



STÉFANNY ARAÚJO MARTINS

**RESISTÊNCIA GENÉTICA E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA
NO MANEJO DA MANCHA AUREOLADA E ISOLAMENTO
DE FITOBACTÉRIAS**

**LAVRAS – MG
2018**

STÉFANNY ARAÚJO MARTINS

**RESISTÊNCIA GENÉTICA E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NO MANEJO DA
MANCHA AUREOLADA E ISOLAMENTO DE FITOBACTÉRIAS**

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

Prof. PhD. 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).

Martins, Stéfanny Araújo.

Resistência genética e indução de resistência no manejo da
mancha aureolada e isolamento de fitobactérias / Stéfanny Araújo
Martins. - 2018.

97 p. : il.

Orientador(a): Mário Lúcio Vilela de Resende.

Tese (doutorado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras,
2018.

Bibliografia.

1. *Pseudomonas syringae* pv *garcae*. 2. *Coffea* sp. 3. *Xilella*
fastidiosa. I. de Resende, Mário Lúcio Vilela. II. Título.

STÉFANNY ARAÚJO MARTINS

**RESISTÊNCIA GENÉTICA E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NO MANEJO DA
MANCHA AUREOLADA E ISOLAMENTO DE FITOBACTÉRIAS**

**GENETIC RESISTANCE AND RESISTANCE INDUCTION IN THE
MANAGEMENT OF BACTERIAL HALO BLIGHT AND PHYTOBACTERIA
ISOLATION**

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

APROVADA em 07 de março de 2018
PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende, UFLA
Dr. Rubens José Guimarães, UFLA
Dr. Ricardo Magela de Souza, UFLA
Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza, EPAMIG
Dra. Fernanda Carvalho Lopes de Medeiros, UFLA

Prof. PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

**Lavras –MG
2018**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas bênçãos até hoje alcançadas.

À Universidade Federal de Lavras, ao programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao professor Mário Lúcio Vilela de Resende, pela orientação, dedicação e confiança no meu trabalho.

Aos co-orientadores do período sanduíche na Holanda, Jan Van der Wolf e Luc Stevens, pela orientação e confiança.

À Fernanda Carvalho Lopes de Medeiros, pelo apoio e valiosas contribuições na reta final dessa caminhada.

Ao professor Luciano Vilela Paiva, pelo uso do Laboratório Central de Biologia Molecular.

Aos meus pais, Arceli e Maria de Fátima e minha irmã, Jennifer, pelo apoio incondicional em todos os momentos, e, apesar da distância mantiveram-se minha base forte. Ao meu namorado, Thiago Arbex, pelas contribuições, infinita paciência, e, sobretudo todo amor que tem me dedicado principalmente no final dessa caminhada.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite e pelas valiosas sugestões. Aos professores do programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pelos ensinamentos. A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela convivência e disponibilidade, durante todo o curso, especialmente as meninas da limpeza que todos os dias me receberam com muita alegria e pelos dedos de prosa.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo: Deila, Joyce, Ana Cristina, Ariana, Victor Augusto, Priscilla, Wilder, Paula, Manoel, Moisés, Bruno, Brunão, Dario, Eliane, Camila, Alexandre e Tharyn, pela convivência e auxílio nos ensaios. Aos amigos do laboratório do Plant Research Wageningen, Patricia, Yvone, Pieter, Tanvi, Stefan, Juan, Dirk-Jan, Mark, Dan, Bram, Craig, Odette, Ilse e Else muito obrigada pela paciência na convivência, parceria e amizade.

Aos colegas do departamento, Julio, Sueny, Luma, Stelio (in memoriam), Breno e Rafaella pela parceria e cafés com prosa.

Às amigas que tive o prazer de dividir o mesmo lar: Tati, Vivi, Agatha e Mari, obrigada por todo apoio durante todo esse processo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do café (INCT-Café) pelo financiamento concedido à realização deste projeto.

À Wageningen Plant research- WUR pela oportunidade de realização deste trabalho.

Meu agradecimento especial a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, mas não foram mencionados.

O meu muito obrigada!

RESUMO GERAL

A mancha aureolada, de agente etiológico *Pseudomonas syringae* pv *garcae*, é responsável por perdas significativas em viveiros e lavouras, quando em condições favoráveis. Considerando a necessidade do manejo dessa doença, o objetivo desse estudo foi avaliar o comportamento de progênies cafeeiras quanto ao nível de resistência à mancha aureolada, obter um marcador bioquímico para a característica de resistência, elucidar mecanismos do café relacionados à defesa essa doença, encontrar tratamentos indutores de resistência para essa doença e obter um novo protocolo de isolamento de fitobacterias. Dentre a população estudada, a progênie UFV 7158 foi a mais promissora para resistência a *Pseudomonas syringae* pv *garcae*. Posteriormente a esse estudo, foi analisada a expressão de três genes de defesa com e sem a presença do patógeno tanto na cultivar utilizada como padrão de susceptibilidade (Mundo Novo 763/4) quanto na progênie UFV 7158. Os resultados obtidos demonstraram que os níveis de transcritos do gene *PAL* nas mudas inoculadas com a bactéria foram diferentes nos dois materiais genéticos. Na cultivar susceptível, houve diferença na expressão desse gene nas mudas inoculadas em relação às não inoculadas e esta ocorreu com 48 horas após a exposição ao patógeno, enquanto que na progênie selecionada com baixa incidência da doença, essa expressão ocorreu mais rapidamente, após 12 horas de exposição ao patógeno. Paralelo ao estudo da expressão gênica foi realizado um estudo sobre a quantificação de bioativos nas folhas de cafeeiros com diferentes níveis de resistência à mancha aureolada. Foi possível observar sempre que a cultivar ou progênie possuía alguma resistência os níveis de ácido clorogênico aumentavam na folha. Dessa maneira, o ácido clorogênico pode ser usado como marcador bioquímico para essa doença. Quanto à indução de resistência, os resultados mostraram que alguns tratamentos foram capazes de diminuir significativamente a doença em até 90 % quando as plantas foram tratadas preventivamente, podendo, assim ser utilizado no manejo integrado dessa doença. Para o isolamento de bactérias foi possível observar que a molécula N-acetylcisteína reduz a formação de biofilmes bacterianos dentro do tecido da planta, e que esse resultado pode ser incrementado quando se utiliza enzimas e ultrassom, obtendo, até o dobro de células liberadas viáveis quando comparado ao protocolo de isolamento padrão.

Palavras-chaves: *Pseudomonas syringae* pv *garcae*. Controle alternativo. Resistência. Seleção de progênies.

GENERAL ABSTRACT

The bacterial blight in coffee, etiological agent *Pseudomonas syringae* pv *garcae*, is responsible for significant losses in nurseries and crops, when under favorable conditions. Considering the need to manage this disease, the objective of this study was to evaluate the behavior of coffee progenies as to the level of resistance to the bacterial halo blight, to obtain a biochemical marker for the resistance, to elucidate the coffee mechanisms related to this disease defense, to find treatments inducers of resistance to this disease and to obtain a new protocol for the isolation of phyto-bacteria. Among the studied population, progeny UFV 7158 was the most promising for resistance to *Pseudomonas syringae* pv *garcae*. After this study, the expression of three defense genes with and without the presence of the pathogen were analyzed in both the cultivar used as a susceptibility standard (Mundo Novo 763/4) and in the UFV progeny 7158. The results obtained demonstrated that the levels of transcripts of the *PAL* gene in the seedlings inoculated with the bacterium were different in the two genetic materials. In the susceptible cultivar, there was a difference in the expression of this gene in the inoculated one in relation to the non inoculated, and this occurred 48 hours after exposure to the pathogen, while in the selected progeny with low incidence of the disease, this expression occurred more quickly after 12 hours of exposure to the pathogen. Parallel to the study of gene expression, a study on the quantification of bioactives in leaves of coffee trees with different levels of resistance to the aureolated spot was carried out. It was always possible to observe that when the cultivar or progeny had some resistance, the levels of chlorogenic acid increased in the leaf. Therefore, chlorogenic acid can be used as a biochemical marker for this disease. Regarding the induction of resistance, the results showed that some treatments were able to significantly reduce the disease by up to 90% when the plants were treated preventively and could thus be used in the integrated management of this disease. Regarding the bacteria's isolation, it was possible to observe that the N-acetylcysteine molecule reduces the formation of bacterial biofilms inside the plant tissue, and that this result can be increased when using enzymes and ultrasound, obtaining up to twice the cells released viable when compared to the standard isolation protocol.

Keywords: *Pseudomonas syringae* pv *garcae*. Alternative control. Resistance. pre breeding.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	1
1	INTRODUÇÃO	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1	Cultura do cafeeiro.....	2
2.2	Mancha aureolada.....	3
2.3	Resistência genética.....	5
2.4	A defesa de plantas	6
2.5	Metabólitos secundários.....	10
2.5.1	Compostos fenólicos	11
2.5.2	Alcaloides	12
2.6	Indução de resistência no controle de doenças em plantas.....	13
2.7	Isolamento de fitobacterias.....	15
	REFERÊNCIAS	17
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	26
	ARTIGO 1- RESISTANCE OF GENOTYPES AND DEFENSE COMPOUNDS AGAINST BACTERIAL HALO BLIGHT OF COFFEE.....	26
	ARTIGO 2- INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NO MANEJO DA MANCHA AUREOLADA	50
1	INTRODUÇÃO	54
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70
	ARTIGO 3- NEW PROTOCOL FOR PHYTOBACTERIA ISOLATION: CASE STUDY-XYLELLA FASTIDIOS	73
1	INTRODUCTION	77
2	MATERIALS AND METHODS.....	78
3	RESULTS AND DISCUSION.....	82
4	CONCLUSIONS.....	93
	REFERENCES	94

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O Brasil continua como o maior produtor de café “in natura”, com 32% do mercado mundial, inserido num universo de 72 países produtores desse grão. E é o segundo maior mercado consumidor, ficando atrás somente dos Estados Unidos da América (MEDEIROS; RODRIGUES, 2017). A commodity do café é o segundo em valor de mercado mundial, e, com os seguintes números nacionais: 287 mil produtores, em 15 estados, em 2,256 milhões de hectares, gerando aproximadamente oito milhões de empregos (MEDEIROS; RODRIGUES, 2017).

O cafeeiro (*Coffea* sp.) pertence à família Rubiaceae e é amplamente cultivado em países tropicais. Entre as espécies cultivadas, *Coffea arabica* e *Coffea canephora* são as mais importantes economicamente. No primeiro levantamento do ano, a Conab estimou entre 54,44 milhões e 58,51 milhões de sacas de 60 quilos, uma alta de 21 a 30 % sobre 2017 e superior também ao recorde anterior, de 51,37 milhões de sacas, registrado em 2016 (CONAB, 2018).

Dentre os fatores que limitam a produção de café, destacam-se: condições climáticas adversas, deficiências nutricionais e a presença de pragas e doenças (KUTYWAYO et al., 2013). Dentre as doenças do cafeeiro, destaca-se a mancha aureolada, que causa perdas tanto em mudas de viveiro quanto em plantas adultas em condições de campo.

A mancha aureolada tem como agente etiológico *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, que é uma bactéria Gram negativa, com células em forma de bastonetes retos ou levemente curvados (LELLIOTT; BILLING; HAYWARD, 1966). Em condições favoráveis, como regiões sujeitas a ventos fortes, temperaturas amenas, chuvas frequentes e bem distribuídas, a mancha aureolada pode causar perdas significativas tanto em viveiros de mudas quanto em campo (ZOCCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011). O controle dessa doença é dificultado, devido ao pouco conhecimento sobre a sua dinâmica, assim como pela ineficiência de produtos fitossanitários utilizados no controle dessa bacteriose em condições de campo (RODRIGUES et al., 2013).

O manejo da mancha aureolada baseia-se em medidas preventivas, como mudas saudáveis, escolha de áreas livres da doença, formação de quebra-ventos ao redor da lavoura, as quais visam combater a entrada da doença nas lavouras e/ou dificultar o avanço da bactéria nas áreas nas quais foi detectada. O controle químico da mancha aureolada utilizado para mudas é

aplicação de cloridato de casugamicina intercaladas com oxiclureto de cobre. Em condições de campo é utilizado produtos com sais de cobre como princípio ativo, podendo não apresentar boa eficácia no controle (RODRIGUES et al., 2013). Em virtude disso, estudos em bancos de germoplasma possibilitam a detecção de genótipos resistentes a essa bacteriose, que poderão ser utilizados nos programas de melhoramento do cafeeiro contra essa doença, o que leva diminuição do uso de produtos tóxicos ao homem e meio ambiente, além de mais eficientes e de menor custo ao produtor.

A avaliação de severidade de doença em muitos materiais diferentes é um trabalho oneroso, com diversas etapas: colheita de sementes, lavagem, germinação, transplante, tratos culturais, inoculação e avaliação da severidade da doença. Uma forma prática de selecionar progênies em bancos de germoplasma seria com a identificação de marcadores para a característica desejada. Marcadores são substâncias que podem indicar a ocorrência de determinada característica. Podem ser células específicas, moléculas, genes, enzimas ou hormônios (VIERA, 1999). O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de progênies do banco de germoplasma em relação à severidade da mancha auerolada, melhorar o método de isolamento das bacterioses e obter um marcador bioquímico para resistência dessa doença.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura do cafeeiro

O café é uma das maiores commodities do mundo, ficando atrás apenas do petróleo em exportações (RODRIGUES et al., 2013), sendo indiscutível sua importância para o Brasil por ser o maior produtor e exportador mundial (CONAB, 2018). Para a safra 2018, o País deverá colher entre 54 e 58 milhões de sacas de 60 quilos do produto beneficiado. O resultado representa um aumento de mais de 20% quando comparada com a produção obtida na temporada anterior (CONAB, 2018). O estado de Minas Gerais destaca-se como o maior produtor nacional, com cerca de 50% de todo o café produzido no País.

O aumento na demanda pelo café, principalmente nos países de clima mais frio, vem refletindo no aumento crescente da área de cultivo. Existem diversas espécies de café cultivadas no mundo, no Brasil são conhecidas: o café Arábica (*C. arabica*) e café Robusta (Conillon). Cada espécie tem um grande número de variedades e linhagens. O Arábica tem melhor qualidade de café, com grãos de cor esverdeada, cultivado em altitudes acima de 800m, tem sua

origem no Oriente. O Robusta é originário da África, mais rústico e pode ser cultivado em altitudes mais baixas, como ao nível do mar (TOLEDO; BARBOSA, 1997).

As doenças estão entre os principais fatores que afetam a produtividade e o rendimento da cultura do cafeeiro, destacando-se entre as bacterioses a mancha aureolada do cafeeiro (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956).

2.2 Mancha aureolada

A mancha aureolada do cafeeiro foi relatada pela primeira vez no Brasil, em 1956, no município de Garça, São Paulo. O agente causal da mancha aureolada é *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956), uma bactéria Gram negativa, com células em forma de bastonetes retos ou levemente curvados, com 0,5-1,0 x 1,5-4,0 µm de diâmetro, móveis por meio de flagelos polares. Pertence ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Pseudomonadales e família Pseudomonadaceae (LELLIOT; BILLING; HAYWARD, 1966).

A doença ocorre no Brasil e na África, principalmente no Quênia, que se encontra em expansão (JANSEN, 2005) em mudas e lavouras novas, com até quatro anos de idade. No Brasil foi relatada nos estados de São Paulo na década de 50 (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956), e na década de 70 em Minas Gerais (KIMURA; ROBBS; FERRARI, 1976) e Paraná (KIMURA; ROBBS; FERRARI, 1976; MOHAN, 1976). Os sintomas podem ocorrer nos ramos, folhas, flores e frutos novos. As lesões pardo-escuras envolvidas por anel amarelado, de contorno irregular e tamanho variável, evoluem tornando-se necrosadas e quebradiças. Nas folhas novas as lesões apresentam formato circular e são circundadas por halo amarelo (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956; ZAMBOLIM et al., 1999; 2005). Geralmente, as lesões são mais frequentes nas bordas das folhas, devido aos ferimentos causados por danos mecânicos ou aberturas naturais, facilitando a entrada da bactéria (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997). A doença ocorre também em rosetas, frutos e ramos do cafeeiro, causando a queda prematura de folhas e seca das hastes e dos ramos e, na tentativa de se recuperar, há um superbrotamento com a emissão de novos ramos (RODRIGUES et al., 2013).

A bactéria interfere no “pegamento” das flores quando coloniza as hastes do cafeeiro, refletindo em prejuízo na seguinte produção. A expansão do fruto do café ocorre no período chuvoso juntamente com a infecção da bactéria, especialmente com seca dos ramos, provocando queda dos frutos (COSTA; SILVA, 1960). As condições favoráveis para a bactéria são: temperaturas amenas, alta pluviosidade e ainda, áreas de altitudes elevadas, expostas a

ventos frios (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997; ZAMBOLIM et al., 1997; JANSEN, 2005).

Em estudo sobre a ocorrência da mancha aureolada nas áreas de cultivo de café dos cerrados no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Zoccoli et al. (2011) observaram que em lavouras situadas em municípios com até 950 m de altitude e com relevo mais brando, a ocorrência da mancha aureolada é concentrada em poucas áreas e não é tão frequente. Já nas áreas serranas, de relevo mais acidentado e altitudes mais elevadas, temperaturas amenas e, portanto, sujeitas a ventos fortes, a doença ocorreu em todos os anos, com intensidade variada e sem previsão. Segundo Oliveira e Romeiro (1990), a doença incide mais em folhas e brotações novas do cafeeiro do que em folhas adultas, pois a severidade da doença é influenciada pela idade fisiológica das plantas e o tecido mais tenro das folhas novas favorece a penetração do patógeno.

A disseminação da doença também pode ocorrer mesmo por mudas que não apresentam sintomas, mas que estão infectadas, devido à capacidade de sobrevivência da bactéria como epífita na planta (ZOCCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011). Estes autores observaram que colônias da bactéria ocorrem principalmente na face inferior de folhas assintomáticas do cafeeiro. Para Hirano e Upper (1983) foi possível recuperar a bactéria de folhas sadias desde mudas até cafezais estabelecidos. Evidências da disseminação da mancha aureolada através de mudas aparentemente sadias, mas hospedando a bactéria na forma epifítica, foram observadas em cafezais novos, com menos de um ano, muito afetados com a mancha aureolada. Estas mudas haviam sido adquiridas de viveiros onde se tinha eliminado previamente grande quantidade de mudas com sintomas, mas as restantes aparentemente sadias haviam sido vendidas

Os danos causados por *P. syringae* pv *garcae* estão direta ou indiretamente relacionados à produção. Quando presentes nas folhas e/ou ramos, os sintomas de necrose e posteriormente de abscisão das folhas acarretam diminuição da área fotossinteticamente ativa, resultando em menos energia disponível para os processos fisiológicos da planta. A ocorrência nas flores e frutos causa prejuízos à produção, com a queda prematura das flores e frutos do café.

Em viveiros, a falta do controle da doença pode causar danos em até 100% das mudas, uma vez que as plantas estão mais suscetíveis à doença, pois possuem os tecidos tenros, ainda em formação, o que facilita a colonização do tecido pelo patógeno, aliado ao adensamento das mudas, que facilita a disseminação da doença (RODRIGUES et al., 2013).

A ausência de medidas adequadas de controle leva a perdas econômicas e ao aumento no custo de produção devido ao acréscimo de aplicações de bactericidas e cúpricos na tentativa

de conter o avanço da doença em regiões mais favoráveis à sua incidência. A falta de informações sobre a dinâmica desta doença, a ausência de produtos específicos registrados e o desenvolvimento de resistência do patógeno a antibióticos têm dificultado o controle da doença (JESUS JUNIOR et al., 2002).

Em regiões montanhosas, de altitude elevada, com ventos fortes o controle do patógeno é dificultado, em função da impossibilidade de uso de maquinaria pesada, geralmente devido ao relevo acidentado e também pelo pouco conhecimento sobre a doença (RODRIGUES et al., 2013).

O manejo da mancha aureolada baseia-se em medidas preventivas, como utilização de mudas sadias, escolha de áreas livres da doença, formação de quebra-ventos ao redor da lavoura, as quais visam combater a entrada da bactéria nas lavouras e/ou dificultar o seu avanço nas áreas onde foi detectada.

O controle químico que vem sendo utilizado para mudas é aplicação de cloridrato de kasugamicina intercalado com oxiclreto de cobre. Em condições de campo também é utilizado produtos com sais de cobre como princípio ativo (RODRIGUES et al., 2013), podendo não apresentar boa eficácia no controle. Patrício et al. (2002) também verificaram que cloridrato de kazugamicina (300mL/100L de água) e oxiclreto de cobre reduziram a incidência de mancha aureolada.

2.3 Resistência genética

No manejo integrado de doenças de plantas, a utilização da resistência genética representa um dos métodos de controle mais eficientes, de fácil acesso aos produtores e econômico, reduzindo, de forma expressiva, os prejuízos com a doença e custos de produção, além dos impactos ambientais. Ito et al. (2008) avaliando fontes de resistência a *P. syringae* pv. *garcae* em cultivares de *C. arabica*, expostos à ocorrência natural da doença, verificaram um único caso de resistência completa na cultivar IPR 102 (Catucaí), enquanto que as cultivares IPR 103, IPR 104, IPR 108 e IAPAR 59 apresentaram resistência parcial. Em 2011, Ito et al. avaliando híbridos quanto a características de produção, vigor vegetativo e quantidade média de frutos por nó produtivo, concluíram que o híbrido “Catucaí H9934” x ‘IPR 100 pode se tornar cultivar mesmo com uma heterose menor devido à múltipla resistência à mancha aureolada, ferrugem e nematoides. Moraes et al. (1974) identificaram que o fator genético SH1, encontrados em Harar, Dilla e Alghe, S12 Kaffa e Geisha (cafeeiros com origem na Etiópia) confere resistência específica a algumas raças de *Hemileia vastatrix* em *C. arabica*, como

também resistência à *P. syringae* pv. *garcae*. No entanto, foram identificadas outras fontes de resistência em cafeeiros não portadores do gene SH1 (MOHAN et al., 1976; PETEK et al., 2006), sendo assim possível a existência de outros genes que conferem resistência. Mohan et al. (1978) e Cardoso e Sera (1983) observaram que progênies derivadas do cruzamento "Caturra" x "Híbrido de Timor" e entre progênies resistentes à ferrugem alaranjada existe variabilidade genética para resistência à mancha aureolada.

A engenharia genética molecular cafeeira conta com uma biblioteca de ESTs (*Expressed Sequence Tags*). Nela, é possível encontrar 33 mil unigenes diferentes, pertencentes às espécies *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa* (VIERA et al., 2006). Tal ferramenta permite, a partir das sequências dos genes, desenhar *primers* específicos e estudar a expressão das sequências envolvidas nos processos metabólicos que envolvem o estresse causado por fitopatógenos.

Silvestrini et al. (2005) estudaram a expressão de genes em resposta à infecção por nematoides da espécie *Meloidogyne exigua*, através da análise dos transcritos dos genes relacionados à resistência contra patógenos, superóxido dismutase, WIPK (fator de transcrição WipkA), glucanases e proteínas de resistência ResproB e 5RM1, em *C. arabica* com características segregantes para a resistência a este fitonematoide. Os autores observaram que não havia variações na expressão, independente de as plantas estarem com a presença do nematoide ou não, concluindo então, resistência basal para este patossistema.

Fatobene (2014) estudou a expressão de 12 genes em resposta à infecção de *M. paranaensis* em progênies cafeeiras suscetível e resistente. Foi observado a ativação de quatro genes de defesa: *EDS1*, *P4D4*, *LTP* e *NPR1* em plantas infectadas. Uma vez que estes genes atuam na rota do ácido salicílico, o autor concluiu que a interação deste fitonematoide e as plantas de café ativa o sistema de defesa do AS no cafeeiro.

2.4 A defesa de plantas

Com a evolução das espécies, as plantas desenvolveram mecanismos para superar as intempéries do ambiente. Dessa forma, características de defesa contra herbivoria, poluentes, fatores climáticos, competição e ataque de patógenos foram expressos em forma de espinhos, goma e substâncias tóxicas ou detoxificadoras. Tais mecanismos, agrupados em estruturais ou bioquímicos, podem ser constitutivos ou estar presentes após o agente estressante ser reconhecido (AGRIOS, 2005; JONES; DANGL, 2006).

As plantas podem perceber a presença de patógenos através do reconhecimento de substâncias eliciadoras patogênicas ou por aquelas originadas com a injúria na planta

(DURRANT; DONG, 2004). Posteriormente, várias mudanças celulares ocorrem até a ativação de cascatas de sinalização na membrana plasmática, que resulta na indução de redes interligadas de moléculas sinalizadoras, como ácido salicílico (AS), ácido jasmônico, óxido nítrico e etileno, para a formação de respostas de defesa com o intuito de inibir ou atrasar a infecção do patógeno na planta (HARRISON; BALDWIN, 2004).

A resistência local e a resistência induzida são os principais tipos de resistência de plantas. A resistência induzida pode ser classificada como sistêmica adquirida (SAR) e sistêmica induzida (ISR). Enquanto a resistência local, também conhecida como resposta de hipersensibilidade (HR), trata-se de um sistema de defesa localizado, com rápida necrose das células na região de invasão patogênica. A contenção do desenvolvimento do patógeno é realizada também pela formação e acúmulo de metabólitos secundários tóxicos, como fitoalexinas. As células vegetais necróticas ainda fornecem eliciadores secundários, os quais servem de estímulo para mecanismos de defesa nas células vegetais nas proximidades do local de infecção, como por exemplo, maior produção de calose, deposição de compostos fenólicos e lignificação da parede celular na célula infectada (KEEN, 1990; SILVA et al., 2002).

Dependendo do organismo ou indutor que interage com a planta ela é capaz de ativar diferentes tipos de resistência induzida. Dessa forma, apesar de SAR e ISR possuírem fenótipos semelhantes, são reações distintas. Na SAR, a resistência se desenvolve sistemicamente em resposta a patógenos que desencadeiam reação de HR ou por aplicação exógena de ácido salicílico ou, ainda, compostos sintéticos, como o acibenzolar-S-metil (ASM) e o ácido 2,6-dicloroisonicotínico. Nesta, a resistência expressada é mediada pelo AS, a qual é efetiva contra um amplo espectro de patógenos, e envolve produção de proteínas relacionadas à patogênese (PRs). Por outro lado, na ISR, a sinalização é mediada pelo ácido jasmônico e etileno, sem a produção de proteínas PRs (DURRANT; DONG, 2004; LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998; MÉTRAUX, 2007).

Posteriormente ao reconhecimento do patógeno pela planta, a primeira resposta de defesa é a explosão oxidativa, que é a geração de espécies ativas de oxigênio (EAOs) (H_2O_2 , O^{2-} , OH^-). As EAOs se formam no metabolismo celular, tornando-se tóxicas à célula após o acúmulo. Plantas quando estressadas, utilizam um complexo sistema de defesa composto de antioxidantes e várias enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), glutatona-redutase e ascorbato peroxidase (APX). Essas enzimas estabilizam as EAOs e protegem as células dos danos oxidativos (HOSSAIN; UDDIN, 2011; RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

O crescente acúmulo dos níveis de EAOs ativa a síntese de ácido salicílico. Enquanto o ácido salicílico potencializa a produção de EAOs. Desta maneira, a explosão oxidativa pode ser observada no local, macroscopicamente (HR), como também através de explosões oxidativas secundárias que ocorrem nos tecidos distantes (micro-HR's) o que leva à resistência sistêmica adquirida, e consequente ativação da expressão de genes de defesa. Portanto, a ocorrência de HR e SAR são fenômenos dependentes da cascata de sinalização derivada da explosão oxidativa, que, é um evento inicial na resposta da planta contra a invasão de fitopatógenos (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003; VLOT; DEMPSEY; KLESSIG, 2009; ZURBRIGGEN; CARRILLO; HAJIREZAEI, 2010).

O ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno são fitormônios reguladores das vias de sinalização de defesa das plantas (GRANT; LAMB, 2006; POZO; LOON; PIETERSE, 2004). De maneira geral, mecanismos de defesa mediada pelo ácido salicílico atuam sobre patógenos biotróficos e hemibiotróficos, enquanto o ácido jasmônico mediam defesas de patógenos necrotróficos e insetos (GLAZEBROOK, 2005; PARK et al., 2007).

Quando as plantas sofrem estresse causado pela presença de patógenos, compostos químicos ou condições ambientais, há acúmulo de proteínas PRs nos tecidos vegetais. Estas proteínas são classificadas em 17 famílias, das quais, uma grande parte possui atividade antimicrobiana e são bons marcadores moleculares para a resposta de resistência (LOON; REP; PIETERSE, 2006).

Uma das famílias dessas proteínas, a PR-1, ativa a sinalização da rota do AS, e, ao ativar a rota, há indução da expressão de genes de defesa e de outras proteínas PRs (FU; DONG, 2013; LOON; REP; PIETERSE, 2006). São consideradas proteínas PRs: quitinases (PR-2); e, hidrolases, como as β -1,3-glucanases (PR-3, PR-8 e PR-11) que têm sido relatadas como antifúngicas, ao degradar componentes da parede celular (LOON; REP; PIETERSE, 2006). Outra classe de PRs, são as peroxidases, pertencentes à família PR-9, com função de catalisar a oxidação e polimerizar o álcool hidroxicinâmico quando em presença de peróxido de hidrogênio, dando origem à lignina (LOON; STRIEN, 1999). As peroxidases participam da limpeza de EAOs e na oxirredução de diversos substratos, utilizando peróxido de hidrogênio (KAWAOKA et al., 2003).

A formação de lignina e compostos fenólicos inclui diversas rotas e combinações bioquímicas, a partir do metabolismo dos fenilpropanoides (BOATRIGT et al., 2004). A produção de lignina inclui diversas enzimas, dentre elas a fenilalanina amônialiase (PAL), com função de catalisar a conversão da fenilalanina em ácido transcinâmico, originando fitoalexinas, compostos fenólicos e lignina. Estes produtos podem conferir maior resistência à parede celular

das plantas contra os patógenos através da toxicidade direta e maior espessura da parede (NAKAZAWA; NOZUE; YASUDA, 2001). Com o ácido transcinâmico sintetizado, diversos fenilpropanoides simples podem ser produzidos por reações de hidroxilação, metilação e desidratação, como os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico e as cumarinas simples, além dos ácidos benzoico, β -hidroxibenzoico e salicílico (DIXON; PAIVA, 1995; VLOT; DEMPSEY; KLESSIG, 2009).

A formação do ácido benzoico a partir do ácido transcinâmico pode envolver a β -oxidação, sintetizando substâncias intermediárias antes da obtenção do ácido benzoico propriamente dito. O ácido benzoico é convertido em ácido salicílico, por meio da enzima ácido benzoico-2-hidroxilase, ao conjugado à glicose, formando ácido salicílico glicosilado (VLOT; DEMPSEY; KLESSIG, 2009). A enzima polifenol oxidase (PPO) está relacionada à oxidação de compostos fenólicos, produzindo quinonas, que são moléculas tóxicas aos organismos invasores. A PPO também está associada à lignificação, devido a formação de ligações cruzadas entre grupos fenólicos e proteínas de parede, pectinas e outras moléculas (MAYER; STAPLES, 2002; MENDONÇA; GUERRA, 2003).

Na rota do ácido jasmônico, o ácido linoleico é o substrato inicial, que é convertido por meio da via do octadecanoide a ácido jasmonico. Essas reações são mediadas pela ação de enzimas como a lipoxigenase (LOX) e a aleno óxido sintase (PROST et al., 2005; VELLOSILO et al., 2007).

Em condições naturais, as plantas estão expostas a diversos estresses, como ataque de patógenos e insetos, que podem influenciar na sua resposta de defesa induzida (STOUT; THALER; THOMMA, 2006). Desta maneira, um mecanismo de regulação para adaptação às mudanças do ambiente, se faz necessário. Este mecanismo é chamado de *cross talk* entre as vias de sinalização de defesa, que permite ajuste da planta na sua resposta de defesa aos invasores. As interações de sinalização podem trazer resultados funcionais negativos ou positivos, dependendo se a interação for mutuamente antagônica ou sinérgica, respectivamente (BOSTOCK, 2005; KOORNNEEF; PIETERSE, 2008; BARI; JONES, 2009).

Estudos realizados com genótipos de café mostraram que, a resistência à *H. vastatrix* é representada por grande liberação de peróxido de hidrogênio, uma rápida e localizada morte da célula vegetal associada com a restrição do crescimento dos fungos, além do aumento de compostos fenólicos e da atividade de enzimas de defesa (SILVA et al., 2002, 2008; GUERRA-GUIMARÃES et al., 2009; RAMIRO et al., 2009; DINIZ et al., 2012).

2.5 Metabólitos secundários

O conjunto de reações de uma célula é chamado de metabolismo. Os produtos químicos que são formados, degradados ou transformados são denominados de metabólitos (SIMÕES et al., 2010), estes, podem ser divididos em metabólitos primários e secundários (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008). A teoria evolucionista defende que os seres vivos derivam de um precursor comum, o que explicaria, por exemplo, as principais macromoléculas como carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos serem essencialmente as mesmas em vegetais ou animais (SIMÕES et al., 2010).

Os integrantes do metabolismo primário são aqueles considerados essenciais à vida e comuns aos seres vivos. Compreende as reações químicas envolvidas na transformação de moléculas de nutrientes em partes que constituirão organelas essenciais da célula (WATSON, 1965), estas reações também estão envolvidas na manutenção da sobrevivência e do desenvolvimento celular (DIXON, 2001).

Os seres vivos (vegetais, microrganismos e animais) apresentam um metabolismo diferenciado, no que diz respeito a tipo enzimas, coenzimas e organelas, e, são capazes de produzir, transformar e acumular substâncias que não estão relacionadas diretamente à manutenção da vida do organismo produtor. Nesse acúmulo de substâncias, com bioquímica e metabolismo específicos de determinados organismos, estão características únicas que funcionam como elementos de diferenciação e especialização. Esse metabolismo é definido como secundário, com produtos que garantem vantagens para a sobrevivência e perpetuação da espécie do organismo produtor, embora não sejam essenciais ao organismo no seu ciclo de vida (SIMÕES et al., 2010).

Os metabólitos secundários são produzidos em pequena quantidade, com classificação baseada na rota biossintética e, cada família, gênero, e espécie produz uma categoria química característica ou uma mistura delas, que podem ser utilizadas na classificação das plantas como caracteres taxonômicos (BELL; CHARLWOOD, 1980; HARBONE, 1999; WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008). Dentre as funções dos produtos de metabolismo secundário, está a proteção da planta contra herbívoros e ataque de patógenos. Além de favorecer a atração de polinizadores, de animais dispersores de sementes e microrganismos simbiotes. A produção de metabólitos secundários também protege o vegetal de influências abióticas, como temperatura, umidade, proteção contra raios UV e deficiência de nutrientes minerais (ALVES, 2001; PERES, 2004; SIMÕES et al., 2010).

Os principais grupos de metabólitos secundários são os compostos fenólicos, terpenos e alcaloides, utilizados pela planta contra estresses bióticos e abióticos (TAIZ; ZEIGER, 2009). O ácido chiquímico e ácido mevalônico dão origem aos compostos fenólicos. Os terpenos são sintetizados no citoplasma a partir do ácido mevalônico e no cloroplasto a partir do piruvato e 3-fosfoglicerato. Os alcaloides derivam de aminoácidos aromáticos, como triptofano e tirosina, os quais são provenientes do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos, como ornitina e lisina. Flavonoides, taninos e ligninas são compostos fenólicos; dentre os terpenos estão os óleos essenciais, saponinas, carotenoides e a maioria dos fitoreguladores; enquanto a nicotina, cafeína e vincristina são alguns exemplos de alcaloides (ALVES, 2001; PERES, 2004).

A produção de metabólitos secundários é influenciada pela sazonalidade, ritmo circadiano, estágio de desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos, que alteram a quantidade de produção e, até a natureza dos constituintes ativos presentes no tecido (GOBBO NETO; LOPES, 2007). Portanto, a maneira e tempo que um vegetal é coletado é um dos fatores cruciais para o estudo desses metabólitos, considerando que variações são capazes de coordenar ou alterar a síntese desses compostos (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000).

A ampla atuação dos metabólitos secundários dos vegetais evidencia a necessidade e importância do estudo sobre esses compostos. O conhecimento da atuação pode levar a inúmeras possibilidades de pesquisas que utilizem a própria defesa da planta no manejo integrado de doenças, diminuindo prejuízos causados pelo uso desordenado de agrotóxicos (BEZERRA, 2008).

2.5.1 Compostos fenólicos

As plantas são capazes de sintetizar compostos fenólicos por diferentes rotas, o que dá origem a grupos bastante heterogêneos metabolicamente. As rotas metabólicas básicas são do ácido malônico e a do ácido chiquímico, sendo esta última participante da síntese de grande parte dos fenóis vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2009). É possível encontrar compostos fenólicos em forma de molécula simples até com alto grau de polimerização (BRAVO, 1998).

Quimicamente, os compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático, e neste anel, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila (OH^-) (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2002). Em geral, a ocorrência de compostos fenólicos acontece de forma complexada a carboidratos mono e polissacarídeos, proteínas e

outros componentes vegetais (ROBBINS, 2003), o que resulta grande variedade de compostos fenólicos naturais (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Os principais compostos fenólicos são divididos em classes de acordo com o tipo e número de anéis fenólicos, e em subclasses considerando as substituições específicas na estrutura básica, associações com carboidratos e formas polimerizadas (FARAH et al., 2006).

Os compostos polifenóis são classificados basicamente em ácidos fenólicos e flavonóides. Ácidos fenólicos formam ácidos hidroxicinâmicos, possuindo como principal representante o ácido clorogênico. Este é um éster formado entre o ácido cafeico e ácido quínico (GONTHIER et al., 2003).

O ácido clorogênico é o composto fenólico mais abundante e pode ser encontrado amplamente na natureza, principalmente em alimentos do reino vegetal, como café e frutas (GONTHIER et al., 2003; JOHNSTON et al., 2003). O ácido 5-cafeoilquínico é o mais comum dos ácidos clorogênicos biologicamente ativos (CLIFFORD, 2000; OLTHOF et al., 2003)

2.5.2 Alcaloides

Os alcaloides são compostos orgânicos cíclicos, com um ou mais átomos de nitrogênio em estado de oxidação negativo, com presença encontrada somente em seres vivos. Farmacologicamente ativos e encontrados principalmente em angiospermas (HENRIQUES; KERBER; MORENO, 2002). Com características de compostos de baixo peso molecular, com distribuição restrita a natureza, e, derivados de aminoácidos aromáticos, triptofano e tirosina, os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos como a ornitina e a lisina (PERES, 2004).

São classificados de acordo com o aminoácido precursor e sua forma estrutural (DEWICK, 2002), com grupos químicos heterogêneos e com grande potencial bioativo (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997). Os alcaloides estão presentes em 14,2% dos gêneros de plantas superiores (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001), principalmente em tecidos com crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos (SIMÕES et al., 2010).

Diferenças bioquímicas, de biologia celular e molecular dividem subclasses dos alcaloides. Sua biossíntese é catalisada por enzimas estereoespecíficas, que formam um isômero em detrimento de outro arranjo espacial, e regiões específicas, que formam um de dois produtos possíveis, com ação sobre substratos específicos. Os principais aminoácidos envolvidos nessas reações (lisina, ornitina, tirosina e triptofano) ocorrem isolados ou combinados com moléculas

de secoiridoide, esteroide ou terpenoide, de forma a obter diversas classes de alcaloides (FACCHINI; DE LUCA, 2008; YANG; STÖCKIGT, 2010).

A função dos alcaloides nas plantas ainda não é clara, porém de acordo com Croteau et al. (2000), algumas respostas estão sendo evidenciadas amparadas em funções eco-químicas dessas moléculas. O papel dos alcaloides nas defesas das plantas é embasado pela diversidade de efeitos fisiológicos que estas moléculas exercem em animais e por sua atividade antimicrobiana. Vários alcaloides apresentam toxidez aos insetos e atuam como repelente em herbívoros.

2.6 Indução de resistência no controle de doenças em plantas

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

O estudo da indução de resistência em plantas está sendo acompanhado pelo surgimento de novos produtos comerciais que apresentam maior eficácia, estabilidade e menor impacto ao ambiente, sendo capazes de propiciar melhorias na produtividade agrícola, por reduzir perdas causadas por estresses bióticos e abióticos, dentro do conceito de amplo espectro de ação, conferido por estes indutores.

Algumas formulações para indução de resistência são baseadas em extratos vegetais, a exemplo de subprodutos/resíduos da cadeia produtiva do café. Resende et al. (2006) e Resende et al. (2007) solicitaram depósito de patente para formulação a base de extratos de folhas de café (*Coffea* spp.) e para formulação à base de cascas de frutos de café, respectivamente. Estas formulações têm como principal matéria prima reciclável folhas de cafeeiro que caem ao solo (devido a doenças, colheita de frutos, podas e outros estresses) e subprodutos do beneficiamento dos grãos (endocarpo, mesocarpo e exocarpo) e podem ser usadas com ou sem sais minerais ou outros adjuvantes, para o controle de doenças fúngicas no cafeeiro e bacterianas no algodoeiro e tomateiro (RESENDE et al. 2004; BARGUIL et al., 2005; MEDEIROS et al., 2009; ZACARONI; SOUZA; RESENDE, 2010).

A utilização das formulações a base de casca e de folhas de café proporcionou considerável proteção contra *Cercospora coffeicola* e *Phoma costarricensis* (AMARAL, 2005; Santos et al., 2007). Para cercosporiose, Amaral (2005) observou reduções na percentagem da doença de 40% e 37%, respectivamente, em mudas tratadas com formulações a base de extrato de casca de café e extrato de folhas de café. Santos et al. (2007) observou em experimento de campo, que o tratamento com formulações a base de extrato de folhas de café reduziu a área abaixo da curva de progresso da mancha de Phoma em 61%, comparada à testemunha pulverizada com água e em 30% em relação à testemunha pulverizada com Viça-Café Plus®.

Com relação ao efeito sobre a ferrugem, o extrato de casca de café (ECFC) e de folhas de cafeeiro (NEFID), fosfito de manganês e cobre e suas misturas simples proporcionaram controle da ferrugem em mudas de cafeeiro, variando de 34 a 58%. Já a associação de NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês proporcionou controle de 70%. Em campo, formulação de fosfito de K e extrato cítrico (Fortaleza), fosfito de Mn, as associações NEFID + Fortaleza e fosfito de Mn + Fortaleza proporcionaram redução da intensidade da ferrugem do cafeeiro. Fosfito de Mn, Fortaleza e a mistura destes proporcionaram aumentos na produtividade, sendo semelhantes ao tratamento com fungicida sistêmico (padrão de controle). Todas as associações de fosfitos com NEFID ou ECFC proporcionaram maior incremento no crescimento das mudas, além de aumentos nas atividades das enzimas de defesa peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase e nos teores de fenóis solúveis totais. Também foram observados aumentos na expressão de genes que codificam para catalase (CAT) e fenilalanina amônia-liase (PAL), enzimas relacionadas ao metabolismo fenólico, importante para a defesa do cafeeiro (COSTA et al., 2011; VALENTE et al., 2012).

Estudos de indução de resistência contra a mancha aureolada ainda são escassos, entretanto, resultados promissores foram alcançados com o uso do indutor químico de resistência acibenzolar-S-metil (ASM, produto do grupo benzotriazolone ou BTH). Patrício et al. (2002) verificaram que o ASM propiciou controle da mancha aureolada quando aplicado nas doses de 20 e 40g/ha. A aplicação do produto também proporcionou proteção contra *H. vastatrix* em mudas de cafeeiro das cultivares Mundo Novo e Catuaí Vermelho M-99 (MARCHI; BORGES; RESENDE, 2002; GUZZO et al., 2001). Este efeito indutor do ASM contra a ferrugem foi confirmado por Nojosa et al. (2009), onde o tratamento com ASM proporcionou uma percentagem de controle de 56,82% em folhas destacadas e de 52% em mudas de café. No campo, Fernandes et al. (2013) demonstraram que o ASM foi efetivo em controlar a ferrugem do cafeeiro na cultivar Mundo Novo em ano de baixa produção; entretanto o mesmo não ocorreu em ano com alta produção, quando a pressão de inóculo foi maior.

Nardi et al. (2006), utilizando técnicas de PCR quantitativo em tempo real e microarranjos de DNA, observaram que a pulverização com ASM em cafeeiro induziu a expressão de genes de defesa, típicos da resistência sistêmica adquirida. A principal resposta nas folhas foi a expressão de genes relacionados à explosão oxidativa e ao aumento de barreiras físicas e químicas (glutaciona-S-transferase, superóxido dismutase, peroxidase, lipoxigenase e quitinase).

Com relação a mecanismos de defesa contra a bacteriose, Oliveira e Romeiro (1990) observaram maior atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase em extratos provenientes de folhas inoculadas com *P. syringae* pv. *garcae*. Esses autores também sugeriram que compostos fenólicos poderiam estar envolvidos na resistência do cafeeiro à *P. syringae* pv. *garcae*, sendo que extratos de folhas velhas inibiram o crescimento desta bactéria. O acúmulo de substâncias do tipo fitoalexinas, fenólicos e proteínas de defesa é provavelmente apenas uma parte da resposta de defesa do cafeeiro, porém estes e os demais mecanismos dessa resistência não estão claramente definidos.

Diversos compostos foram capazes de induzir resistência de plantas a patógenos fúngicos em experimentos conduzidos em condições controladas (ASLAM et al., 2009), porém, falta a comprovação dos resultados em condições de campo, tanto para patossistemas fúngicos quanto para bacterioses. Esses compostos, potenciais indutores naturais podem minimizar o impacto da aplicação de fungicidas convencionais, reduzindo a contaminação ambiental, como também do aplicador e do consumidor, além de reduzir o risco de resistência dos patógenos ao controle químico.

2.7 Isolamento de fitobacterias

O isolamento de bactérias a partir de plantas doentes faz-se necessário para associar determinada bactéria a uma doença, em outras palavras é a identificação do agente etiológico da doença. Essa associação foi descrita pela primeira vez por Robert Koch (1843-1910), o qual criou uma metodologia para estabelecimento de correlação entre um microrganismo e uma determinada enfermidade (ROMEIRO, 2005). Após o estudo de Koch, diversas bactérias da área medicinal humana foram descobertas e descritas. Até os dias de hoje, seu procedimento é utilizado, inclusive em fitobacterias, chamado de Postulados de Koch.

As bactérias podem ser classificadas como fastidiosas e não fastidiosas. As fastidiosas são aquelas que não crescem ou de difícil crescimento em meios artificiais. Enquanto as não fastidiosas são aquelas que crescem com relativa facilidade em meios de cultura, desde que na

presença de fontes de carbono e nitrogênio (ROMEIRO, 2005). Com o isolamento de bactérias, é possível dispor do organismo em questão sob forma de cultura pura em meio artificial. Uma vez isolado, poderá-se-a proceder com metodologias de patogenicidade, anatomia, fisiologia e teste para gama de hospedeiros, de forma a facilitar a identificação e caracterização.

O isolamento padrão de bactérias fitopatogênicas requer cuidados de assepsia, uma vez que, bactérias saprófitas estão presentes associada ao tecido doente, principalmente em lesões mais velhas. O procedimento para isolamento de bactérias consiste a partir da coleta do material (órgão vegetal ou planta inteira) nos estágios iniciais da infecção; corte do tecido; lavagem em álcool etílico 50%; lavagem em hipoclorito 2%; lavagem em água esterilizada e maceração do tecido. A suspensão obtida é plaqueada geralmente em meio 523 de Kado e Heskett (1970), o meio mais comumente utilizado na fitopatologia, embora outros meios enriquecidos também possam ser utilizados.

O método tradicional de isolamento nem sempre é eficiente, principalmente em materiais com baixo nível de infecção bacteriana. O isolamento ineficiente pode levar a falsos negativos em metodologias de detecção de determinado patógeno, o que pode ocasionar disseminação de algum patógeno em áreas até então livres destes, através da disseminação de materiais contaminados com patógenos de regulamentação controlada.

O uso de novas técnicas de isolamento de fitobacterias, que liberem mais células viáveis de materiais infectados pode trazer mais eficiência para métodos de detecção, principalmente para órgãos fiscalizadores que controlam o transporte de materiais vegetais hospedeiros de organismos bacterianos controlados entre fronteiras nacionais ou internacionais. Técnicas mais eficientes de isolamento também poderão facilitar rotina de laboratórios que trabalharam com estes microrganismos.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. Plant pathology. San Diego: **Elsevier Academic Press**, 2005.
- ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 3, p. 10–15, 2001.
- AMARAL, J. F.; TEIXEIRA, C.; PINHEIRO, E.D. A bacterium causing halo blight of coffee. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 23, p. 151–155, 1956.
- AMARAL, D. R. **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), p. 96, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- ASLAM, M. et al. Development and evaluation of a new high yielding and better fibre quality mutant NIAB-824 of cotton through pollen irradiation. **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, n. 6, p.715, 2009.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.
- BARGUIL, B. M. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 535–537, 2005.
- BARI, R.; JONES, J. D. G. Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Molecular Biology**, v. 69, n. 4, p. 473–488, 2009.
- BELL, E. A.; CHARLWOOD, B.V. **Secondary plant products, in Encyclopedia Plant Physiology**. New York: Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, v. 8, 1980.
- BEZERRA, D. A. C. **Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-Árido). Patos, PB: Universidade Federal de Campina Grande, p. 62, 2008.
- BOATRIGHT, J. et al. Understanding *in vivo* benzenoid metabolism in petunia petal tissue. **Plant Physiology**, v. 135, n. 4, p. 1993–2011, 2004.
- BOSTOCK, R. M. Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 545–580, 2005.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317–38, 1998.
- CARDOSO, R.M.L.; SERA, T. Obtenção de cultivares de *Coffea arabica* L. com resistência simultânea a *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. e *Pseudomonas syringae* pv *garcae* Amaral et al. no Estado do Paraná. In: **Simpósio sobre ferrugens do cafeeiro**. Oeiras. Resumos, Lisboa, CIFC/IICT, p. 417–419, 1983.

- CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4^aed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade, p. 443–461, 2002.
- CAVALCANTI, L. S. et al. (eds). Indução de Resistência em Plantas Contra Patógenos e Insetos. Piracicaba, **FEALQ**, p. 263, 2005.
- CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n.7, p. 1033–1043, 2000.
- CONAB; Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: café, Brasília: **Conab**, v. 1, n. 1, 2018. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/>. Acesso em: 14 de setembro de 2021.
- CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phythererapy Research**, v. 15, p. 183–205, 2001.
- COSTA, A. S.; SILVA, D.M. A Mancha aureolada do cafeeiro. **Bragantia**, v.19, p.LXII-LXVIII, 1960.
- COSTA, P. H. et al. Associação de indutores de resistência no manejo da ferrugem do cafeeiro. In: **VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. Resumos, Araxá, 2011.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Rockville: American Society of Plant Physiologists, p.1250–1318, 2000.
- DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 2. ed. London: John **Wiley & Sons**, p. 517, 2002.
- 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**, v. 133, n. 1, p. 141–157, 2012.
- DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, p. 843–847, 2001.
- DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1085–1097, 1995.
- DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 185–209, 2004.
- FACCHINI, P. J.; LUCA, V. Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 763–784, 2008.

- FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Ed. Universidade Federal de Santa Catarina, p. 163–179, 2000.
- FARAH, A. et al. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, v. 98, p. 373–380, 2006.
- FATOBENE, B. J. R. **Seleção de cafeeiros com resistência múltipla a nematoide do gênero *Meloidogyne***. Tese (Doutorado). Instituto Agrônomico de Campinas, Campinas, SP, p. 71, 2014.
- FERNANDES, L. H. M. et al. Acibenzolar-s-methyl is rust and blotch control in field condtions. **Coffee Science**, v. 8, n.1, p. 21, 2013.
- FU, Z. Q.; DONG, X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 839–863, 2013.
- GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 205–227, 2005.
- GOBBO, N. L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.
- GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro. In **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Eds H. KIMATI, L. AMORIM, A. F. BERGAMIN, L. E. A.; CAMARGO; J. A. M. REZENDE. SP, Brasil: Editora Agronômica Ceres, 3ª ed, v. 2, p. 184–200, 1997.
- GONTHIER, M.P. et al. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 1853–1859, 2003.
- GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 4, p. 414–420, 2006.
- GUERRA- GUIMARÃES, L. et al. Chitinases of *Coffea arabica* genotypes resistant to orange rust *Hemileia vastatrix*. **Biologia Plantarum**, v. 53, n. 4, p. 702–706, 2009.
- GUZZO, S.D. et al. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 1, p. 89–94, 2001.
- HARBORNE, J.B. Classes and functions of secondary products, In: Walton NJ, Brown DE (Ed.). **Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products**. London: Imperial College, p.1–25, 1999.
- HARRISON, M. J.; BALDWIN, I. T. Biotic interactions: ploy and conter-ploy in the biotic interactions of plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, n. 4, p. 353–355, 2004.

- HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade, p.651–666, 2002.
- HIRANO, S. S.; UPPER, C.D. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 21, p. 243–269, 1983.
- 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**, Melbourne, v. 5, n. 9, p. 1094–1101, 2011.
- ITO, D. S. et al. Resistance to bacterial blight in arabica coffee cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, p. 99–103, 2008.
- ITO, D. S. et al, Heterose em híbridos de café arábicos com resistência à ferrugem, mancha areolada e aos nematóides. In: **VII Simpósio das Pesquisas dos cafés do Brasil**. Resumos. Araxá, 2011.
- JANSEN, A. Plant protection in coffee: recommendations for the common code for the coffee community initiative. **Convention Project Chemical Safety**, p. 62, 2005. Disponível em: <http://www.sustainable-coffee.net/download/2006/4c-pesticidereport.pdf>. Acesso em: 05 de junho de 2012.
- JESUS JUNIOR, W. C. J. et al. Controle químico da mancha aureolada do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 61, 2002. (Suplemento)
- JOHNSTON, K. L.; CLIFFORD, M. N.; MORGAN, L. M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 4, p. 728–733, 2003.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, London, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006.
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, p. 969–976, 1970.
- KAWAOKA, A. et al. Ectopic expression of a horseradish peroxidase enhances growth rate and increases oxidative stress resistance in hybrid aspen. **Plant Physiology**, v. 132, n. 3, p. 1177–1185, 2003.
- KEEN, N. T. Phytoalexins and their elicitors. In: HOAGLAND, R. E. (Ed.). *Microbes and microbial products as herbicides*. Washington: **American Chemical Society**, p. 114–129, 1990.
- KIMURA, O.; ROBBS, C.F.; FERRARI, J.A.R. Algumas observações relacionadas com as bacterioses do cafeeiro. In: **4º Congresso brasileiro de pesquisas cafeeiras**, Caxambu. Resumos. Rio de Janeiro: IBC/GERCA, p. 104, 1976.

