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* em progênes de Catimor, Sarchimor e Cavimor e na cultivar Mundo Novo 379-19. Silva et al. (1998), mostraram que as cultivares Catuaí e Mundo Novo foram susceptíveis a isolados de *Colletotrichum* spp..

Orozco (2003) constatou em testes de resistência para frutos verdes, que as cultivares Mundo Novo IAC 319-19, Rubi MG 1192, Catuaí Amarelo IAC 62, Catuaí Vermelho IAC 99, Acáia Cerrado MG 1474 e Katipó, apresentaram maior número de frutos necrosados que as cultivares Apoatã e Icatu IAC 382 e estas mais suscetíveis que a Catucaí Vermelho e Tupi IAC 1669-33.

Ferreira et al. (2005), avaliaram a incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos de cafeeiro em diferentes estádios fisiológicos e nos tecidos do fruto maduro em oito cultivares e verificaram diferentes porcentagens de incidência desse patógeno. As cultivares Rubi-MG 1192 e Topázio MG 1190 foram as mais infectadas, em todos os tecidos estudados, ambas com 94,4% de colonização, enquanto que a cultivar Icatu IAC 3282 seguida pela Mundo Novo IAC 379-19 obtiveram os menores índices de colonização com 72,8% e 78,4% respectivamente. Essa observação permitiu inferir que a diferença entre as cultivares seja devido à herança genética, e que a maior resistência da cultivar Icatu ao fungo seja fonte de resistência para trabalhos de melhoramento genético visando resistência a *Colletotrichum* spp.

Marques (2009) estudou a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* em frutos verdes de cafeeiro, relatando a variabilidade na reprodução dos sintomas de antracnose entre as diferentes cultivares de cafeeiros utilizados, dentre as quais a cultivar IAPAR 59 mostrou maior resistência. Sera (2006) verificou que genótipos como Obatã IAC 1669-20, Catucaí Vermelho 4-79,

Catuaí Vermelho IAC-99 e IAPAR III-1-9, apresentaram baixa incidência de necrose dos frutos. O autor menciona que essa resistência seja derivada de cruzamento com *Coffea canephora*, pois essas cultivares possuem genes dessa espécie.

No Brasil grande parte da área cultivada com café arábica é composta por cultivares de germoplasma de Catuaí e Mundo Novo, representando um grande problema, já que essas duas cultivares, aparentemente, não são resistentes a *Colletotrichum* spp., podendo ter severas perdas de produção na cafeicultura brasileira (SERA, 2006).

Conclui-se que informações sobre resistência do cafeeiro ao *Colletotrichum* são de grande importância, uma vez que pouco se conhece sobre os genes de resistência, genes de virulência, agressividade dos diversos isolados de *Colletotrichum* spp., e a durabilidade da resistência (SERA, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Avaliação da resistência de genótipos de cafeeiro a *C. gloeosporioides*

Primeiramente foram avaliadas a severidade e a incidência da doença em plântulas de oito genótipos de cafeeiro.

3.1.1 Obtenção do isolado de *C. gloeosporioides*

O isolado de *C. gloeosporioides* foi obtido de hastes de cafeeiro, com sintomas foliares da mancha manteigosa, no campo experimental da UFLA. Tecidos infectados foram desinfestados com álcool etílico a 50% por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 1% por um minuto, lavados em água destilada esterilizada. Posteriormente, foram secos em papel filtro esterilizado e em seguida, transferidos para placa de Petri contendo meio de cultura MEA a 2% (extrato de malte e ágar). As placas foram incubadas por sete dias, em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. A partir dessas placas foram obtidas culturas monospóricas.

A patogenicidade desses isolados foi confirmada pela inoculação em folhas de cafeeiro da cultivar Catuaí. Foi selecionado o isolado mais agressivo ao cafeeiro.

Esse foi denominado UFLA 77 e para sua preservação, discos de micélio foram mantidos em água destilada e esterilizada (CASTELLANI, 1967).

3.1.2 Obtenção das plântulas de cafeeiro

As plântulas foram obtidas a partir de sementes sadias de cafeeiro produzidas na safra de 2010/2011 na Fazenda Experimental da EPAMIG no município de Três Pontas MG.

As sementes foram obtidas de frutos no estádio cereja, colhidos manualmente. Os frutos foram submetidos ao despolpamento e, em seguida, as sementes foram desmuciladas por fermentação em água, por 24 horas. Após a retirada da mucilagem, as sementes foram lavadas em água corrente e dispostas em bandejas forradas com papel filtro esterilizado e colocadas à sombra para a retirada do excesso de água. Posteriormente, as mesmas foram colocadas em sementeira contendo areia e logo após a emissão da radícula foram transferidas para bandejas de isopor com 128 células contendo o substrato comercial Plantmax®.

Foram utilizadas oito cultivares de cafeeiro descritas a seguir:

- **Oeiras MG 6851**- Originada a partir do híbrido CIFC HW 26/5, resultante do cruzamento entre o Caturra Vermelho (CIFC 19/1) e híbrido de Timor (CIFC 832/1).

- **Paraíso H 419-1** – É resultado da hibridação artificial de Catuaí Amarelo IAC30 com o acesso de Híbrido de Timor 445-46, originado da introdução do Centro de Investigações das Ferrugens do Cafeeiro – CIFC 2570. As sementes recebidas pela UFV, dessa introdução, foram oriundas da seleção realizada na estação regional de Uige, em Angola com registro ERU 209-15.

- **Araponga MG 1**- É derivada da hibridação artificial entre Catuaí Amarelo IAC 86 (UFV 2154-345 EL7) e o Híbrido de Timor UFV 446-08, o último como doador de genes responsáveis pela resistência à ferrugem. As gerações segregantes foram conduzidas pelo método genealógico para a obtenção dessa cultivar.

- **Sacramento MG-1** – É derivado da hibridação artificial entre Catuaí Vermelho IAC81 (UFV 2145-79 EL7) e o Híbrido de Timor UFV 438-52 (doador de resistência à ferrugem). Para obtenção dessa cultivar foi adotado o método genealógico de condução das gerações segregantes .

- **Catiguá MG-2** – Resultante da hibridação artificial entre Catuaí Amarelo IAC 86 (UFV 2154-344 EL7) e uma planta selecionada de Híbrido de Timor (UFV 440-10) como doadora de resistência a *H. vastatrix*. O método genealógico foi adotado no processo.

- **Pau-Brasil MG 1** – Derivada da hibridação artificial entre Catuaí Vermelho IAC 141 (UFV 2194-141 EL7) e o Híbrido de Timor UFV 442-34 (doador de genes responsáveis pela resistência à ferrugem).

- **Catuaí Vermelho IAC 144** - Originou-se a partir de um cruzamento artificial entre cafeeiros selecionados, pela produtividade, das cultivares Caturra Amarelo de prefixo IAC 476-11 e Mundo Novo, IAC 374-19, de *C. arábica*.

