



JOÃO PEDRO GOMES PAGAN

**IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CAFEIEIRO QUANTO
A RESISTÊNCIA À FERRUGEM ALARANJADA**

LAVRAS – MG

2022

JOÃO PEDRO GOMES PAGAN

**IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CAFEIRO QUANTO A RESISTÊNCIA À
FERRUGEM ALARANJADA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

Prof^a. Dr^a. Flávia Maria Avelar Gonçalves

Orientadora

LAVRAS – MG

2022

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

Pagan, João Pedro Gomes.

Identificação de genótipos de cafeeiro quanto a resistência à
ferrugem alaranjada / João Pedro Gomes Pagan. - 2022.

42 p. : il.

Orientador(a): Flávia Maria Avelar Gonçalves.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Coffea arabica. 2. Melhoramento genético. 3. Hemileia
vastatrix. I. Gonçalves, Flávia Maria Avelar. II. Título.

JOÃO PEDRO GOMES PAGAN

**IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CAFEIEIRO QUANTO A RESISTÊNCIA À
FERRUGEM ALARANJADA**

**IDENTIFICATION OF COFFEE GENOTYPES AS TO COFFEE LEAF RUST
RESISTANCE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de maio de 2022.

Dr^a. Flávia Maria Avelar Gonçalves
Dr. Cesar Elias Botelho
Dr^a. Deila Magna Dos Santos Botelho

UFLA
EPAMIG
UFLA



Prof^a. Dr^a. Flávia Maria Avelar Gonçalves
Orientadora

LAVRAS – MG

2022

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e especialmente ao departamento de Biologia pela oportunidade.

À minha família e noiva por todo o apoio e ajuda durante esses anos.

À minha orientadora Flávia por todo o auxílio.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio e financiamento.

Aos amigos do GEN pelo companheirismo e ajuda durante todo o trabalho.

Ao laboratório de fitopatologia, e em especial, à Dr^a. Deila pela ajuda na condução das análises laboratoriais.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

RESUMO

Diversos problemas fitossanitários afetam a cultura do café, dentre eles a ferrugem, que é causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, um dos mais comuns à cultura, acarretando perdas significativas. O controle da doença se dá por meio de aplicações constantes de fungicidas nas lavouras, mas vem se procurando cada vez mais a utilização de cultivares resistentes. Dessa forma, os objetivos do trabalho foram avaliar e identificar progênies F₄, do programa de melhoramento do cafeeiro da UFLA/Epamig, que apresentem resistência à ferrugem alaranjada do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) e verificar a relação da resistência à ativação enzimática de β -1,3-glucanases e quitinases, além de lignina solúvel e compostos fenólicos solúveis totais. Para isso, foram utilizados 31 genótipos de cafeeiro, sendo 26 progênies F₄ e mais cinco testemunhas, dentre elas três resistentes (Ametista, MGS Paraíso 2 e Catiguá MG 2) e duas suscetíveis (Catuaí Vermelho IAC 99 e Topázio MG 1190). As plantas foram inoculadas com esporos de *H. vastatrix* e foram realizadas cinco avaliações semanais seguindo uma escala de notas após o aparecimento dos primeiros sintomas, além de serem coletadas folhas nos tempos de 24, 48, 72, 120, 192 e 216 horas após a inoculação para a avaliação da quitinase e β -1,3-glucanase e coletadas folhas 240 horas após a inoculação para avaliação de compostos fenólicos solúveis totais e lignina solúvel. Houve diferença significativa entre os genótipos avaliados para severidade de ferrugem alaranjada. Dentre as progênies F₄ avaliadas, pode-se verificar algumas resistentes à *Hemileia vastatrix* quando comparado com as testemunhas resistentes. Não foi possível encontrar uma relação entre a resistência e/ou suscetibilidade à *Hemileia vastatrix* e a quantificação dos teores de compostos fenólicos solúveis totais, lignina solúvel, quitinase e β -1,3-glucanase nos genótipos avaliados.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. Melhoramento genético. *Hemileia vastatrix*.

ABSTRACT

Several phytosanitary problems affect the culture of coffee, among them the rust, caused by the fungus *Hemileia vastatrix* is one of the most common to the culture, causing significant losses. The control of the disease occurs through constant applications of fungicides in the crops, but the use of resistant cultivars has been increasingly sought. Thus, the objectives of this work were to evaluate and identify F4 progenies from the UFLA/Epamig coffee breeding program that show resistance to coffee orange rust (*Hemileia vastatrix*) and to verify the relationship of resistance to the enzymatic activation of β -1,3 -glucanases and chitinases in addition to soluble lignin and total soluble phenolic compounds. For this, 31 coffee genotypes were used, being 26 F-4 progenies and five controls, including three resistant (Ametista, MGS Paraíso 2 and Catiguá MG 2) and two susceptible (Catuaí Vermelho IAC 99 and Topázio MG 1190). The plants were inoculated with spores of *H. vastatrix* and five weekly evaluations were carried out following a rating scale after the appearance of the first symptoms, in addition to collecting leaves at 24, 48, 72, 120, 192 and 216 hours after inoculation for evaluation of chitinase and β -1,3-glucanase and leaves collected 240 hours after inoculation for evaluation of total soluble phenolic compounds and soluble lignin. There was a significant difference between the genotypes evaluated for orange rust severity. Among the evaluated F4 progenies, some resistant to *Hemileia vastatrix* can be verified when compared with the resistant controls. It was not possible to find a relationship between resistance and/or susceptibility to *Hemileia vastatrix* and the quantification of the levels of total soluble phenolic compounds, soluble lignin, chitinase and β -1,3-glucanase in the evaluated genotypes.

Keywords: *Coffea arabica*. Breeding. *Hemileia vastatrix*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1	Café no Brasil.....	10
2.2	Melhoramento do cafeeiro	11
2.3	Ferrugem alaranjada do cafeeiro	13
2.4	Resistência a <i>Hemileia vastatrix</i>	14
2.5	Ações enzimáticas na indução de resistência.....	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	Análise fenotípica.....	18
3.1.1	Plantio das mudas de cafeeiro em casa de vegetação	18
3.1.2	Inoculação do fungo <i>Hemileia vastatrix</i>	18
3.1.3	Avaliação da severidade da doença e análise dos dados.....	19
3.2	Análises bioquímicas	20
3.2.1	Quitinase e β -1,3-glucanase.....	21
3.2.1.1	Quitinase.....	21
3.2.1.2	β -1,3-glucanase.....	21
3.2.2	Compostos fenólicos solúveis totais e lignina solúvel.....	22
3.2.2.1	Quantificação dos compostos fenólicos solúveis totais.....	22
3.2.2.2	Quantificação de lignina solúvel	22
3.2.3	Análise dos dados bioquímicos	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1	Severidade da ferrugem alaranjada do cafeeiro	24
4.2	Quitinase e β -1,3-glucanase	26
4.3	Compostos fenólicos solúveis totais e lignina solúvel.....	33
5	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

O *Coffea arabica* L. foi introduzido no Brasil em 1727 (CARVALHO, 1993) e o início do melhoramento genético se deu por volta de 1930. Os melhoristas, desde então, procuram obter plantas que apresentam não só uma alta produtividade como também outras características de interesse agrônomo, tais como: baixos teores de cafeína, ciclo precoce, resistência a patógenos, entre outros (CARVALHO; CHALFOUN; CUNHA, 2010).

Dentre essas características, a ocorrência de doenças tem grande importância, uma vez que elas são responsáveis por prejuízos econômicos, devido, principalmente, à diminuição da longevidade das lavouras cafeeiras (CARVALHO; CHALFOUN; CUNHA, 2010). Uma das principais doenças problema no cafeeiro é a ferrugem alaranjada, cujo agente etiológico é o fungo *Hemileia vastatrix*. Ela foi constatada no Brasil em 1970, no sul da Bahia e disseminou rapidamente por toda a região cafeeira brasileira (CORREA JUNIOR, 1990). A ferrugem causa desfolha das plantas adultas do cafeeiro e redução das áreas fotossinteticamente ativas, ocasionando a morte dos ramos laterais, afetando o florescimento, o pegamento de frutos e conseqüentemente a produção na safra seguinte (ZAMBOLIM et al., 2005). Se a desfolha das plantas provocada pela ferrugem ocorrer antes do florescimento, ou durante o desenvolvimento dos frutos, ocorrerá respectivamente a redução da floração e a má formação dos frutos.

Dependendo da altitude, das condições climáticas, do estado nutricional da planta e da sua característica de suscetibilidade, as perdas causadas pelo fungo podem ser de 35 a 50% na média do biênio (ZAMBOLIM et al., 2005). No Brasil, o problema se torna muito mais sério, pois, no atual momento, grande parte das lavouras brasileiras são compostas por cultivares suscetíveis, principalmente ‘Catuaí’ e ‘Mundo Novo’ (ZAMBOLIM et al., 2005). O controle químico, quando utilizado corretamente, é um método eficiente, porém, as sucessivas aplicações aumentam o custo de produção e conseqüentemente diminuem o lucro do produtor.

Com isso, o foco dos programas de melhoramento genético do cafeeiro, na obtenção de cultivares resistentes ao patógeno, se torna cada vez mais essencial, a fim de se evitar, ou pelo menos minimizar os prejuízos por ele ocasionados à cafeicultura brasileira. Além das vantagens de ordem econômica, devemos também levar em consideração que o plantio de cultivares resistentes à ferrugem reduzirá ou diminuirá a contaminação do ambiente e o risco de contaminação dos trabalhadores, uma vez que possibilitará reduzir a utilização de produtos fitossanitários na cafeicultura (VÁRZEA; MARQUES, 2005).

O sistema de defesa das plantas consiste em mecanismos constitutivos e induzidos, também chamados de pré e pós-formados. Os pré-formados, também denominados barreiras

constitutivas, estão presentes na planta mesmo antes da infecção e são estruturas como: ceras, cutículas, parede celular espessa, tricomas, adaptações em estômatos e fibras vasculares; e os compostos químicos como: fenóis, alcaloides, lactonas insaturadas, glicosídeos cianogênicos, fototoxinas, inibidores proteicos e enzimas hidrolíticas (STANGARLIN et al., 2011). Os mecanismos pós-formados são aqueles que se manifestam após a infecção, conhecidos como induzíveis ou pós-formados, e envolvem a formação de papilas, halos, lignificação, formação de camadas de cortiça, tiloses e deposição de gomas, além da liberação de compostos como fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas-RP) e enzimas antioxidantes (AGRIOS, 2005).

Durante os últimos anos, os programas de melhoramento genético do cafeeiro têm disponibilizado aos agricultores várias cultivares geneticamente resistentes à ferrugem alaranjada. Porém, o contínuo surgimento de novas raças fisiológicas destes patógenos (VÁRZEA; MARQUES, 2005) faz com que o melhoramento continue buscando novos genótipos, com boas características agronômicas e com resistência mais ampla ao patógeno.

Diante disso, o trabalho tem como objetivos avaliar e identificar genótipos que apresentem resistência a *Hemileia vastatrix* e verificar a relação da resistência à ativação enzimática de β -1,3-glucanases e quitinases, além de lignina solúvel e compostos fenólicos solúveis totais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Café no Brasil

A cultura do café é uma das mais tradicionais e cobiçadas no mundo, pelo seu alto consumo no mercado e pela rentabilidade que pode trazer ao produtor quando se obtém sucesso em sua produção (OLIVEIRA NETO et al., 2017). O café chegou ao Brasil em 1727, quando o sargento Mor Francisco de Mello Palheta trouxe mudas e sementes provenientes da Guiana Francesa para o estado do Pará, a pedido do governador e capitão-general do estado do Maranhão, João da Maia da Gama (CARVALHO, 1993). O café já tinha grande importância comercial no mundo, e se espalhou pelo Brasil, adaptando-se rapidamente, principalmente nos estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais. E, em curto período, tornou-se um dos produtos de maior importância para a economia nacional (CONAB, 2022).

A área ocupada pela atividade cafeeira no Brasil no ano de 2021 é de cerca de 2,20 milhões de hectares, divididos em 15 estados produtores, apresentando um decréscimo de 1,8% de área cultivada, quando comparada ao ano de 2020. Quando se observa a produção, essa também apresenta uma redução quanto ao ano anterior, sendo para o ano de 2021, 47 milhões de sacas, número 26% inferior ao de 2020 (CONAB, 2022). Tal queda é explicada devido principalmente, ao fato de 2021 ser um ano de bienalidade negativa (EMBRAPA, 2021). As espécies mais plantadas comercialmente no país são *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* L. (CONAB, 2022).