KOORNNEEF, A.; PIETERSE, C. M. Cross talk in defense signaling. **Plant Physiology**, v. 146, n. 3, p. 839–844, 2008.

KUTYWAYO, D. et al. The impact of climate change on the potential distribution of agricultural pests: the case of the coffee white stem borer (*Monochamusleuconotus* P.) in Zimbabwe. **PloS One**, v. 8, n. 8, p. 1–13, 2013.

LELLIOT, R.A.; BILLING, E.; HAYWARD, A.C. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonads. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 29, n. 3, p. 470–589, 1966.

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

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

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

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**, v. 26, n. 5, p. 1103–1106, 2002.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, Oxford, v. 60, n. 6, p. 551–565, 2002.

MEDEIROS, F. C. L. et al. Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, p. 1–9, 2009.

MEDEIROS, R. de V. V.; RODRIGUES, P. M. A. A economia cafeeira no Brasil e a importância das inovações para essa cadeia. **A economia em revista**, v. 25, n.1, 2017.

MENDONÇA, S. C.; GUERRA, N. B. Métodos físicos e químicos empregados no controle do escurecimento enzimático de vegetais. **Boletim SBCTA**, v. 37, n. 2, p. 113–116, 2003.

MÉTRAUX, J. P. Induced defenses in plants. In: **Indução de resistência em plantas e patógenos**. Anais da III Reunião Brasileira sobre indução de resistência em plantas e patógenos. Universidade Federal de Viçosa- UFV, Viçosa, 2007.

MOHAN, S. K. Investigações sobre *Pseudomonas garcae* Amaral et al. em cafeeiros. In: **Congresso brasileiro de pesquisas cafeeiras**, Caxambu. Resumos. Rio de Janeiro: IBC/GERCA, p. 56, 1976.

MOHAN, S. K.; CARDOSO, R.M.L.; PAIVA, M.A. Resistência em germoplasma de Coffea ao cretamento bacteriano incitado por *Pseudomonas garcae* Amaral et al. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 13, n. 1, p. 53–64, 1978.

- MORAES, S. A. et al. Resistência de cafeeiros à *Pseudomonas garcae* In: **2º Congresso brasileiro de pesquisas cafeeiras**, Resumos. Poços de Caldas (MG). Rio de Janeiro; IBC, p. 183, 1974.
- NAKAZAWA, A.; NOZUE, M.; YASUDA, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. **Journal of Plant Research**, v. 114, n.2, p. 323–328, 2001.
- NARDI, B. et al. Differential responses of *Coffea arabica* L. leaves and roots to chemically induced systemic acquired resistance. **Genome**, v. 49, n. 12, p. 1594–1605, 2006.
- NOJOSA, G. B. A. et al. Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de *Phoma*. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 1, p. 60–62, 2009.
- OLIVEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S. Reação de folhas novas e velhas de cafeeiro a infecção por *Pseudomonas cichorii* e *P. syringae* pv. *garcae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 1, p. 355–356. 1990.
- OLTHOF, M. R. et al. Chlorogenic acid, quercetin-3- rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 6, p. 1806–1814, 2003.
- PARK, S. W. et al. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. **Science**, v. 318, n. 5847, p. 113–116, 2007.
- PATRÍCIO, F.R.A.; ALMEIDA, I.M.G.; BARROS, B.C.; SANTOS, A.S. Effect of fungicides, antibiotics, and acibenzolar-S- methyl over cercosporiosis and bacterial halo blight in coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 147, 2002. (Suplemento)
- PERES, L. E. P. Metabolismo Secundário. Piracicaba, São Paulo: **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**. ESALQ/Universidade de São Paulo, p. 1–10, 2004.
- PETEK, M. R. et al. Seleção de progênies de *Coffea arabica* com resistência simultânea à mancha aureolada e à ferrugem alaranjada. **Bragantia**, v. 65, p. 65–73, 2006.
- POZO, M. J.; LOON, L. C. van; PIETERSE, C. M. J. Jasmonates-signals in plant-microbe interactions. **Plant Growth Regulation**, v. 23, n. 3, p. 211–222, 2004.
- PROST, I. et al. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. **Plant Physiology**, v. 139, n. 4, p. 1902–1913, 2005.
- 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**, v. 58, n. 5, p. 944–955, 2009.
- RESENDE, M.L.V.; BARGUIL, B.M.; RESENDE, R.S.; BESERRA JÚNIOR, J.E.A.; SALGADO, S.M.L. Induction of resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. **The International Joint Workshop on PR-Proteins and Induced Resistance**. Helsingor, Dinamarca, p. 79, 2004.

RESENDE, M.L.V.; CAVALCANTI, F.R.; SANTOS, F.S.; AMARAL, D.R.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M. **Formulação para indução de resistência em plantas, a base de extrato vegetal obtido de folhas do cafeeiro** (PI 0603575-2). 2006.

RESENDE, M. L. V. et al. **Composição para indução de resistência em plantas, a base de extratos de casca de frutos de café** (PI 0705598-6). 2007.

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**, v. 28, n. 1, p. 123–130, 2003.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia & Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Editora Premier, p. 372, 1997.

ROBBINS, R. J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2866–2887, 2003.

RODRIGUES L. M. V et al. Mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Campinas: **Instituto Agrônomo** (Série Tecnologia Apta. Boletim técnico IAC, 212), p. 24, 2013.

ROMEIRO, R. S. Bactérias fitopatogênicas. Viçosa: **Imprensa Universitária/UFV**, p. 417, 2005.

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

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

SILVA, M. C. et al. Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 72, n. 1/3, p. 29-38, 2008.

SILVESTRINI, M. et al. Expressão de genes de resistência em resposta infecção por nematoides. In: **Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil**, Londrina. Anais, Brasília, DF: Embrapa Café, 2005.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: Da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: **Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Universidade Federal de Santa Catarina**, p. 1102, 2010.

STOUT, M. J.; THALER, J. S.; THOMMA, B. P. H. J. Plant-mediated interactions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 51, p. 663–689, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 4.ed. Porto Alegre: **Artmed**. 2009.

TOLEDO, L. B.; BARBOSA, A. T. Classificação e degustação de café. Rio de Janeiro, **ABIC: Brasil**, p. 20, 1997.

VALENTE, T. C, T. **Expressão gênica e atividade de catalase e fenilalanina amônia liase ativadas por indutores de resistência em cafeeiro**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal. Universidade Federal de Lavras- UFLA, Lavras, p. 67, 2012.

VELLOSILLO, T. et al. Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. **Plant Cell**, v. 19, n. 3, p. 831–846, 2007.

VIERA, J. G. H. Considerações Sobre os Marcadores Bioquímicos do Metabolismo Ósseo e sua Utilidade Prática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia metabologia**, v. 43, n. 6, 1999.

VIERA, L. G. E. et al. Brazilian coffee genome Project: na EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 95–108, 2006.

VLOT, A. C.; DEMPSEY, D. M. A.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. **Annual Review Phytopathology**, v. 47, p. 177–206, 2009.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. Thin layer chromatography in phitochemistry. **Chromatographic Science Series**. v. 99; 2008.

WATSON, J. D. **Molecular biology of the gene**. New York: W. A. Benjamin, 1965.

YANG, L.; STÖCKIGT, J. Trends for diverse production strategies of plant medicinal alkaloids. **Natural Products Reports**, v. 27, n. 10, p. 1469–1479, 2010.

ZACARONI, A. B.; SOUZA, R. M.; RESENDE, M. L. V. Extratos de folhas de café microprocessadas, puros e em misturas com ASM, fertilizantes foliares e óleo vegetal no controle da mancha-angular do algodoeiro, altura de plantas e massa seca da parte aérea. In: **XLIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, v. 35. p. S27-S27, 2010.

ZAMBOLIM, L. et al. Manejo integrado das doenças do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. **Encontro sobre produção de café com qualidade**. Palestras. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 134–215, 1999.

ZAMBOLIM L., VALE F. X. R., PEREIRA, A. A., CHAVES, G. M. Café. In Controle de doenças de plantas, p. 83–180. Eds F. X. R. VALE; L. ZAMBOLIM. Viçosa: **Universidade Federal de Viçosa**, 1997.

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**, v. 2, p. 165–180, 2005.

ZOCCOLI, D. M.; TAKATSU, A.; UESUGI, C. H. Ocorrência de mancha aureolada em cafeeiros na Região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. **Bragantia**, v. 70, n. 4, p. 843–849, 2011.

ZURBRIGGEN, M. D.; CARRILLO, N.; HAJIREZAEI, M. R. ROS signaling in the hypersensitive response: when, where and what for? **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 4, p. 393–396, 2010.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

**ARTIGO 1- RESISTANCE OF GENOTYPES AND DEFENSE COMPOUNDS
AGAINST BACTERIAL HALO BLIGHT OF COFFEE**

Artigo submetido de acordo com o periódico Journal of Phytopathology.

Resistance of genotypes and defense compounds against bacterial halo blight of coffee

Stéfanny Araújo Martins¹, Mário Lúcio Vilela Resende¹, Ana Cristina Andrade Monteiro,
Wilder Douglas Santiago², Victor Augusto Maia Vasconcelos¹, Tharyn Reichel¹, Matheus
Henrique Brito Pereira¹, Deila Magna dos Santos Botelho*¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, caixa postal 3037, Lavras MG, Brazil

²Universidade Federal de Lavras, Departamento de Química, caixa postal 3037, Lavras MG, Brazil

*Corresponding author: Deila Magna dos Santos Botelho, E-mail: deilamagna@hotmail.com

Abstract

Bacterial halo blight of coffee (BHB), caused by *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, is one of the main coffee diseases, and is economically important mainly in regions of higher altitudes and mild temperatures. The use of resistant cultivars in the management of diseases is the most efficient and least costly technology for producers. The Coffee Germplasm Bank of Minas Gerais State has genotypes with great genetic variability, some of which are sources of resistance to several diseases and pests. Thus, the objective of this study was to evaluate the potential of 34 genotypes from the Coffee Germplasm Bank of Minas Gerais State and five cultivars with resistance to BHB. We evaluated the expression of three plant defense genes (phenylalanine ammonia liase-*PAL*, peroxidase-*POX*, and cinnamyl alcohol dehydrogenase- *CAD*), and quantified the content of total soluble phenolic compounds, lignin, caffeine, trigonelline, and chlorogenic acid in coffee leaves showing different levels of resistance to BHB. The cultivar IPR 102 (resistant control to BHB), the Catimor UFV 7158, Caturra Vermelho x CIFIC H 79/1 UFV 339-34, Catiguá MG2, Volutifolia Vermelho, Caturra Vermelho, Híbrido de Timor UFV 432-02, Caturra Vermelho x CIFIC H 288/14 UFV 319-04, and Caturra Vermelho x CIFIC H 79/1 UFV 339-02 genotypes showed low disease severity. The UFV 7158 genotype showed higher *PAL* and *POX* expression levels than Mundo Novo 376/4 cultivar. The IPR 102 cultivar and UFV 7158 genotype showed high chlorogenic acid content and low caffeine and trigonelline contents.

Keywords: *Coffea* sp., *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, phenylalanine ammonia lyase, peroxidase, chlorogenic acid

1 Introduction

Several factors limit coffee production in Brazil, including the occurrence of fungal and bacterial diseases. The bacterial halo blight of coffee (BHB) is the main bacterial disease of coffee, and its etiologic agent is *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Amaral et al., 1956, Young et al., 1978), a gram-negative bacterium with straight or slightly curved rod-shaped cells (Lelliott et al. 1966).

Regions subject to strong winds, mild temperatures, and frequent rains provide favorable conditions for this disease, which causes losses in both nursery and field conditions (Zoccoli et al. 2011). The management of BHB is based on preventive measures, such as the choice of healthy seedlings and disease-free areas, formation of windbreaks around the crop, and measures that aim to prevent entry of the pathogen, and/or prevent the advancement of bacteriosis in the areas where it has been detected. Chemical control of this disease on coffee seedlings consists of an application of the antibiotic kasugamycin chloridate intercalated with copper-based products (Barbosa et al. 2018; Rodrigues et al. 2013).

However, the development of resistant cultivars to BHB and other diseases is the most efficient and economical management practice for producers, allowing them to reduce production costs and minimize the use of chemicals in the environment (Brummer et al., 2011). Oliveira and Romeiro (1990) observed increased activity of peroxidase and polyphenol oxidase in extracts from coffee leaves inoculated with *P. syringae* pv. *garcae* and concluded that phenolic compounds could be involved in coffee resistance. The accumulation of phytoalexin-like substances, phenolic compounds, and defense proteins is probably only part of the defense response of coffee, but these and other mechanisms are not clearly defined (Hahn 1996; Kuc 1995; Smith 1996; Wulff and Pascholati 1998). Phenolic compounds, which mainly consist of phenolic acids and derivatives, lignins, and tannins, are secondary metabolites widely distributed in nature and are related to plant defense against pathogens (Daayf et al. 2012; Nicholson and Hammerschmidt 1992).

To understand the resistance mechanisms of plants, molecular technologies may be used as a tool that provides information on mechanisms of pathogen recognition, signal transduction and activation of

defense genes (Cramer et al. 1993). The identification of genes related to the plant's defense against diseases in genetic materials that have some level of resistance helps in understanding the mechanisms that act during pathogenesis (Xue et al., 2015, Pokou et al., 2019).

A practical way to select genotypes resistant to pests and diseases in germplasm banks is to identify markers, which are substances that can indicate the occurrence of particular characteristics (Kavino et al., 2009, El-DougDoug et al., 2013). Coffee Germplasm Bank of Minas Gerais State, located at EPAMIG's Experimental Farm in Patrocínio, MG, contains great genetic variability, consisting of many sources of resistance to pests and diseases of the coffee tree (Botelho et al. 2017). However, there is no information on the interaction of this collection with the pathogen *P. syringae* pv. *garcae*.

Thus, the objective of this study was to evaluate 34 genotypes of Coffee Active Germplasm Bank of *Minas Gerais State*, and five cultivars in relation to the severity of the bacterial halo blight of coffee. We also aimed to quantify the levels of total soluble phenolic compounds and lignin in the leaves, the metabolites synthesized in the leaves of genotypes with different levels of resistance when inoculated with *P. syringae* pv. *garcae* and the expression of genes related to plant defense.

2 Material and methods

2.1 Resistance of coffee genotypes to bacterial halo blight of coffee

The experiment was carried out at the Department of Phytopathology at the Federal University of Lavras - UFLA. Seeds from 34 open-pollinated genotypes S4 generation (Germplasm Bank of Minas Gerais State, Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais—EPAMIG, located at Patrocínio-MG), and five cultivars (IPR 102, Araponga MG 1, Catiguá MG 2, Catucaí Amarelo 2SL, Mundo Novo IAC 376/4) (Table 2), were germinated in plastic trays containing autoclaved sand. The germination chamber was calibrated at 30°C and 80% humidity. Coffee seedlings with three pairs of fully expanded leaves of genotypes selected were used in this trial. The bacterial suspension used as inoculum was prepared with *P. syringae* pv. *garcae* pathotype strain CFPB1634, provided by the bacteriology laboratory of the Federal University of Lavras. The cultures grown for 48 h on nutrient agar medium and suspension was prepared and standardized in a spectrophotometer to contain approximately 5.1×10^9 CFU.mL⁻¹ (A600 = 0.8). The bacterial suspension was sprayed on the

leaf's abaxial surface, and the plants were kept in a moist chamber for 24 h. The experiment was conducted in a growth chamber under controlled conditions (relative humidity 90% and temperature 21°C).

The first assessment of disease severity was carried out five days after inoculation using the diagrammatic scale proposed by Belan et al. (2014). Five severity assessments were carried out at three-day intervals. After the evaluations, using the disease severity data, the area under the disease progress curve (AUDPC) was calculated, according to the formula proposed by Shaner and Finney (1977). The experimental design adopted was randomized blocks, with 39 treatments (coffee genotypes) and three replications, each experimental plot consisting of four plants.

2.2 Plant material for molecular analysis of gene expression and levels of lignin and phenols

The first two pairs of fully expanded leaves of the four plants of the experimental plot were used for analyses of the expression of defense genes by RT-qPCR and phenolic compounds and lignin contents. The genotypes used for these evaluations were Mundo Novo 376/4 and UFV 7158. The leaves were frozen in liquid nitrogen after collection and stored in a freezer at -80°C until the beginning of the analyses. The experimental design was a randomized block with four treatments (two genotypes and inoculation- inoculated and non-inoculated plants with *P. syringae* pv. *garcae*), and three replications, each experimental plot consisting of three plants. Leaf samples were collected at 0, 12, 24 and 48 h after inoculation for molecular analysis, and samples collected at 96h after inoculation were used for quantification of phenolic compounds and lignin.

2.3 Analysis of gene expression by RT-qPCR

The expression of genes related to enzymes that participate in the route of phenolic compounds was analyzed by RT-qPCR. The analyzed genes were *PAL*, *POX*, and *CAD*, which encode the enzymes phenylalanine ammonia lyase, peroxidase, and cinamyl alcohol dehydrogenase, respectively.

2.3.1 RNA extraction, DNase treatment and synthesis of cDNA

The leaf samples of the selected genotypes were macerated in a mortar using liquid nitrogen, and the Invitrogen Concert™ Plant RNA reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was used for RNA extraction. After RNA extraction, the samples were quantified on a Nanovue® spectrophotometer (NanoVue GE Healthcare). The integrity of the RNA was verified by electrophoresis on a 0.8% agarose gel. The samples were treated with the Turbo DNA Free™ kit (Ambion) to eliminate residual DNA.

For the synthesis of cDNA, the SuperScript® III First-Strand Synthesis Super Mix kit (Invitrogen) was used according to the manufacturer's protocol. The samples were stored at -20°C until the analyses were performed.

2.3.2 Primers

The primers for the expression analysis of the *PAL*, *POX*, and *CAD* genes of coffee were designed with the aid of Integrated DNA Technologies (IDT) software. As reference genes, *UBIQUITIN* and *RPL7* were selected, based on a study carried out by Cruz et al. (2009) (Table 1). The efficiency of all the evaluated primers was tested. The efficiency of PCR amplification was determined by the standard curve method using pooled samples with a serial dilution of 5 times.

2.3.3 RT-qPCR

The ABI PRISM 7500 Real-Time PCR model (Applied Biosystems) was used, and the detection system was SYBR Green. The reaction conditions were 2 minutes at 50°C, 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C and ending with 15 seconds at 95°C. For each reaction, 1.0 µL of cDNA, 0.2 µL of each primer and 5.0 µL of Power SYBR® Green PCR Master Mix with ROX (Invitrogen) were used for a final volume of 10.0 µL, per sample. For each gene analyzed, the experiment was conducted using cDNAs obtained from three biological replicates, with three technical replicates, and the results were normalized using CTs (threshold cycles) obtained by expression of the reference gene. Gene expression was quantified using the comparative CT method (Livak and Schmittgen 2001).

2.4 Preparation of leaf tissues for quantification of lignin and total soluble phenols

Leaf plant tissues were macerated in liquid nitrogen and lyophilized for 48 h. A 30.0 mg aliquot of the lyophilized material was homogenized with 1.5 mL of 80% methanol and kept on a rotary shaker overnight at room temperature. The suspension was centrifuged at $12,000 \times g$ for 5 min. The supernatant was used for the determination of total soluble phenolic compounds, while the solid residue was used for the determination of soluble lignin.

For the determination of total soluble phenolic compounds, 150 μL aliquots of the methanolic extract were mixed with 150 μL of the 0.25 N Folin–Ciocalteu reagent for 5 min, homogenized with 150 μL of 1 M Na_2CO_3 , for 10 min, and diluted with 1.0 mL distilled water. The absorbance values of this reaction were determined at 725 nm using a microplate spectrophotometer and calculated based on a chlorogenic acid curve. The total phenolic compounds were expressed in μg equivalents of chlorogenic acid per milligram of dry mass (Spanos and Wrolstad 1990).

The determination of soluble lignin in the different genotypes was carried out according to the methodology proposed by Doster and Bostock (1988): 1.5 mL of 80% methanol, homogenized, and centrifuged, was added to the solid residue at $12,000 \times g$ for 5 min at 4°C . The supernatant was discarded and the residue was kept at 65°C for 15 h. Subsequently, 1.5 mL of a solution of thioglycolic acid and 2M HCl (1:10) was added, aiming to precipitate lignin bound to thioglycolic acid. The absorbance of the samples was determined using a microplate spectrophotometer at 280 nm, and the values were calculated based on the lignin curve and expressed in μg of soluble lignin per milligram of dry mass.

2.5 Preparation of aqueous extracts of coffee leaves for quantification of bioactive compounds

To quantify the bioactive compounds, the coffee cultivars used were IPR 102, Iapar 59, and Mundo Novo 376/4, considered resistant, partially resistant and susceptible to BHB, respectively (Ito et al. 2008; Sera et al. 2017). The UFV 7158 genotype showed a similar pattern of disease severity for control resistance (IPR 102) and was also evaluated.

Two extracts were prepared for each genotype, from inoculated and non-inoculated leaves with the bacterium *P. syringae* pv. *garcae*. The leaves were collected 48 h after inoculation, and dried in an oven at 50°C until reached constant weight. The extraction was performed according to the methodology proposed by (Moreira et al. 2013): for each 0.5 g of sample, 50 mL of water was added and the extraction

was carried out under heating up to boiling temperature for three min. The extracts were then filtered through filter paper.

2.5.1 Chromatographic analysis

The chromatographic analyses were performed on a Shimadzu HPLC system equipped with a high-pressure quaternary pump model LC-20AT, degasser model DGU-20A5, interface model CBM-20A, automatic injector model SIL-20A-HT, and UV-Vis detector (SPD-20A). The column employed was a Supelcosil LC-C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm) connected to a Supelcosil C18 pre-column (4.6 × 12.5 mm, 5 μm).

The methodology used for the analysis of bioactive compounds was carried out according to the methodology proposed by Malta and Chagas (2009) with modifications. The compounds analyzed were trigonelline, chlorogenic acid (5-caffeoylquinic), and caffeine. The solvents referring to the mobile phase were methanol, glacial acetic acid and water obtained from a Milli-Q system.

The method used for quantification was external standardization. To construct the analytical curves, dilutions were carried out on an intermediate solution containing a mixture of all standards, which had been obtained by diluting the stock solutions previously prepared. In this intermediate solution, the standards were at a concentration of 1 mg mL⁻¹ and the construction range of the analytical curve was 0.01 to 0.7 mg mL⁻¹. Solutions of 1% acetic acid in water (solvent A) and methanol: water: acetic acid (85%:14%:1% v/v/v) (solvent B) were used as the mobile phase for the elution of the analyzed compounds. The wavelength used was 272 nm, flow of 1.0 mL min⁻¹, and injection volume of 20 μL.

The samples and standards were filtered through a 0.45 μm polyethylene membrane (Millipore) and injected directly into the chromatographic system. The injections of the standards and samples were performed in triplicate, and the identity of the analytes was confirmed by the retention time and the profile of the sample peaks compared to those of the standards.

The experimental design adopted to quantification of bioactive compounds was randomized blocks, with eight treatments (four coffee genotypes and inoculation- inoculated and non-inoculated

plants with *P. syringae* pv. *garcae*), and three replications. Each experimental plot consisting of three plants.

2.6 Statistical analysis

The data were submitted to a Shapiro–Wilk test (Shapiro & Wilk, 1965) to verify the analysis of variance (ANOVA) assumptions. Significant variables in the F-test ($p \leq 0.05$) were submitted to the Scott–Knott test at 5% probability using Sisvar version 5.1 program (Ferreira, 2011).

3 Results

3.1 Resistance to bacterial halo blight of coffee

The five cultivars and the 34 genotypes from the germplasm bank differed significantly in terms of disease severity (Table 2). The IPR 102 cultivar, considered a resistance standard for this disease, progenie Catimor UFV 7158, Caturra vermelho x CIFC H 79/1 UFV 339-34, Catiguá MG2, Volutifolia Vermelho, Caturra Vermelho, Híbrido de Timor UFV 432-02, Caturra Vermelho x CIFC H 288/14 UFV 319-04, Caturra Vermelho x CIFC H 79/1 UFV 339-02 showed reduced values of AUDPC, varying from 0 to 09.85, which was significantly similar to each other.

The cultivars Araponga MG 01, Catucaí Amarelo 2SL and 10 genotypes from the germplasm bank were statistically similar to each other, with AUDPC values between 11.46 and 18.60 (Table 2). The Mundo Novo IAC 376/4 cultivar (susceptibility control) and the Amphillo × H. Natural MR 36–352, H514-7-1-06, Híbrido de Timor UFV 432–07, and Caturra Vermelho × DK 1/6 UFV 309–05 genotypes presented AUDPC values from 39.90 to 57.5. The genotype Híbrido de Timor UFV 376–37 presented the largest AUDPC value among the evaluated genotypes, 89.05.

3.2 Analysis of the expression of *PAL*, *POX* and *CAD* genes in the defense against *P. syringae* pv. *garcae*

The analysis of *PAL* relative expression, inoculated plants of the UFV 7158 genotype showed a significant increase when compared to plants sprayed with water at 12 h after inoculation. At the time of collection, 24 and 48 h after inoculation, plants from the UFV 7158 genotype, inoculated and non-

inoculated, showed greater relative expression, when compared to the Mundo Novo cultivar (Figure 1 A).

The UFV 7158 genotype inoculated with *P. syringae* pv. *garcae* showed higher relative expression of *POX* at 12 and 24 h after inoculation when compared to the expression to inoculated plants of Mundo Novo cultivar (Figure 1 B). As observed in the *PAL* expression, the UFV 7158 genotype sprayed with water showed greater expression than Mundo Novo cultivar.

In the analysis of the *CAD* transcripts, there was no difference between values for inoculated or non-inoculated plants at any evaluated collection time (Figure 1 C).

3.3 Quantification of total soluble phenolic compounds and soluble lignin

The total soluble phenolic compounds and soluble lignin in inoculated and non-inoculated Mundo Novo and UFV 7158 plants, was significantly similar. (Supplemental Figure 1).

3.4 Profile of bioactive compounds in the leaves of coffee genotypes

Quantification of chlorogenic acid, caffeine, and trigonelline was performed on the leaves of coffee genotypes Mundo Novo, Iapar 59, IPR102 and UFV 7158 (Figure 2). The caffeine content in the susceptible and moderately resistant cultivars, Mundo Novo and Iapar 59, respectively, was about two-fold higher than IPR 102 cultivar, resistant control to BHB (Figure 2 A). The IPR 102 cultivar showed an increase of 41% in caffeine after inoculation, while Iapar 59 (moderately resistant) showed a reduction of 50.5% after inoculation with the bacteria (Figure 2 B).