- **Mundo Novo IAC 376/4** - Corresponde a uma recombinação resultante de um cruzamento natural entre as cultivares Sumatra e Bourbon Vermelho, encontrada no município paulista de Mineiros do Tietê. Sementes de um desses cafeeiros foram plantadas no município de Mundo novo, hoje Urupês (SP), onde foram selecionadas as plantas matrizes que deram origem a cultivar Mundo Novo.

3.1.3 Inoculação e avaliação

A inoculação foi realizada nas folhas cotiledonares das plântulas no estágio “orelha de onça”. Vinte e quatro horas antes da inoculação foi preparada uma câmara úmida com saco plástico e as plântulas foram mantidas em BOD com temperatura média de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

A inoculação foi feita utilizando suspensão de conídios do isolado UFLA 77 de *C. gloeosporioides* na concentração de 2×10^6 . A suspensão de conídios foi atomizada tanto na face abaxial como na face adaxial das folhas. Para permitir a penetração e colonização, o tecido foliar foi previamente ferido num diâmetro de 1,4 cm com um conjunto de agulhas entomológicas. Quarenta e oito horas após a inoculação a câmara úmida feita com saco plástico foi retirada. As plântulas inoculadas foram mantidas em BOD com temperatura média de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações da severidade da doença foram realizadas aos 2, 6, 11 e 16 dias após a inoculação. Para a avaliação da severidade foi utilizada uma escala de notas adaptada por Várzea (1995) (Tabela 1).

Tabela 1 Critérios de avaliação do espectro de reação a *Colletotrichum* sp. apresentados por plantas de café

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

A partir desses dados foi determinado o índice da doença (ID), conforme a fórmula proposta por Cirulli e Alexander (1966 citado por CARVALHO, 2004):

$$\text{ID: } \sum (F \times V) / (N \times X) \times 100, \text{ em que:}$$

F: número de folhas com determinado grau de sintomas;

V: grau de sintomas;

N: número total de folhas inoculadas;

X: grau máximo se sintomas.

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

$$\text{AACPD} = \sum [(X_i + X_{i+1})/2](t_{i+1} - t_i), \text{ em que:}$$

X: intensidade da doença;

t: tempo;

n: número de avaliações no tempo;

A partir dos dados da incidência nas folhas, foi calculada área abaixo da curva de progresso da incidência da doença (AACPI) (SHANER; FINNEY, 1977).

$$\text{AACPI} = \sum [(X_i + X_{i+1})/2](t_{i+1} - t_i), \text{ em que:}$$

X: % de incidência;

t: o tempo;

n: o número de avaliações no tempo;

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com quatro repetições constituídas por cinco plântulas com as duas folhas cotiledonares inoculadas.

Os dados de AACPD e AACPI foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) utilizando o *software* estatístico Sisvar (FERREIRA, 2000).

3.2 Avaliação da resposta de defesa de cafeeiro contra *Colletotrichum gloeosporioides*

Para a avaliação da resposta de defesa do cafeeiro ao *C. gloeosporioides* foram determinadas a atividade das proteínas totais, das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase.

3.2.1 Obtenção das mudas de café

Para a avaliação bioquímica das respostas de defesa foi selecionada a cultivar Paraíso MG h419-1 que apresentou maior resistência a *C. gloeosporioides* em comparação a cultivar Catuai Vermelho 144 que apresentou menor resistência ao fungo.

A produção das mudas foi realizada como descrito anteriormente, porém foram utilizadas mudas com três pares de folhas verdadeiras. Os tratamentos constituíram das duas cultivares descritas acima, com e sem inoculação com *C. gloeosporioides*.

3.2.2 Inoculação

Vinte e quatro horas antes da inoculação foi preparada uma câmara úmida com saco plástico, temperatura média de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A inoculação foi realizada utilizando suspensão de conídios do isolado de *C. gloeosporioides* na concentração de 2×10^6 . Para tanto, foi depositada uma gota (10 μL) da

suspensão na face abaxial das folhas do segundo par de folhas verdadeiras, em um círculo com 1,4 cm de diâmetro previamente ferido com um conjunto de agulhas para permitir a penetração e colonização do fungo. Posteriormente, sobre a área inoculada, colocou-se um disco de papel semipermeável com 1,4 cm de diâmetro, previamente umedecido, formando uma microcâmara úmida (ABREU, 1988). Essa microcâmara úmida foi retirada 48 horas após a inoculação, juntamente com a câmara úmida feita com saco plástico. As plântulas inoculadas foram mantidas em temperatura média de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

3.2.3 Coleta de material para análise

Para a determinação da atividade das proteínas totais, das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase foram avaliadas cinco mudas de café nos tempos de 24, 48, 96 e 144 horas após inoculação.

Após a coleta, as amostras foram envolvidas em papel alumínio, identificadas, mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em *freezer* (-80°C). Para o preparo dos extratos enzimáticos cada amostra congelada foi macerada individualmente com um pistilo em almofariz de porcelana até se obter um pó fino. Um grama desse pó foi homogeneizado sob agitação em 5 mL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 7, contendo PMSF (Fluoreto de fenilmetanosulfonil) 1 mM e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM. O extrato foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi colocado em microtubos de 2 mL e armazenados a -80°C para análises posteriores.

Todas as análises bioquímicas foram realizadas em triplicata.

3.2.4 Determinação de proteínas totais

A determinação das concentrações das proteínas solúveis totais foi realizada de acordo com o método proposto por Bradford (1976), sendo a concentração das proteínas calculada com base em curva padrão de albumina sérica bovina (BSA). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm. Os ensaios foram conduzidos em triplicatas e os resultados foram expressos em miligrama de proteínas por mililitro de extrato. Os resultados foram utilizados para o cálculo da peroxidase de guaiacol, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase. (ANEXO A, Tabela 18).

3.2.5 Peroxidase de guaiacol

A atividade de peroxidase de guaiacol (POX) foi determinada pela adição de 20 μL do extrato enzimático a uma solução contendo 100 μL de tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,2), 40 μL de guaiacol (500 mM), 20 μL peróxido de hidrogênio (150 mM) e 20 μL de água (URBANEK; KUZNIAK-GEBAROWSKA; HERKA, 1991) em microplacas de 96 cavidades. A incubação ocorreu a 30 °C por 10 minutos e a leitura foi realizada a 470 nm. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 26,6 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ e expressa como unidade de atividade por miligrama de proteína por minuto ($\text{U mg}^{-1} \text{P min}^{-1}$).

3.2.6 Polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidases (PPO) foi determinada pela adição de 25 μL do extrato enzimático em uma solução contendo 100 μL de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,0), 25 μL de catecol (100 mM) e 50 μL de

água (GAUILLARD; RICHARD-FORGET; NICOLAS, 1993) em microplaca de 96 cavidades. Após incubação a 30 °C por 10 minutos a absorbância foi medida a 410nm. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de $3.450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expressa como unidade de atividade por miligrama de proteína por minuto ($\text{U mg}^{-1} \text{ P min}^{-1}$).