No entanto, atualmente, o cultivo da cultura se restringe apenas a algumas regiões, sendo o estado de Minas Gerais o maior produtor brasileiro com cerca de 46,4% de toda produção do país, seguido por Espírito Santo (29,6%), São Paulo (8,3%), Bahia (7,2%), Rondônia (4,7%) e Paraná (1,8%) (CONAB, 2022).

O Brasil é o maior produtor mundial de café, com cerca de 47 milhões de sacas de 60 quilogramas, e ocupa o primeiro lugar na exportação mundial, com cerca de 40,4 milhões de sacas. O estado de Minas Gerais é o maior produtor de *Coffea arabica*, correspondendo a 77% da produção nacional, e possui em sua maioria, pequenos produtores nas regiões de elevada altitude: Sul de Minas e Matas de Minas (CONAB, 2022).

2.2 Melhoramento do cafeeiro

Embora a diversidade de espécies de café seja ampla, apenas duas destas são utilizadas comercialmente: *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. No entanto, espécies consideradas selvagens, como *C. congensis*, *C. sessiliflora*, *C. stenophylla*, *C. kapakata*, *C. eugenioides*, *C. liberica*, *C. dewevrei* e *C. racemosa*, por mais que não sejam aproveitadas comercialmente, apresentam uma grande variabilidade genética. Essa variabilidade é largamente utilizada nos programas de melhoramento em busca de características como resistência a pragas e doenças e características de interesse agrônomo como ciclo, porte e teores de cafeína e sólidos solúveis, por meio de cruzamentos interespecíficos (SAKIYAMA et al., 1999).

A maioria das espécies de café são diploides ($2n=2x=22$), alógamas e auto incompatíveis, exceto o *Coffea arabica* que é naturalmente alotetraploide ($2n=4x=44$) e autógena, com taxa de autofecundação de 95% (CHARRIER; BERTHAUD, 1985). No que diz respeito à sua origem, aponta-se que o *C. arabica* é originado do cruzamento natural entre duas espécies selvagens, *C. canephora* (genitor masculino) e *C. eugenioides* (genitor feminino) (CHARRIER; BERTHAUD, 1985).

Até o ano de 1859, os cafezais brasileiros descendiam de somente uma planta do jardim botânico de Amsterdã, que deu origem aos cafezais de Suriname, Guiana e Brasil. Portanto, os cafezais brasileiros eram uma enorme progênie de um só cafeeiro, sendo essa denominada *Typica* (CARVALHO, 1993). Então, o governo brasileiro mandou buscar sementes de *Coffea arabica* L. var. Bourbon Vermelho da Ilha Reunião para a introdução no Brasil, em virtude da sua alta produtividade e boa qualidade de bebida. Além da introdução do Bourbon vermelho, outra importante introdução se deu com a cultivar Sumatra provindo da ilha de Sumatra no ano de 1896, essa cultivar era descrita como bem produtiva, vigorosa e de sementes maiores do que as do Bourbon Vermelho, contudo, quando introduzida suas produções não eram satisfatórias. Sendo assim, não teve a mesma expansão do Bourbon (KRUG et al., 1939).

O melhoramento genético da cultura do cafeeiro no Brasil se deu início em meados da década de 1930, pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), cerca de 200 anos depois da introdução da cultura no país. Até então, o melhoramento só ocorria de forma empírica, pelos próprios agricultores, que selecionavam as plantas superiores, provavelmente, provenientes de mutações ou recombinações tais como Bourbon Amarelo, Mundo Novo e Maragogipe, com o intuito de formar novas lavouras (CARVALHO et al., 1952, BERTHAUD; HARRIER, 1988).

Em 1943, o IAC foi informado sobre uma lavoura da cultivar Sumatra no município de Urupês, que tinha suas plantas excepcionalmente desenvolvidas e produtivas, além de

possuírem variação. Posteriormente, com alguns estudos sobre a filogenia deste cafeeiro, concluiu-se que as plantas eram oriundas de um cruzamento natural entre as cultivares Sumatra e Bourbon. Inúmeras plantas foram selecionadas daquela lavoura e deram origem às 14 cultivares (RNC, 2018), que foram denominadas Mundo Novo (CARVALHO et al., 1952, MENDES et al., 2008).

Dentre as diversas seleções feitas no IAC, a realizada entre as progênes de Caturra Amarelo (que apresentam porte baixo) e Mundo Novo, mereceu total atenção. Esta seleção teve início em 1949, e após várias gerações, obtiveram recombinações valiosas que foram denominadas Catuaí Amarelo e Catuaí Vermelho. Entre suas características estavam: o porte pequeno do Caturra e a rusticidade do Mundo Novo (MATIELLO, 2005, PEREIRA et al., 2010).

Atualmente, das 141 cultivares de *C. arabica* que estão registradas no Registro Nacional de Cultivares (RNC), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 66 são do Instituto Agrônomo de Campinas, 40 da Fundação de Apoio à Tecnologia Cafeeira (FUNPROCAFÉ), 20 da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e 15 do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IAPAR) (MAPA, 2022). As cultivares Mundo Novo e Catuaí representam uma grande área plantada no Brasil, essas cultivares são preferidas pelos agricultores pela rusticidade, produtividade, capacidade de adaptação e qualidade de bebida (SOUZA, 2015).

Com a chegada da ferrugem alaranjada do cafeeiro no Brasil, o melhoramento genético do *C. arabica* tomou um novo rumo (CARVALHO, 2007). As instituições de ensino e pesquisa como a Universidade Federal de Viçosa (UFV), o Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), a Universidade Federal de Lavras (UFLA) e a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), intensificaram os seus programas de melhoramento com o intuito de lançar cultivares que apresentassem alta produtividade e certo grau de tolerância à ferrugem (MEDINA FILHO; BORDIGNON; CARVALHO, 2008).

Mesmo com a existência de um número considerável de genótipos que apresentam certo nível de resistência, os programas de melhoramento continuam buscando incorporar novos genes de resistência, devido ao fato de que o fungo *Hemileia vastatrix* possui uma alta variabilidade genética, dificultando muito a previsão de durabilidade da resistência das cultivares lançadas (VÁRZEA; MARQUES, 2005).

Além do melhoramento que visa a resistência à ferrugem, existem outras linhas de pesquisas do cafeeiro que são desenvolvidas pelos órgãos públicos, tais como: resistência a nematoides, resistência ao bicho mineiro (*Leucoptera coffeella*), baixos teores de cafeína nos

grãos, maior uniformidade de maturação, resistência à broca dos frutos (*Hypothenemus hampei*), maior tamanho de grão e melhor qualidade de bebida (MEDINA FILHO; BORDIGNON; CARVALHO, 2008).

Também é importante ressaltar que os programas de melhoramento do cafeeiro, assim como a grande maioria das espécies perenes, são muito onerosos e necessitam de uma grande quantidade de colheitas e avaliações. Segundo relatos na literatura, são necessárias no mínimo quatro colheitas para a validação das melhores progênes. Deste modo, o tempo mínimo necessário desde a hibridação até o lançamento da cultivar, é de aproximadamente 30 anos (CARVALHO et al., 1993).

Devido ao número de genes que controla a resistência à ferrugem do cafeeiro, a metodologia mais utilizada nos programas de melhoramento para este caráter é a seleção recorrente, que visa aumentar gradativamente a frequência de alelos favoráveis. Esta seleção se baseia em três etapas básicas: a obtenção da população segregante, a avaliação e seleção destas progênes e a recombinação das progênes selecionadas para formar o próximo ciclo de seleção. O método também tem a vantagem de permitir a obtenção de linhagens superiores a cada ciclo, maior eficiência no acúmulo de alelos favoráveis, viabilidade de inserção de germoplasma exótico na população e maior oportunidade de recombinação genética (GERALDI, 1997).

2.3 Ferrugem alaranjada do cafeeiro

A ferrugem alaranjada do cafeeiro é a principal doença do cafeeiro no Brasil, ocorrendo em plantações da cultura espalhadas por todo o mundo. Causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, esta doença foi encontrada pela primeira vez em cafeeiros silvestres, no ano de 1861, na região do Lago Vitória, no Quênia (CHAVES et al., 1970). Nos primeiros 100 anos após a sua constatação, o patógeno disseminou-se por todos os países produtores da África, Ásia e Oceania. A identificação do patógeno ocorreu no Ceilão (atual Sirilanka) em 1869, país que atualmente é produtor de chá devido à alta gravidade da doença na área (MATIELO; ALMEIDA, 2006). O nome da espécie como *vastatrix*, deve-se a sua rápida disseminação, e o nome do gênero *Hemileia*, ao fato de os esporos possuírem metade da parede celular com aspecto liso e a outra metade de aspecto rugoso (BERKELEY, 1869).

No Brasil, a doença foi constatada pela primeira vez no sul da Bahia, em 1970, e a partir disso, apesar dos esforços concentrados em conter a disseminação do patógeno, a doença encontra-se em todas as regiões cafeeiras do Brasil (CORREA JUNIOR, 1990). Em lavouras adultas, a desfolha chega a ser tão intensa que reduz drasticamente a área fotossintética

causando a morte dos ramos produtivos e conseqüentemente o pegamento de frutos e a produção na próxima safra (CHALFOUN; ZAMBOLIN, 1985), causando perda na produção de até 50% (ZAMBOLIN et al., 1999).

O patógeno é altamente influenciável pelas condições ambientais. Sendo assim, as condições ideais para infecção são: temperaturas entre 20 e 25°C e molhamento foliar (ZAMBOLIN et al., 1985). Com estas condições e em anos de alta produção, há um aumento significativo no ataque do patógeno (MARIOTO et al., 1974).

O controle da ferrugem é feito utilizando os princípios de proteção e de terapia. Na proteção utilizam-se fungicidas chamados de protetores, principalmente os cúpricos, que tem se mostrado mais eficientes; já na terapia, utiliza-se de fungicidas sistêmicos, aplicados via solo ou via foliar (ZAMBOLIN et al., 1997). Por mais que o controle químico venha se mostrando eficiente, devem ser levados em consideração outros fatores, como o custo, que pode ser alto, dependendo do produto utilizado, reduzindo assim a lucratividade da lavoura; o risco de contaminação dos trabalhadores e do ambiente; e a dificuldade de aplicação destes produtos em lavouras de difícil acesso, como lavouras implantadas em regiões de alta declividade.

Com isso, o mercado vem exigindo cada vez mais dos programas de melhoramento, cultivares resistentes à ferrugem. Mas, o contínuo aparecimento de novas raças fisiológicas do fungo tem ocasionado a quebra da resistência das cultivares utilizadas pelos agricultores (CAPUCHO et al., 2012), as quais haviam sido escolhidas devido a essa característica. Mostrando assim a necessidade de se obter cultivares com boas características agrônômicas e contendo uma resistência durável à *Hemileia vastatrix*.

2.4 Resistência a *Hemileia vastatrix*

Quando se fala sobre melhoramento visando resistência à doenças, é de extrema importância o conhecimento sobre as raças fisiológicas do patógeno presentes na região de interesse, e os genes que conferem esta resistência na planta, para assim, então, introduzi-los.

O Centro de Investigação da Ferrugem do Cafeeiro (CIFC) em Oeiras, Portugal, caracterizou 50 raças de *H. vastatrix* no mundo (VÁRZEA; MARQUES, 2005; TALHINHAS et al., 2017). No Brasil, em *Coffea arabica*, foram identificadas 15 raças fisiológicas do fungo (I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXII, XXIII, XXIV, XXV, XXXIII, XXXVII) (CHAVES et al., 1970; CARDOSO et al., 1986, 1988; FAZUOLI et al., 2005; ZAMBOLIM et al., 2005; CABRAL et al., 2009; CAPUCHO et al., 2012), sendo que a raça II ocorre com maior frequência (ZAMBOLIM et al., 2005). O desafio dos melhoristas na obtenção de cultivares com

resistência durável é grande, uma vez que existem raças que apresentam um amplo espectro de virulência, (raça XXXVII) (CABRAL et al., 2009), e uma alta diversidade genética das populações do patógeno (NUNES et al., 2009; MAIA et al., 2013).