The UFV 7158, IPR 102 and Iapar 59 genotypes showed a higher concentration of chlorogenic acid (5-caffeoylquinic) in the leaves (Figure 2C). The inoculation with *P. syringae* pv. *garcae* altered the levels of chlorogenic acid in the genotypes evaluated (Figure 2 D). The Mundo Novo and Iapar 59 cultivars increased the concentrations of this compound by 73.7 and 33.2%, respectively. Trigonelline levels were significantly higher in the Mundo Novo and Iapar 59 cultivars (Figure 2 E). Iapar 59 cultivar differed significantly after inoculation with *P. syringae* pv. *garcae*, presenting a reduction in the content, when compared to the non-inoculated plants (Figure 2 F).

4 Discussion

The results of severity of cultivars IPR 102 and Mundo Novo 376/4, considered resistant and susceptible to BHB, respectively, in this study, confirmed this classification of resistance to BHB, as verified in other studies (Ito et al., 2008; Sera et al., 2017; Rodrigues et al., 2019; Fernandes et al. 2020). Among the evaluated genotypes from the germplasm bank to BHB resistance, eight genotypes showed disease severity similar to cultivar IPR 102, for example UFV 7158 genotype and Catiguá MG2 cultivar. The UFV 7158 genotype belongs to Catimor germoplasm (crossing between Caturra Vermelho x Híbrido de Timor). Híbrido de Timor is the principal source for disease and pest resistance genes in *C. arabica* breeding program worldwide (Setotaw et al., 2020). Furthermore, UFV 7158 has potential for the production of specialty coffees and resistance source to rust -*Hemileia vastatrix* (Malta et al., 2019; Maia et al., 2013). Resistance sources to BHB in *C. canephora* germplasm was studied by Rodrigues et al. (2020). The authors evaluated cultivars, botanical varieties, clones and hybrids of *C. canephora* against a highly virulent *P. syringae* pv. *garcae* strain by artificial inoculation under greenhouse conditions. The authors observed that only 1.4% of 2.421 evaluated plants were considered resistant to BHB.

Catiguá MG2 cultivar is resistant to rust (Carvalho et al. 2017; Del Grossi et al. 2013) and showed moderate resistance to cercosporiosis in coffee seedlings (Botelho et al. 2017). Fernandes et al. (2020), evaluated the BHB severity under field conditions and this cultivar showed moderate resistance to disease. Although, inoculation methods may influence the response of coffee genotypes to BHB. Rodrigues et al. (2017) compared sprinkling and multiple needles methods and the abrasion technique for resistance tests of BHB on coffee. The results indicated that the abrasion method on first pair of leaves was the most promising technique for early selection on coffee breeding to BHB. However, we evaluated the resistance to BHB, and aimed to quantify defense response of coffee genotypes against *P. syringae* pv. *garcae*. The abrasion technique could active mechanisms plant defense, fact that would change our results.

The UFV 7158 genotype, in general, showed higher *PAL* and *POX* expression levels in inoculated and non-inoculated plants than Mundo Novo cultivar. Disease resistance depends on plant ability to recognize the pathogen in a timely manner to activate defense mechanisms to prevent infection

(Cramer et al., 1993). As the infection process of *P. syringae* pv. *garcae* in coffee leaves has exponential increase in colonization after inoculation (Souza et al., 2019), UFV 7158 genotype possibly was more effective in the increase expression this gene of plant defense. Studies carried out with tobacco modified for *PAL* gene overexpression indicated that these plants were more resistant to infection by *Cercospora nicotianae* than wild plants (Shadle et al. 2003). Gayoso et al. (2010), studying resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae*, quantified increased expression of the *PAL* gene in resistant plants between 8 and 48 h after inoculation with the pathogen. Resistant cotton plants inoculated with *V. dahliae* showed a greater increased expression level of lignin synthesis-related genes and activity of *PAL* and peroxidase than susceptible plants (Xu et al. 2011). Phenylalanine ammonia lyase is involved in the defense of plants against pathogens, mainly because it is at the beginning of the phenylpropanoid route and in catalysis of reactions such as conversion of phenylalanine to transcinamic acid that may lead to the production of phytoalexins and lignin (Dixon 2001; Nakazawa et al. 2001). Increasing peroxidase expression could effectively increase the resistance to disease in plants (Peng and Kuc 1992, Do et al. 2003, Li et al., 2020).

The soluble lignin and total soluble phenolic compound contents did not differ in inoculated and non-inoculated Mundo Novo and UFV 7158 plants. This result may be related to the time that the samples were collected or this compounds not play a fundamental role this pathosystem.

Regarding bioactive compounds, the levels of chlorogenic acid obtained in the present study were close to those found in other studies with coffee leaves (Rodrigues et al. 2011, Fernandes et al., 2009). Higher amounts of this compound were quantified in coffee genotypes with low severity disease. Chlorogenic acid has been listed in several studies as a compound linked to increased resistance (Sheppard and Peterson 1976, Johnson and Schaal 1952, Oliveira and Romeiro 1990, Bennett and Wallsgrove 1994, Rodrigues et al. 2011, Ngadze et al., 2012). According to the results obtained in the present study, chlorogenic acid values around to 2% could be used as a quantification tool in coffee cultivars with potential for resistance to BHB. This could reduce time and labor in the selection of genotypes for resistance to this disease.

In the present study, the reduction in the chlorogenic acid content after inoculation was observed in IPR 102 and UFV 7158. These results can be explained by the possible conversion of this

compound by the plant into substances that are more toxic to the pathogen. According to Lima et al. (2005), plant phenolic compounds have in common the aromatic ring linked to hydroxyl or its derivatives; found in vacuoles in non-toxic form (glycosides). But after the arrival of a pathogen, phenolic compounds released into the cytoplasm and converted by the beta-glucosidase enzyme to aglycones, which are extremely toxic to the pathogen.

The levels of caffeine found in the present study are similar to those reported in previous studies on Arabica coffee leaves (Ashihara et al. 1996; Rodrigues et al. 2011; Teixeira et al. 2012). The lower levels of caffeine quantified in the genotypes more resistant to BHB may be related to the fact that some substances can be converted into other derivatives and become very toxic (Barros et al. 2010; Hartleb et al. 1997). Caffeine is directly toxic to fungi (Chalfoun et al. 2000; Sugiyama et al. 2016) beyond to its possible involvement in signaling plant defense by direct activation or indirect gene expression (Kim and Sano 2008).

Trigonelline content, as observed in the caffeine, was lower in IPR 102 and UFV 7158 genotypes. However, unlike caffeine, the degradation activity of trigonelline in coffee plants is extremely low (Ashihara, 2006). Then, these results can be related to the constitutive characteristics of this alkaloid in the evaluated genotypes. Other studies quantified trigonelline in coffee leaves (Ashihara and Watanabe, 2014, Silva et al., 2019, Monteiro et al., 2020), but without relating to disease resistance. Trigonelline acts as a chemical defense that protects tissues from herbivorous predators such as insect larvae in *Murraya paniculata* (Ashihara and Watanabe, 2014).

Conclusions

The IPR 102 cultivar (resistant control to BHB), the Catimor UFV 7158, Caturra Vermelho x CIFIC H 79/1 UFV 339-34, Catiguá MG2, Volutifolia Vermelho, Caturra Vermelho, Híbrido de Timor UFV 432-02, Caturra Vermelho x CIFIC H 288/14 UFV 319-04, and Caturra Vermelho x CIFIC H 79/1 UFV 339-02 genotypes showed low severity to BHB.

The UFV 7158 genotype showed higher *PAL* and *POX* expression levels in inoculated and non-inoculated plants than Mundo Novo cultivar. The cultivar IPR 102 and UFV 7158 genotype showed high chlorogenic acid content and low caffeine and trigonelline contents.

Acknowledgments

This research was supported by Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais (FAPEMIG), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and the National Institute of Science and Technology of Coffee (INCT-Café).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

Stéfanny Araújo Martins: Methodology, Investigation; Writing- Original draft preparation, Mário Lúcio Vilela de Resende: Conceptualization, Supervision; Ana Cristina Andrade Monteiro: Methodology, Data curation, Wilder Douglas Santiago: Methodology, Formal analysis, Victor Augusto Maia Vasconcelos: Methodology, Tharyn Reichel: Methodology, Investigation; Matheus Henrique Brito Pereira: Methodology, Data curation; Deila Magna dos Santos Botelho: Data curation, Writing- Original draft preparation. All authors read and approved the final manuscript.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

- Amaral JF, Teixeira CG, Pinheiro ED (1965) O bactério causador da mancha aureolada do cafeeiro. *Arquivos do Instituto Biológico*, 23:151-155
- Ashihara, H. (2006). Metabolism of alkaloids in coffee plants. *Brazilian J Plant Physiol* 18(1): 1-8
- Ashihara H, Watanabe S. (2014). Accumulation and function of trigonelline in non-leguminous plants. *Nat Prod Commun* 9(6):795-798
- Ashihara H, Monteiro AM, Gillies FM, Crozier A. (1996) Biosynthesis of Caffeine in Leaves of Coffee. *Plant Physiol* 111:747–753. <https://doi.org/10.1104/pp.111.3.747>
- Barbosa R, Santini P, Guilherme L. (2018). Kasugamycin influence on bacterial blight of coffee and on green coffee beans physicochemical quality. *Coffee Science*. <https://doi.org/10.25186/cs.v13i1.1384>
- Barros FC, Sagata E, de Castro Ferreira LC, Juliatti FC. (2010) Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. *Biosci J* 26:231–239
- Belan LL, Pozza EA, Freitas ML, Souza RM, Jesus Junior WC, Oliveira JM. (2014) Diagrammatic Scale for Assessment of Bacterial Blight in Coffee Leaves. *J Phytopathol* 162:801–810. <https://doi.org/10.1111/jph.12272>
- Bennett RN, Wallsgrave RM. (1994) Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol* 127:617–633. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x>
- Botelho DM, de Resende MLV, Andrade VT, Pereira AA, Patricio FRA, Junior PR, Ogoshi C, de Rezende JC. (2017) Cercosporiosis resistance in coffee germplasm collection. *Euphytica* 213:1–12. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1901-9>
- Brummer EC, Barber WT, Collier SM, Cox TS, Johnson R, Murray SC, Olsen RT, Pratt RC, Thro AM (2011), Plant breeding for harmony between agriculture and the environment. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 9: 561-568. <https://doi.org/10.1890/100225>
- Carvalho AM, Cardoso DA, Carvalho GR, Carvalho VL, Pereira AA, Dominghetti A, Carneiro LF. (2017) Comportamento de cultivares de cafeeiro sob a incidência das doenças da ferrugem e cercosporiose em dois ambientes de cultivo. *Coffee Sci*, 12(1):100-107
- Chalfoun SM, Pereira MC, Angélico CL. (2000) Efeito da cafeína (1,3,7 -trimethylxantina) sobre o crescimento micelial de fungos associados ao café. *Rev Bras Armazenamento* 1:50-53
- Cramer CL, Weissenborn D, Cottingham CK, Denbow CJ, Eisenback JD, Radin DN, Yu X. (1993) Regulation of Defense-related Gene Expression during Plant-Pathogen Interactions. *J Nematol* 25:507–18
- Cruz F, Kalaoun S, Nobile P, Colombo C, Almeida J, Barros LMG, Romano E, Grossi-de-Sá MF, Vaslin M, Alves-Ferreira M. (2009) Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. *Mol Breeding* 23(4):607–616. <https://doi.org/10.1007/s11032-009-9259-x>
- Del Grossi L, Sera T, Sera GH, Fonseca ICB, Ito DS, Shigueoka LH, Andreazi E and Carvalho FG (2013) Rust resistance in Arabic coffee cultivars in northern Paraná. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 56: 27-33. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000100004>
- Daayf F, El Hadrami A, El-Bebany AF, Henriquez MA, Yao Z, Derksen H, El-Hadrami I, Adam LR. (2012) Phenolic Compounds in Plant Defense and Pathogen Counter-Defense Mechanisms. In:

- Cheyrier V, Sarni-Manchado P, Quideau S. (eds) Recent Advances in Polyphenol Research. John Wiley & Sons, Ltd., pp 191–208
- Dixon RA. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411:843–847
- Do HM, Hong JK, Jung HW, Kim SH, Ham JH, Hwang BK. (2003) Expression of peroxidase-like genes, H₂O₂ production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annuum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 16:196–205. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.3.196>
- Doster M, Bostock R. (1988) Quantification of lignin formation in almond bark in response to wounding and infection by *Phytophthora* species. *Phytopathology* 78(4):473–477
- El-DougDoug N K, Mahfouze SA, Ahmed SA, Othman BA, Hazaa MM (2013). Identification of Biochemical and Molecular Markers in Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistant Tomato Species. *Sci Agric* 2 (2): 46-53
- Fernandes, F. L. et al. (2009) Constituintes químicos em frutos e folhas em diferentes cultivares de café e relação com insetos. *Centro Científico Conhecer*, 7
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência E Agrotecnologia*, 35, 1039–1042. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>
- Fernandes LE, dos Santos WG, Carducci FC, Fonseca ICB, Rodrigues LMR, Beriam LOS, Pereira CTM, Shigueoka LH, Sera GH. (2020) Resistance of Arabica coffee cultivars to leaf wounds and *Pseudomonas syringae* under field conditions. *Aust J Crop Sci* 14:46–50. <https://doi.org/10.21475/ajcs.20.14.01.p1781>
- Gayoso C, Pomar F, Novo-Uzal E Merino F, Ilárduya OM.(2010) The Ve-mediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H₂O₂, peroxidase and lignins and drives *PAL* gene expression. *BMC Plant Biol* 10:1–19. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-232>
- Hahn MG (1996) Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annu Rev Phytopathol* 34:387–412
- Hartleb H, Heitefuss R, Hoppe H. (1997) Resistance of crop plants against fungi. Stuttgart, G. Fischer.
- Ito, D. S. et al. Resistance to bacterial blight in arabica coffee cultivars. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 8: 99-103, 2008.
- Johnson G, Schaal LA. (1952) Relation of chlorogenic acid to scab resistance in potato. *Science* 5:627-629
- Kavino M, Kumar N, Damodaran T, Harish S, Saravanakumar D (2009) Biochemical markers as a useful tool for the early identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, race 1 resistance banana clones, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 42:11, 1069-1078. <https://doi.org/10.1080/03235400701622089>
- Kim YS, Sano H. (2008) Pathogen resistance of transgenic tobacco plants producing caffeine. *Phytochemistry* 69:882–888. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.10.021>
- Kuc J. (1995) Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annu Rev Phytopathol* 33:275–297. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.33.090195.001423>
- Lelliott RA, Billing E, Hayward AC. (1966) A Determinative Scheme for the Fluorescent Plant Pathogenic *Pseudomonads*. *J Appl Bacteriol* 29:470–489. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1966.tb03499.x>

- Li Q, Qin X, Qi J, Dou W, Dunand C, Chen S, He Y. (2020). CsPrx25, a class III peroxidase in *Citrus sinensis*, confers resistance to citrus bacterial canker through the maintenance of ROS homeostasis and cell wall lignification. *Hortic Res* 7, 192. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00415-9>
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Maia T, Maciel-Zambolim E, Caixeta E, Mizubuti E, Zambolim L. (2013). The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. *Australasian Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s13313-013-0213-3>.
- Malta MR, Chagas SJ de R. (2009) Avaliação de compostos não-voláteis em diferentes cultivares de cafeeiro produzidas na região sul de Minas Gerais. *Acta Sci - Agron* 31:57–61. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v31i1.6629>
- Malta MR, Oliveira ACBde, Liska GR, Fassio LO, Carvalho GR, Pereira A A, Silva, AD da, Alvaro LN, Marques E R (2019). Qualidade de bebida de grupos genealógicos de genótipos elite de café arábica submetidos ao processamento via úmida. X Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Internet Resource: <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/12476> (verified Jan 10, 2021).
- Monteiro Â, Colombari S, Azinheira HG, Guerra-Guimarães L, Silva MDC, Navarini L, Resmini, M. (2020) Dietary antioxidants in coffee leaves: Impact of botanical origin and maturity on chlorogenic acids and xanthenes. *Antioxidants* 9:1–16. <https://doi.org/10.3390/antiox9010006>
- Moreira ME de C, Pereira RGFA, Dias DF, Gontijoc VS, Vilelad FC, Moraesc G de OI, Giusti-Paivad A, dos Santos MH. (2013) Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of roasted and green *Coffea arabica* L. *J Funct Foods* 5:466–474. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.12.002>
- Nakazawa A, Nozue M, Yasuda H, Takeba G, Kubo H. (2001) Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. *J Plant Res* 114:323–328. <https://doi.org/10.1007/pl00013994>
- Ngadze, E., Icishahayo, D., Coutinho, T. A., and van der Waals, J. E. 2012. Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. *Plant Dis*. 96:186-192.
- Nicholson RL, Hammerschmidt R. (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* 30:369–389
- Oliveira JR, Romeiro RS. (1990) Reação de folhas novas e velhas de cafeeiro a infecção por *Pseudomonascichorii* e *P. syringae* pv. *garcae*. *Fitopatol Bras*, 15(1): 355-356
- Peng M, Kuc J. (1992) Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82:696–699
- Petek M R, Sera T, Sera GH, Fonseca ICB, Ito DS (2006). Selection of progenies of *Coffea arabica* with simultaneous resistance to bacterial blight and leaf rust. *Bragantia* 65(1): 65-73. <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052006000100009>
- Pokou DN, Fister AS, Winters N, Tahi M, Klotioloma C, Sebastian A, Marden JH, Maximova SN, Guiltinan MJ. (2019) Resistant and susceptible cacao genotypes exhibit defense gene polymorphism and unique early responses to *Phytophthora megakarya* inoculation. *Plant Mol Biol*. 99(4-5):499-516. doi: 10.1007/s11103-019-00832-y.
- Rodrigues, L. M. R., Almeida, I. M. G., Patrício, F. R. A., Beriam, L. O. S., Maciel, K. W., Braghini, M. T., & Filho, O. G. (2016). Aggressiveness of Strains and Inoculation Methods for Resistance Assessment to Bacterial Halo Blight on Coffee Seedlings. *J Phytopathol*, 165(2): 105–

114. <https://doi:10.1111/jph.12543>

- Rodrigues, L. M. R., Andrade, V. T., Carneiro, M. G., Destéfano, S. A. L., Beriam, L. O. S., Braghini, M. T., ... Filho, O. G. (2020). The alarming vulnerability of *Coffea canephora* varieties and germplasm to a virulent strain of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, the cause of bacterial halo blight of coffee in Brazil. *J Plant Pathol.* <https://doi:10.1007/s42161-020-00715-y>
- Rodrigues, L M R., Destéfano, S.A.L., Almeida, IMG., Beriam, L. O. S.; Braghini, M. T.; Guerreiro Filho, O. (2019) Multiple resistance to bacterial halo blight and bacterial leaf spot in *Coffea* spp.*. *Arquivos do Instituto Biológico*, 86, e0632018. Epub, 25 .<https://doi.org/10.1590/1808-1657000632018>
- Rodrigues FA, Carré-Missio V, Jham GN, Berhow M, Schurt DA. (2011) Chlorogenic acid levels in leaves of coffee plants supplied with silicon and infected by *Hemileia vastatrix*. *Trop Plant Pathol* 36:404–408. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762011000600010>
- Rodrigues LMR, Almeida IMG de, Patrício FRA, Beriam LOS, Maciel KW, Braghini MT, Guerreiro Filho O. (2013) Mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Campinas, Instituto Agronômico.
- Sera, GH, Sera, T, Fazuoli, LC (2017) IPR 102 – Dwarf Arabica coffee cultivar with resistance to bacterial halo blight. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 17: 403-407. <https://doi.org/10.1590/1984-70332017v17n4c60>
- Setotaw TA, Caixeta ET, Zambolim EM, Sousa TV , Pereira AA , Baião AC, Cruz CD , Zambolim L, Sakiyama NS (2020). Genome Introgression of Híbrido de Timor and Its Potential to Develop High Cup Quality *C. arabica* Cultivars. *J Agric Sci.* 12 (4):64-76 <https://doi.org/10.5539/jas.v12n4p64>
- Shadle GL, Wesley SV, Korth KL, Chen F, Lamb C, Dixon RA. (2003) Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry* 64(1):153-161
- Shaner G, Finney RE. (1977) The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. *Phytopathology* 67:1051-1056
- Sheppard JW, Peterson JF. (1976) Chlorogenic Acid and Verticillium Wilt of Tobacco. *Can J Plant Sci* 56:157–160. <https://doi.org/10.4141/cjps76-023>
- Silva MC, Guerra-Guimarães L, Loureiro A, Nicole MR. (2008) Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). *Physiol Mol Plant Pathol* 72:29-38.
- Silva, J. A. G., Resende, M. L. V., Monteiro, A. C. A., Pádua, M. A., Guerra-Guimarães, L., Medeiros, F. L., ... Botelho, D. M. S. (2019). Resistance inducers applied alone or in association with fungicide for the management of leaf rust and brown eye spot of coffee under field conditions. *Journal of Phytopathology.* doi:10.1111/jph.12814
- Smith CJ. (1996) Accumulation of phytoalexins: Defence mechanism and stimulus response system. *New Phytol* 132:1–45. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1996.tb04506.x>
- Souza JOG de, Pozza EA, Belan LL, Freitas ML de O, Oliveira JM. (2019) Initial stages of infectious process of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* in coffee leaves. *Coffee Sci* 14:338–348
- Spanos GA, Wrolstad RE. (1990) Influence of Processing and Storage on the Phenolic Composition of Thompson Seedless Grape Juice. *J Agric Food Chem* 38:1565–1571. <https://doi.org/10.1021/jf00097a030>
- Sugiyama A, Sano CM, Yazaki K, Sano H. (2016) Caffeine fostering of mycoparasitic fungi against

- phytopathogens. *Plant Signal Behav* 11(1). <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1113362>
- Teixeira AL, Prado PER, Dias KO das G, Malta MR, Gonçalves FMA. (2012) Avaliação do teor de cafeína em folhas e grãos de acessos de café arábica. *Rev Ciência Agronômica* 43:129–137. <https://doi.org/10.1590/s1806-66902012000100016>
- Wulff NA, Pascholati SF. (1998) Preparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. *Sci Agric* 55(1):138-143
- Xu L, Zhu LF, Tu LL, Liu LL, Yuan DJ, Jin L, Long L, Zhang XL (2011) Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. *J Exp Bot* 62(15):5607–5621. [doi:10.1093/jxb/err245](https://doi.org/10.1093/jxb/err245)
- Xue R, Wu J, Zhu Z, Wang L, Wang X, Wang S, et al. (2015) Differentially Expressed Genes in Resistant and Susceptible Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotypes in Response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *PLoS ONE* 10(6): e0127698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127698>
- Young JM, Dye DW, Bradbury JF, Panagopoulos CG, Robbs CF (1978) A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand J Agric Res*, 21:153-177. <https://doi.org/10.1080/00288233.1978.10427397>
- Zoccoli DM, Takatsu A, Uesugi CH (2011) Ocorrência de mancha aureolada em cafeeiros na Região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. *Bragantia* 70:843–849. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052011000400017>

Table 1 Sequence of *primers* used to RT-qPCR analysis.

Genes	Sequence <i>primers</i> (5'-3')	Amplicon (bp)	Acession number
<i>PAL</i>	F: CATCAGGGCTTCGACAAAAT R: CGGGTGTATCCATCGAGAC	141	GT697082.1 ^a
<i>POX</i>	F: TTGCCTTCTCTGCTTTTGCA R: GCTTGACTTGCTCCCTGATGA	111	GR987384.1 ^a
<i>CAD</i>	F: AAAATGGGGAGCTTGGAAGT R: CATCTTCAGGGCCTGTGTTT	112	GT020694.1 ^a
<i>UBQ</i>	F: AAGACAGCTTCAACAGAGTACAGCAT R: GGCAGGACCTTGGCTGACTATA	59	AF297089 ^a
<i>RPL7</i>	F: GACCTTGCCCATGAGATCCTGAC R: CCAGCATCGCCTCCTTCAACATAG	137	SGN-U351477 ^b

^a Access number GenBank; ^b Access number SOL Genomics Network; F: sequence of foward primer; R: sequence of reverse primer.

Table 2. Area under the disease progress curve (AUDPC) of genotypes evaluated in growth chamber.