3.2.7 Fenilalanina amônia-liase

A atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) foi determinada pela adição de 10 μL do extrato enzimático, ajustado para 250 μL de solução contendo 100 μL de tampão Tris- HCL (100 mM pH 8,8), 50 μL de fenilalanina (40 mM) e 40 μL de água Mori, Sakurai e Sakuta (2001). A solução foi incubada a 37°C por 30 minutos, a reação foi paralisada utilizando 50 μL de ácido clorídrico 6N. A absorbância foi medida em espectrofotômetro 280 nm.

3.2.8 Delineamento experimental e análise dos dados

O experimento para a avaliação das atividades enzimáticas foi instalado em blocos casualizados com três repetições e parcela de cinco plantas por coleta. As médias das atividades enzimáticas dentro de cada tempo de coleta, quando significativas pelo teste F, foram agrupadas pelo teste de Scott Knott ($P \leq 0,05$) utilizando-se o programa estatístico Sisvar[®] (FERREIRA, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação de genótipos de cafeeiro quanto à resistência a *Colletotrichum gloeosporioides*

Grande parte dos trabalhos que avaliaram a resistência do cafeeiro ao *C. gloeosporioides* foram realizados através da inoculação em frutos ou hipocótilos. No presente trabalho foi a primeira vez que se utilizou a inoculação em folhas cotiledonares. Os sintomas observados foram manchas irregulares, de coloração castanha a castanho acinzentada.

Todas as cultivares utilizadas apresentaram susceptibilidade ao isolado de *C. gloeosporioides* UFLA 77. No entanto, houve uma “interação diferencial” entre os genótipos utilizados. Dois grupos diferiram quanto à resistência. No primeiro grupo as cultivares Paraíso MG h419-1, Catiguá MG-2, Oeiras MG-6851 e Sacramento MG-1 se comportaram de maneira homogênea e apresentaram uma maior resistência, diferindo das cultivares Catuaí Vermelho IAC 144, Mundo Novo IAC 376/4, Pau-Brasil MG-1 e Araçuaia MG1 que apresentaram menor resistência e não diferiram entre si. Os resultados podem ser vistos no Gráfico 1 onde expressa a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD).

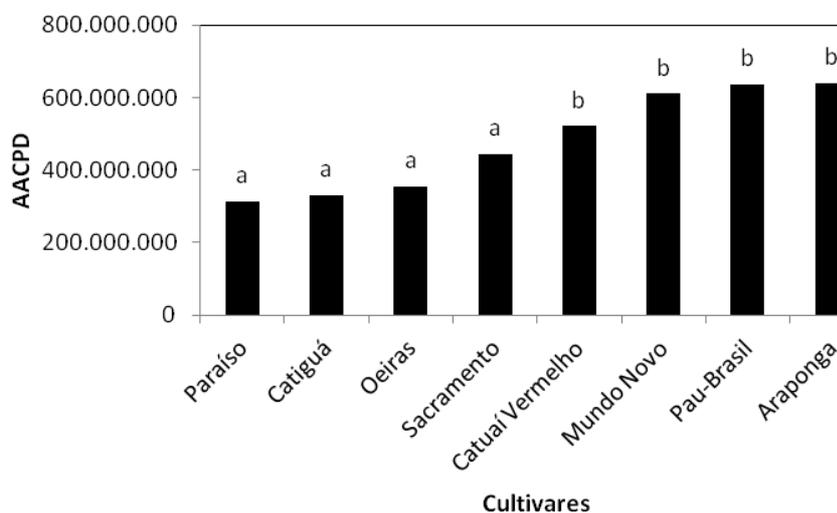


Gráfico 1 Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), para oito cultivares de cafeeiro. Valores seguidos da mesma letra pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$). CV 28,69%

As cultivares Paraíso MG h419-1, Catiguá MG-2, Oeiras MG-6851, Sacramento MG-1, Pau-Brasil MG-1 e Araponga MG1 são descendentes do Híbrido de Timor (HDT). Sabe-se que HDT é portador de resistência ao *Colletotrichum kahawae* (Rodrigues Júnior, Gonçalves e Várzea, 2004) e segundo Van der Vossen e Walyaro (1980) a resistência do HDT ao *C. kahawae* provavelmente provém do *C. canephora*. Sera et al. (2007) ao estudar a resistência de frutos de cafeeiro ao *C. gloeosporioides* constataram que a resistência é provavelmente derivada do *C. canephora* Pierre. No entanto, no presente trabalho foram observados diferentes níveis de resistência entre os genótipos descendentes do HDT, tal fato é devido à utilização de diferentes materiais de HDT como progenitores visando apenas à resistência ao fungo *Hemileia vastatrix*. Isso mostra que para resistência ao *Colletotrichum* podem estar envolvidos outros mecanismos de defesa.

O controle genético pode ser determinado por resistência horizontal, ou quantitativa (vários genes de pequenos efeitos) e, por resistência qualitativa (advinda de poucos genes de grande efeito na redução da intensidade da doença). Neste trabalho, não foi verificada imunidade à doença, mas sim eficiência de infecção diferenciada nos genótipos estudados, o que indica que o tipo de resistência encontrada pode ser horizontal (Gráfico 2). Segundo Ribeiro, Bergamim Filho e Carvalho (1981), a resistência horizontal pode ser indicada pela menor severidade.

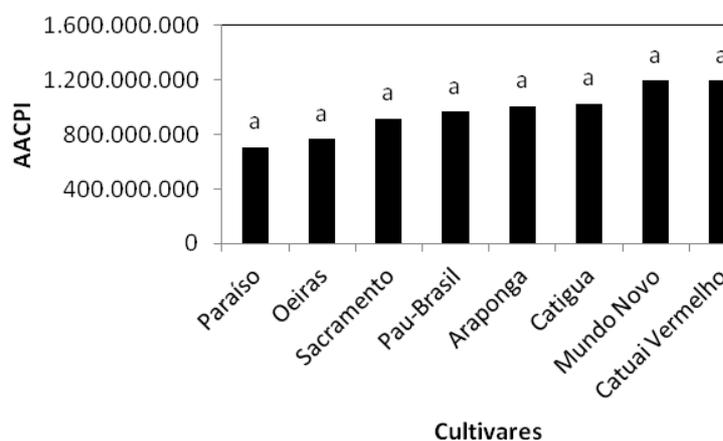


Gráfico 2 Área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) para oito cultivares de café. Valores seguidos da mesma letra pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$). CV 29,23%

Ao comparar a avaliação por severidade e por incidência, a severidade é uma medida de avaliação mais trabalhosa e que requer um maior conhecimento da enfermidade estudada, porém, ela expressa melhor a área ou quantidade de tecido lesionado pela doença. Por outro lado, a incidência é a característica de mais fácil e de rápida quantificação (VALE et al., 2004). No entanto, para programas de melhoramento que avaliam grande número de genótipos,

associações entre os valores de AACPD e AACPI nas avaliações são importantes para as discriminações dos níveis de resistência. Para a metodologia usada neste trabalho, observou-se, no entanto, que os resultados indicaram que considerar apenas a avaliação da incidência não proporciona dados equivalentes à AACPD, o que poderia comprometer a discriminação da resistência.