Estudos demonstram que a resistência à ferrugem do cafeeiro é determinada, por pelo menos, nove genes denominados S_H (S_{H1} a S_{H9}) (BETTENCOURT; RODRIGUES JÚNIOR, 1988; CAPUCHO et al., 2012). Em *C. arabica* foram identificados quatro genes de efeitos dominantes: S_{H1} , S_{H2} , S_{H4} e S_{H5} (BETTENCOURT; NORONHA-WAGNER, 1971), enquanto em *C. canephora* estão presentes os genes S_{H6} , S_{H7} , S_{H8} e S_{H9} (BETTENCOURT; NORONHA; LOPES, 1980). Também se tem o gene S_{H3} , oriundo da introgressão de *C. liberica* em *C. arabica*, que tem tido bons resultados quanto a duração da sua resistência, sendo assim muito importante nos programas de melhoramento. Além destes genes citados acima, admite-se haver outros que ainda não foram identificados.

2.5 Ações enzimáticas na indução de resistência

As plantas têm a capacidade de identificar e desenvolver mecanismos de defesas sofisticados quando reconhecem uma infecção de agentes patogênicos (STASKAWICZ, 2001). Tais mecanismos atuam formando barreiras físicas e químicas e são constitutivos das próprias plantas, já outros são induzidos somente após o reconhecimento do ataque do patógeno, ativando assim a expressão de genes que codificarão proteínas relacionadas ao mecanismo de defesa (DIXON; LAMB, 1990).

Os mecanismos de defesa chamados de constitutivos ou pré-formados são conhecidos pela formação de estruturas como cutícula, cera, tricomas, parede celular espessa, bem como substâncias químicas, como os fenóis, alcaloides, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, fototoxinas, inibidores proteicos e enzimas hidrolíticas (PASCHOALATI; LEITE, 1995).

De outra forma, os mecanismos de resistência induzidos ou pós-formados, são caracterizados pela formação de papila, halos, lignificação, camada de cortiça, formação de tiloses, deposição de goma, além da produção de compostos como as fitoalexinas, que são proteínas ligadas à patogênese, também conhecidas como “PR proteínas” (PASCHOALATI; LEITE, 1995).

A proteção obtida quando esses mecanismos são ativados pode ser local ou sistêmica, e depende do intervalo de tempo entre o contato das plantas com o agente indutor e a inoculação

dos patógenos. A duração da resistência pode ser por poucos dias, ou até todo o ciclo de vida da planta (PASCHOALATI; LEITE, 1995).

A resistência induzida é subdividida em duas categorias principais: a resistência sistêmica adquirida (STICHER; MAUCH-MANI; METRAUX, 1997) e a resistência sistêmica induzida (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). Na resistência sistêmica adquirida, geralmente a resistência formada é efetiva contra um amplo espectro de patógenos e está associada com a produção das proteínas ligadas à patogênese ou PR proteínas.

Dentre as PR proteínas, podemos destacar a atuação das quitinases e β -1,3-glucanases (glucanase). As quitinases agem hidrolisando eficientemente a quitina, que é o principal componente da parede celular de muitos fungos, enquanto as β -1,3-glucanases são enzimas que hidrolisam polímeros de β -1,3-glucana, polímeros que juntamente com a quitina, são os principais componentes que conferem resistência à parede celular dos fungos (CORNELISSEN; MELCHERS, 1993).

Na indução de resistência, as quitinases e glucanases agirão de forma conjunta. Uma pequena quantidade de glucanases é sintetizada e secretada para o espaço intercelular das folhas, assim, quando é iniciado o crescimento fúngico nesse espaço, esta enzima inicia a degradação da parede celular do fungo, e os fragmentos liberados pela ação da enzima funcionarão como eliciadores, induzindo a síntese de quitinases e glucanases, que serão acumuladas nos vacúolos celulares. Desta forma, quando o patógeno penetra o ambiente celular, os vacúolos se rompem, liberando grande quantidade dessas enzimas e reprimem a ação do fungo (MAUCH; STAEHELIN, 1989).

Podemos destacar também alguns compostos fenólicos que trabalham no mecanismo de defesa das plantas. Essas substâncias abrangem um extenso grupo heterogêneo que contém em sua estrutura um grupo fenol, constituído por um anel aromático e pelo menos uma hidroxila funcional (TAIZ; ZEIGER, 2013). Geralmente, assim como as quitinases e glucanases, esses compostos estão localizados no vacúolo das células vegetais e podem já estar presentes ou serem formados posteriormente em resposta à entrada de patógenos. Além disso, são conhecidos por sua ação fungitóxica, antibacteriana e antivirótica. Dentre os diversos grupos de fenóis ocorre variação do efeito inibitório de germinação de esporos, crescimento micelial e produção e atividade das enzimas dos patógenos (STANGARLIN; KUHN., 2011).

Temos também a lignina, que por sua vez, é uma macromolécula fenólica que consiste em um polímero de grupos fenilpropanoides altamente ramificados. Ela, além de ter funções estruturais na planta, também desempenha funções protetoras formando uma barreira física e limitando a ação do patógeno (BOTELHO et al., 2005). Esta lignificação tem o intuito de

reforçar a parede celular, ou envolver as estruturas do patógeno, impedindo que ele venha a adentrar o citoplasma, dessa maneira, paralisando a infecção. Entretanto, a quantidade de lignina produzida pode variar entre hospedeiros, determinando se estes apresentam resistência ou suscetibilidade à doença, quando relacionado aos aspectos fisiológicos (STANGARLIN; KUHN, 2011; PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise fenotípica

3.1.1 Plantio das mudas de cafeeiro em casa de vegetação

Em setembro de 2019 foram plantadas em vasos 26 progênies F₄ de cafeeiro, oriundas do segundo ciclo de seleção recorrente, juntamente com cinco testemunhas (Catuaí Vermelho IAC 99, Ametista, MGS Paraíso 2, Topázio MG 1190 e Catiguá MG2) em três repetições. Em cada vaso de 8 litros foram realizadas três covas e foram plantadas três sementes, obtendo-se assim nove plantas por vaso, que posteriormente foram desbastadas para se obter ao final, três plantas por vaso.

O substrato utilizado foi a mistura padrão de esterco, terra, adubo químico e calcário, nas proporções de 3:1 (terra e esterco), e para cada metro cúbico de mistura adicionou-se 5kg de superfosfato simples e 1kg de cloreto de potássio.

3.1.2 Inoculação do fungo *Hemileia vastatrix*

A inoculação foi realizada no dia 15 de abril de 2020 às 17:30, a partir de esporos do fungo *Hemileia vastatrix*, coletados nas lavouras de café da Universidade Federal de Lavras. Os esporos foram coletados seguindo a metodologia de Zambolin e Chaves (1970), que consiste na raspagem dos esporos das folhas infectadas, utilizando cápsula de medicamento, e posteriormente armazenamento em ambiente controlado, sem incidência de luz, a 21°C.

Os esporos foram colocados em uma solução de ágar + 100 mL de água e adicionado tween20 para que os esporos se espalhem de maneira mais uniforme na solução. Para aferir se a solução de esporos tinha concentração de pelo menos $2,5 \times 10^5$ conídios/mL, realizou-se a contagem do número de esporos presentes. A solução foi despejada em um borrifador, o qual foi utilizado para a inoculação do fungo.

No momento da inoculação, as plantas tinham de dois a três pares de folhas verdadeiras, completamente expandidas. As mudas tiveram suas folhas borrifadas na face abaxial até atingirem ponto de escorrimento, visando uma infecção mais fácil pelo fungo. Após a inoculação, as plantas foram acondicionadas em um ambiente escuro por aproximadamente 72 horas, e após este tempo, foram colocadas sob fotoperíodo de 12 horas.

3.1.3 Avaliação da severidade da doença e análise dos dados

As avaliações de severidade da doença tiveram início no dia 28 de maio de 2020, dois dias após os primeiros sinais de esporulação e infecção das plantas. Foram realizadas cinco avaliações, sendo uma por semana, e estas foram feitas por três avaliadores. Para tais avaliações, utilizou-se um par de folhas do terço superior da planta, o qual foi identificado, a fim de sempre avaliarem as mesmas folhas. Utilizou-se a escala diagramática proposta por Cunha (2001), atribuindo-se notas de zero a seis de acordo com a área foliar infectada, sendo zero para folhas sem nenhuma lesão esporulando e seis para folhas com mais de 50% da área lesionada (Figura 1).

A partir das notas atribuídas pelos avaliadores, foi feito o cálculo para se atribuir a porcentagem de área foliar infectada pela doença e em seguida calculada a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD), calculada de acordo com Shaner e Finney (1977):

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

em que:

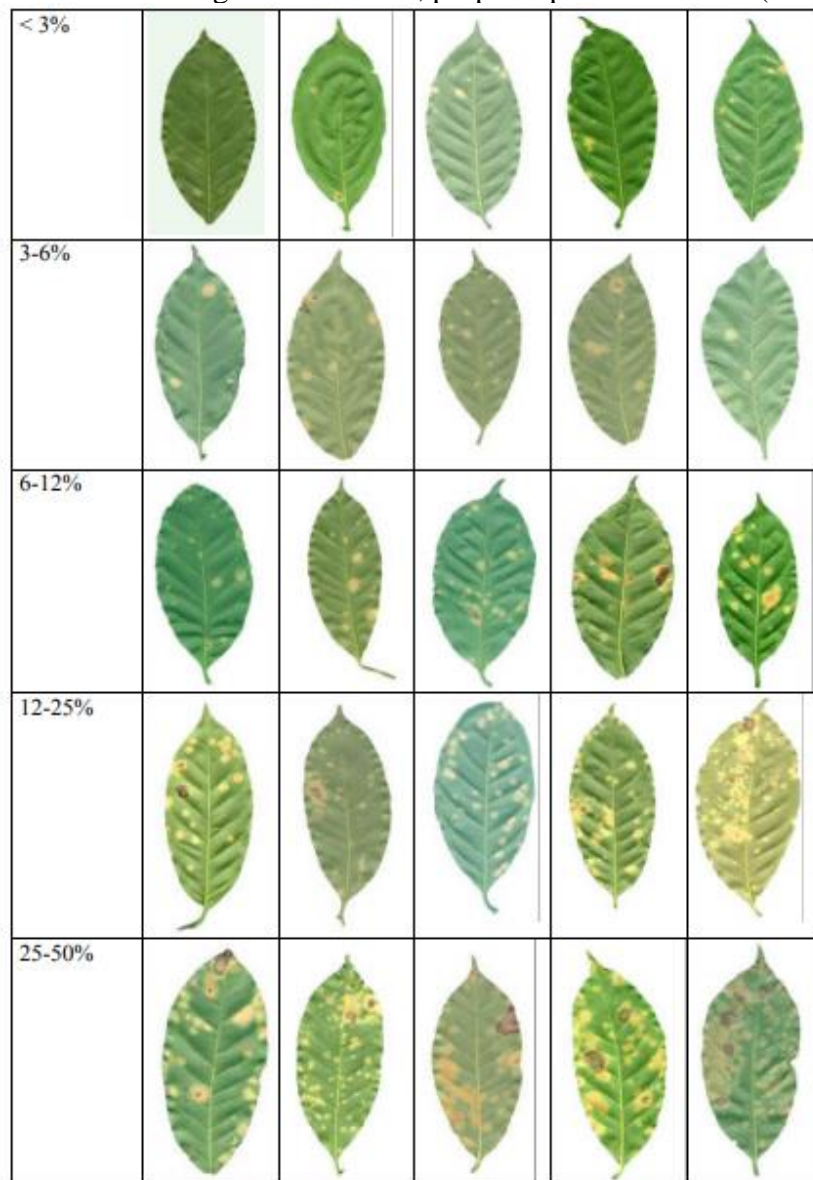
y_i é a proporção da doença na i -ésima observação;

t_i é o tempo, em dias, na i -ésima observação;

n é o número total de observações.

Para a realização das análises de variância de severidade da doença, utilizou-se os dados da AACPD. E os genótipos foram comparados pelo teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Figura 1 - Escala diagramática para avaliação de severidade da ferrugem do cafeeiro, proposta por Cunha et al. (2001).



Fonte: Cunha et al. (2001).

3.2 Análises bioquímicas

Para a realização das análises bioquímicas utilizou-se o experimento instalado para a avaliação da severidade da ferrugem, entretanto essas análises foram realizadas apenas em 17 genótipos, e para duas testemunhas, uma suscetível (Catuaí Vermelho IAC 99) e uma resistente (MGS Paraíso 2).

3.2.1 Quitinase e β -1,3-glucanase

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

Os tecidos vegetais foliares foram coletados em seis tempos diferentes, 24, 48, 72, 120, 192 e 216 horas após a inoculação tanto de genótipos inoculados com o fungo *H. vastatrix*, como não inoculados (controle). Essas amostras foram trituradas em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, aproximadamente 200 mg desse pó foi depositado em um eppendorf®, ao qual se adicionou o tampão acetato de sódio 50mM pH 5,2 e homogeneizou-se por 10 segundos, em agitação. Após esse processo, a suspensão foi centrifugada a 12.000 g. por 15 minutos (0-4°C), sendo o sobrenadante utilizado para quantificação das enzimas.