Ranking	Genotype	AUDPC
1	IPR 102*	00.00 a
2	Progeny Catimor UFV 7158	05.15 a
3	Caturra Vermelho x CIFC H 79/1 UFV 339-34	06.48 a
4	Catiguá MG 2	06.54 a
5	Volutifolia Vermelho	06.57 a
6	Caturra Vermelho	08.52 a
7	HdT UFV 432-02	08.79 a
8	Caturra Vermelho x CIFC H 288/14 UFV 319-04	08.94 a
9	Caturra Vermelho x CIFC H 79/1 UFV 339-02	09.85 a
10	Mundo Novo x S 795 UFV 315-08	11.46 b
11	Catucaí Amarelo 2SL	11.55 b
12	HdT UFV 439-01	11.90 b
13	Mundo Novo x S 795 UFV 315-01	13.01 b
14	H 493-1-2-1-0-3 (HdT derived)	13.83 b
15	Mundo Novo x S 795 UFV 315-17	14.12 b
16	HdT UFV 376-31	14.81 b
17	Caturra Alaranjado	15.59 b
18	Araponga MG1	18.04 b
19	KP 423 UFV 163-01	18.60 b
20	Sumatra	21.68 b
21	Dilla & Alghe x HdT UFV 400-07	22.44 c
22	H 971-99-313 (HdT derived)	22.67 c
23	Sumatra Amarelo Pl 01	22.73 c
24	BE 5 Wush-Wush x HdT UFV 366-09	24.93 c
25	Bourbon N197 x HdT UFV 403-24	25.03 c
26	Catuaí Vermelho x Amphillo MR 2161	25.40 c
27	<i>Coffea arabica</i> var. <i>purpurascens</i>	26.35 c
28	K 7 IAC 1151-2 C 1003 UFV 165-01	26.57 c
29	K 7 IAC 1151-2 C 1003 UFV 165-04	28.22 c
30	Bourbon N197 x HdT UFV 403-01	28.76 c
31	Caturra Vermelho x CIFC H 79/1 UFV 339-25	29.87 c
32	Bourbon Vermelho T4	30.48 c
33	HdT UFV 408-12	33.91 c
34	Amphillo X Hibrido Natural MR 36-352	39.90 d
35	H 514-7-10-6 (HdT derived)	46.20 d
36	Mundo Novo 376/4*	49.57 d
37	HdT UFV 432-07	51.08 d
38	Caturra Vermelho x DK 1/6 UFV 309-05	57.58 d
39	HdT UFV 376-37	89.05 e

*Cultivars used as susceptibility and resistance control. HdT- Hibrido de Timor. Means followed by same letters do not differ among themselves by the Scott-Knott test at 5% probability. Transformed data $\sqrt{x+0.5}$ to normalize the variance

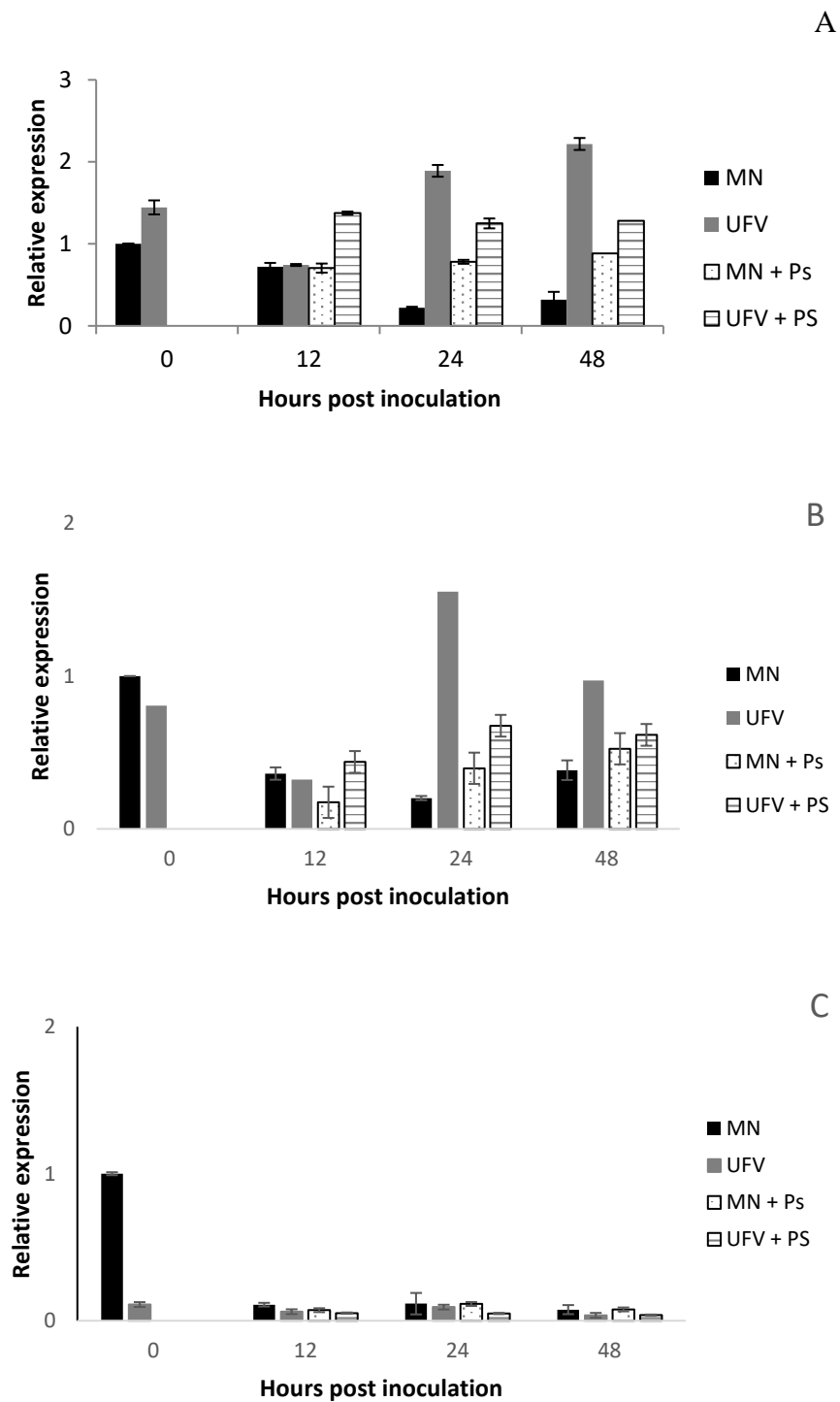


Figure 1. Relative expression of *PAL* (A), *POX* (B) e *CAD* (C) genes in Mundo Novo 376/4 and UFV 7158 coffee seedlings evaluate at 0, 12, 24 e 48 hours post inoculation. MN: Mundo novo 376/4 cultivar; MN + PS: Mundo novo 376/4 +*P. syringae* pv *garcae*; UFV -UFV 7158 genotype; UFV+PS - UFV 7158+ *P. syringae* pv *garcae*. The *RPL7* and *UBIQUITINA* genes were used as endogenous control. Bars show the mean value \pm standard error.

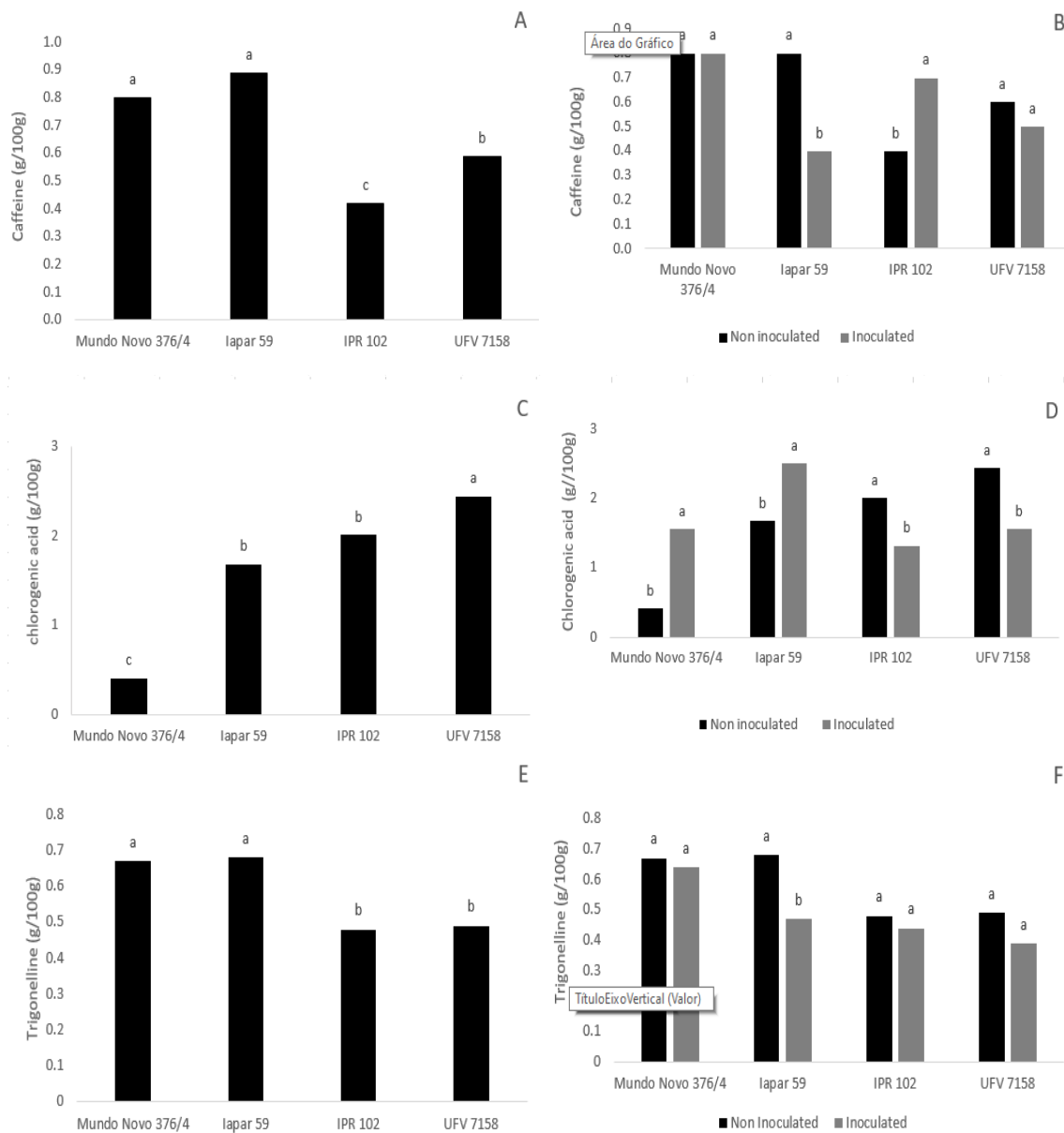
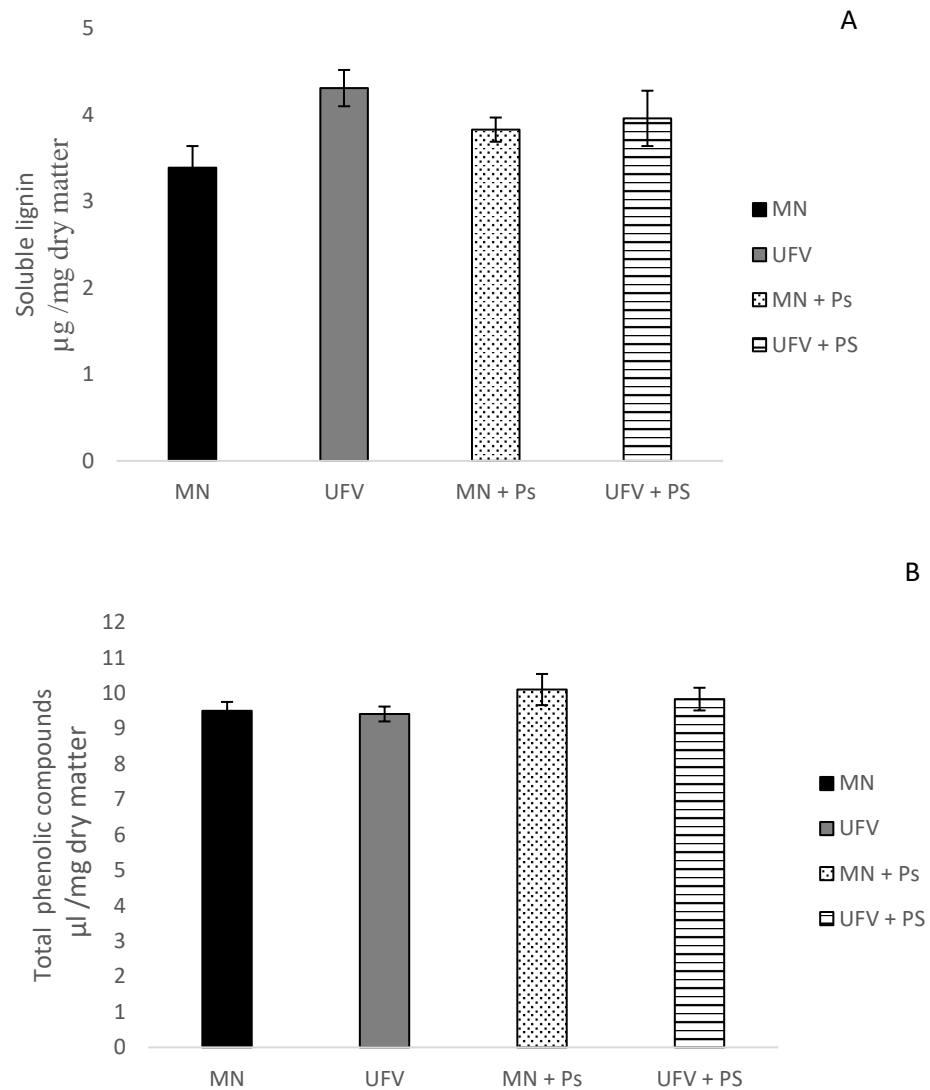


Figure 2- Caffeine (A), chlorogenic acid (C) and trigonelline (E) contents, in g / 100g, in the Mundo Novo 376/4, Iapar-59, IPR 102 and UFV 7158 genotypes, and compared in inoculated and non inoculated plants with *P. syringae* pv. *garcae* (B, D and F). Bars followed by the same letter, in the same treatment (inoculation), do not differ by the Scott Knott test at 5% probability.



Supplemental Figure 1. Soluble lignin (A) and total phenolic compounds (B) in Mundo Novo 376/4 and UFV 7158 coffee seedlings. MN: Mundo Novo 376/4 cultivar; MN + PS: Mundo novo 376/4 +*P. syringae* pv *garcae*; UFV -UFV 7158 genotype; UFV+PS - UFV 7158+ *P. syringae* pv *garcae*. Bars show the mean value \pm standard error.

**ARTIGO 2- INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NO MANEJO DA MANCHA
AUREOLADA**

**Artigo elaborado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2018) e formatado de acordo com
o Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações.**

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NO MANEJO DA MANCHA AUREOLADA

**INDUCTION OF RESISTANCE IN THE MANAGEMENT OF THE BACTERIAL
HALO BLIGHT**

Stéfanny Araújo Martins¹; Mário Lúcio Vilela Resende¹; Victor Augusto Maia Vasconcelos

¹Departamento de Fitopatologia-UFLA, CEP 37200-000, Lavras, MG

RESUMO

A mancha aureolada é uma doença bacteriana considerada fator limitante do cultivo de cafezais em regiões de condições climáticas favoráveis à doença. A indução de resistência à mancha aureolada do cafeeiro (agente etiológico *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*), é o principal objetivo deste trabalho. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de produtos alternativos no controle da mancha aureolada em mudas de cafeeiro. O estudo foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, com mudas de *Coffea arabica* L. cultivar Mundo Novo. Foi avaliado o potencial curativo e preventivo da aplicação de diferentes formulações de fosfitos e uma formulação de óxido cuproso em mudas com sintomas da bacteriose. As formulações foram pulverizadas uma vez. Foram realizadas cinco avaliações da severidade da doença, sendo a primeira antes da pulverização e as demais a cada sete dias após a pulverização. O experimento com caráter curativo, o produto Bion, GreenForce CuCa, GreenFós, Reforce e Fulland (10 mL/L) apresentaram maiores reduções na severidade da mancha aureolada nas mudas de cafeeiro, variando de 18 a 41% de controle, superiores ao antibiótico Kasumin que não diferiu da testemunha. Enquanto que no preventivo o controle alcançou 90 % de controle. Após avaliação de severidade de doença, os tratamentos mais promissores foram testados para toxidez direta e realizada atividade de enzimas relacionadas a defesa da planta. Os resultados mostraram que alguns tratamentos foram capazes de diminuir significativamente a doença, podendo, assim ser utilizado no manejo integrado dessa doença.

Palavras-chave: Fosfitos, indução de resistência e *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*.

ABSTRACT

The bacterial halo blight is a bacterial disease considered a limiting factor for the cultivation of coffee plantations in regions of climatic conditions favorable to the disease. The induction of resistance to coffee blight (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) is the main objective of this project. Therefore, the objective of this project was to evaluate the effect of alternative products on the control of the bacterial halo blight in coffee seedlings. The study was conducted in the Department of Phytopathology of the Federal University of Lavras's greenhouse, with seedlings of *Coffea arabica* L. cultivar Mundo Novo. The curative and preventive potential of the application of different formulations of phosphites and a cuprous oxide formulation on seedlings with bacteriose symptoms were evaluated. The formulations were sprayed once. Five disease severity assessments were performed, the first one before spraying and the other, seven days after spraying. The Bion, GreenForce CuCa, GreenFós, Reforce and Fulland (10 mL / L) products showed greater reductions in the severity of the bacterial halo blight in the coffee seedlings, ranging from 18% to 41% of control, higher than the Kasumin antibiotic which did not differ from the witness, while in the preventive, control reached 90%. After evaluation of the disease severity, the most promising treatments were tested for direct toxicity and performed enzyme activity related to plant defense. The results showed that some treatments were able to significantly reduce the disease and could therefore be used in the integrated management of this disease.

Key words: Phosphites, resistance induction and *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*.

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro (*Coffea* spp.) pertence à família Rubiaceae e é amplamente cultivado em regiões tropicais e subtropicais. Entre as espécies cultivadas, *Coffea arábica* e *Coffea canéfora* são as mais importantes economicamente. O Brasil é o principal produtor e exportador mundial de café, sendo prevista uma produção entre 54 e 58, 4 milhões de sacas de 60 kg do produto beneficiado para a safra 2018 (CONAB 2018). O estado de Minas Gerais contribui com aproximadamente 57% da produção nacional, destacando-se como o maior produtor brasileiro (CONAB, 2018). Alguns fatores limitam a produção de café, como condições climáticas adversas, deficiências nutricionais e, principalmente, a presença de pragas e doenças. Dentre as doenças do cafeeiro, destaca-se a mancha aureolada, que causa perdas tanto no campo quanto no viveiro.

A mancha aureolada tem como agente etiológico *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, que é uma bactéria Gram negativa, com células em forma de bastonetes retos ou levemente curvados (LELLIOTT et al., 1966). No Brasil foi relatada nos Estados de São Paulo na década de 50 (AMARAL et al., 1956) e na década de 70 em Minas Gerais (KIMURA; ROBBIS; FERRARI, 1976) e Paraná (KIMURA; ROBBIS; FERRARI, 1976; MOHAN, 1976). Os sintomas podem ocorrer nos ramos, folhas, flores e frutos novos. As lesões pardo-escuras envolvidas por anel amarelado, de contorno irregular e tamanho variável, evoluem tornando-se necrosadas e quebradiças.

Nas folhas novas as lesões apresentam formato circular e são circundadas por halo amarelo (AMARAL et al., 1956; ZAMBOLIM et al., 1999; 2005). Geralmente, as lesões são mais frequentes nas bordas das folhas, devido aos ferimentos causados por danos mecânicos ou aberturas naturais, facilitando a entrada da bactéria (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997). A doença ocorre também em rosetas, frutos e ramos do cafeeiro, causando a queda prematura de folhas e seca das hastes e dos ramos e, na tentativa de se recuperar, há um superbrotamento com a emissão de novos ramos (RODRIGUES et al., 2013). As condições favoráveis para a bactéria são: temperaturas amenas, alta pluviosidade e ainda, áreas de altitudes elevadas, expostas a ventos frios (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997; ZAMBOLIM et al., 1997; JANSEN, 2005).

A indução de resistência é um método alternativo no controle de doenças, que ativa os mecanismos de defesa latentes na planta. A resistência induzida pode ser ativada em plantas por uma série de substâncias, evitando ou atrasando a entrada e/ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos, por meio de mecanismos de defesa próprios. A resistência induzida

em plantas pode ocorrer por meio do tratamento com agentes bióticos, como extratos vegetais, microrganismos ou parte desses ou, ainda, abióticos (substâncias químicas) (RESENDE et al., 2004; CAVALCANTI et al., 2005).

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação de fosfitos e subprodutos da indústria cafeeira como indutores de resistência contra a mancha aureolada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das mudas de cafeeiro (experimento preventivo)

Sementes de Mundo Novo IAC 376/4, foram germinadas em bandejas plásticas contendo areia autoclavada, com capacidade de 5 litros. A câmara de germinação foi calibrada para 30 °C e 80% de umidade. As mudas foram transplantadas para sacos plásticos de polietileno perfurados (estagio orelha de onça), de cor preta, com as dimensões usuais para mudas de café (0,11 x 0,20 m), contendo substrato constituído por 300 l de esterco, 700 l de terra extraída da camada de 0,40 a 0,80 m de um Latossolo Vermelho distroférico, adubado com 5 kg de superfosfato simples e 500 g de cloreto de potássio por m³ de substrato (CFSEMG, 1999). As irrigações eram realizadas duas vezes ao dia, pela manhã e no período da tarde, por um sistema de aspersão, a fim de manter-se o substrato na capacidade de campo para todos os tratamentos.

2.2 Obtenção das mudas de cafeeiro e condução do experimento (curativo)

Foram utilizadas mudas de café da cultivar Mundo Novo 376/4 com sintomas de mancha aureolada, provenientes de viveiro comercial da cidade de Três Pontas-MG. O estudo foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFLA, onde foram irrigadas periodicamente e receberam adubações conforme recomendação técnica para a cultura. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com 12 tratamentos e quatro repetições, sendo a parcela experimental composta por quatro plantas com seis meses de idade. Antes da pulverização dos tratamentos (Tabela 1), foi a medição da altura das plantas e realizada a avaliação da severidade da mancha aureolada. Como as mudas não apresentavam severidade da doença homogênea, foi considerado como 100% a primeira avaliação de cada tratamento e, a partir desta, calculada as demais avaliações para cada tratamento (severidade relativa).

Para a confirmação da etiologia bacteriana, foram coletadas folhas com sintomas da doença para isolamento, teste de exsudação e de patogenicidade. As mudas foram pulverizadas com os tratamentos até o ponto de escorrimento, utilizando-se um pulverizador manual. As avaliações de severidade foram realizadas semanalmente por cinco semanas.

Os dados de AACPSD e crescimento das mudas foram submetidos à análise de variância e, quando significativos pelo teste F, foram comparados pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) utilizando-se o programa Sisvar versão 5.1 (FERREIRA, 2000).

2.3 Obtenção do inóculo e inoculação

A bactéria *P. syringae* pv. *garcae* foi obtida a partir de folhas de cafeeiro com sintomas da mancha aureolada, proveniente de Nepomuceno-MG e o isolado de referência de *P. syringae* pv. *garcae* souche patotype (CFPB1634). A inoculação com mais de um isolado visou abranger maior espectro de variabilidade da bactéria. Para a inoculação, a bactéria foi repicada para placas de petri contendo meio King B e incubada a 22 °C. Após 48 horas de crescimento em BOD, as colônias foram removidas das placas com auxílio de alça de Drigasli e calibradas para $OD_{600nm} = 0,8$ e pulverizadas nas mudas até o ponto de escorrimento. Foi realizada câmara úmida com o auxílio de sacos plástico, 24 horas antes e depois da inoculação. No estudo preventivo a inoculação foi realizada quatro dias após a aplicação dos produtos.

2.4 Produtos alternativos na proteção de mudas de cafeeiro contra a mancha aureolada em câmara de crescimento (preventivo)

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento do Departamento de Fitopatologia da UFLA em delineamento de blocos casualizados (DBC) com 13 tratamentos e quatro repetições, sendo cada parcela experimental composta por quatro plantas com seis meses de idade.

Tabela 1- Formulações utilizadas na proteção de mudas de cafeeiro contra *P. syringae* pv *garcae*.

	Tratamentos	Dose (g ou mL L ⁻¹)	Formulação
1.	Testemunha	---	---
2.	Reforce	4 mL	Fosfito de potássio
3.	Reforce Cu	3 mL	Fosfito de potássio + cobre
4.	Big Red	3 mL	Óxido cuproso
5.	Recop	3 g	Oxicloreto de cobre
6.	Fulland	3 mL	Fosfito de cobre
7.	Greenfós	4 mL	Fosfito de potássio
8.	Red Shield	2g	Óxido cuproso
9.	Green Force CuCa	4 mL	Formulação à base de subproduto da indústria cafeeira e nutrientes
10.	Kasumin	3 mL	Antibiótico kasugamicina
11.	Bion	0,2 g	Acibenzolar S-metil
12.	Cuprozeb	4 g	Mancozebe + oxicloreto de cobre
13.	Fortaleza	3 mL	Fosfito de potássio + subproduto cítrico

Fonte: Da autora (2018).

As mudas foram pulverizadas com os tratamentos até o ponto de escorrimento, utilizando-se um pulverizador manual. Quatro dias após a aplicação dos tratamentos, as plantas foram inoculadas com *P. syringae* pv. *garcae* como descrito anteriormente. As avaliações da mancha aureolada foram realizadas a cada três dias, a partir do surgimento dos primeiros sintomas da doença, utilizando-se a escala diagramática baseada em Leônidas L. Belan (2014). Com notas variando de 0 a 8, em que 0 (0%), 1 (0.1–0.99%), 2 (1–2%), 3 (2.01–4%), 4 (4.01–8%), 5 (8.01–16%), 6 (16.01–25%), 7 (25.01–45%) e 8 ($\geq 45.1\%$). Foram realizadas cinco avaliações.

2.5 Toxidez direta dos fosfitos -Antibiograma

Para avaliar o efeito bactericida dos produtos, a bactéria obtida conforme descrito anteriormente foi repicada para meio líquido King B. Após 24 horas de incubação (25 °C), 5 mL deste meio foi vertido em placa de petri, com 10 mL do meio líquido e 5 mL dos produtos diluídos em água estéril para que as concentrações finais fossem iguais às do experimento *in vivo*. Além dos produtos utilizados nos testes *in vivo* foi utilizada também uma testemunha apenas com água estéril e uma testemunha com o antibiótico sulfato de estreptomicina (0,2 g L⁻¹). Após cinco dias o crescimento da bactéria foi avaliado.

2.6 Determinação das enzimas PAL e POX no estudo da indução de resistência dos produtos alternativos

Foram utilizados os tratamentos mais promissores do experimento preventivo da câmara de crescimento para a caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa, foi utilizado também uma testemunha pulverizada com água, todos inoculados e não inoculados com *P. syringae* pv. *garcae*.

Foram utilizadas mudas de cafeeiro, como descrito anteriormente, com três a quatro pares de folhas definitivas. A aplicação dos tratamentos foi realizada quatro dias antes da inoculação. Os tempos de coleta das amostras foliares foram: 0, 6, 12 horas e 24 horas após a inoculação. Foram utilizadas quatro repetições de quatro plantas cada, por tempo de coleta e por tratamento.

Foram analisadas as atividades das enzimas peroxidase de guaiacol (POX) (URBANEK; KUZNIAK-GEBAROWSKA; HERKA, 1991), fenilalanina amônia liase (PAL) (MORI; SAKURAI; SAKUTA, 2001), além dos teores de lignina solúvel (DOSTER; BOSTOCK, 1988) e de fenóis solúveis totais (SPANOS; WROLSTAD, 1990).

2.6.1 Peroxidases de guaicol (POX)

A atividade de peroxidases de guaiacol foi determinada pela adição de 100µL do extrato enzimático, ajustado para 2 mL de solução contendo 900µL de acetato de sódio 50 mM pH 5,2, 500µL de guaiacol 20 mM e 500 µL peróxido de hidrogênio 60 mM. Após incubação a 30 °C, por 10 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro, a 480 nm (URBANEK; KUZNIAK-GEBAROWSKA; HERKA, 1991). Uma unidade POX foi expressa como variação de 1 OD 480 por miligrama de proteína solúvel por minuto - UA (mg P min)⁻¹.

2.6.2 Fenilalanina Amonia Liase (PAL)

A atividade da fenilalanina amônia-liase foi medida de acordo com Mori et al. (2002). Uma mistura de reação foi preparada adicionando 100 µL de tampão 100 mM Tris-HCl (pH 8,8) e 50 µL de 40 mM de fenilalanina com 50 µL do extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada por 30 min a 37 °C e a atividade da enzima foi paralisada com a adição de 50 µL HCl.

A fenilalanina foi adicionada aos controles após a incubação e adição do HCL. A mistura de ensaio foi centrifugada a 1450 rpm por 15 min a 4 °C, e a absorbância do sobrenadante (180 µL) foi medida em 280 nm e a quantidade de ácido trans-cinâmico formado foi avaliada em comparação com uma curva padrão (0,01–0,10 mg de ácido trans-cinâmico mL⁻¹). Os valores foram expressos como unidade de atividade por miligrama de proteína por minuto.

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

Os tecidos vegetais foliares foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 24 horas. Uma alíquota de 30,0 mg do material liofilizado foi transferida para microtubo de 2,0 mL, homogeneizada com 1,5mL de metanol a 80% e mantida sob agitação, por 15 horas, em agitador rotativo, protegido da luz à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada, a 12.000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante (extrato metanólico) foi transferido para novo microtubo, com o qual se realizou a determinação de fenóis solúveis totais, enquanto o resíduo sólido foi utilizado para determinação de lignina solúvel como descrito a seguir.

2.7.1 Determinação de lignina

Foi adicionado ao resíduo sólido 1,5 mL de água, homogeneizado e centrifugado, a 12.000 rpm, por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o resíduo seco, foi mantido a 65 °C, por 15 horas. Posteriormente, foi acrescentado 1,5 mL de solução de ácido tioglicólico em HCl 2M (1:10). Em seguida os microtubos suavemente agitados para hidratar o resíduo e colocados em banho-maria, em fervura por quatro horas. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados, a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,5 mL de água ultrapura e novamente centrifugado, a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4 °C.