4.2 Atividade Peroxidase (POX)

Não houve diferença na atividade da POX entre plantas inoculadas e plantas não inoculadas para cada cultivar. Ao comparar as duas cultivares pode-se verificar que a cultivar Paraíso apresentou uma maior atividade da POX nas avaliações de 24 e 48 h.a.i. em relação a cultivar Catuaí Vermelho. (Gráfico 3)

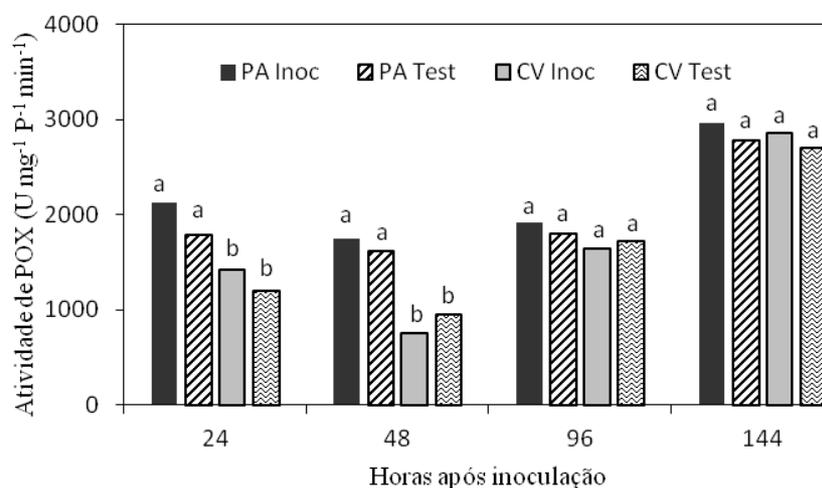


Gráfico 3 Atividade específica da Peroxidase em mudas de café determinada em diferentes épocas após a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides*. Mudas da cultivar Paraíso inoculadas com Cg (PA Inoc), mudas cultivar Paraíso não inoculadas (PA Test), mudas da cultivar Catuaí Vermelho inoculadas com Cg (CV Inoc) e mudas da cultivar Catuaí Vermelho inoculadas não inoculadas (CV Test). Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada período pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade

A atividade da POX é frequentemente aumentada em resposta ao ataque de fitopatógenos (ANTEROLA; LEWIS, 2002). Os papéis das POXs na defesa de plantas é o fortalecimento da parede celular como a formação de lignina, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, ou seja, proteção celular contra reações oxidativas e aumento na produção das fitoalexinas (KRISTENSEN; BLOCH; RASMUSSEN, 1999).

Neste trabalho, não foi verificada diferença na atividade da POX entre plantas inoculadas com o patógeno e as testemunhas inoculadas com água. Isto pode estar relacionado ao ferimento realizado nas plantas para inoculação. No entanto, segundo Hiraga et al. (2000), vários genes relacionados a atividade da

POX estão relacionados tanto a ferimentos quanto à infecção por patógenos ou tratamentos com elicitores, porém, esses genes podem responder diferentemente para ferimentos e para infecção por patógenos. Incrementos na atividade da peroxidase, associados a ferimentos em vegetais, podem indicar aumento na biossíntese de lignina, esta atua como uma barreira à infecção microbiana e também pode promover aumentos na concentração de produtos de oxidação de fenólicos (MERRIOTT et al., 1978). Silva et al. (2008) ao estudarem a interação *Hemileia vastatrix* e cafeeiro, relacionaram o aumento de atividade da POX a reação de hipersensibilidade e a lignificação das paredes da célula hospedeira.

Maia (2012) e Ogoshi (2011) relacionam o incremento na atividade da POX à resposta de defesa do cafeeiro ao *C. gloeosporioides*. Neste trabalho, a maior atividade da POX para a cultivar Paraíso pode estar relacionada a maior resistência dessa cultivar em relação a cultivar Catuaí Vermelho, porém, outras enzimas como a quitinase, lipoxigenase entre outras podem também estar envolvidas na resposta de defesa das plantas.

4.3 Atividade Polifenoloxidase (POL)

A atividade da POL foi de maneira geral semelhante entre plantas inoculadas com o patógeno e não inoculadas com o patógeno, a única exceção foi verificada para cultivar Paraíso 96 h.a.i. quando a atividade da POL foi maior em plantas não inoculadas. A cultivar Paraíso apresentou uma maior atividade da POL em relação a cultivar Catuaí Vermelho a 48 h.a.i., no entanto, a 144 h.a.i. A Cultivar Catuaí Vermelho apresentou um maior incremento da atividade da POL em relação a cultivar Paraíso. (Gráfico 4)

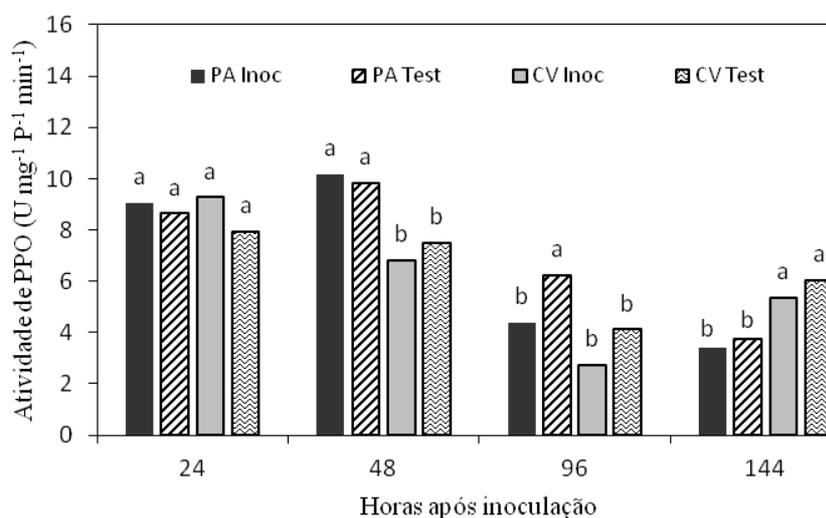


Gráfico 4 Atividade específica da Polifenoloxidase em mudas de café determinada em diferentes épocas após a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides*. Mudas da cultivar Paraíso inoculadas com Cg (PA Inoc), mudas da cultivar Paraíso inoculadas não inoculadas (PA Test), mudas da cultivar Catuaí Vermelho inoculadas com Cg (CV Inoc) e mudas da cultivar Catuaí Vermelho não inoculadas (CV Test). Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada época pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade

Segundo Wheatley (1982 citado por CAMPOS et al., 2004) a ação da polifenoloxidase processa-se por meio da hidroxilação de monofenóis para o-difenóis e oxidação destes o-difenóis para quinonas. Campos et al. (2004), ao estudarem a atividade da POL na resistência do feijão à antracnose, relatam que a importância da atividade da POL na resistência a doenças deve-se, provavelmente, a sua propriedade em oxidar compostos fenólicos para quinonas, os quais são muito mais tóxicos aos microrganismos do que o fenol original, e à sua ação protetora no local do ferimento.