3.2.1.1 Quitinase

A atividade enzimática quitinase foi determinada pela adição de 100 μ L do extrato enzimático, ajustado para 320 μ L de uma solução com acetato de sódio 50mM pH 5,2 e 70 μ L de CM-Chitin-RBV (2mg mL⁻¹; um substrato específico para quitinase fornecido por LOEWE Biochemica GmbH), em microplacas de 96 cavidades, com volume de 350 μ L por cavidade. Após incubação a 35°C, por 80 minutos, as amostras foram acidificadas com 50 μ L de HCl 0,5N, resfriadas em banho de gelo por 10 minutos e centrifugadas a 1.450g por 10 minutos, em uma temperatura de 4°C. Uma alíquota de 200 μ L do sobrenadante de cada amostra foi transferida para nova microplaca, para leitura em 492nm, no espectrofotômetro. A atividade quitinase foi expressa pela variação de 1 OD₄₉₂ por miligrama de proteína solúvel por minuto (Δ OD_{492nm} mgP⁻¹ min⁻¹).

3.2.1.2 β -1,3-glucanase

A atividade da enzima β -1,3-glucanase foi determinada de modo análogo ao da quitinase, apenas com substituição do substrato para CM-Curdlan-RBB (4 mg mL⁻¹; Loewe Biochemica GmbH). Para promover ação hidrolítica de β -1,3-glucanase, foi adotado tempo de incubação, a 35°C por 80 minutos. As amostras foram submetidas à leitura fotométrica em filtro

de 620 nm no espectrofotômetro. A atividade da enzima foi expressa pela variação de 1 OD₆₂₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{620\text{nm}} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

3.2.2 Compostos fenólicos solúveis totais e lignina solúvel

A quantificação da concentração de compostos fenólicos solúveis totais (fenol) e lignina solúvel (lignina) nas folhas inoculadas e nas controle com o fungo *Hemileia vastatrix*, foram realizadas no laboratório do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras - UFLA. Foram coletadas as folhas dos tratamentos 240 horas após a inoculação dos genótipos (inoculados com esporos da ferrugem alaranjada) e dos controles. Essas folhas foram maceradas em solução tampão e nitrogênio líquido, e armazenadas em tubos eppendorfs® de 2 mL, à -80°C. Para ambas as avaliações os genótipos foram liofilizados por 48 horas e depois pesados em amostras de 30 mg de tecido, os quais foram colocados em tubos de 2 mL. Adicionou-se 1,5 mL de metanol 80%, cobriu-se o tubo com papel alumínio e as amostras foram agitadas em “shaker” por aproximadamente 15 horas, à 100 rpm e à temperatura ambiente. Após esse tempo, foi coletado o sobrenadante para análise de compostos fenólicos solúveis totais e o resíduo para análise de lignina solúvel.

3.2.2.1 Quantificação dos compostos fenólicos solúveis totais

As amostras foram centrifugadas à 25°C, em 14.000 rpm, durante dez minutos. Coletou-se o sobrenadante, transferindo-o para um tubo de 1,5 mL e adicionou 150 uL de extrato metanoico + 150 mL de Folin-Ciocalteu 0,25 N, após cinco minutos, foi adicionado 150 uL de Na₂CO₃ 1 M, homogeneizou as amostras manualmente e deixou-as em repouso durante dez minutos. Após esse período, acrescentou-se 1 mL de água destilada, permanecendo por uma hora em repouso antes de ser avaliado no teste Elisa, em que foi realizado uma leitura a 725 nm de absorbância, seguindo a metodologia de Spanos e Wrolstad (1990).

3.2.2.2 Quantificação de lignina solúvel

Foi adicionada à amostra 1,5 mL de metanol 80% e centrifugou-se por sete minutos à 14.000 rpm. Posteriormente, foi descartado o sobrenadante e os tubos com o resíduo foram levados à estufa à 45°C, onde permaneceu durante 15 horas. Após esse período, adicionou 1,5

mL de ácido tioglicólico + HCl 2 M, em uma proporção de 1:10, deixou-se as amostras em banho maria por quatro horas, e depois centrifugou novamente. O sobrenadante foi descartado e adicionou à amostra 1,5 mL de água destilada, passou pela centrífuga por mais dez minutos, descartou novamente o sobrenadante e adicionou 1,5 mL de NaOH 0,5 M, e depois as amostras foram agitadas em “shaker” por aproximadamente 15 horas. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo, adicionando 200 uL de HCl concentrado e depois levado à geladeira por quatro horas. Centrifugou-se novamente e em um béquer foi descartado o sobrenadante e adicionado 2 mL de NaOH 0,5 M. A solução foi levada para análise no teste Elisa, em que foi realizado uma leitura a 280 nm de absorbância, seguindo a metodologia de Doster e Bostock (1988).

3.2.3. Análise dos dados bioquímicos

Para as análises enzimáticas foram plotadas curvas de progresso da atividade das enzimas por tempo de coleta utilizando o erro padrão da média antes e após a inoculação.

Para os teores de lignina e fenóis solúveis totais foram utilizadas as médias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Severidade da ferrugem alaranjada do cafeeiro

Durante a condução do trabalho, dois dias após o aparecimento dos primeiros sinais de esporulação na testemunha suscetível, foi iniciado as avaliações da ferrugem alaranjada. Após as avaliações, calculou-se a AACPD com as médias das notas dadas pelos avaliadores. De acordo com a análise de variância pode-se verificar que ocorreu variabilidade genética, uma vez que o p-valor igual a 0,0 ($p < 0,05$) e F calculado (5,26) maior que F tabelado (3,32), isso se deve ao fato de terem sido introduzidos por meio de cruzamentos, alguns genótipos sabidamente resistentes à essa população no início do programa (TABELA 1). Como pode-se observar por meio do agrupamento de Scott-Knott alguns genótipos se destacam com a menor AACPD quando comparados com a AACPD das testemunhas suscetíveis Catuaí Vermelho IAC 99 e Topázio MG 1190, as quais ficaram no grupo “C e B” respectivamente, enquanto as testemunhas resistentes Ametista, MGS Paraíso 2 e Catiguá MG 2 ficaram todas no grupo “A” (TABELA 2).

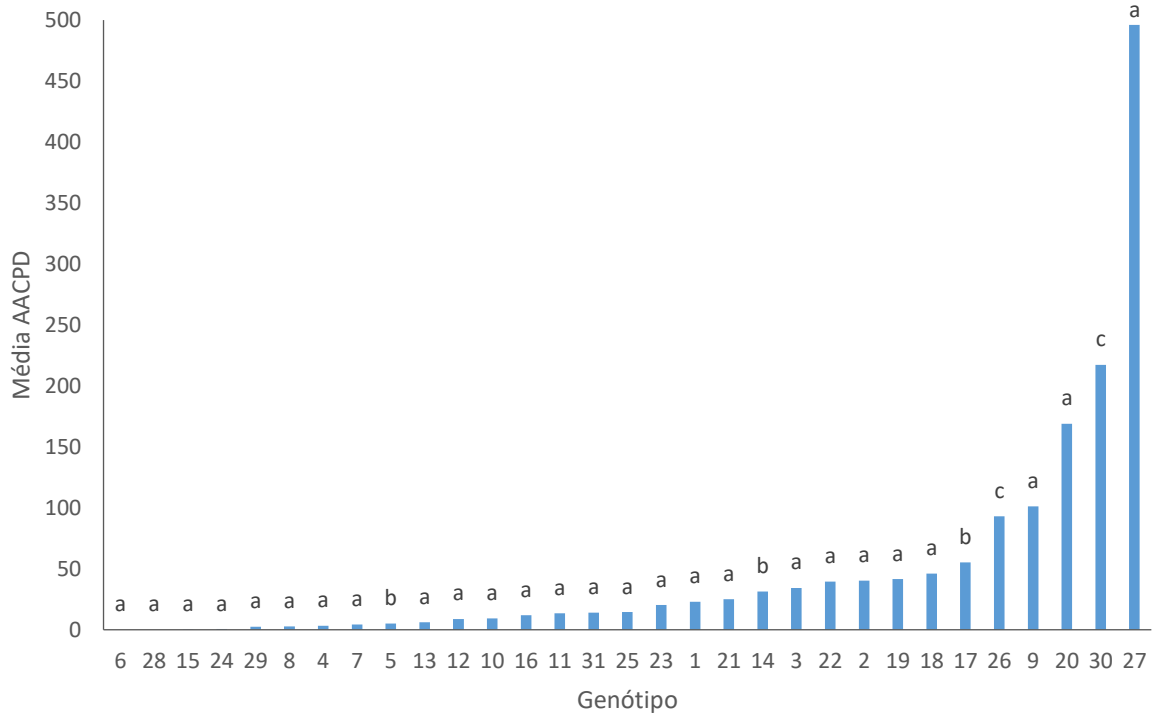
As progênies que se destacaram foram: 6, 15, 24, 8, 4, 7, 5, 13, 12, 10, 16, 11, 25, 23, 1, 21, 14, 3, 22, 2, 19, 18 e 17, com a AACPD variando de 0,00 (6) à 55,18 (17) (TABELA 2). Algumas progênies apresentaram AACPD bem baixa, próximo ou igual a zero, sendo elas: 6 (0), 15 (0,22), 24 (0,54), 8 (2,74) e 4 (3,28), que apresentaram comportamento próximo no ranqueamento em relação às testemunhas resistentes, Ametista (0) e MGS Paraíso 2 (2,52), mostrando essas progênies terem uma boa resistência à ferrugem alaranjada do cafeeiro (TABELA 2 E FIGURA 2).

Tabela 1 - Resumo da análise de variância da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) ferrugem alaranjada de genótipos (progênies F₄ e testemunhas) de cafeeiro.

FV	GL	SQ	QM	F	Probabilidade (%)
Blocos	2	0,756692	0,378346		
Genótipos	30	1199,002	39,96675	5,2589	0**
Resíduo	60	455,9896	7,599826		
Total	92	1655,749			

Fonte: Do autor (2022).

Figura 2 – Gráfico das médias da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) ferrugem alaranjada de genótipos (progênes F₄ e testemunhas) de cafeeiro.



Fonte: Do autor (2022).

O resultado observado já era esperado, uma vez que, como comentado anteriormente, na recombinação das progênes, no programa de seleção recorrente, foram inseridos genótipos resistentes à ferrugem alaranjada. Observa-se que as progênes 6, 15 e 24 se destacaram com a AACPD muito próxima a zero, juntamente com a testemunha resistente Ametista (FIGURA 2), contrapondo-se o resultado da testemunha suscetível Catuaí Vermelho IAC 99, que apresentou AACPD próxima à 500. Tal informação é de extrema importância para o programa de seleção recorrente da UFLA/EPAMIG, pois indica que existem progênes promissoras para esse caráter, as quais poderão ser utilizadas para a obtenção do próximo ciclo, pois elas também apresentam porte, produtividade e arquitetura de planta requeridas pelos agricultores. Cultivares que apresentem resistência à ferrugem são de suma importância para o cafeicultor, uma vez que muitas das cultivares registradas e utilizadas já tiveram a sua resistência quebrada devido à pressão de infecção e surgimento de novas raças do patógeno (VÁRZEA; MARQUES, 2002).

4.2 Quitinase e β -1,3-glucanase

Para o estudo das enzimas quitinase e β -1,3-glucanases (glucanase) foi necessário definir um ponto de referência, para que se pudesse comparar a atividade das enzimas em plantas inoculadas e não inoculadas (controle) com esporos de ferrugem alaranjada (*Hemileia vastatrix*). Para isso foi definido como referência a data da inoculação das plantas não-controle.

A correlação entre as enzimas quitinase e glucanase, quando as plantas foram inoculadas com esporos de ferrugem alaranjada nas controle (0,70), foram de alta magnitude, 0,86 e 0,70, respectivamente. Como relatado na literatura, as enzimas quitinases e glucanases estão associadas a indução de resistência à patógenos (MAUCH; STAEHELIN, 1989) e elas podem atuar isoladamente ou em sinergismo (KOMBRINK; SOMSSICH, 1997).