A seguir, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1,5 mL de NaOH 0,5M e mantido em agitador rotativo, por 15 horas, à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4 °C e o sobrenadante transferido para novo microtubo, ao qual foram adicionados 200 µL de HCl concentrado. A suspensão obtida foi mantida em câmara fria (4 °C), por quatro horas, para permitir 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 será descartado e o precipitado ressuspenso em 2,0 mL de NaOH 0,5 M. A absorbância desta solução foi determinada em espectrofotômetro, a 280 nm, e os valores calculados com base na curva de lignina e expressos em µg de lignina solúvel por miligrama de massa seca (DOSTER; BOSTOCK, 1988).

2.7.2 Determinação de fenóis solúveis totais

Alíquotas de 150 µL do extrato metanólico foram misturadas a 150 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25 N, por 5 minutos, homogeneizadas com 150 µL de Na₂CO₃ 1 M, por 10 minutos e diluídas com 1,0 mL de água ultrapura, à temperatura ambiente, por uma hora. Os valores de absorbância desta reação foram determinados, a 725 nm, em espectrofotômetro e calculados com base em curva de catecol. Os compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente µg de catecol por miligrama de massa seca (SPANOS; WROLSTAD, 1990).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado efeito dos tratamentos na área abaixo da curva do progresso da severidade da mancha aureolada (Figura 1). Os produtos que proporcionaram maior redução na severidade da doença foram o indutor de resistência comercial Bion (ASM), o produto à base de extrato vegetal e nutrientes GreenForce Cuca e os produtos à base de fosfitos Reforce Cu, Reforce (2,5 e 5 mL/L), GreenFós (2,5 e 5 mL/L), Fulland (10 mL/L) e o produto a base de óxido cuproso Big red (Figura 1), obtendo controle de 10 a 27% em relação à testemunha (Figura 1).

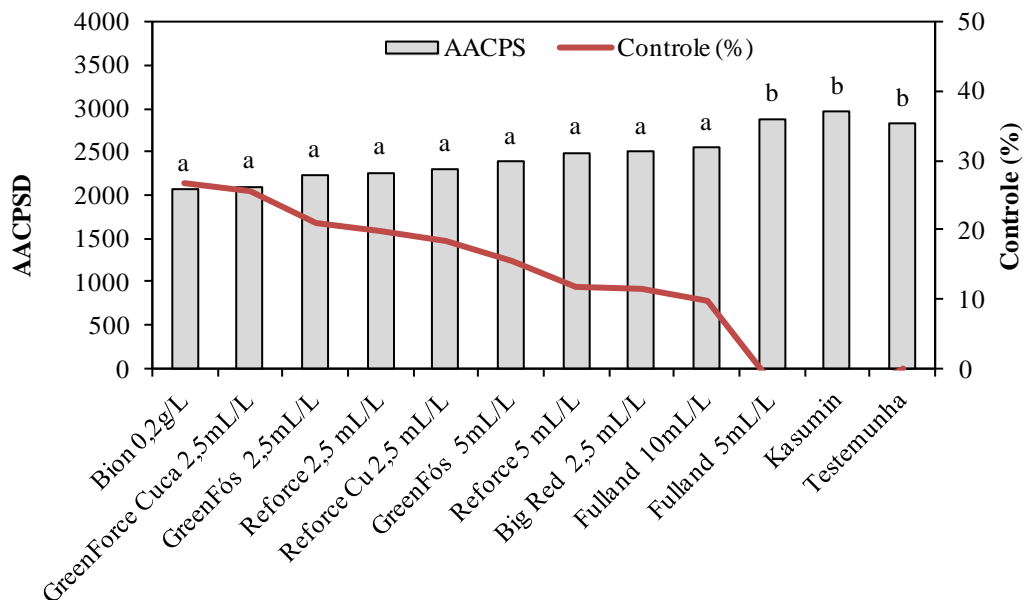
O Kasumin e Fulland (5 mL/L), não diferiram da testemunha. Os fosfitos estão entre os fertilizantes foliares mais frequentemente relatados na literatura como indutores de respostas de defesa em plantas, incluindo a síntese de fitoalexinas (JACKSON et al., 2000; NOJOSA, 2003; NOJOSA; RESENDE; RESENDE, 2005). Sendo apresentados como possíveis eliciadores de resistência contra doenças do cafeeiro. Não existem relatos da utilização destes produtos no controle da mancha aureolada do cafeeiro. Entretanto, existem relatos para doenças fúngicas nesta cultura.

Ribeiro Júnior (2008) realizando pulverizações de fosfitos de potássio, manganês e zinco em cafeeiros adultos por dois anos consecutivos observou reduções de 30% e 25% em ano de alta produção, respectivamente para ferrugem e cercosporiose, e reduções de 53% e 32% em ano de baixa, na severidade da ferrugem e cercosporiose, respectivamente. Em trabalho

estudando aplicação de produtos contendo fosfitos em mudas de cafeeiro, observaram controle eficaz de *Phoma costarricensis*, reduzindo a severidade da mancha de Phoma, sem diferir em relação aos fungicidas tebuconazole e fosetyl-Al (NOJOSA et al., 2009).

Formulações a base de extrato da lavoura cafeeira também foi alvo de estudo para manejo de doenças fúngicas do cafeeiro. Santos et al. (2007) observaram em testes de campo, que o tratamento com formulações a base de extrato de folhas de café reduziu a área abaixo da curva de progresso da mancha-de-Phoma em 61%, comparada à testemunha pulverizada com água.

Figura 1- Efeito dos tratamentos na área abaixo da curva de progresso da severidade da mancha aureolada do cafeeiro (AACPSD).



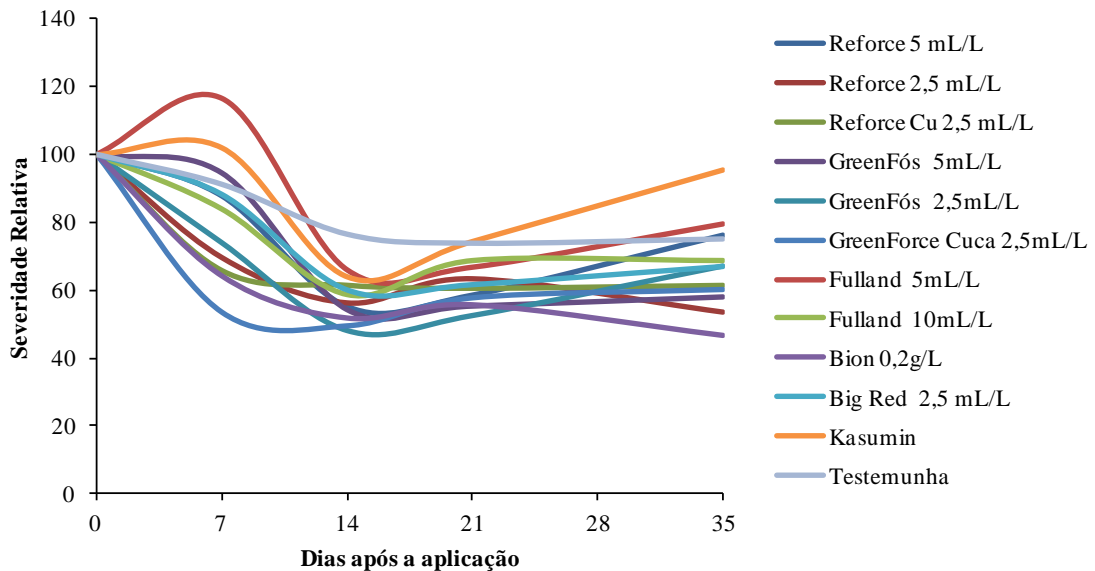
Legenda: Barras com mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2018).

Observa-se pela curva do progresso da mancha aureolada (Figura 2), que aos sete dias após a pulverização, houve maior redução da doença em relação às demais avaliações. Nesta avaliação, destacaram-se o GreenForce Cuca, Bion, Reforce Cu, Reforce e GreenFós (2,5 mL/L) com 41, 30, 30, 24 e 20% de controle respectivamente. A partir da segunda avaliação, houve diminuição do controle dessa doença. Foi observado também, em todos os tratamentos, que a severidade da mancha aureolada reduziu ao longo do tempo, inclusive na testemunha. Possivelmente, este fato ocorreu devido a baixa pressão de inóculo no ambiente do experimento

em comparação ao viveiro de origem das mudas, associado à emissão de novas folhas sadias nas plantas.

Figura 2- Efeito dos tratamentos na curva de progresso da severidade relativa da mancha aureolada do cafeeiro.



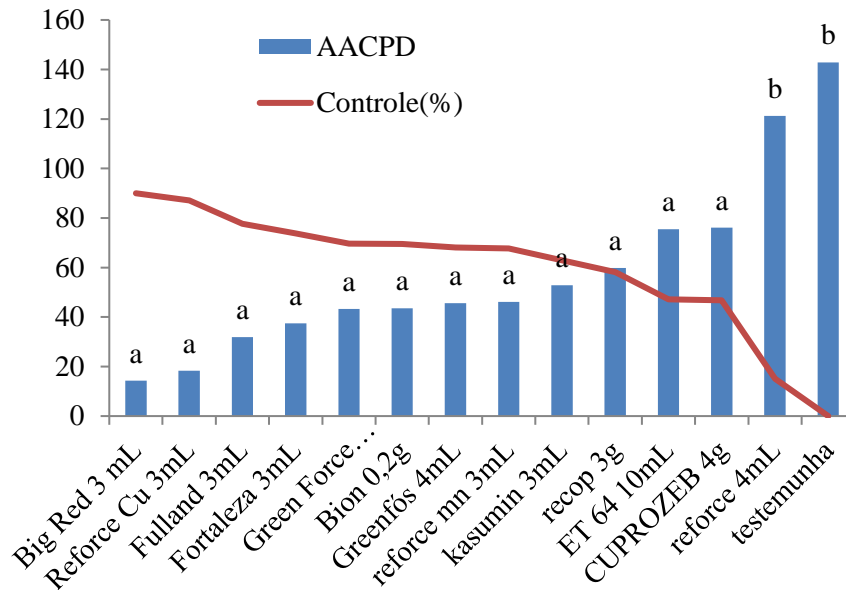
Legenda: Avaliações realizadas semanalmente dos 0 até 35 dias após pulverização
 Fonte: Da autora (2018).

Para o crescimento das mudas, não foi observado efeito significativo da aplicação dos produtos, não diferindo do tratamento testemunha. Os produtos alternativos avaliados não influenciaram induzindo crescimento das mudas de cafeeiro nem apresentaram efeito fitotóxico que poderia reduzir o crescimento destas.

Diante dos resultados, experimentos com caráter preventivo foram realizados utilizando esses mesmos produtos na proteção de mudas de cafeeiro contra a mancha aureolada, com pulverização quatro dias antes da inoculação da *P. syringae* pv. *garcae*.

3.1 Produtos alternativos na proteção de mudas de cafeeiro contra a mancha aureolada em câmara de crescimento (preventivo)

Figura 2- Efeito dos produtos alternativos na proteção de mudas do cafeeiro contra mancha aureolada.



Legenda: Testemunha (Água), Reforce (fosfito de potássio; 4mL/L), Cuprozeb (mancozebe + oxiclreto de cobre; 4g/L), Big Red (óxido cuproso; 3mL/L), GreenforceCuca (fosfito de potássio+ extrato de indústria cafeeira+ cobre e cálcio; 4mL/L),Recop (oxiclreto de cobre; 3g/L),Reforce + cu (fosfito de potássio + cobre; 3mL/L),Fulland (fosfito de cobre; 3mL/L), Greenfós (fosfito de potássio; 4mL//L), Kasumin (cloridrato de Kasugamicina; 3 mL/L), Bion (acibenzolar-S-metil; 0,2g/L) e Fortaleza (fosfito de potássio + extrato cítrico; 3 mL/L).

Fonte: Da autora (2018).

Os tratamentos alternativos, fosfitos ou não, demonstraram proteção às mudas de café, com até 90% de controle em relação à testemunha pulverizada com água (figura 2). Diversos trabalhos encontraram resultados semelhantes, como por exemplo, algumas formulações para indução de resistência que são baseadas em extratos vegetais, a exemplo de subprodutos/resíduos da cadeia produtiva do café. Estas, podem ser usadas com ou sem sais minerais ou outros adjuvantes, para o controle de doenças fúngicas no cafeeiro e bacterianas no algodoeiro e tomateiro (RESENDE et al. 2004; BARGUIL et al., 2005; MEDEIROS et al., 2009).

A utilização das formulações a base de casca e de folhas de café proporcionou considerável proteção contra *Cercospora coffeicola* e *Phoma costarricensis* (AMARAL, 2005;

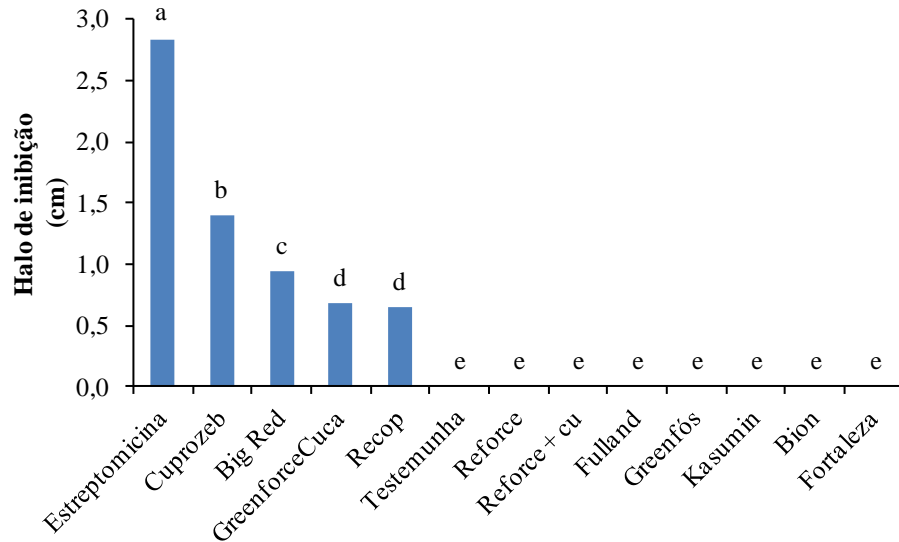
SANTOS et al., 2007). Para cercosporiose, Amaral (2005) observou reduções na percentagem da doença de 40% e 37%, respectivamente, em mudas tratadas com formulações a base de extrato de casca de café e extrato de folhas de café. Santos et al. (2007) observou em experimento de campo, que o tratamento com formulações a base de extrato de folhas de café reduziu a área abaixo da curva de progresso da mancha de Phoma em 61%, comparada à testemunha pulverizada com água e em 30% em relação à testemunha pulverizada com Viça-Café Plus®.

Com relação ao efeito sobre a ferrugem, o extrato de casca de café (ECFC) e de folhas de cafeeiro (NEFID), fosfito de manganês e cobre e suas misturas simples proporcionaram controle da ferrugem em mudas de cafeeiro, variando de 34 a 58%. Já a associação de NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês proporcionou controle de 70%. Em campo, formulação de fosfito de K e extrato cítrico (Fortaleza), fosfito de Mn, as associações NEFID + Fortaleza e fosfito de Mn + Fortaleza proporcionaram redução da intensidade da ferrugem do cafeeiro. Fosfito de Mn, Fortaleza e a mistura destes proporcionaram aumentos na produtividade, sendo semelhantes ao tratamento com fungicida sistêmico (padrão de controle).

Estudos de indução de resistência contra a mancha aureolada ainda são escassos, entretanto, resultados promissores foram alcançados com o uso do indutor químico de resistência acibenzolar-S-metil (ASM, produto do grupo benzotriazolone ou BTH). Patrício et al. (2002) verificaram que o ASM propiciou controle da mancha aureolada quando aplicado nas doses de 20 e 40g/ha. A aplicação do produto também proporcionou proteção contra *H. vastatrix* em mudas de cafeeiro das cultivares Mundo Novo e Catuaí Vermelho M-99 (MARCHI; BORGES; RESENDE, 2002; GUZZO et al., 2001). Esse efeito indutor do ASM contra a ferrugem foi confirmado por Nojosa et al. (2009), onde o tratamento com ASM proporcionou uma percentagem de controle de 56,82% em folhas destacadas e de 52% em mudas de café. No campo, Fernandes et al. (2013) demonstraram que o ASM foi efetivo em controlar a ferrugem do cafeeiro na cultivar Mundo Novo em ano de baixa produção; entretanto o mesmo não ocorreu em ano com alta produção, quando a pressão de inóculo foi maior.

3.2 Toxidez direta – Antibiograma

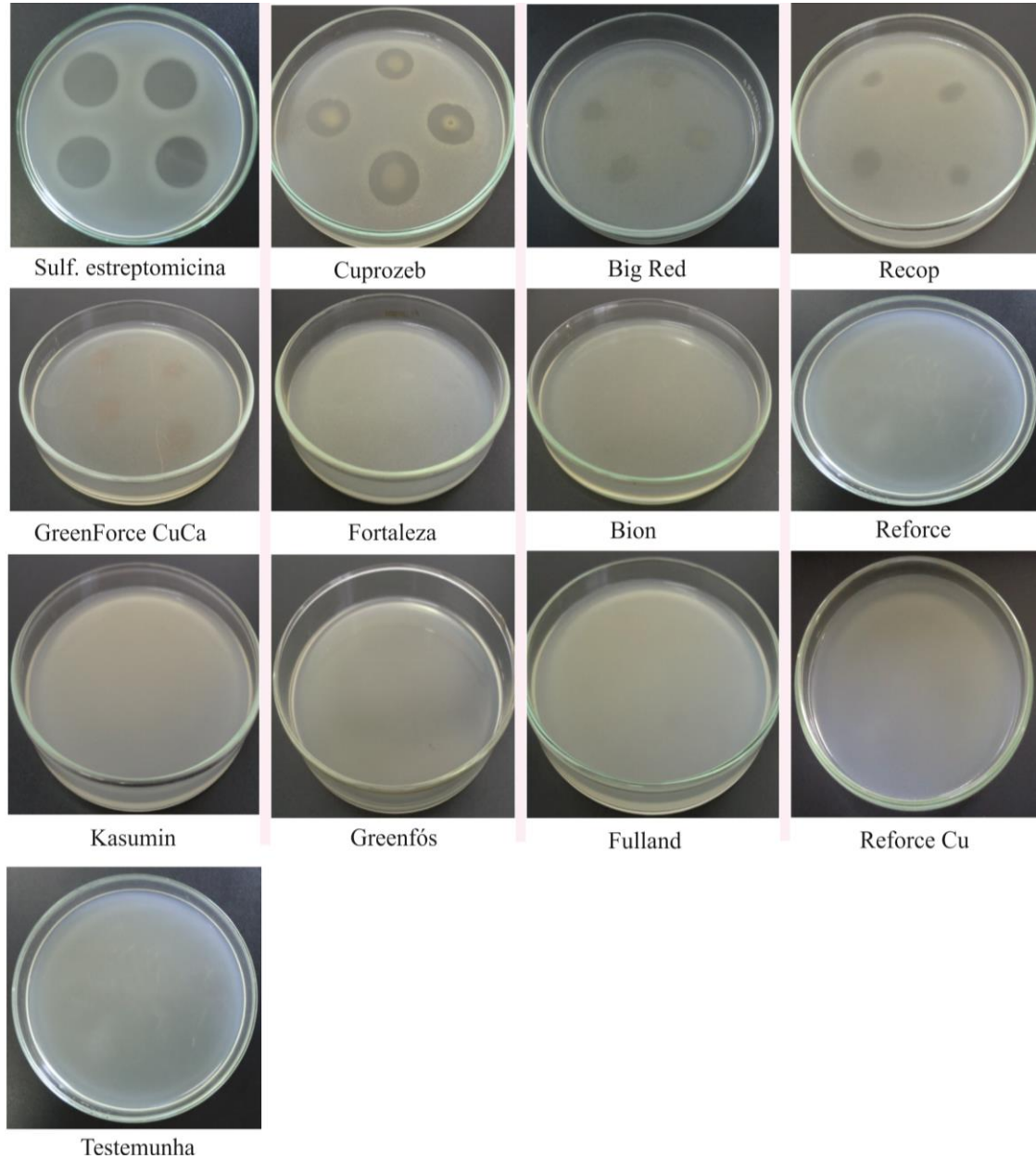
Figura 3- Efeito dos tratamentos na toxidez direta (halo de inibição) à *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, agente etiológico da mancha aureolada do cafeeiro.



Legenda: Testemunha (Água), Reforce (fosfito de potássio; 4mL/L), Estreptomicina (sulfato de estreptomicina; 200mg/L), Cuprozeb (mancozebe + oxiclreto de cobre; 4g/L), Big Red (óxido cuproso; 3mL/L), GreenforceCuca (fosfito de potássio+ extrato de indústria cafeeira+ cobre e cálcio; 4mL/L), Recop (oxiclreto de cobre; 3g/L), Reforce + cu (fosfito de potássio + cobre; 3mL/L), Fulland (fosfito de cobre; 3mL/L), Greenfós (fosfito de potássio; 4mL/L), Kasumin (cloridrato de Kasugamicina; 3 mL/L), Bion (acibenzolar-S-metil; 0,2g/L) e Fortaleza (fosfito de potássio + extrato cítrico; 3 mL/L).

Fonte: Da autora (2018).

Figura 4- Efeito dos tratamentos na toxidez direta (halo de inibição) à *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, agente etiológico da mancha aureolada do cafeeiro.



Legenda: Testemunha (Água), Reforce (fosfito de potássio; 4mL/L), Estreptomicina (sulfato de estreptomicina; 200mg/L), Cuprozeb (mancozebe + oxiclóreto de cobre; 4g/L), Big Red (óxido cuproso; 3mL/L), GreenforceCuca (fosfito de potássio+ extrato de indústria cafeeira+ cobre e cálcio; 4mL/L), Recop (oxiclóreto de cobre; 3g/L), Reforce + cu (fosfito de potássio + cobre; 3mL/L), Fulland (fosfito de cobre; 3mL/L), Greenfós (fosfito de potássio; 4mL/L), Kasumin (cloridrato de Kasugamicina; 3 mL/L), Bion (acibenzolar-S-metil; 0,2g/L) e Fortaleza (fosfito de potássio + extrato cítrico; 3 mL/L).

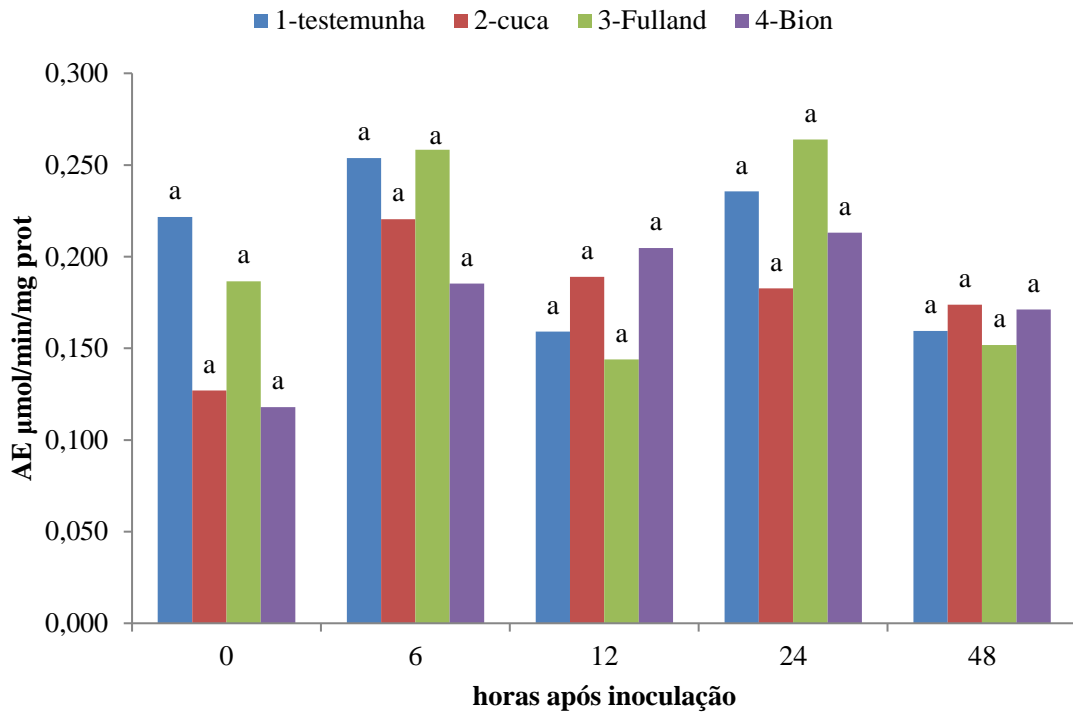
Fonte: Da autora (2018).

Dos 13 tratamentos avaliados, cinco apresentaram *in vitro* toxidez direta à *P. syringae* pv. *garcae* (figura 3 e 4). Sulfato de estreptomicina apresentou maior toxidez, como esperado,

diferindo dos demais tratamentos, seguido pelo cuprozeb, big red, que diferiram entre si. O Greenforce Cuca e o Recop apresentaram toxidez intermediária à bactéria. Os demais tratamentos não apresentaram toxidez direta ao patógeno não diferindo da testemunha (água).

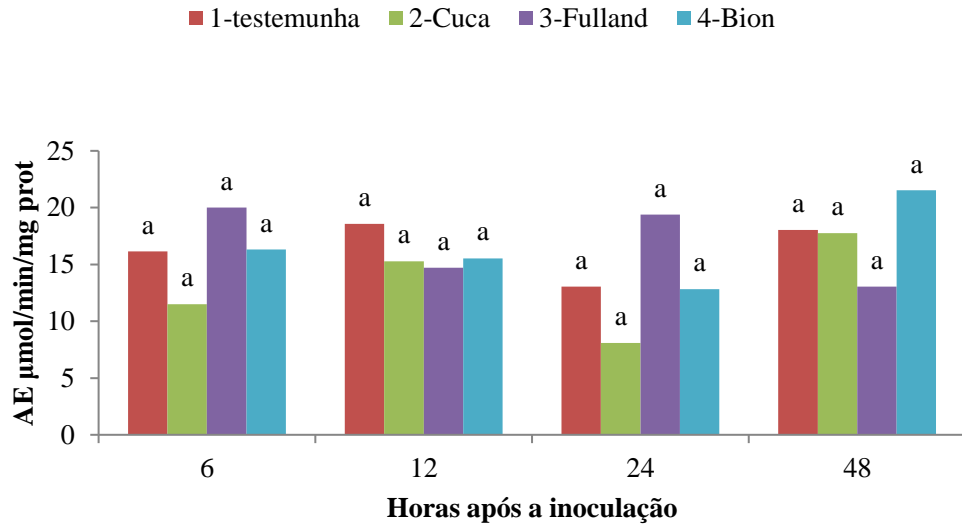
3.3 Determinação das enzimas PAL e POX no estudo da indução de resistência dos produtos alternativos

Figura 5- Quantificação da enzima PAL em mudas da cultivar Mundo Novo 376/4 após a inoculação da bactéria *P. syringae*.



Legenda: Foram avaliados cinco tempos de coleta. Teste Scott-knott, nível de significância 5%.
Fonte: Da autora (2018).