Melo, Shimizu e Mazzafera (2006) compararam a atividade da POL em folhas de café da cultivar Mundo Novo e HDT inoculadas com *H. vastatrix*, interação compatível e incompatível respectivamente. Esses autores constataram um incremento na atividade da POL somente para o HDT que é resistente à ferrugem. Para o patossistema *Colletotrichum* x cafeeiro, neste trabalho foi observado que apesar de se utilizar uma cultivar de *Coffea arábica* e uma derivada do cruzamento entre *Coffea arábica* x HDT resistente a *H. vastatrix*, ambas as cultivares apresentaram expressão da POL como resposta de defesa.

No patossistema *C. gloeosporioides* x cafeeiro o aumento da atividade da POL foi relacionado à resposta de defesa da planta por Maia (2012) e Ogoshi (2011). Apesar de existirem outras enzimas relacionadas à resistência de plantas a patógenos, a maior atividade da POL 48 h.a.i. para a cultivar Paraíso pode estar relacionada a maior resistência dessa cultivar em relação a cultivar Catuai Vermelho. Segundo Lins (2006) é a partir de 48 h.a.i. que ocorre invasão do mesófilo das folhas do cafeeiro por hifas do *C. gloeosporioides*, quando é realizado ferimento para inoculação, o que indica ser possível a atuação da enzima na resistência dessa cultivar a *C. gloeosporioides*.

4.4 Atividade da Fenilalanina amônia-liase (FAL)

Para a atividade da FAL não houve diferença significativa entre os tratamentos. (Gráfico 5)

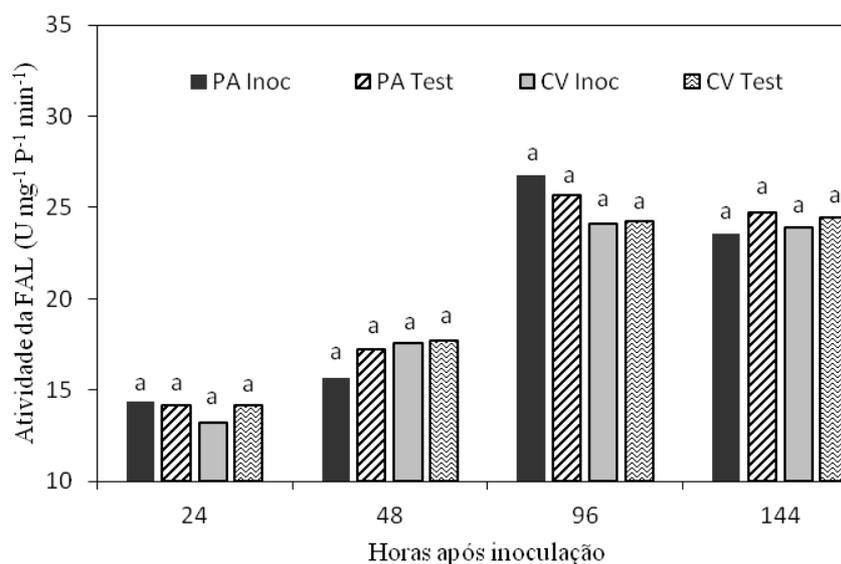


Gráfico 5 Atividade específica de fenilalanina amônia-liases em mudas de café determinada em diferentes épocas após a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides*. Mudas da cultivar Paraíso inoculadas com Cg (PA Inoc), mudas da cultivar Paraíso não inoculadas (PA Test), mudas da cultivar Catuai Vermelho inoculadas com Cg (CV Inoc) e mudas da cultivar Catuai Vermelho não inoculadas (CV Test). Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada época pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade

A atividade da FAL está relacionada à resistência de plantas a patógenos, notadamente, por estar envolvida no primeiro passo da síntese dos fenilpropanoides, com participação de fenilalanina e sua conversão em ácido-transcinâmico, catalisada pela FAL, resultando em compostos como fitoalexinas e, principalmente, lignina, que confere maior resistência à parede celular das plantas aos patógenos (NAKAZAWA; NOZUE; YASUDA, 2001).

5 CONCLUSÃO

O uso de mudas com folhas cotiledonares inoculadas permite inferir sobre a resistência do cafeeiro a *C. gloeosporioides* e para separar os genótipos em diferentes níveis.

As cultivares Paraíso MG h419-1, Catiguá MG-2, Oeiras MG-6851 e Sacramento MG-1 apresentam maior resistência ao *C. gloeosporioides*.

Os aumentos da atividade da POX e da POL podem estar relacionados à resistência do cafeeiro ao *C. gloeosporioides*.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. S.; FERREIRA, J. B.; MARTINS, F. G. **Mancha manteigosa no contexto do complexo *Colletotrichum* em cafeeiros**. In: SIMPÓSIO DE MANEJO DE PLANTAS: MANEJO FITOSSANITÁRIO DO CAFEERIO, 8., 2008, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2008. p. 105-126.

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

ANAND, T. et al. Defence responses of chilli fruits to *Colletotrichum capsici* and *Alternaria alternata*. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 53, p. 553-559, 2009.

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

BITANCOURT, A. A. As manchas da folha do cafeeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 24, n. 10, p. 191-201, out. 1958.

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

BRIDGE, P. D. et al. Variability of *Colletotrichum kahawae* in relation to other *Colletotrichum* species from tropical perennial crops and the development of diagnostic techniques. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, p. 274–280, 2008.

CAI, L. et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Mataran, v. 39, p. 183–204, 2009.

CAMPBELL, M.; SEDEROFF, R. Variation in lignin content and composition: mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 110, p. 3, 1996.

CAMPOS, A. D. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

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

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

CHALFOUN, S. M. **Doenças do cafeeiro**: importância, identificação e métodos de controle. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 93 p.

CHEN, Z. J.; LIANG, J.; RODRIGUES, C. J. J. *Colletotrichum gloeosporioides* can overgrow *Colletotrichum kahawae* on green coffee berries first inoculated with *C. kahawae*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 27, p.679–682, 2005.

CHEN, Z. J. **Morphocultural and pathogenic comparisons between *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from coffee berries**. 2002. 163 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica) – Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2002.

CIRULLI, M.; ALEXANDER, L. J. A comparison of pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f. *licopersici* and different sources of resistance in tomato. **Phytopathology**, Ithaca, v. 56, p. 1301-1304, 1966.

COMPANHIA NACIONAL ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: jan. 2012.