Para a enzima glucanase, observou-se que quando não inoculadas, a testemunha suscetível (TS) e a resistente (TR) apresentaram pico da enzima as 120 horas, com valores 55,58 e 38,16 $\Delta_{620\text{nm}} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectivamente, evidenciando que há maior ativação da TS nessa condição (FIGURAS 3 e 7). Após a inoculação, verificou-se que elas continuaram a apresentar pico de atividade aos 120 dias, contudo verificou-se um comportamento inverso das cultivares, sendo que a TS apresentou menor atividade enzimática, 38,64 $\Delta_{620\text{nm}} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$ quando comparada a TR que apresentou uma maior atividade da enzima, 55,75 $\Delta_{620\text{nm}} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (FIGURAS 4 e 8). Como já descrito na literatura, embora a enzima glucanase esteja envolvida na resistência de plantas, ela não é necessariamente identificada por sua ação anti-patogênica, contudo, sabe-se que ocorre o acúmulo dela em plantas resistentes submetidas a algum patógeno (BELETE; BOYRAZ, 2017; PERROT, PAULY, RAMÍREZ, 2022; VAN LOON, 1997). Este fato explica o resultado encontrado neste trabalho, em que ocorreu aumento de 68% na ativação enzimática na testemunha resistente quando inoculada com esporos da ferrugem alaranjada.

Figura 3 - Atividade da enzima β -1,3-glucanase em mudas de cafeeiro resistentes à *Hemileia vastatrix* após 24, 48, 72, 120, 192 e 216 horas depois da coleta das folhas não inoculadas.

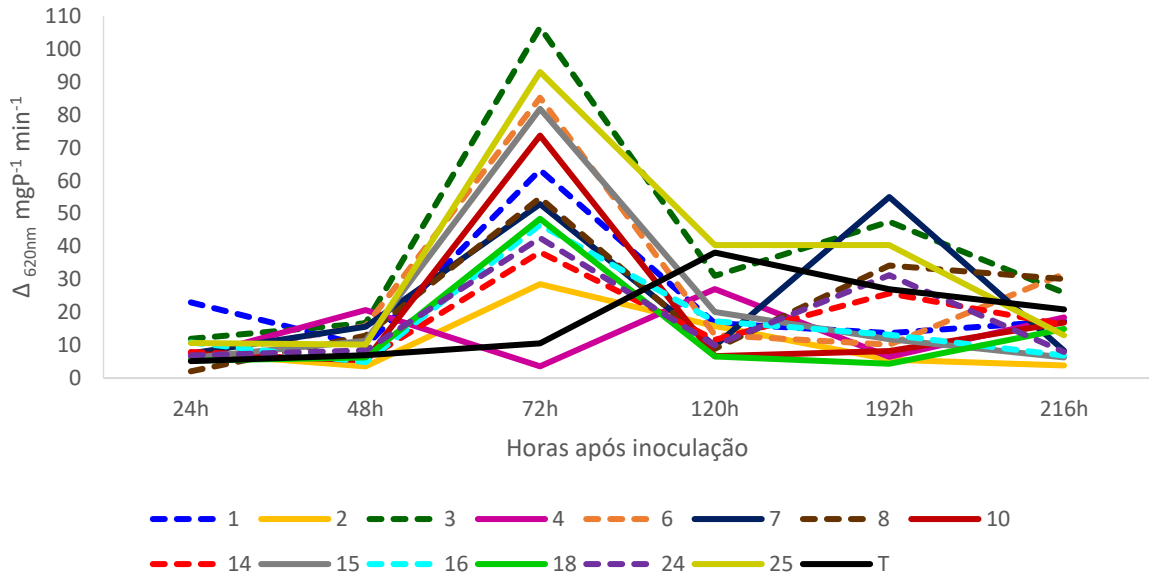
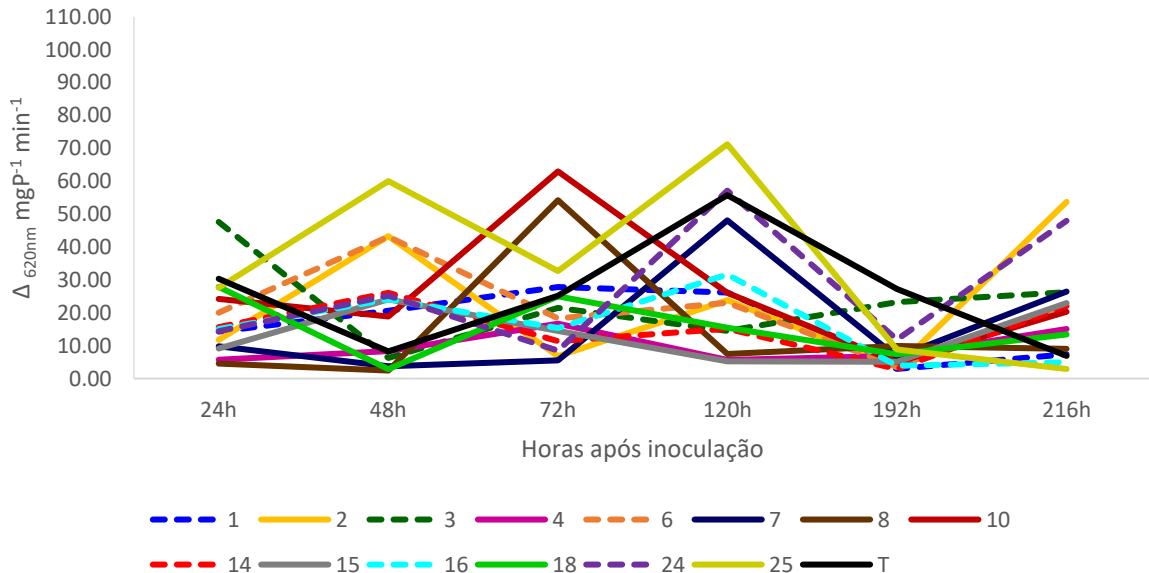


Figura 4 - Atividade da enzima β -1,3-glucanase em mudas de cafeeiro resistentes à *Hemileia vastatrix* após 24, 48, 72, 120, 192 e 216 horas depois da inoculação das folhas. TR é a testemunha resistente.



O pico máximo das progênies controle resistentes ocorre na maioria dos casos às 72h após a inoculação com uma queda às 120h, enquanto para a testemunha resistente não

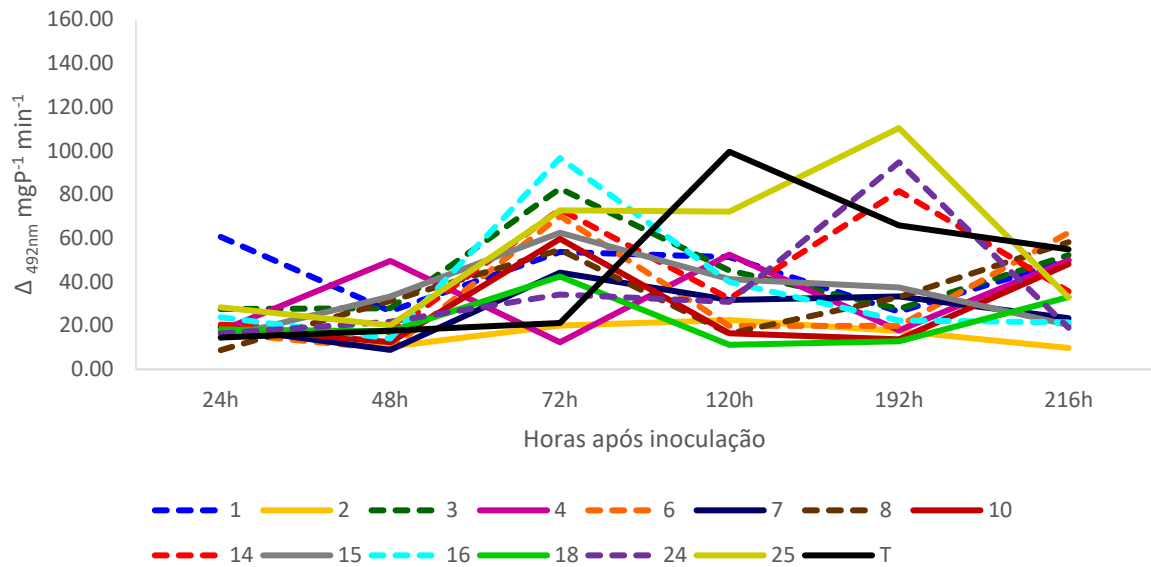
inoculada, o pico só ocorre às 120h, ocorrendo queda posteriormente (FIGURA 3). Um fato interessante é que as progênes 4 e 6 são provenientes do mesmo cruzamento e apresentam um comportamento divergente, sendo que às 72h a progênie 6 apresenta maior ativação enzimática ($85,23 \Delta_{620\text{nm}} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$) e a 4 a menor ativação ($3,58 \Delta_{620\text{nm}} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Isto pode estar ocorrendo, uma vez que as progênes estudadas provêm de uma geração F₄, em que não há ainda, completa homozigose. Cabe ressaltar, que o comportamento da progênie 4 é muito similar ao que acontece com a TR, contrapondo-se às demais progênes testadas.

Quando se observa as mesmas cultivares resistentes, porém inoculadas, vê-se que o comportamento das progênes diverge bastante, contudo há um pico enzimático entre 48 ($60 \Delta_{620\text{nm}} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$) a 120h ($71,22 \Delta_{620\text{nm}} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$) e atividade mínima da enzima, na maioria dos casos, ocorre em 192h ($2,89 \Delta_{620\text{nm}} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$) após a inoculação (FIGURA 4).

Um fato que chama a atenção é que a progênie oito apresentou o mesmo comportamento entre 24 e 120h, na condição de inoculada e controle (FIGURAS 3 e 4). Enquanto, de modo geral, observa-se que quando inoculado as progênes apresentam ativação da enzima mais cedo que quando em controle.

Para a enzima quitinase, observa-se que, no geral, as resistentes inoculadas em controle possuem um padrão semelhante com começo de ativação enzimática às 48 horas e pico às 72 horas (FIGURA 5), com exceção das progênes um e quatro, que apresentaram ativação mais cedo e o pico entre 24h e 48h, respectivamente. Esse resultado foi similar ao que ocorreu com a glucanase (FIGURA 3), como também já comentado para a mesma, quando inoculadas, as progênes possuem uma resposta variável. Contudo, observa-se uma queda acentuada em 192 horas para a maioria das progênes em estudo, tanto inoculadas quanto em controle.

Figura 5 - Atividade da enzima quitinase em mudas de cafeeiro resistentes à *Hemileia vastatrix* nos tempos 24, 48, 72, 120, 192 e 216 (horas após a inoculação) das folhas não inoculadas.

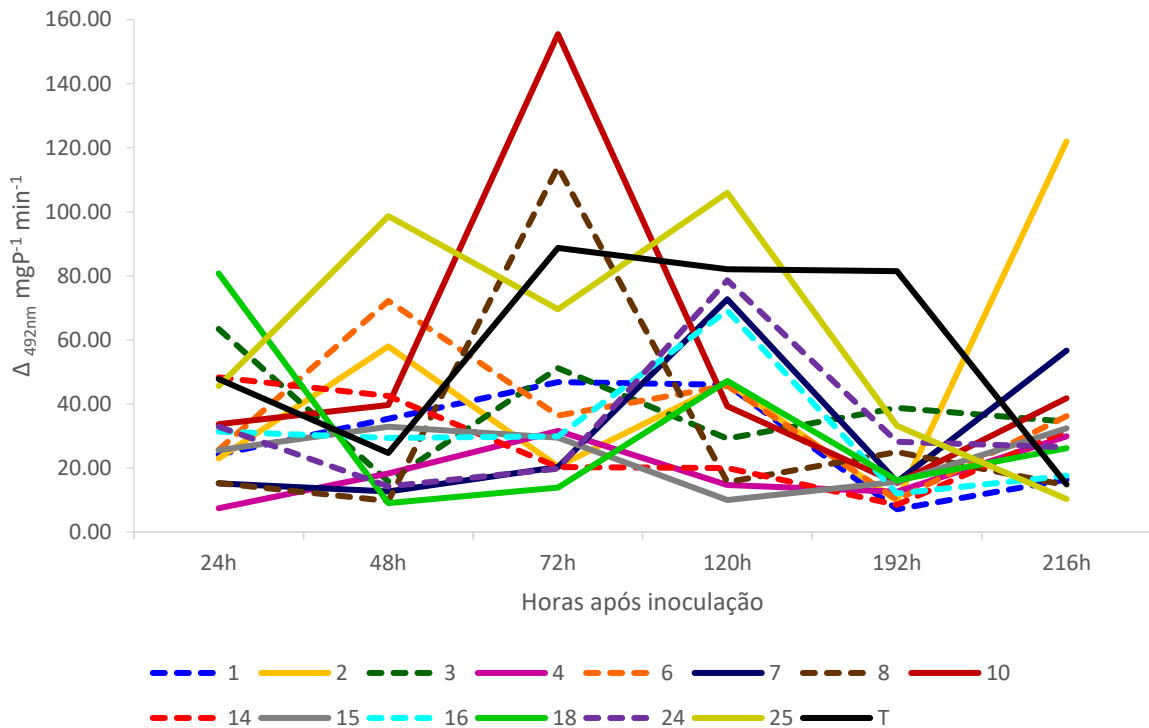


Fonte: Do autor (2022).