Figura 6- Quantificação da enzima PAL em mudas da cultivar Mundo Novo 376/4após a inoculação da bactéria *P. syringae*.



Legenda: Foram avaliados cinco tempos de coleta. Teste Scott-knott, nível de significância 5%.
Fonte: Da autora (2018).

Nesse estudo não houve diferença da quantificação dos valores obtidos pela PAL nem da POX nos tempos de coleta avaliados (Figura 5 e 6). Apesar de que, outros autores, trabalhando com as associações de fosfitos com NEFID ou ECFC encontraram maior incremento no crescimento das mudas, além de aumentos nas atividades das enzimas de defesa peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase e nos teores de fenóis solúveis totais. Também foram observados aumentos na expressão de genes que codificam para catalase (CAT) e fenilalanina amônia-liase (PAL), enzimas relacionadas ao metabolismo fenólico, importante para a defesa do cafeeiro (COSTA et al., 2011; VALENTE et al., 2012).

Nardi et al. (2006), utilizando técnicas de PCR quantitativo em tempo real e microarranjos de DNA, observaram que a pulverização com ASM em cafeeiro induziu a expressão de genes de defesa, típicos da resistência sistêmica adquirida. A principal resposta nas folhas foi a expressão de genes relacionados à explosão oxidativa e ao aumento de barreiras físicas e químicas (glutathiona-S-transferase, superóxido dismutase, peroxidase, lipoxigenase e quitinase).

Com relação a mecanismos de defesa contra a bacteriose, Oliveira e Romeiro (1990) observaram maior atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase em extratos provenientes de folhas inoculadas com *P. syringae* pv. *garcae*. Esses autores também sugeriram que compostos fenólicos poderiam estar envolvidos na resistência do cafeeiro à *P. syringae* pv.

garcae, sendo que extratos de folhas velhas inibiram o crescimento desta bactéria. O acúmulo de substâncias do tipo fitoalexinas, fenólicos e proteínas de defesa é provavelmente apenas uma parte da resposta de defesa do cafeeiro, porém estes e os demais mecanismos dessa resistência não estão claramente definidos.

Diversos compostos foram capazes de induzir resistência de plantas a patógenos fúngicos em experimentos conduzidos em condições controladas (ASLAM et al., 2009), porém, falta a comprovação dos resultados em condições de campo, tanto para patossistemas fúngicos quanto para bacterioses.

4 CONCLUSÃO

Alguns produtos alternativos, como Fulland e Cuca, podem atuar como potenciais indutores de resistência e, assim, minimizar o impacto da aplicação de fungicidas convencionais, reduzindo a contaminação ambiental, como também do aplicador e do consumidor, além de reduzir o risco de resistência dos patógenos ao controle químico.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, J. F.; TEIXEIRA, C.; PINHEIRO, E.D. A bacterium causing halo blight of coffee. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 23, p. 151–155, 1956.
- AMARAL, D. R. **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), p. 96, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- ASLAM, M. et al. Development and evaluation of a new high yielding and better fibre quality mutant NIAB-824 of cotton through pollen irradiation. **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, n. 6, p.715, 2009.
- BARGUIL, B. M. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 535–537, 2005.
- CAVALCANTI, L.S, et al. (eds). Indução de Resistência em Plantas Contra Patógenos e Insetos. Piracicaba, **FEALQ**, p. 263, 2005.
- COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais:5ª aproximação**. Viçosa, p. 359, 1999.
- CONAB; Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: café, Brasília: **Conab**, v. 1, n. 1, 2018. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/>. Acesso em: 14 de setembro de 2021.
- COSTA, P. H. et al. Associação de indutores de resistência no manejo da ferrugem do cafeeiro. In: **VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. Resumos, Araxá, 2011.
- DOSTER, M. A; BOSTOCK, R. M. Quantification of lignin formation in almond bark in response to wounding and infection by *Phytophthora* species. **Phytopathology**, v. 78, n. 4, p. 473–477, 1988.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: **45ª Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria**, São Carlos: UFSCar, p. 255–258, 2000.
- FERNANDES, L. H. M. et al. Acibenzolar-s-methyl is rust and blotch control in field condtions. **Coffee Science**, v. 8, n.1, p. 21, 2013.
- GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C. L. **Doenças do cafeeiro**. In **Manual de Fitopatologia, Doenças das plantas cultivadas**. Eds H. KIMATI, L. AMORIM, A. F. BERGAMIN, L. E. A.; CAMARGO; J. A. M. REZENDE. SP, Brasil: Editora Agronômica Ceres, v. 2, 3ª ed, p. 184–200, 1997.
- GUZZO, S.D. et al. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 1, p. 89-94, 2001.

JANSEN, A. Plant protection in coffee. **Recommendations for the common code for the coffee community initiative**, 2005. Disponível em: <http://www.sustainable-coffee.net/download/2006/4c-pesticidereport.pdf>. Acesso em 05 jun 2012.

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

KIMURA, O.; ROBBS, C.F.; FERRARI, J.A.R. Algumas observações relacionadas com as bacterioses do cafeeiro. In: **4º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS**, Caxambu. Resumo. Rio de Janeiro: IBC/GERCA, p. 104, 1976.

LELLIOT, R.A.; BILLING, E.; HAYWARD, A.C. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 29, n. 3, p. 470–589, 1966.

LEÔNIDAS, L. BELAN. Diagrammatic scale for assessment of bacterial blight in coffee leaves. **Journal of Phytopathology**, 2014.

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**, v. 26, n. 5, p. 1103–1106, 2002.

MEDEIROS, F.C.L. et al. Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, p. 1–9, 2009.

MOHAN, S.K. Investigações sobre *Pseudomonas garcae* Amaral et al. Em cafeeiros. In: **4º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS**. Palestras. Caxambu. Rio de Janeiro: IBC/GERCA, p. 56, 1976.

MORI, T.; SAKURAI, M.; SAKUTA, M. E. Vectors 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**, v. 160, p. 355–360, 2001

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

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

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

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

- OLIVEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S. Reação de folhas novas e velhas de cafeeiro a infecção por *Pseudomonas cichorii* e *P. syringae* pv. *garcae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 355–356, 1990.
- PATRÍCIO, F.R.A.; ALMEIDA, I.M.G.; BARROS, B.C.; SANTOS, A.S. Effect of fungicides, antibiotics, and acibenzolar-S- methyl over cercosporiosis and bacterial halo blight in coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 147, 2002. (Suplemento)
- 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. **The International Joint Workshop on PR-Proteins and Induced Resistance**. Helsingor, Dinamarca, p. 79, 2004.
- RODRIGUES L. M. V; ALMEIDA, I. M. G de; PATRÍCIO, F. R A.; BERIAM, L. O. S; MACIEL, K. W.; BRAGHINI, M. T, FILHO, O. G. **Mancha aureolada do cafeeiro causada por Pseudomonassyringaepv. garcae**. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 24, 2013.
- RIBEIRO JÚNIOR, P.M. **Fosfitos na proteção e na indução de resistência do cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* e *Cercospora coffeicola***. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, p. 107, 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**, v. 38, p. 1565–1571, 1990.
- URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologica Plantarum**, v. 13, p. 43–50. 1991.
- VALENTE, T. C, T. **Expressão gênica e atividade de catalase e fenilalanina amônia liase ativadas por indutores de resistência em cafeeiro**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal. Universidade Federal de Lavras- UFLA, Lavras, p. 67, 2012.
- ZAMBOLIM, L. et al. Café. In: **Controle de doenças de plantas**. Eds F. X. R. VALE; L. ZAMBOLIM. Viçosa, Brasil: Universidade Federal de Viçosa, p. 83–180, 1997.
- ZAMBOLIM, L. et al. Manejo integrado das doenças do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. **Encontro sobre produção de café com qualidade**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 134–215, 1999.
- 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, v. 2, p. 165–180, 2005.

**ARTIGO 3- NEW PROTOCOL FOR PHYTOBACTERIA ISOLATION: CASE
STUDY- *Xylella fastidiosa***

**Artigo elaborado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2018) e formatado de acordo com
o Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações.**

NEW PROTOCOL FOR PHYTOBACTERIA ISOLATION: CASE STUDY- *Xylella fastidiosa*

NOVO PROTOCOLO PARA ISOLAMENTO DE FITOBACTERIAS: ESTUDO DE CASO- *Xylella fastidiosa*

Stéfanny Araújo Martins¹; Mário Lúcio Vilela Resende¹; Luc Stevens² e Jan van der Wolf².

¹Departamento de Fitopatologia-UFLA, CEP 37200-000, Lavras, MG

² Business Unit Glastuinbouw- WUR, Postbus 16, 6700 AB Wageningen

ABSTRACT

Xylella fastidiosa is a plant pathogenic bacterium that causes diseases in several important agriculturally significant crops. *X. fastidiosa* grows as biofilm, it is difficult to isolate, exhibits slow growth and has high nutritional requirements with specific compounds to develop in vitro. As it is a pathogen of difficult isolation, which makes its detection difficult, in hosts with low concentration of infection it is not possible to perform the detection even by molecular basis methods. Therefore, it is necessary to improve techniques that release viable plant cells for detection even in low levels. Many substances and techniques were reported to decompose biofilms. Amongst them are enzymes, which present a good option to biofilm degradation without causing the cells's death, since they possess characteristics of high specificity and rapid reaction in mild conditions. This study proposes to isolate *X. fastidiosa* using N-acetylcystein and a mix of enzymes combined with ultrasounds application. The results show that it releases around twice as much alive cells compared to standard isolation protocol for bacterial microorganisms.

Keywords: Enzymes. Microscopy. Sonification. N-acetylcysteine

RESUMO

Xylella fastidiosa é uma bactéria fitopatogênica que causa doenças em várias culturas agrícolas importantes. *X. fastidiosa* cresce na forma de biofilme, é difícil de isolar, apresenta crescimento lento e alta exigência nutricional com compostos específicos para se desenvolver in vitro. Por ser um patógeno de difícil isolamento, o que dificulta sua detecção, em hospedeiros com baixa concentração de infecção não é possível realizar a detecção mesmo por métodos de base molecular. Portanto, é necessário aprimorar técnicas que liberem células vegetais viáveis para detecção mesmo em níveis baixos. Muitas substâncias e técnicas foram relatadas para decompor biofilmes. Entre elas estão as enzimas, que apresentam uma boa opção para a degradação do biofilme sem causar a morte das células, pois possuem características de alta especificidade e rápida reação em condições moderadas. Nesse estudo, *X. fastidiosa* foi isolada usando N-acetilcisteína e uma mistura de enzimas combinadas com aplicação de ultrassom. Os resultados mostram que o novo protocolo libera cerca de duas vezes mais células vivas em comparação com o protocolo de isolamento padrão para microrganismos bacterianos.

Palavras-chave: Enzimas. Microscopia. Sonificação. N-acetilcisteína

1 INTRODUCTION

Xylella fastidiosa is a plant pathogenic bacterium that causes diseases in several important agriculturally significant crops, such as Pierce's disease in grapevine, citrus variegated chlorosis, almond leaf scorch, oleander leaf scorch and coffee leaf scorch (HOPKINS; PURCELL, 2002; ALMEIDA; PURCELL, 2003; ALMEIDA; NUNNEY, 2015). This pathogen is considered one of ten most important plant pathogenic bacteria based on scientific/economic reasons (MANSFIELD et al., 2012) and in the EPPO A1 list of quarantine pathogens (EPPO/OEPP, 1992). It has been reported in America, where it infects more than 300 hosts (EFSA, 2015), Asia (SU et al., 2013) and Europe (SAPONARI et al., 2013; MARTELLI et al., 2016). *X. fastidiosa* is difficult to isolate, exhibits slow growth and has high nutritional requirements with specific compounds to develop in vitro (BELL et al. 1995; RODRIGUES et al., 2003). *X. fastidiosa* is restricted to xylem infection and colonization of these vessels results in biofilm formation.

As it is a pathogen of difficult isolation, which makes its detection difficult, in hosts with low concentration of infection it is not possible to perform the detection even by molecular basis methods (DGAV; 2016). Therefore, it is necessary to improve techniques that release viable plant cells for detection even in low levels.

Various bacteria species form biofilm communities which develop from planktonic cells after binding to a substratum (OSIRO et al., 2004). Biofilm consists in communities of bacteria embedded in a polymeric matrix fixed on an immersed surface (OULAHAL et al., 2007; HOWARD et al., 2015). The main compounds presented in bacteria biofilm are complex exopolysaccharides (EPSs), along with proteins, lipids, nucleic acids and humic substances. Figure 1 shows the presumed EPS backbone of fastidium gum, produced by *X. fastidiosa* (DA SILVA et al., 2001). The composition and quantity of EPS formed by microorganisms depends on the species, the age and environmental factors. Although there are some differences, the result is always a hydrogel, which keeps the biofilm adhered to the support (MAYER et al 1999). Many species are able to modulate to cell adhesiveness, and thus colonize the host (SAHOO et al., 2016). The high stability of biofilm can be overcome by cleaning agents (MAYER et al, 1999). These agents act weakening the mechanical stability of the biofilm matrix (MAYER et al, 1999).

Many substances and techniques were reported to decompose biofilms. Amongst them are enzymes, which present a good option to biofilm degradation without causing the death of the cells, since they possess characteristics of high specificity and rapid reaction in mild

conditions (BRISOU 1995; OULAHAL et al., 2007), enzymes such as Trypsin which catalyzes the hydrolysis of peptide bonds, deriving smaller proteins, and Amyloglucosidase, obtained from *Aspergillus niger* fungus that remove units from starch, resulting glucose, these are examples of enzymes that could be used in biofilm treatments. Another substance reported is N-Acetylcysteine (NAC), which is used to control bacterial biofilm in human diseases, although it is not an antibiotic drug, it has antibacterial properties. NAC is cysteine analogue, it is able to disrupt disulphide bonds in mucus (PÉREZ-GIRALDO et al., 1997; MURANAKA et al., 2013), and, has reported decreasing biofilm formation of a variety bacteria and also reducing the production of extracellular polysaccharide matrix and mature biofilm dismemberment (OLOFSSON et al., 2003; MURANAKA et al., 2013). Furthermore, the low cost and unknown environmental damage make NAC a good strategy to release the attached cells into the cell wall host plant (MURANAKA et al., 2013). In other hand, ultrasound represents an invasive technique which produces cavitation bubble activity, disruption of biofilms to various surfaces and low cost (STICKLET; HEWITT, 1991; BHAT; GOH, 2017). Disruption of *Xylella* biofilm which is a one the vulnerable points for isolation of these fastidious quarantine bacteria. Therefore, this study aims to evaluate ultrasounds combined to enzymes and a molecule with antibacterial properties, to determine an appropriate and potentially effective method for the liberation of bacteria *X. fastidiosa* cells from infected plant material to use in detection tests.

2 MATERIALS AND METHODS

Two different experiments were evaluated: The first tested its effect on *X. fastidiosa* grown in artificial medium (in vitro experiments) and then on bacteria in plants (in vivo experiments).

2.1 In vitro experiments

2.1.1 Bacterial strain and medium conditions

X. fastidiosa strain 3927, isolated from tobacco leaves, was grown in PWG or modified periwinkle-gelrite medium (DAVIS et al., 1983), and positive PCR confirmed the identity. In a beaker, float 3 g of bovine serum albumin on top of 30 ml H₂O. Stirring to dissolve on room temperature. In a beaker, dissolve 4 g L-glutamine in 100 ml H₂O by heating on a water bath (50 °C). In a 2 liter flask, add the following to 865 ml H₂O while stirring: phytone peptone 4 g;

tryptonebacto 1 g; MgSO₄, 0.4 g; K₂HPO₄ 1.2 g; KH₂PO₄ 1 g; phenol red stock 0.2 % in H₂O 10 ml; hemin chloride (0.1 % in 0.05 N NaOH, 10 ml; and, Gelrite gellan gum 8 g if making solid media. Amount of water increased accordingly. Autoclave contents of the 2 L flask only. When cooled to ca. 50 °C, add filter sterilized BSA and glutamine mixed together (filters 0.2 µm). Swirl gently to mix. All components used were acquired from Sigma-Aldrich.

2.1.2 Biofilm development and analyses

Strains cells at a concentration of 10⁶ CFU/ mL⁻¹ were placed in liquid culture medium (PWG) in tubes (10 mL) and wells of flat-bottomed polystyrene microtiter plates at 28 °C in a rotary shaker at 100 rpm. An inoculum at 10⁸ CFU/ mL⁻¹ was obtained after two weeks of growth. After that, the bacterial biofilms attached to the acrylic surface were exposed on different treatments and the biofilm remained was quantified spectrophotometrically.

2.1.3 Crystal readings on spectrophotometry

The technique was performed in tubes (10 mL) and wells of flat-bottomed polystyrene microtiter plates, and some wells were left free of treatments (controls). The biofilm formation was quantified spectrophotometrically after treatments were exposed by staining the remaining population with 0.5 % crystal violet for 30 minutes at room temperature. The excess crystal violet was washed three times by demineralized water. The crystal violet bound to the wall cells was recovered in absolute ethanol and quantified by measuring absorbance at 570 nm and the results were recorded as OD.

2.2 Number and Viability of cells

2.2.1 Microscopy

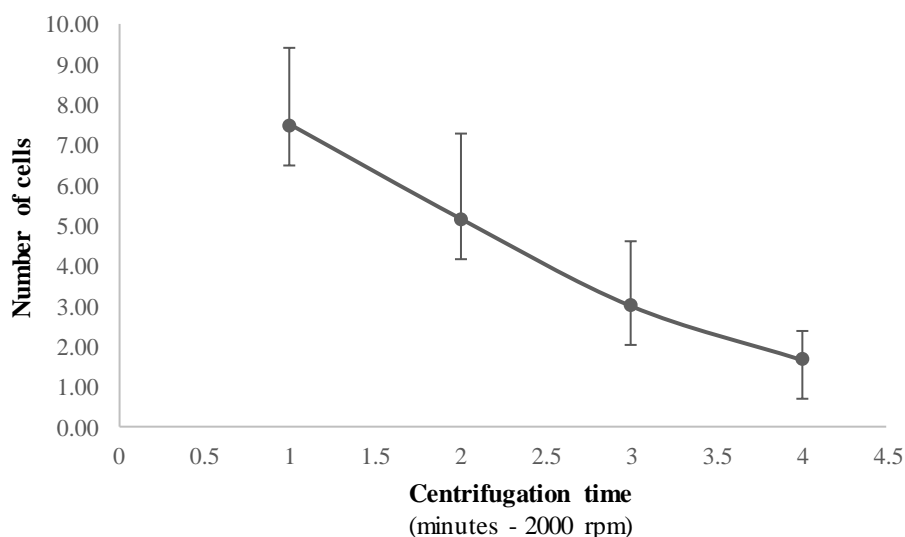
To quantify the living cells, the samples for this analysis were centrifuged at low speed 2000 rpm for one minute (figure 2), and taken 250 µl of the supernatant, transferred to a Eppendorf and added 0.75 µL of BacLight™ Kits that utilize mixtures of SYTO® 9 green-fluorescent nucleic acid stain and the red-fluorescent nucleic acid stain, propidium iodide (Syto 9 and PI, 1:1, purchased by Molecular probes Invitrogen detection technologies), mixed in

vortex for 3 seconds and incubated at room temperature in the dark for 15 minutes. Trapped 5 μL of the stained treated bacterial suspension between a slide and an 18 mm square coverslip and it was observed in a fluorescence microscope equipped.

2.2.2 Culturing cells

An aliquot of 100 μL of each treatment was used to plate in petri dishes containing PWG medium. After 30 days, the number of colonies forming units (CFU) was counted in each plate. We used two replicates' plates.

Figure 2- Centrifugation test applied in smashed samples of plant material infected with Xff.



Subtitle: The picture shows the number of cells recovered from supernatant aliquots counted on microscope.

Source: From the author (2018).

2.3 Techniques/treatments used to remove biofilm from the surface

2.3.1 Enzymes

Enzymes were purchased from Sigma-Aldrich: trypsin and amyloglucosidase, dissolved 100 mg/mL^{-1} . The enzymes were prepared in 50 mM PB buffer, pH 7 (oncl. 5 mM

Sodium Metabisulphite) and then sterilised by filtration (Millipore 0.2 µm). The enzyme/ NAC solution ratio used was 1:28 times.

2.3.2 N-Acetylcysteine (NAC)

Nac was purchased from Sigma-Aldrich, >99 % purity. The NAC final concentration was 6 mg/mL (established with previous assays – data not shown).

2.3.3 Ultrasound's technique

The treatment with ultrasounds to remove biofilm from the tubes surface was obtained by dipping the tubes in the ultrasonication machine and the application of ultrasound waves for 90 seconds in treatment solution.

2.4 In vivo experiments

2.4.1 Plant inoculation

Tobacco plants were used in experiment and inoculated with *X. Fastidiosa* strain 3927. The detection and quantification were confirmed by PCR.

2.5 Isolation

2.5.1 Preliminary procedure

For isolations, stems were excised from infected plants, surfaces disinfected for 2 min each in 70 % ethanol and 2 % sodium hypochlorite, rinsed for three times in sterile distilled water and cut to small pieces with a sterile scalpel. These samples were stored in a - 20 °C freezer. Before use for the release of the cells, samples were taken from the freezer and placed in the freeze dryer for 3 days.

2.5.2 Isolation standard

Samples treated in preliminary procedure were placed in sterile Bioreba bags (BIOREBA AG), smashed with a hammer and added phosphate buffer (10 mM PB) at a ratio of 1:4 (w:v), and left soaked for 30 min at room temperature. An aliquot of 50 μL of sap was added to 450 μL of sterile 10mM PB and used to prepare a serial 10-fold dilution (up 10^{-3}). Aliquots of 50 μL of 10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3} dilutions are then plated on the specific media (PWG), incubated at 28°C, and monitored for colony development for 4 weeks. Concomitant, an aliquot of 250 μL of sap was also maintained for counting the number of living cells in the microscope, prepared as described previously.

2.5.3 Isolation proposes

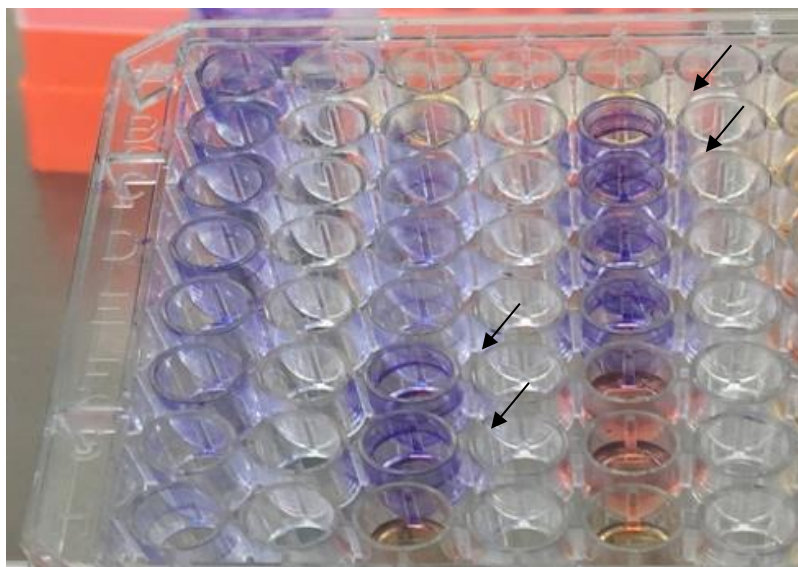
Samples treated in preliminary procedure were placed in sterile Bioreba bags (BIOREBA AG), smashed with hammer and added NAC + enzymes solution at a ratio of 1:4 (w:v), and left soaked for 1 hour at 35 °C incubation. After incubation, the sample was exposed to ultrasound for 90 seconds. An aliquot of 50 μL of sap was added to 450 μL of sterile 10mM PB and used to prepare a serial 10-fold dilution (up 10^{-3}). Aliquots of 50 μL of 10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3} dilutions were then plated on the specific media (PWG), incubated at 28 °C, and monitored for colony development for 4 weeks. Concomitant, an aliquot of 250 μL of sap was also maintained for counting the number of living cells in the microscope, prepared as described previously.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Biofilms – Crystal readings

It was possible to observe the presence of the biofilm in microtiter plates (Figure 2). These results were confirmed by microscopy (Figure 3). The removed biofilm obtained by each procedure (ultrasounds, ultrasounds combined with enzymes preparations and/or molecules) was quantified by using crystal violet readings.

Figure 2- Biofilm in microtiter plates coloured by crystal violet (part of procedure).



Source: From the author (2018).

Results are expressed as percentages of biofilm removal. Percentage data was averaged from six repetitions tested together during each treatment and are presented in Table 1.

Table 1- *X. fastidiosa* biofilm removal from artificial surfaces by ultrasonic irradiation combined with enzyme and/or chelating preparations.

Treatment	Percentage of biofilm removal (%)
Nac	46.12*
Cellulase	18.75 ^{ns}
Pectinase	-6.25 ^{ns}
Cellulase + pectinase+ NAC	12.50 ^{ns}
Dnase	6.25 ^{ns}
EDTA	3.12 ^{ns}
EDTA+Cellulase+Pectinase	18.75 ^{ns}
Phosphate buffer + ultrasounds	80.66*
Nac +Trypsin+Amyloglycosidase ultrasounds	80.33*

Subtitle: *Significant, at 1 % probability by Scott-knott test.

Source: From the author (2018).