COSTA, H.; VENTURA, J. A.; FERRÃO, M. A. Mancha manteigosa em café arábica na região serrana do Estado do Espírito Santo. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 3., 2003, Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro: Embrapa Café, 2003. p. 206.

DIAS, M. D. **Caracterização morfológica, Bioquímica e Patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. Em *Coffea arabica* L.** 2002. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

DORIZZOTTO, A.; ABREU, M. S. Reação de plântulas e frutos verdes de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) a *Colletotrichum coffeanum* NOACK e *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 1993, Piracicaba. **Palestras e Resumos...** Piracicaba: SBF, 1993. p. 124. Supl.

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

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

FERREIRA, J. B. et al. Efeito de fungicidas no controle da seca de ramos do cafeeiro (*C. arabica* L.) com mancha manteigosa (*Colletotrichum* spp.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 111-111, ago. 2005.

FERREIRA, J. B. et al. Prejuízos ocasionados pela mancha manteigosa em cafeeiros (*Coffea arabica* L.). In: ENCONTRO SUL MINEIRO DE CAFEICULTURA, 10. 2004, Lavras; SIMPÓSIO DE PESQUISA CAFEIEIRA DO SUL DE MINAS, 5., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: Necaf, 2004. 1 CD ROM.

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

GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F.; NICOLAS, J. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 215, p. 59-65, 1993.

GIBBS, J. N. Inoculum sources for coffee berry disease. **Annals of Applied Biology**, Hoboken, v. 64, p. 515-522, 1969.

HINDORF, H. *Colletotrichum* spp. isolated from *Coffea arabica* L. in Kenya. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, Local, v. 77, p. 328-331, 1970.

HIRAGA, S. et al. Wound-induced expression of a tobacco peroxidase is not enhanced by ethephon and suppressed by methyl jasmonate and coronatine. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 41, n. 2, p. 165-170, 2000.

JULIATTI, F. C. et al. Agressividade e divergência genética por RAPD de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* coletados em lavouras cafeeiras de Minas Gerais. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 22, n. 2, p. 159-169, 2006.

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

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

LI, L.; STEFFENS, J. C. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. **Planta**, Berlin, v. 215, p. 239-247, 2002.

LINS, S. R. O. **Estudos hispatológicos da mancha manteigosa em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e comportamento de isolados de *Colletotrichum* spp. em plantas obtidas por cultura de embrião**. 2006. 104 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MAIA, F. G. M. ***Colletotrichum gloeosporioides*: transmissibilidade em sementes e mecanismos de defesa em mudas micropropagadas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2012. 101p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

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

MARQUES, V. V. **Patogenicidade e variabilidade genética de *Colletotrichum* spp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2009. 114 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

MASABA, D.; WALLER, J. M. Coffee berry disease: the current status. In: BAILEY, J. A.; JEGGER, M. J. (Ed.). ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 237-249.

MC DONALD, J. A preliminary account of a disease of green coffee berries in Kenya colony. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 11, p. 145–154, 1926.

MELO, G. A.; SHIMIZU, M. M.; MAZZAFERA, P. Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. **Phytochemistry**, New York, v. 67, p. 277–285, 2006.

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

MORI, T.; SAKURAI, M.; SAKUTA, M. Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. **Plant Science**, Limerick, v. 160, p. 355-360, 2001.

NAKAZAWA, A.; NOZUE, M.; YASUDA, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 114, p. 323-328, 2001.

NECHET, K. L.; ABREU, M. S. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1135-1142, nov./dez. 2002.

NECHET, K. S. **Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1999. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

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

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

OGOSHI, C. **Fosfito de Potássio no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de plantas de cafeeiro com sintoma de mancha manteigosa**. 2011. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

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

PARESQUI, L. **Patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ ao cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2003. 44 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

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

PEREIRA, I. S. **Compatibilidade vegetativa e sexual do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado ao cafeeiro e estudos histopatológicos**. 2005. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

PEREIRA, S. C. et al. Aplicação foliar de silício na resistência da soja à ferrugem e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 164-170, 2009.

PRIHASTUTI, H. et al. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand . **Fungal Diversity**, Mataran, v. 39, p. 89-109, 2009.

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

RAYNER, R. W. Latent Infection in *Coffea arabica* L. **Nature**, London, v. 161, n. 4085, p. 245-246, 1952.

RIBEIRO, I. J. A.; BERGAMIM FILHO, A.; CARVALHO, P. C. T. Avaliação da resistência horizontal a *Hemileia vastatrix* Berk et Br. em cultivares de *Coffea arabica* L. em condições naturais de epidemia. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 7, n. 1/2, p. 80-95, abr./jun. 1981.

RODRIGUES JÚNIOR, C. J.; GONÇALVES M. M.; VÁRZEA, V. M. P. Importância do híbrido de Timor para o território e para o melhoramento da cafeicultura mundial. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, v. 27, n. 2/4, p. 203-216, 2004.

SBALCHEIRO, C. C. **Ação do biocontrolador com atividade de indução de resistência no controle do cretamento bacteriano comum do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2006. 112 p. Dissertação (Mestre em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Passo Fundo, 2006.

SCHUSTER, B.; RÉTEY, J. The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase: the role of prosthetic dehydrolanine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, p. 8433-8437, 1995.

SERA, G. H. **Comportamento em campo de genótipos de café Arabica a necrose dos frutos associado ao *Colletotrichum* spp.** 2006. 90 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Miologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

SERA, G. H. et al. Partial resistance to fruit necrosis associated to *Colletotrichum* spp. among arabic coffee genotypes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 3, p. 395-402, 2007.

SERA, G. H. et al. Partial resistance to fruit necrosis in arabic coffee genotypes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 2031-2037, 2009.

SHANER, G.; FINNEY, R. F. The effects of nitrogen fertilization on the expression of show-mildwing in knox wheat. **Phytopathology**, Ithaca, v. 67, p. 1051 -1055, 1977.

SILVA, C. C. N. et al. Características fisiológicas e genéticas de isolados de *Colletotrichum* sp. Coletados em lavouras cafeeiras (*Coffea arabica* L.) de Minas Gerais. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA EM CAFEICULTURA IRRIGADA, 1., 1998, Araguari, MG. **Anais...** Araguari: [s. n.], 1998. p. 97-100.

SILVA, F. A. C. et al. Descritores bioquímicos em cultivares de algodoeiro em resposta à inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 2, p. 114-118, 2010.

SILVA, M. C. et al. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, p. 119-147, 2006.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 449-484.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, H. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologia Plantarum**, New York, v. 13, p. 43-50, 1991.

VALE, F. X. R. et al. Quantificação de doenças e do crescimento do hospedeiro. In: VALE, F. X. R.; JESUS JÚNIOR, W. C.; ZAMBOLIM, L. **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perfil, 2004. p. 95-96.

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

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

VARZEA, V. M. P. et al. Resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O Estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 321-368.

VARZEA, V. M. P.; RODRIGUES JÚNIOR, C. J.; SILVA, M. C. M. L. Resistência do cafeeiro à antracnose dos frutos verdes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O Estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 321-368.