A TR inoculada tem aumento na ativação da quitinase às 72h ($88,71 \Delta_{492nm} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$) e mantém estável até 192h ($88,41 \Delta_{492nm} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$) (FIGURA 6). De modo geral, similar ao que ocorre com a glucanase, quando inoculadas, as progênies apresentam ativação enzimática mais cedo que quando não inoculado, sendo que sempre ocorre uma queda após o pico.

Um fato interessante ocorre com a progênie dois, em que quando não inoculada apresenta ativação menor do que $23 \Delta_{492nm} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$ em todos os tempos avaliados e após a inoculação apresenta oscilação entre os tempos, chegando em 216h com uma ativação enzimática acima de $120 \Delta_{492nm} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

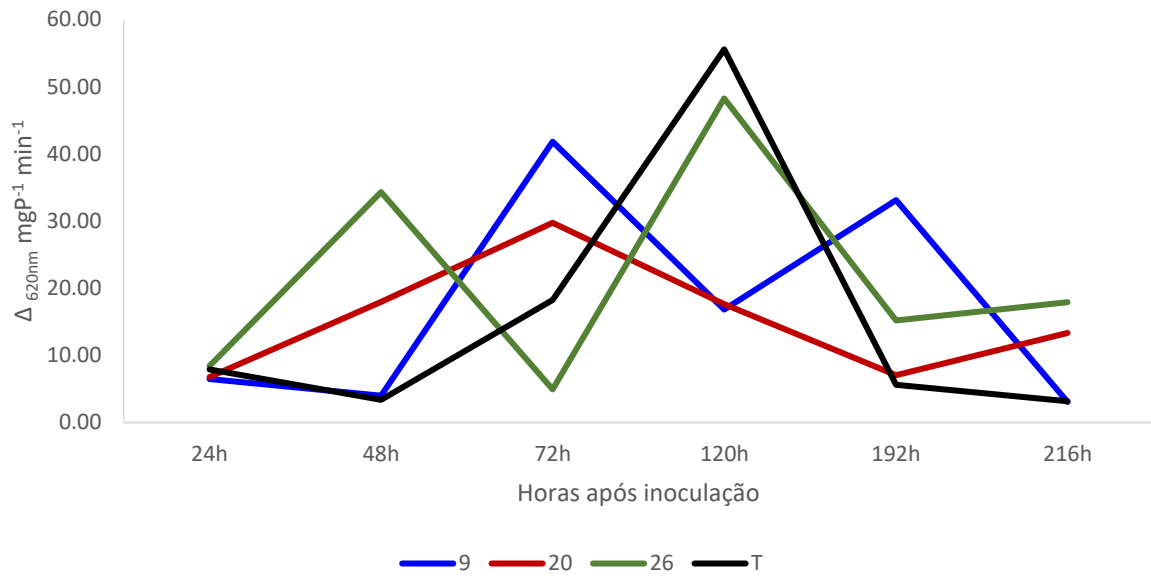
Figura 6 - Atividade da enzima quitinase em mudas de cafeeiro resistentes à *Hemileia vastatrix* nos tempos de 24, 48, 72, 120, 192 e 216 (horas após a inoculação) das folhas inoculadas.



Fonte: Do autor (2022).

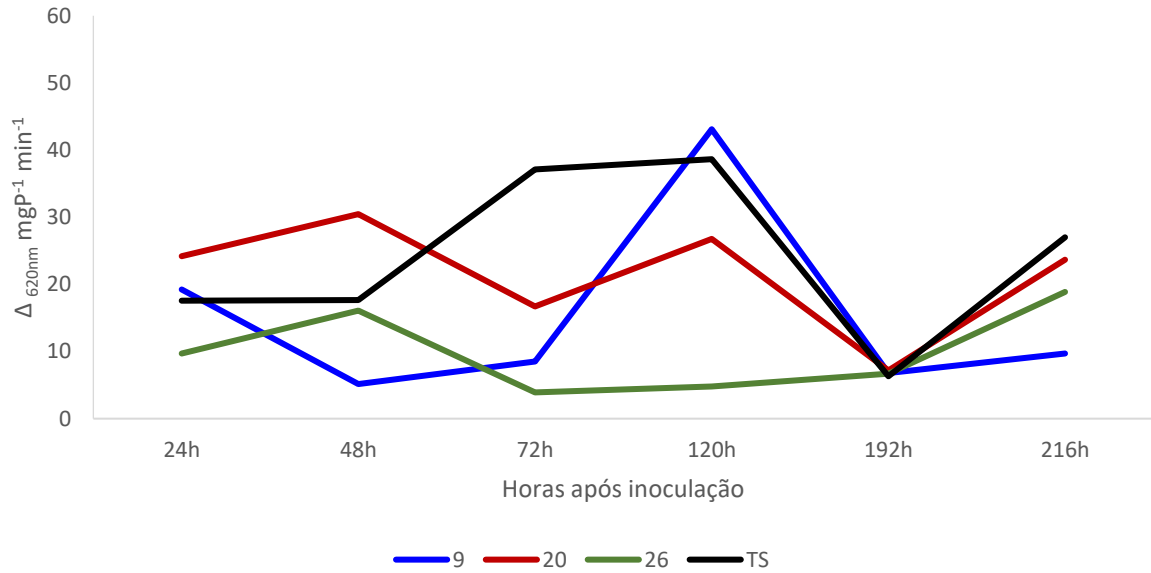
Ao se observar as progênies suscetíveis verifica-se que o comportamento delas é ainda mais divergente, sendo semelhante para ambas as enzimas (FIGURAS 7, 8, 9 e 10). Contudo é possível verificar que há uma tendência em reduzir a ativação da enzima no tempo de 192h, tanto nas progênies controle quanto nas inoculadas. De modo geral, nas controle o pico máximo de ativação ocorre entre 72 e 120 horas (FIGURAS 7 e 9) e após a inoculação este pico acontece em 120 horas (FIGURAS 8 e 10). Um ponto interessante é que a cultivar suscetível apresenta um pico elevado às 72h quando em controle (FIGURA 10), com posterior declínio acentuado para a quitinase, enquanto para a glucanase se observa, após esse pico, uma estabilização da enzima até as 120h antes do declínio (FIGURA 7).

Figura 7 - Atividade da enzima β -1,3-glucanase em mudas de cafeeiro suscetíveis à *Hemileia vastatrix* após 24, 48, 72, 120, 192 e 216 horas depois da coleta das folhas não inoculadas.



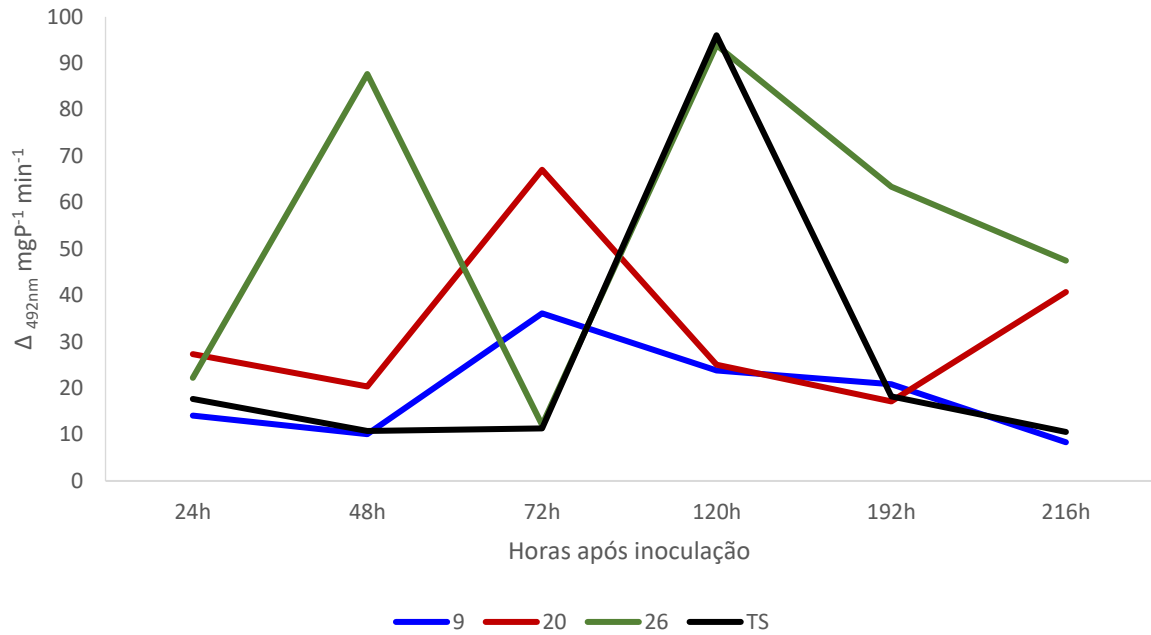
Fonte: Do autor (2022).

Figura 8 - Atividade da enzima β -1,3-glucanase em mudas de cafeeiro suscetíveis à *Hemileia vastatrix* após 24, 48, 72, 120, 192 e 216 horas depois da inoculação das folhas.



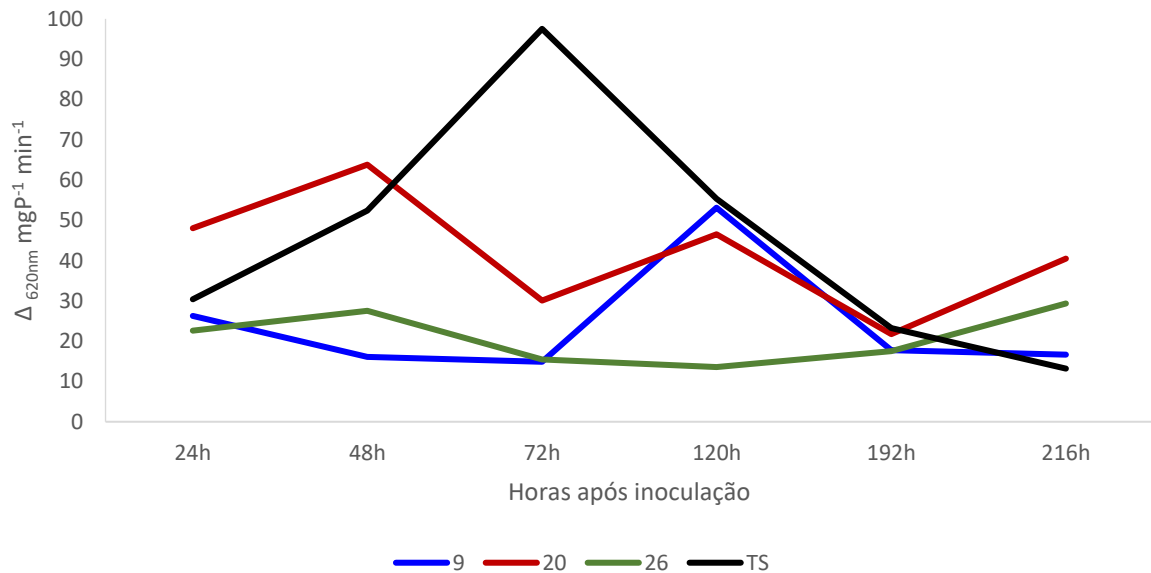
Fonte: Do autor (2022).

Figura 9 - Atividade da enzima quitinase em mudas de cafeeiro suscetíveis à *Hemileia vastatrix* após 24, 48, 72, 120, 192 e 216 horas depois da coleta das folhas não inoculadas.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 10 - Atividade da enzima β -1,3-glucanase em mudas de cafeeiro suscetíveis à *Hemileia vastatrix* após 24, 48, 72, 120, 192 e 216 horas depois da inoculação das folhas.



Fonte: Do autor (2022).