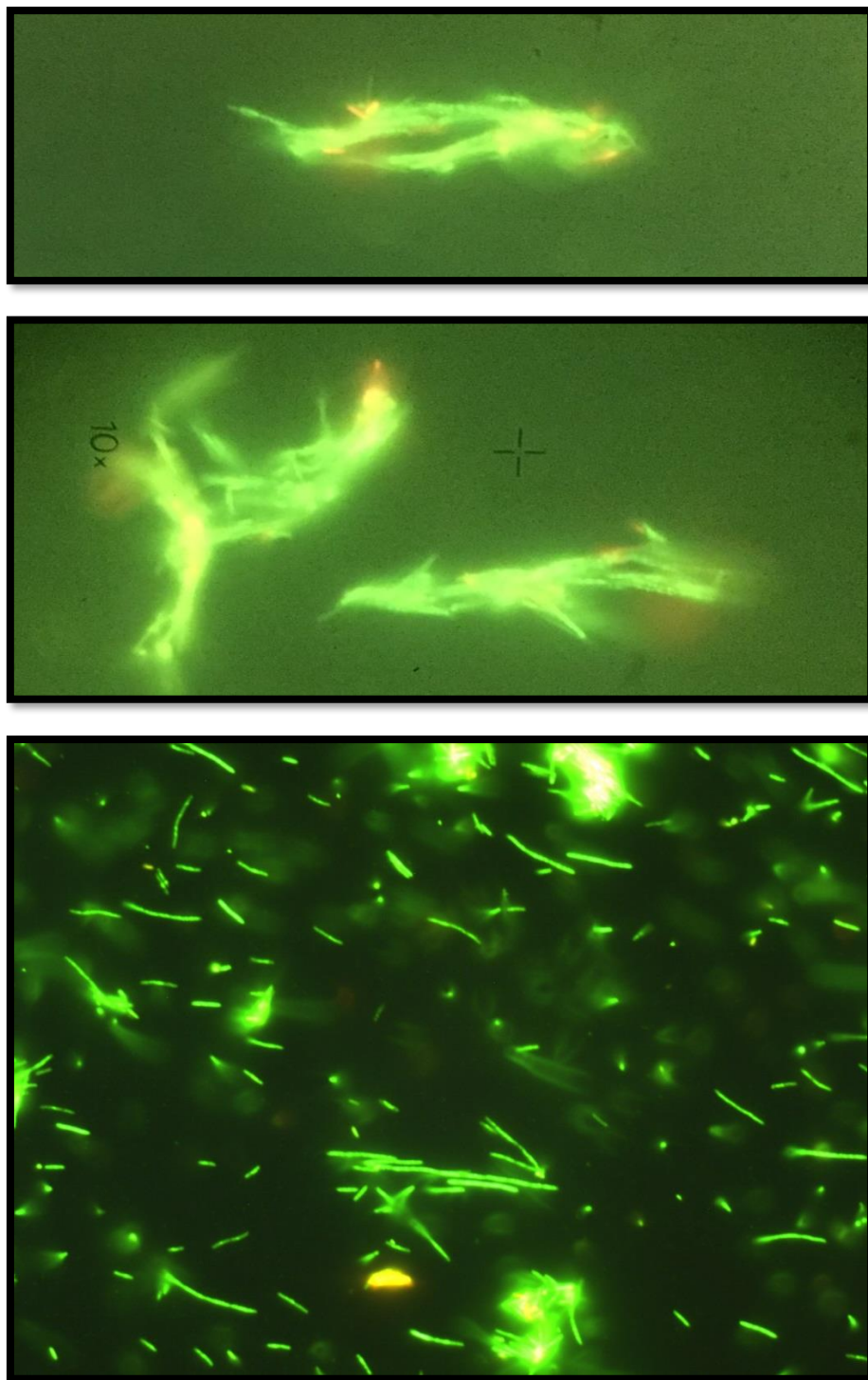
NAC reduces *X. fastidiosa* biofilm formation with concentration 6.0 mg/mL significantly if exposed for one hour. These results can be increased if enzymes and ultrasound are included. Enzymes can help in cell release because they can break down exopolysaccharides and glycoproteins that keeps the adhesion of bacteria to the surface and bacterial accumulation in the biofilm (BEECH et al, 1991; COSTERTON et al., 1995).

Therefore, many enzymes, molecules and a chelating agent combined with ultrasound application helped for the efficiency of the biofilm removal. Due to the heterogeneity of the extracellular polysaccharides and proteins in the biofilm, a mix of enzymes specificities may be necessary to stop biofilm degradation (JOHANSEN; FALHOLT; GRAM, 1997).

Removal rates were comprised between -6.25 and 80.66 %. Nac treatment removed 46.12% of biofilm and, if combined with Trypsin, Amyoglycosidase and ultrasounds application, this result reached 80.33 %, although the same result was reached by phosphate buffer and ultrasounds application.

These results in crystal readings are about all the cells released, both dead and alive. The next step was to confirm the viability of cells in each treatment.

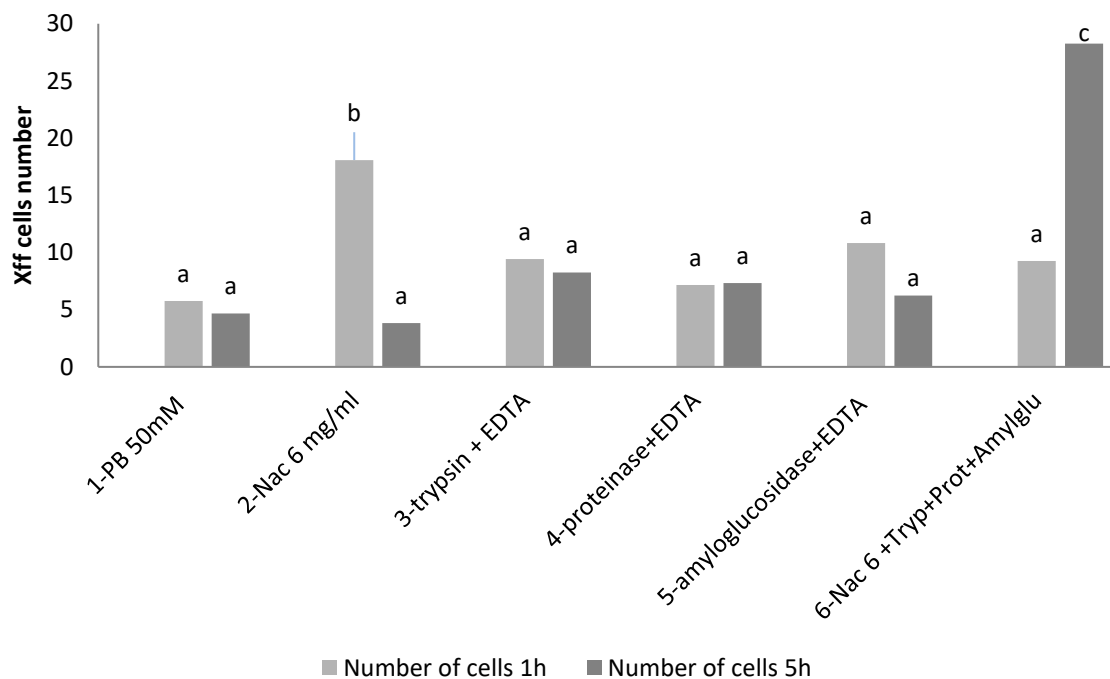
Figure 3- *X. fastidiosa* cells in microscopy slides from agar plates (A) and microtitler plates (B).



Source: From the author (2018).

3.2 Microscopy

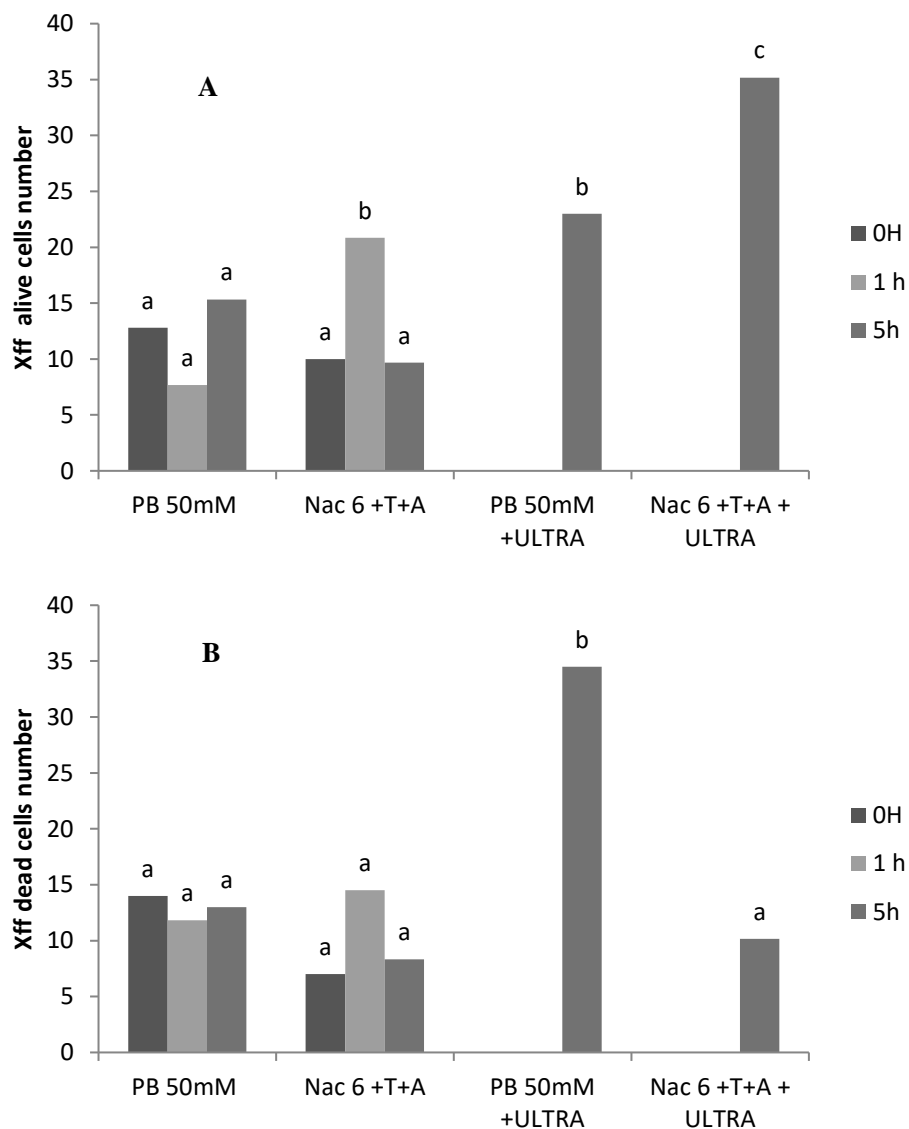
Figure 4- *X. fastidiosa* cells number counted in microscope.



Subtitle: 1- Control: Phosphate buffer 50 mM; 2- N-acetylcistein 6 mg/mL; 3-Trypsin enzyme + EDTA; 4- Proteinase enzyme + EDTA; 5- Amyloglucosidase enzyme + EDTA; 6- N-acetylcistein 6 mg/mL + Trypsin + Proteinase + Amyloglucosidase. Significant, at 1 % probability, by Scott-knott test.

Source: From the author (2018).

The count in the microscope showed that one hour of exposure to Nac released 18.1 cells of Xff while the phosphate buffer released 5.8 cells and the Nac treatment plus a mix of enzymes released 9.3 cells during the same exposure time (figure 4). This represents an increase of 212.07 % and 60.34 % in relation to the control (buffer). With the increased exposure to the treatments, a large cell release was observed in the treatment of Nac with enzyme mix, releasing 28.3 cells after 5 hours of exposure, representing an increase of 387.93 %, this means almost 5 times more than the control. Increasing release with increased exposure to enzyme treatment was expected, since the release by enzymatic action required time.

Figure 5- *X. fastidiosa* cells number counted in microscope.

Subtitle: A) *X. fastidiosa fastidiosa* alive cells: Control: Phosphate buffer 50 mM; Phosphate buffer 50 Mm + ultrasonic application for 90 seconds; N-acetylcistein 6 mg/mL + Trypsin + Amyloglucosidase + ultrasonic application for 90 seconds. Significant, at 1 % probability, by Scott-knott test.

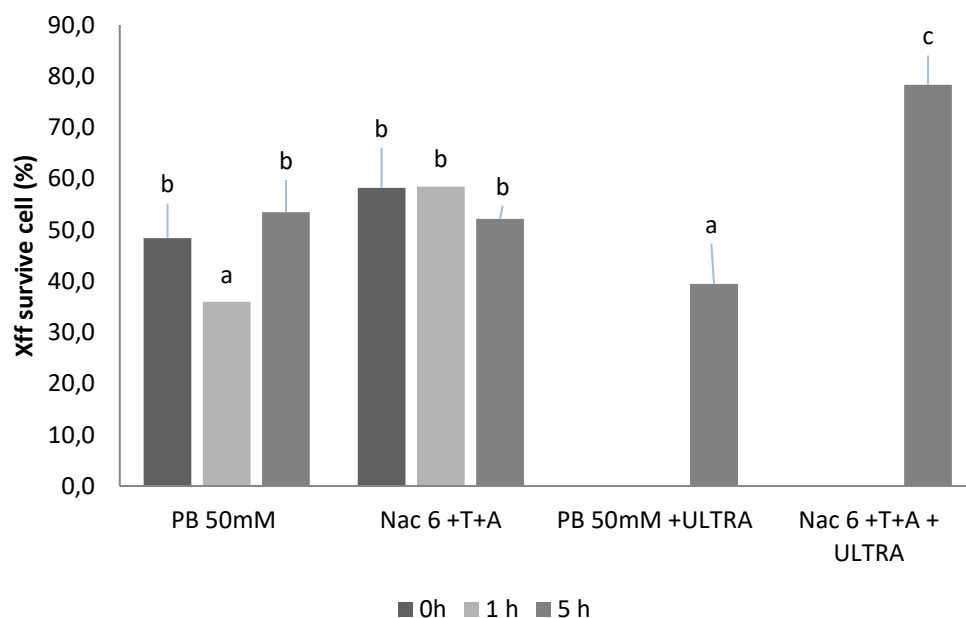
Source: From the author (2018).

In another experiment, the ultrasound application treatment was added (figure 5). In this study we separated living cells from dead. Only the treatment that liberated the biofilm cells (Nac + Trypsin + Amyloglucosidase) and the buffer used as control were evaluated. The results obtained demonstrated greater release of live cells from the selected treatment after one hour of exposure (Figure 5a). After the ultrasound application, the buffer that had released 15.3 cells passed to 23 cells, representing 50.32 % more (Figure

5). While the treatment with Nac and enzymes obtained increase from 10 to 35 live cells, representing an increase of 266.25 % (figure 5a).

In the picture of the dead cells, an opposite increase was observed. There was a large number of dead cells in the control treatment, with 34.5 dead cells, while in the selected there were 10.16 dead cells (Figure 5b). Although the total number of control treatment is higher than the selected treatment, cell survival is significantly higher in Nac combined with enzymes and ultrasound (Figure 6). The living cells in control treatment represented 39.5 % of alive cells while in the selected treatment it obtained 78.3 % survival (figure 6).

Figure 6- *X. fastidiosa* percentage of survive.



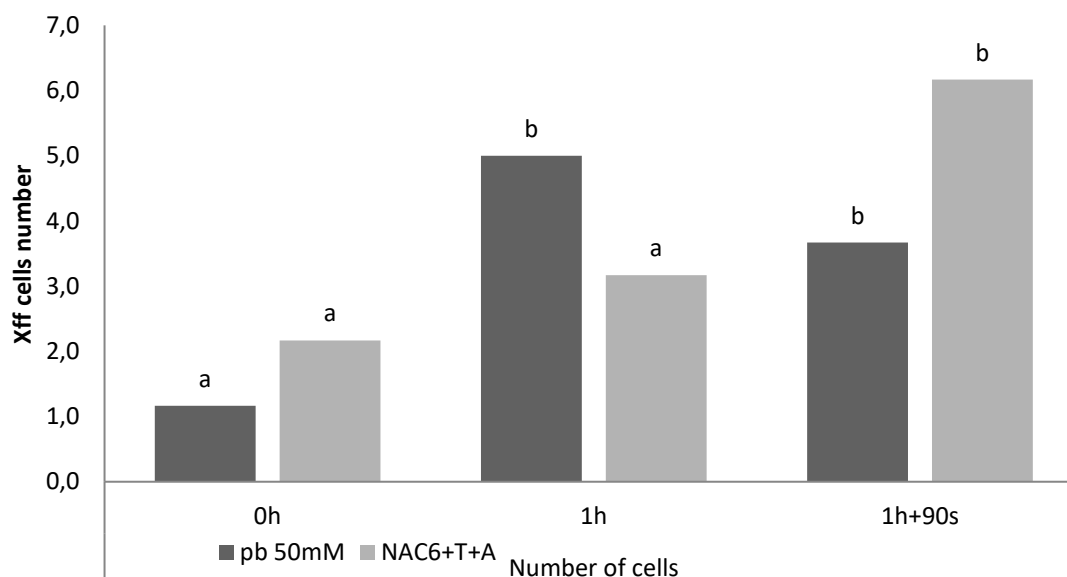
Subtitle: Control- Phosphate buffer 50 mM; Phosphate buffer 50 Mm + ultrasonic application for 90 seconds; N-acetylcistein 6 mg/mL + Trypsin + Amyloglucosidase + ultrasonic application for 90 seconds. Significant, at 1 % probability, by Scott-knott test.

Source: From the author (2018).

3.3 Plant material

3.3.1 Microscopy

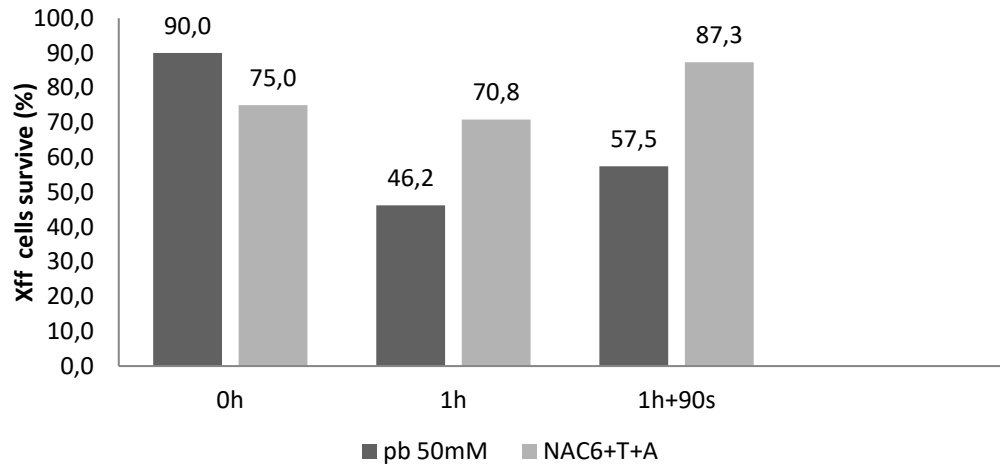
Figure 7- *X. fastidiosa* cells number from plant material.



Subtitle: Control- Phosphate buffer 50 mM; N-acetylcistein 6 mg/mL + Trypsin + Amyloglucosidase; Phosphate buffer 50 Mm + ultrasonic application for 90 seconds; N-acetylcistein 6 mg/mL + Trypsin + Amyloglucosidase + ultrasonic application for 90 seconds. Significant, at 1 % probability, by Scott-knott test.

Source: From the author (2018).

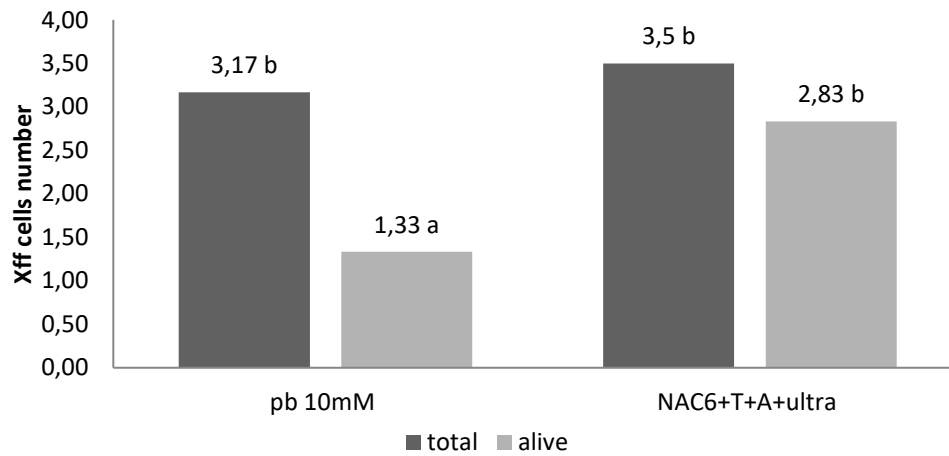
The treatment selected in the in vitro assays were applied to the plant material infected with *X. fastidiosa* (Figure 7). Control and treatment Nac + enzymes were statistically the same in total number of cells released, even after the application of ultrasound (figure 7). However, when analyzing the survival of the cells, we obtained the same result of the in vitro assay, the survival is statistically higher with the treatment of Nac + enzymes. Survival represented 87.3 % of the total cells released in the Nac + enzymes treatment whereas in the control, the survival obtained was 57 % of the cells (figure 8). This experiment was repeated and obtained similar results.

Figure 8- *X. fastidiosa* cells survive (%) from plant material.

Subtitle: Control- Phosphate buffer 50 mM; N-acetylcistein 6 mg/mL + Trypsin + Amyloglucosidase; Phosphate buffer 50 Mm + ultrasonic application for 90 seconds; N-acetylcistein 6 mg/mL + Trypsin + Amyloglucosidase + ultrasonic application for 90 seconds. Significant, at 1 % probability, by Scott-knott test.

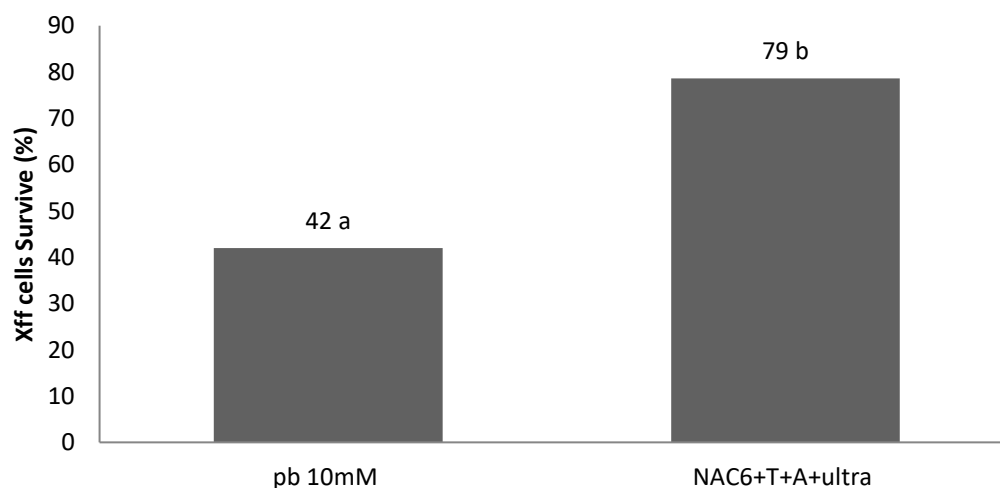
Source: From the author (2018).

The last step of the trials was to compare the standard isolation protocol used for bacterial and the proposed protocol. The same plant material with infected *X. fastidiosa* of the previous experiments was used. The results obtained can be observed in figure 9. The total number of cells released were statistically equal in both protocols, but survival in the proposed protocol was almost doubled (Figure 10). In practice, if we consider only living cells, it means that the standard protocol obtained 1.68×10^6 , while the proposed one obtained 3.95×10^6 cells per ml of suspension.

Figure 9- *X. fastidiosa* cells number from plant material.

Subtitle: Total and alive cells in both protocols: Phosphate buffer 10 mM (standard protocol); N-acetylcystein 6 mg/mL + Trypsin + Amyloglucosidase + ultrasonic application for 90 seconds (propose protocol). Significant, at 1 % probability, by Scott-knott test.

Source: From the author (2018).

Figure 10- *X. fastidiosa* cells survive (%) from plant material

Subtitle: Phosphate buffer 10 mM (standard protocol); N-acetylcystein 6 mg/mL + Trypsin + Amyloglucosidase + ultrasonic application for 90 seconds (propose protocol). Significant, at 1% probability, by Scott-knott test.

Source: From the author (2018).

4 CONCLUSION

NAC reduces *X. fastidiosa* biofilm formation with concentration 6.0 mg/mL significantly if exposed for one hour. This result can be increased if enzymes and ultrasound treatments are included. Bacterial isolation protocol from EPPO and the protocol propose released equal number of bacterial cells. But protocol propose releases around twice as much alive cells.

REFERENCES

- ALMEIDA, R. P. P.; PURCELL, A. H. Biological Traits of *Xylella fastidiosa* Strains from Grapes and Almonds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 7447–7452, 2003.
- ALMEIDA, R. P. P.; NUNNEY, L. How do plant diseases caused by *Xylella fastidiosa* emerge? **Plant Disease**, v. 99, p. 1457–1467, 2015.
- Bhat, R. K.M. G. Sonication treatment convalesce the overall quality of hand-pressed strawberry juice. **Food Chemistry**, v. 215, p. 470–476, 2017.
- BEECH, I. B. et al. Extracellular polyssacharides from *Desulfovibrio desulfuricans* and *Pseudomonas fluorescens* in the presence of mild and stainless steel. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 65–71, 1991.
- BELL, C.R. et al. Endophytic bacteria in grapevine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 46–53, 1995.
- BRISOU, J. F. **Biofilms, methods for enzymatic release of microorganisms**. Boca Raton: CRC Press Inc, p. 218, 1995.
- COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711–745, 1995.
- DGAV. **Plano de contingencia para controle da *Xylella fastidiosa* e seus vetores**. Direção geral de alimentação e veterinária. República Portuguesa. Portugal, 2016. Disponível em: http://www.drapal.min-agricultura.pt/drapal/images/servicos/produtos_fitofarmaceuticos/DGAV_Plano_Xf_contingenciav2b.pdf. Acesso em: 23 de setembro de 2021.
- DA SILVA, F. R. et al. Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters**, 203: 165–171, 2001.
- DAVIS, M. J. et al. Periwinkle wilt bacterium: axenic culture, pathogenicity, and relationships to other gram- negative, xylem-inhabiting bacteria. **Phytopatholog**, v. 73, p. 1510–1515, 1983.
- EFSA. Scientific opinion of the risk to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction options. **EFSA Journal**, v. 13, p. 3989, 2015.
- EPPO/OEPP. *Xylella fastidiosa*. **EPPO data sheets on quarantine pests**, n. 166, 1992.
- HOPKINS, D. L.; PURCELL, A. H. *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's Disease of Grapevine and Other Emergent Diseases. **Plant Disease**. v. 86, n. 10, p. 1056–1066, 2002.

HOWARD R. J. et al. Efficacy of agricultural disinfectants on biofilms of the bacterial ring rot pathogen, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 37, n. 3, p. 273–284, 2015.

JOHANSEN, C.; FALHOLT, P.; GRAM, L. Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3724–3728, 1997.

MANSFIELD, J. et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 6, p. 614–629, 2012.

MARTELLI, G. P. et al. The olivequick decline syndrome in south-east Italy: A threatening phytosanitary emergency. **European Journal of Plant Pathology**, v. 144, p. 235–243, 2016.

MAYER C. et al. The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. **International Journal of Biological Macromolecules**. Vol. 26, p. 3–16, 1999.

MURANAKA, L. S., et al. N-Acetylcyteine in Agriculture, a Novel Use for an Old Molecule: Focus on Controlling the Plant–Pathogen *Xylella fastidiosa*. **PLoS ONE**, v. 8, n.8, p. e72937, 2013.

OLOFSSON, A. C., HERMANSSON, M., ELWING, H. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4814–4822, 2003.

OSIRO, D. et al. A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence. **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, p. 313–318, 2004.

OULAHAL, N. et al. Removal of meat biofilms from surfaces by ultrasounds combined with enzymes and/or a chelating agent. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 192–196, 2007.

PÉREZ-GIRALDO, C. et al. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 39: 643–646, 1997.

RODRIGUES, J. L. M. et al. Detection and Diversity Assessment of *Xylella fastidiosa* in Field-Collected Plant and Insect Samples by Using 16S rRNA and *gyrB* Sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4249–4255, 2003.

SAHOO, P. K. et al. Nanowire arrays as cell force sensors to investigate adhesion-enhanced holdfast of single cell bacteria and biofilm stability. **Nano Letters**, v. 16, p. 4656–4664, 2016.

SAPONARI, M. D. et al. Identification of DNA sequences related of *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (southern Italy). **Journal of Plant Pathology**, v. 95, p. 668, 2013.

STICKLER, D. J.; HEWITT, P. The activity of antiseptics against biofilms of mixed bacterial species growing on silicone surfaces. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 10, p. 416–421, 1991.

SU, C.C. et al. Pierce's Disease of grapevines in Taiwan: isolation, cultivation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*. **Journal of Phytopathology**. v. 161, p. 389–396, 2013.