VARZEA, V. M. P. **Variabilidade em *Colletotrichum* spp. de cafeeiro. Pesquisa de fontes de resistência ao *C. kahawae***. 1995. 128 p. Dissertação (Investigador auxiliar) – Instituto de Investigação Científica Tropical, Lisboa, 1995.

WALLER, J. M. Coffee rust epidemiology and control. **Crop Protection**, Guildford, v. 1, p. 385-404, 1982.

WALLER, J. M. et al. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 8, p. 989-994, 1993.

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

WHEATLEY, C. **Studies on cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root post-harvest physiological deterioration**. 1982. 242 p. Thesis (PhD) - University of London, London, 1982.

ANEXOS

ANEXO A – TABELAS

Tabela 1 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados da área abaixo da curva de progresso da doença, para oito cultivares de cafeeiro. UFLA, Lavras, MG, 2012

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamento	7	537852,752637	76836,107520	2,439	0,0060
Bloco	3	226117,525613	75372,508538	1,247	0,0221
Erro	21	399984,289037	19046,870907		
CV(%)	28.69				

Tabela 2 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados da área abaixo da curva de progresso da incidência para oito cultivares de cafeeiro. UFLA, Lavras, MG, 2012

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamento	7	693278,207650	99039,743950	2,439	0,0537
Bloco	3	151826,597925	50608,865975	1,247	0,3181
Erro	21	852608,818775	40600,419942		
CV(%)	21.11				

Tabela 3 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados da atividade da peroxidase em mudas de cafeeiro coletadas 24 horas após a inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2012

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamento	3	1486015,895758	495338,631919	5,908	0,0318
Bloco	2	64864,301717	32432,150858	0,387	0,6950
Erro	6	503080,725017	83846,787503		
CV(%)	17.66				

Tabela 4 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados da atividade da peroxidase em mudas de cafeeiro coletadas 48 horas após a inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2012

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamento	3	2139236,406300	713078,802100	9,420	0,0109
Bloco	2	83109,063350	41554,531675	0,549	0,6041
Erro	6	454212,967450	75702,161242		
CV(%)	21.67				

Tabela 5 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados da atividade da peroxidase em mudas de cafeeiro coletadas 96 horas após a inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2012

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamento	3	115230,964892	38410,321631	0,215	0,8827
Bloco	2	741996,804617	370998,402308	2,075	0,2065
Erro	6	1072607,219783	178767,869964		
CV(%)	23.82				

Tabela 6 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados da atividade da peroxidase em mudas de cafeeiro coletadas 144 horas após a inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2012

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamento	3	107557,194425	35852,398142	0,144	0,9300
Bloco	2	124591,380817	62295,690408	0,250	0,7865
Erro	6	1495124,036450	249187,339408		
CV(%)	17.62				

Tabela 7 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados da atividade da polifenoloxidase em mudas de cafeeiro coletadas 24 horas após a inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2012

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamento	3	3,201892	1,067297	0,790	0,5422
Bloco	2	0,106017	0,053008	0,039	0,9618
Erro	6	8,107583	1,351264		
CV(%)	13.32				

Tabela 8 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados da atividade da polifenoloxidase em mudas de cafeeiro coletadas 48 horas após a inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2012

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamento	3	25,049167	8,349722	5,930	0,0316
Bloco	2	2,451617	1,225808	0,871	0,4656
Erro	6	8,448383	1,408064		
CV(%)	13.83				

Tabela 9 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados da atividade da polifenoloxidase em mudas de cafeeiro coletadas 96 horas após a inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2012

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamento	3	18,617092	6,205697	11,106	0,0073
Bloco	2	0,240000	0,120000	0,215	0,8127
Erro	6	3,352733	0,558789		
CV(%)	17.10				

Tabela 10 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados da atividade da polifenoloxidase em mudas de cafeeiro coletadas 144 horas após a inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2012

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamento	3	14,181958	4,727319	25,762	0,0008
Bloco	2	0,258050	0,129025	0,703	0,5317
Erro	6	1,101017	0,183503		
CV(%)	9,22				

Tabela 11 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados da atividade da Fenilalanina Amônia Liase em mudas de cafeeiro coletadas 24 horas após a inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2012

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamento	3	2,242200	0,747400	0,181	0,9058
Bloco	2	26,706467	13,353233	3,226	0,1119
Erro	6	24,838200	4,139700		
CV(%)	14,56				

Tabela 12 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados da atividade da Fenilalanina Amônia Liase em mudas de cafeeiro coletadas 48 horas após a inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2012

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamento	3	7,759825	2,586608	0,270	0,8452
Bloco	2	36,641217	18,320608	1,911	0,2279
Erro	6	57,519850	9,586642		
CV(%)	18,14				

Tabela 13 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados da atividade da Fenilalanina Amônia Liase em mudas de cafeeiro coletadas 96 horas após a inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2012

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamento	3	14,364158	4,788053	0,180	0,9065
Bloco	2	12,918317	6,459158	0,242	0,7921
Erro	6	159,918017	26,653003		
CV(%)	20,50				

Tabela 14 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados da atividade da Fenilalanina Amônia Liase em mudas de cafeeiro coletadas 144 horas após a inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2012

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamento	3	2,432967	0,810989	0,103	0,9552
Bloco	2	50,481867	25,240933	3,212	0,1126
Erro	6	47,146133	7,857689		
CV(%)	11,60				

Tabela 15 Dados área abaixo da curva de progresso da incidência. UFLA, Lavras, MG, 2012

Cultivar	Bloco	AACPI
Araponga	1	1360
Araponga	2	420
Araponga	3	1235
Araponga	4	1005
Catiguá	1	1130
Catiguá	2	1026
Catiguá	3	925
Catiguá	4	1025
Catuaí Vermelho	1	1400
Catuaí Vermelho	2	800
Catuaí Vermelho	3	1380
Catuaí Vermelho	4	1193
Mundo Novo	1	1045
Mundo Novo	2	1056
Mundo Novo	3	1195
Mundo Novo	4	1193
Oeiras	1	765
Oeiras	2	940
Oeiras	3	620
Oeiras	4	735
Paraíso	1	755
Paraíso	2	800
Paraíso	3	708
Paraíso	4	570
Pau-Brasil	1	965
Pau-Brasil	2	975
Pau-Brasil	3	840
Pau-Brasil	4	1080
Sacramento	1	1055
Sacramento	2	1040
Sacramento	3	870
Sacramento	4	700

Tabela 16 Dados da área abaixo da curva de progresso da doença. UFLA, Lavras, MG, 2012