Não se pode constatar uma relação entre os valores máximos e mínimos da ativação enzimática nos diferentes tempos nas progênies suscetíveis ou resistentes. Como também não

foi possível encontrar um valor mínimo ou máximo que pudesse definir se uma progênie seria resistente ou suscetível. Ressalta-se que a atividade enzimática da glucanase é também induzida por diversos fatores bióticos e abióticos, tais como estresses, estiagem, salinidade, danos mecânicos metais pesados e reguladores de crescimento vegetal, hormônio, umidade, temperatura, pragas e doenças (PHUNJA; ZHANG, 1993; PERROT; PAULY; RAMÍREZ, 2022), o que pode estar dificultando detectar a relação das enzimas com a resistência à ferrugem, uma vez que ela está envolvida em diversos processos fisiológicos, não sendo exclusivos da defesa vegetal (ROMERO et al., 1998; LEUBNER-METZGER, MEINS, 2003; BALASUBRAMANIAN et al., 2012) . Um outro fato que pode estar contribuindo, é que as progênies estudadas se encontram na geração F₄, ou seja, ainda apresentam segregação.

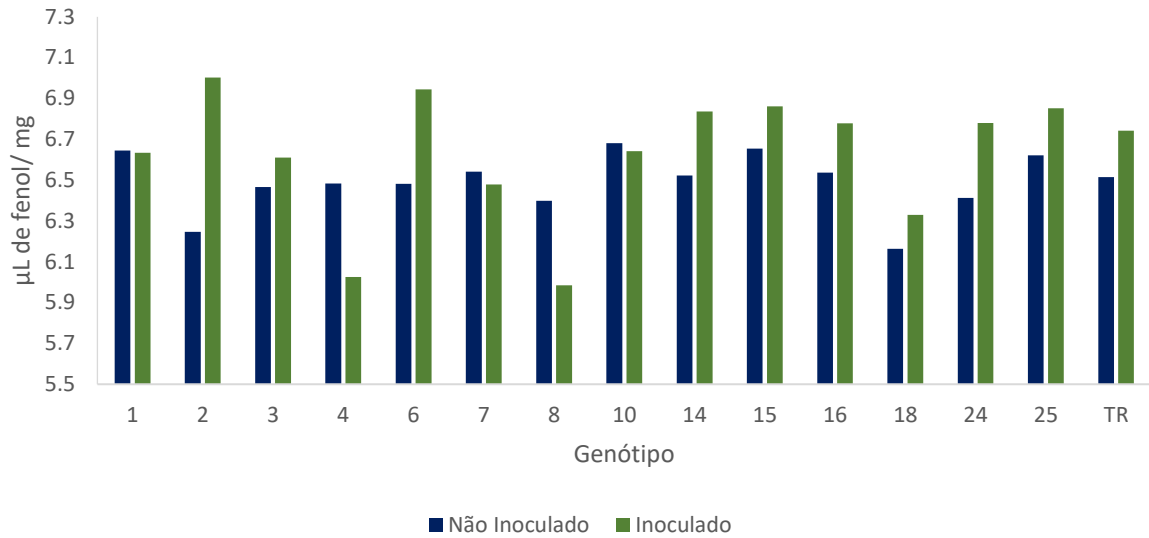
A maioria das pesquisas que avalia os mecanismos de defesa de plantas à patógenos, a partir da quantificação da atividade enzimática da quitinase e glucanase, utilizam com indutores da resistência produtos como fosfitos, reguladores de crescimento, fungicidas, ácidos, entre outros (CAVALCANTI et al., 2006; COSTA et al., 2018, ZHANG et al., 2016). Na literatura, são escassos os trabalhos que estudam a atividade dessas enzimas para verificar a resistência ou a suscetibilidade de cultivares a algum patógeno, sem o uso de nenhum produto como foi o caso deste trabalho.

4.3 Compostos fenólicos solúveis totais e lignina solúvel

Outros componentes para verificar a resistência ou suscetibilidade dos genótipos são os compostos fenólicos solúveis totais (fenol) e lignina solúvel (lignina). Os compostos fenólicos atuam na formação dos precursores da lignina, a qual atua na resposta de defesa das plantas por reforçar as paredes celulares contra invasão dos patógenos, além de ser tóxica para eles (RAES et al., 2013; NICHOLSON e HAMMERSCHMIDT, 1992; WEETE, 1980).

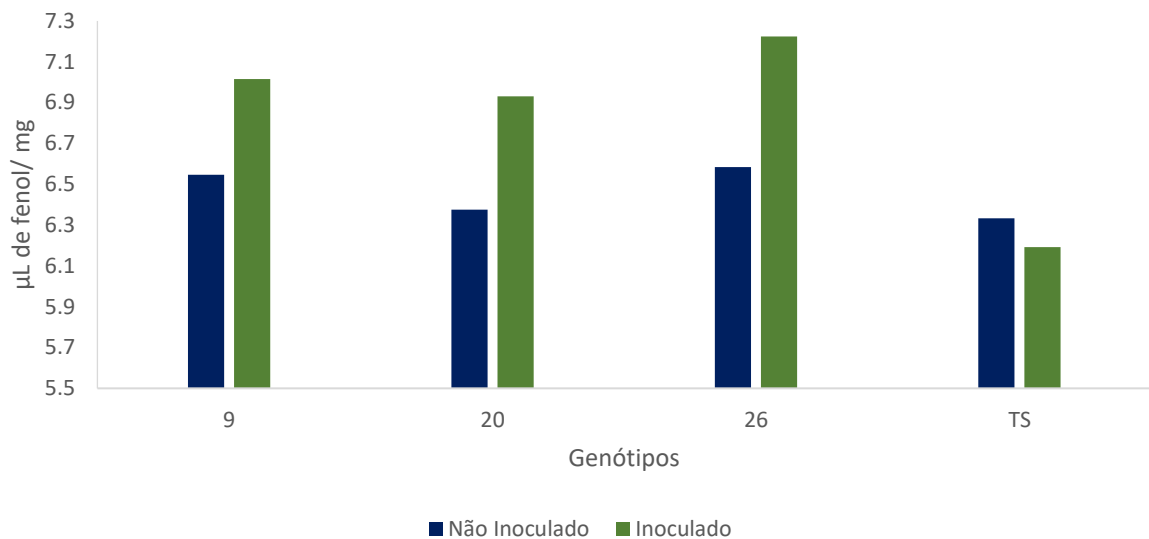
No caso do fenol, observou-se que, 71% dos genótipos resistentes à ferrugem avaliados, apresentaram maiores teores de fenol quando inoculados (FIGURA 11). Nos genótipos suscetíveis avaliados, apenas a testemunha suscetível apresentou teor de fenol menor quando inoculado em relação ao não inoculado (FIGURA 12). Esse resultado está de acordo com o encontrado na literatura que indica que há um aumento nos teores de fenol em plantas inoculadas resistentes, embora haja variação entre os genótipos (MELO; SHIMIZU; MAZZAFERA, 2006). Esses autores constataram que para o híbrido de Timor há um aumento nos teores de fenol, enquanto para a cultivar Mundo Novo (suscetível) esse aumento não ocorre.

Figura 11 - Quantificação de fenol em genótipos de cafeeiro resistentes com e sem inoculação de *Hemileia vastatrix*.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 12 - Quantificação de fenol em genótipos de cafeeiro suscetíveis com e sem inoculação de *Hemileia vastatrix*.



Fonte: Do autor (2022).

Constata-se que apesar dos genótipos 9, 20 e 26 terem sido considerados suscetíveis pelas análises de severidade, na quantificação do fenol, observa-se que esses genótipos, em comparação com as testemunhas suscetível e resistente, tenderiam a ser enquadrados como resistentes, devido ao alto teor de fenóis após a inoculação (FIGURA 12). Contrapondo ao que se encontra na literatura (que é possível diferenciar cafeeiros suscetíveis e resistentes à ferrugem

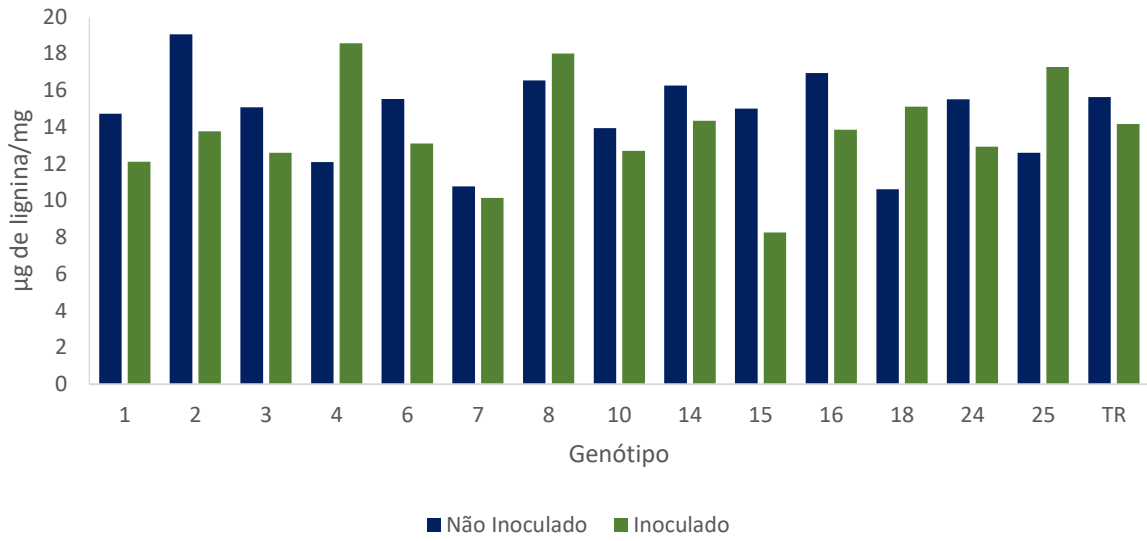
com base na concentração de fenol), ou seja, plantas suscetíveis apresentam menores teores (SILVA et al., 2020; MELO; SHIMIZU; MAZZAFERA, 2006). A testemunha suscetível utilizada valida a afirmativa de Silva et al, 2020, contrapondo-se aos genótipos avaliados.

Similarmente ao que já foi discutido para quitinases e glucanases, os teores de fenol podem ser alterados em função de fatores abióticos e bióticos (MELO; SHIMIZU; MAZZAFERA, 2006), o que justifica as progênies suscetíveis apresentarem comportamentos divergentes da TR.

Quanto à lignina, as testemunhas utilizadas, neste trabalho, nos mostram que o teor de lignina não apresenta relação com a suscetibilidade ou resistência à ferrugem, uma vez que o teor de lignina quando inoculado, foi sempre inferior ao teor de quando não inoculado. Porém, ressalta-se que em valores absolutos, a testemunha resistente possui maiores teores que a suscetível antes e depois da inoculação (FIGURAS 13 e 14).

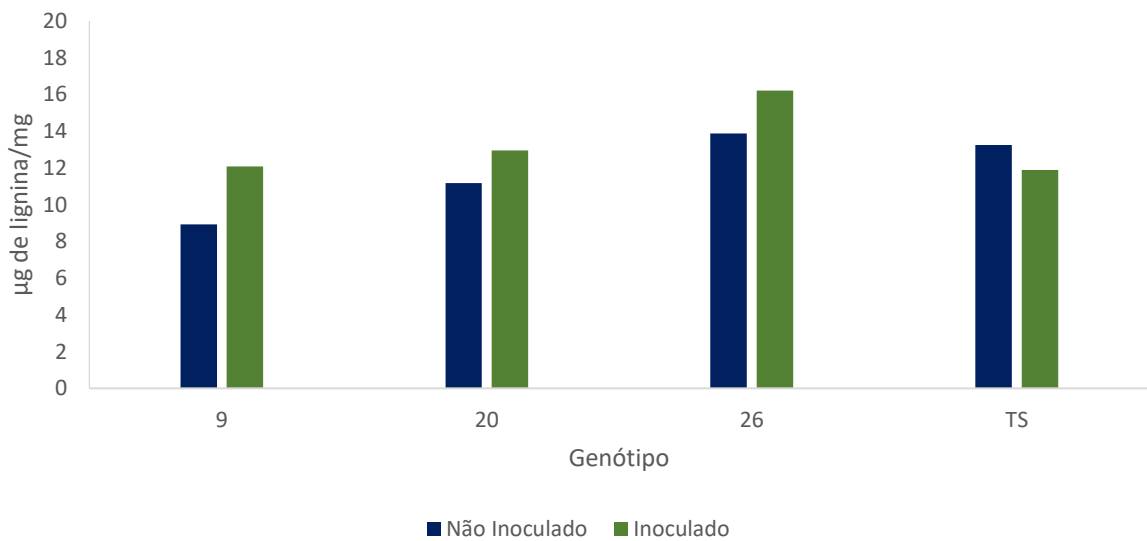
Mediante aos resultados, pode-se concluir que a produção de lignina solúvel pela planta pode não estar diretamente relacionada à presença do patógeno, uma vez que sua produção pode estar relacionada com diversos fatores como os aspectos fisiológicos da planta e a própria biossíntese da mesma, não restringindo essa produção pela presença ou ausência do patógeno. Alguns autores constataram uma relação entre o acúmulo de lignina e fungicidas alternativos para o combate da ferrugem alaranjada, assimilando o aumento do teor de lignina com o uso de óleos essenciais de citronela, o que proporcionou o controle parcial da ferrugem e ativou mecanismos de defesa das plantas (PEREIRA et al., 2012).

Figura 13 - Quantificação de lignina solúvel em genótipos de cafeeiro resistentes com e sem inoculação de *Hemileia vastatrix*.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 14 - Quantificação de lignina solúvel em genótipos de cafeeiro suscetíveis com e sem inoculação de *Hemileia vastatrix*.



Fonte: Do autor (2022).

5 CONCLUSÃO

Dentre as progênies F₄ avaliadas, pode-se verificar algumas resistentes à *Hemileia vastatrix* quando comparado com as testemunhas resistentes.

Não foi possível encontrar uma relação entre a resistência e/ou suscetibilidade à *Hemileia vastatrix* e a quantificação dos teores de compostos fenólicos solúveis totais, lignina solúvel, quitinase e β -1,3-glucanase nos genótipos avaliados.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. New York: Academic Press, 2005.
- BALASUBRAMANIAN, V. et al. Plant β -1.3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 11, p. 1983-1990, 2012.
- BERKELEY, M. J. **The Gardener's Chronicle and Agricultural Gazette**, London: Published for the proprietors, v. 45, 1869.
- BERTHAUD, J.; HARRIER, A. **Genetic resources of Coffea**, In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (eds) *Coffee*. London: Elsevier, 1988.
- BETTENCOURT, A. J.; NORONHA-WAGNER, M. Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk & Br. **Agronomia Lusitana**, v. 31, p. 285-292, 1971.
- BETTENCOURT, A. J.; NORONHA-WAGNER, M.; LOPES, J. Factor genético que condiciona a resistência do clone 1343/269 ("Híbrido de Timor) à *Hemileia vastatrix* Berk & Br. **Broteria Genética**, v. 1, n. 76, p. 53-58, 1980.
- BETTENCOURT, A. J.; RODRIGUES Jr., C. J. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other disease. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (eds) **Coffee**. London: Elsevier, v. 4, p. 199-234, 1988.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.
- CABRAL, P. G. C. et al. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 4, p. 129-130, 2009.
- CAPUCHO, A. S. et al. Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 7, p. 1-3, 2012.
- CARVALHO, A. et al. Breeding programmes. In: KUSHALAPPA, A. C.; ESKES, A. B. **Coffee rust: epidemiology, resistance and management**. Boca Raton, CRC Press, p. 293-335, 1989.
- CARVALHO, A. **Histórico do desenvolvimento do cultivo do café no Brasil**. Campinas: Documentos IAC, v. 34, 1993.
- CARVALHO, A. et al. Melhoramento do cafeeiro: IV Café Mundo Novo. **Bragantia**, v. 12, p. 97-129, 1952.
- CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M.; CUNHA, R. L. Manejo de doenças do cafeeiro. In: REIS, P. R.; CUNHA, R. L. (Ed.). **Café Arábica: do plantio à colheita**. Lavras: EPAMIG, 2010. p.693-747.

- CAVALCANTI, F. R. et al. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 12, p. 1721-1730, 2006.
- CHALFOUN, S. M.; ZAMBOLIM, L. Ferrugem do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, v. 11, n. 126, p. 42-46, 1985.
- CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of Coffee. In: CLIFFORF, M. N.; WILLSON, K. C. **Coffee: botany, biochemistry, and production of beans and beverage**. London: Croom Helm, 1985, p. 13-47.
- CHAVES, G. M. et al. A ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.). Revisão de literatura, com observações e comentários sobre a enfermidade no Brasil. Viçosa: **Seiva**. 30 ed., p. 1-75, 1970.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café**, Brasília, v. 8, safra 2021, n. 4, 2022.
- CORNELISSEN, B. J. C.; MELCHERS, L. S. Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. **Plant Physiology**, v. 101, n. 3, p. 709-712, 1993.
- CORREA JÚNIOR, A. **Estudos bioquímicos e fisiológicos da diferenciação de estruturas de infecção da ferrugem do café (*Hemileia vastatrix* Berk e Br.)**, 146 p., 1990. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1990.
- CORREA JUNIOR, A. **Estudos bioquímicos e fisiológicos da diferenciação de estruturas de infecção da ferrugem do café (*Hemileia vastatrix* Berk e Br.)**. 1990. Dissertação (Mestrado) Microbiologia Agrícola - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, University of São Paulo, Piracicaba, 1990.
- COSTA, B. H. G. et al. Potassium phosphites in the protection of common bean plants against anthracnose and biochemical defence responses. **Journal of Phytopathology**, v. 166, n. 2, p. 95-102, 2018.
- BELETE, T.; BOYRAZ, N. Critical review on apple scab (*Venturia inaequalis*) Biology, Epidemiology, Economic Importance, Management and Defense Mechanisms to the Causal Agent. **Journal Plant Physiology Pathology**, v. 5, n. 2, p. 1-11, 2017.
- CUNHA, R. L. et al. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para avaliar a severidade da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro. In: II Simpósio de Pesquisa dos cafés do Brasil. 2001.
- DIXON, R. A.; LAMB, C. J., Molecular communication in interactions between plant and microbial pathogens. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 339-367, 1990.
- DOSTER, M. A.; BOSTOCK, R. M. Quantification of lignina formation in almond bark in response to wounding and infection by *Phytophthora* species. **Physiology and Biochemistry**, v. 78, n. 4, p. 473-477, 1988.

GERALDI, I. O. **Por que realizar seleção recorrente?** In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 9, 2005, Lavras, Anais, Lavras: UFLA, 2005, 97 p.

GERALDI, I. O. Selección recorrente en el mejoramiento de plantas, In: GUIMARÃES, E, P. (Ed.). **Selección recorrente en arroz**. Cali: CIAT, p. 3-11, 1997.

KOMBRINK, E.; SOMSSICH, I. E. Pathogenesis-related proteins and plant defense. In: **Plant relationships**. Berlin: Springer Heidelberg, 1997. p.107-128.

KRUG, C. A.; MENDES, J. E. T.; CARVALHO, A. **Taxonomia de *Coffea arabica* L.: descrição das variedades e formas encontradas no Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1939, 57p.

LEUBNER-METZGER, G.; MEINS JR, F. Functions and regulation of plant β -(PR-2). In: DATTA, S. K.; MUTHUKRISHNAN, S. (Eds). **Pathogenesis-related proteins in plants**. Boca Raton: CRC Press LLC, p. 49-76, 1999.

MAPA. 2022. Disponível em:

https://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php?txt_ordem=&od_especie=2797&postado=1&acao=pesquisar. Acesso em 20/05/22.

MARIOTTO, P. R. et al. **Efeito da produção sobre a incidência da ferrugem no cafeeiro**. In: 2º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras. Rio de Janeiro. 1974.

MATIELLO, J. B. et al. **Cultura do café no Brasil: novo manual de recomendações**. Varginha: PROCAFÉ, 2005. 438p.

MATIELLO, J. B.; ALMEIDA, S. R. **A ferrugem do cafeeiro no Brasil e seu controle**. Varginha: PROCAFÉ, 2006, 98p.

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

MEDINA FILHO, H. P.; BORDIGNON; CARVALHO, C. H. S. Desenvolvimento de novas cultivares e Café Arabica. In: CARVALHO, C. H. S (Ed.). **Cultivares de café: origem, características e recomendações**, Brasília: EMBRAPA Café, 2008, p. 79-102.

MELO, G. A.; SHIMIZU M. M.; MAZZAFERA, P. Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. **Phytochemistry**, v. 67, p. 277-280, 2006.

MENDES, A. G. et al. História das primeiras cultivares de café planadas no Brasil. In: CARVALHO, C. H. S. (Orgs). **Cultivares de café: origem, características e recomendações**, Brasília: Embrapa Café, v. 1, p. 57-64, 2008.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, n. 1, p. 369-389, 1992.

NUNES C. C. Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. **Austral Plant Pathology**, v. 38, p. 445-452, 2009.

OLIVEIRA NETO, A. A. et al. **A Cultura do Café: análise dos custos de produção e da rentabilidade nos anos safra 2008 a 2017**. Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), Compêndio de estudos CONAB, v. 12, 2017.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de resistência, In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed) **Manual de Fitopatologia: princípios e Conceitos**, São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1, cap. 22, p. 417-454, 1995

PEREIRA, A. A. et al, Cultivares: origem e suas características, In: REIS, P. R.; CUNHA R. L. **Café Arábica do plantio a colheita**, Lavras: EPAMIG, v.1, p. 167-220, 2010.

PEREIRA, R. B. et al. Citronella essential oil in the control and activation of coffee plants defense response against rust and brown eye spot. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, p. 383-390, 2012.

PERROT, T.; PAULY, M.; RAMÍREZ, V. Emerging Roles of β -Glucanases in Plant Development and Adaptative Responses. **Plants**, v. 11, n. 9, p. 1119, 2022.

PUNJA, Z. K.; ZHANG, Y. Y. Plant Chitinases and Their Roles in Resistance to Fungal Diseases. **Journal of Nematology**, v. 25, n. 4, p. 526-540, 1993.

RAES, J. et al. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 133, n. 3, p. 1051-1071, 2013.

ROMERO, G. O. et al. Characterization of rice endo- β -glucanase genes (Gns2-Gns14) defines a new subgroup within the gene family. **Gene**, v. 223, n. 1, p. 311-320, 1998.

SAKIYAMA, N. S.; PEREIRA, A. A.; ZAMBOLIM, L. Melhoria do Café Arábica. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, p. 189-204, 1999.

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

SILVA, F. L. F. et al. The concentration of polyphenolic compounds and trace elements in the *Coffea arabica* leaves: Potential chemometric pattern recognition of coffee leaf rust resistance. **Food Research International**, v. 134, p. 1-9, 2020.

SOUZA, A. S. Revista cafeeira. (Org.) 2015. Disponível em: <https://revistacafeicultura.com.br/index.php?tipo=revista>. Acesso em: 20/04/2022.
SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of thompson seedless grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 1565-1571, 1990.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011.

STASKAWICZ B. J. Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. **Plant Physiology**, v. 125, p. 73-76, 2001.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954p.

TALHINHAS, P. et al. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, p. 1039-1051, 2017.

VAN 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.

VAN LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, p. 753-765, 1997.

VÁRZEA, V. M. P.; MARQUES, D. V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: ZAMBOLIM, L.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; VÁRZEA, V. M. P. (Eds.). **Durable Resistance to Coffee Leaf Rust**. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 2005. p. 53-74.

WEETE E. R. Lipid Biochemistry of Fungi and Other Organisms. New York: Plenum Press, 388p., 1980.

ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G. M. Efeito de baixas temperaturas e do binômio temperatura-umidade relativa sobre a viabilidade dos uredosporos de *Hemileia vastatrix* Berk, et Br, e *Uromyces phaseolityca* Arth, **Experientiae**, p. 151-184, 1974.

ZAMBOLIM, L. et al. Café. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas**, Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa, p. 83-180, 1997.

ZAMBOLIM, L. et al. Manejo integrado das doenças do cafeeiro, In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) I ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE CAFÉ COM QUALIDADE, Viçosa: Editora UFV, 1999, p.134-215.

ZAMBOLIM, L. et al. Physiological races of *Hemileia vastatrix* in Brazil: physiological variability, current situation and future prospects. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E. M.; VÁRZEA, V. M. P. (Orgs.) **Durable resistance to coffee leaf rust**, 1. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora Ltda, v. 1, p. 75-98, 2005.

ZAMBOLIM, L.; MARTINS, M. C.; CHAVES, G. M. Café. **Informe Agropecuário**, v. 11, n. 131, p. 64-75, 1985.

ZHANG, Y. et al. Salicylic acid confers enhanced resistance to *Glomerella* leaf spot in apple. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 64-72, 2016.