Cultivar	Repetição	AACPD
Araponga	1	689,38
Araponga	2	287,5
Araponga	3	937,5
Araponga	4	638,13
Paraíso	1	314,58
Paraíso	2	250
Paraíso	3	437,5
Paraíso	4	256,25
Oeiras	1	354,17
Oeiras	2	393,75
Oeiras	3	343,75
Oeiras	4	325
Sacramento	1	656,25
Sacramento	2	418,75
Sacramento	3	443,75
Sacramento	4	256,25
Catuaí Vermelho	1	520,83
Catuaí Vermelho	2	450
Catuaí Vermelho	3	868,75
Catuaí Vermelho	4	243,75
Catiguá	1	331,25
Catiguá	2	206,25
Catiguá	3	393,75
Catiguá	4	393,75
Mundo Novo	1	537,5
Mundo Novo	2	610,42
Mundo Novo	3	806,25
Mundo Novo	4	487,5
Pau-Brasil	1	750
Pau-Brasil	2	581,25
Pau-Brasil	3	575
Pau-Brasil	4	635,42

Tabela 17 Atividade enzimática. UFLA, Lavras, MG, 2012

Tratamento	Bloco	Coleta	POX	POL	PAL
		h.a.i.	U mg ⁻¹ P min ⁻¹	U mg ⁻¹ P min ⁻¹	U mg ⁻¹ P min ⁻¹
Pa Inoc	1	24	2337,517029	10,85395638	18,09329391
Pa Inoc	2	24	1918,28434	7,661413809	12,81423995
Pa Inoc	3	24	2127,900685	8,691178571	12,2323796
CV Inoc	1	24	1316,194719	8,046084753	13,68291161
CV Inoc	2	24	1530,779478	9,944519352	10,48842357
CV Inoc	3	24	1423,487099	9,832530352	15,56623211
Pa Test	1	24	1816,995257	8,866817806	15,12356508
Pa Test	2	24	2260,510929	8,8699771	13,52113146
Pa Test	3	24	1317,138978	8,178582892	13,79517523
CV Test	1	24	1209,441686	7,510830207	15,05121242
CV Test	2	24	1133,491335	7,924835254	10,95819417
CV Test	3	24	1285,392037	8,338840302	16,39594459
Pa Inoc	1	48	1748,758599	10,09172765	17,40629077
Pa Inoc	2	48	1746,227502	9,509121716	17,98412079
Pa Inoc	3	48	1743,696405	10,87918326	11,71799126
CV Inoc	1	48	756,2090751	7,722064893	12,35366113
CV Inoc	2	48	652,7460713	6,216947237	22,79963634
CV Inoc	3	48	859,6720789	6,482175579	17,63200431
Pa Test	1	48	1693,976502	9,036058623	16,47840483
Pa Test	2	48	2087,7112	10,62801932	16,94068614
Pa Test	3	48	1079,926696	9,832038973	18,32320069
CV Test	1	48	954,6815077	9,356585444	14,85519689
CV Test	2	48	955,3448041	5,516273005	20,02001493
CV Test	3	48	954,0182114	7,661495885	18,25795645
Pa Inoc	1	96	2734,48522	4,248648303	23,39495953
Pa Inoc	2	96	1005,200392	3,779400248	34,52369423
Pa Inoc	3	96	1997,223032	5,131033613	22,38092002
CV Inoc	1	96	1644,998607	2,741828933	19,87480866
CV Inoc	2	96	1502,86837	3,098352068	26,24349858
CV Inoc	3	96	1787,128845	2,385305798	26,21873617
Pa Test	1	96	2035,679917	5,482174525	27,46937998
Pa Test	2	96	1807,026666	6,99689577	19,7321233
Pa Test	3	96	1578,373414	6,239535147	29,73458216
CV Test	1	96	1734,59335	4,623565012	24,21954577
CV Test	2	96	1448,588285	3,213486669	23,98701245
CV Test	3	96	2020,598414	4,532103743	24,45207909
Pa Inoc	1	144	2929,736691	3,421972731	20,42950722

“Tabela 17, continuação”

Tratamento	Bloco	Coleta h.a.i.	POX	POL	PAL
			U mg ⁻¹ P min ⁻¹	U mg-1 P min-1	U mg-1 P min-1
Pa Inoc	2	144	3005,612489	3,678152472	20,26815269
Pa Inoc	3	144	2967,67459	3,16579299	29,99831138
CV Inoc	1	144	2863,736846	4,770123715	22,11832748
CV Inoc	2	144	3475,049925	5,960971375	25,2384784
CV Inoc	3	144	2252,423767	5,365547545	24,46920249
Pa Test	1	144	3115,293059	4,151978065	22,11631274
Pa Test	2	144	2247,58255	3,375281118	24,7468921
Pa Test	3	144	2996,997506	3,763629591	27,37747146
CV Test	1	144	2242,569081	6,03898084	21,5502014
CV Test	2	144	3165,825851	6,373603405	27,27863492
CV Test	3	144	2727,851061	5,704358276	24,41441816

Tabela 18 Proteínas totais. UFLA, Lavras, MG, 2012

Tratamento	Bloco	Coleta h.a.i.	mg proteína/ml de extrato
Pa Inoc	1	24	0,08609697
Pa Inoc	2	24	0,120460606
Pa Inoc	3	24	0,10209697
CV Inoc	1	24	0,106824242
CV Inoc	2	24	0,095369697
CV Inoc	3	24	0,107854545
Pa Test	1	24	0,112278788
Pa Test	2	24	0,121127273
Pa Test	3	24	0,099612121
CV Test	1	24	0,099309091
CV Test	2	24	0,105248485
CV Test	3	24	0,088521212
Pa Inoc	1	48	0,114581818
Pa Inoc	2	48	0,085430303
Pa Inoc	3	48	0,074884848
CV Inoc	1	48	0,1044
CV Inoc	2	48	0,052218182
CV Inoc	3	48	0,067490909
Pa Test	1	48	0,068945455
Pa Test	2	48	0,090036364
Pa Test	3	48	0,065793939
CV Test	1	48	0,097066667
CV Test	2	48	0,059551515
CV Test	3	48	0,053066667
Pa Inoc	1	96	0,0604
Pa Inoc	2	96	0,062581818
Pa Inoc	3	96	0,066884848
CV Inoc	1	96	0,055430303
CV Inoc	2	96	0,061369697
CV Inoc	3	96	0,054763636
Pa Test	1	96	0,068945455
Pa Test	2	96	0,073793939
Pa Test	3	96	0,060339394

“Tabela 18, continuação”

Tratamento	Bloco	Coleta h.a.i.	mg proteína/ml de extrato
CV Test	1	96	0,06670303
CV Test	2	96	0,049309091
CV Test	3	96	0,065490909
Pa Inoc	1	144	0,054278788
Pa Inoc	2	144	0,057369697
Pa Inoc	3	144	0,047854545
CV Inoc	1	144	0,044884848
CV Inoc	2	144	0,043309091
CV Inoc	3	144	0,053854545
Pa Test	1	144	0,069066667
Pa Test	2	144	0,046945455
Pa Test	3	144	0,058036364
CV Test	1	144	0,061187879
CV Test	2	144	0,072278788
CV Test	3	144	0,053793939