

**EXTRATOS VEGETAIS E PRODUTOS  
COMERCIAIS NO MANEJO DA FERRUGEM E  
NOS MECANISMOS DE DEFESA DO CAFEIEIRO  
À CERCOSPORIOSE**

**MÁRCIA TOYOTA**

**2008**

**MÁRCIA TOYOTA**

**EXTRATOS VEGETAIS E PRODUTOS COMERCIAIS NO MANEJO  
DA FERRUGEM E NOS MECANISMOS DE DEFESA DO CAFEIEIRO À  
CERCOSPORIOSE**

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

**Orientador**

**Prof. Ph.D. Mário Lúcio Vilela de Resende**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008**

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

Toyota, Márcia.

Extratos vegetais e produtos comerciais no manejo da ferrugem e nos mecanismos de defesa do cafeeiro à cercosporiose / Márcia Toyota.  
– Lavras : UFLA, 2008.  
66 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.  
Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende.  
Bibliografia.

1. Controle alternativo. 2. Café. 3. *Hemileia vastatrix*. 4. *Cercospora coffeicola*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.7394

**MÁRCIA TOYOTA**

**EXTRATOS VEGETAIS E PRODUTOS COMERCIAIS NO MANEJO  
DA FERRUGEM E NOS MECANISMOS DE DEFESA DO CAFEIEIRO À  
CERCOSPORIOSE**

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

**APROVADA em 04 de março de 2008**

Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu – UFLA

Pesquisadora Dr<sup>a</sup> Sara Maria Chalfoun – EPAMIG- LAVRAS

**Prof. Ph.D. Mário Lúcio Vilela de Resende  
UFLA  
(Orientador)**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008**

Aos meus pais, Tanio e Asami,  
fontes inesgotáveis de amor, força e compreensão,  
sempre presentes ao meu lado me apoiando,

**DEDICO**

Aos meus irmãos Tânia, Edson, Celso e Edna, pelo apoio incondicional e  
amizade sincera.

Aos meus cunhados Mário Kido, Mário Júnior, Sachi e Irani pelo incentivo.

Aos meus sobrinhos queridos Yudie, Evelyn, Allyson, Juliana e Luciana  
com carinho,

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia pela oportunidade concedida para realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado.

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

Ao professor Mário Sobral de Abreu, por aceitar o convite de participar da banca de avaliação e pelas valiosas sugestões apresentadas.

À Doutora Sara Maria Chalfoun pela disponibilidade e pelas sugestões como membro da banca examinadora.

Aos demais professores do Departamento de Fitopatologia pelos conhecimentos transmitidos.

À secretaria da Pós-Graduação do Departamento de Fitopatologia Renata Kelly Rezende, pela atenção e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia Ana Maria, Cleber, Edson, Eliane, Heloísa, Luciene, Rutinha e Tarley, pela agradável convivência e atenção durante o transcorrer do curso.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo (Família Resende) Jadir, Vanessa, Pedro, Daniel, Fernanda, João, Fabrício, Luiz Henrique, Moisés, Ana Cristina, Renato, Henrique, Rodrigo e Flávio Henrique (Pibic júnior), pela convivência e auxílio nos experimentos.

Ao importante apoio oferecido pelos amigos Pedro, Jadir, Daniel e Jerônimo.

Aos amigos Cleilson, Eduardo Freire, Eudes, Jadir, Rejane e Vanessa.

Aos colegas do Departamento Alex, Ana Beatriz, Ângelo, André, Bernardo, Carla, Érika, Esdras, Fernanda Martins, Flávia, Gilvaine, Janine, João Eduardo, Juliano, Lahyre, Luana, Luciana, Ricardo, Rodrigo, Sarah e Valquíria, pelo companheirismo.

À minha nova família, Renata, Paulo, Grazieli e Luciane, pelo carinho, amizade e força durante todos os momentos que passamos juntos nestes dois anos.

Às minhas irmãs de república, Beatriz e Maria Leandra, que sempre estiveram presentes em todos os momentos me apoiando e, principalmente, agüentando o meu mau humor.

Aos amigos que aqui encontrei, em especial Andréia, Cibele, Daniel, Dênis, Eberson (Dudu), Ivan, Neide e Vanderley.

Meu agradecimento especial a todas as pessoas aqui omitidas que contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	3
<b>ARTIGO 1: Efeito de extratos vegetais no manejo da ferrugem do cafeeiro</b> .....	4
Resumo .....	5
Abstract .....	6
Introdução .....	7
Material e métodos .....	9
Resultados e discussão .....	13
Referências bibliográficas .....	19
<b>ARTIGO 2: Efeito de produtos comerciais no manejo da ferrugem do cafeeiro</b> .....	22
Resumo .....	23
Abstract.. .....	24
Introdução .....	25
Material e métodos .....	27
Resultados e discussão .....	32
Referências bibliográficas .....	39
<b>ARTIGO 3: Determinação da atividade de enzimas na resposta de defesa em mudas de cafeeiro contra <i>Cercospora coffeicola</i> induzidos por fosfito de cobre e acibenzolar-S-metil em mistura com extrato vegetal</b> .....	43
Resumo.....	44
Abstract.....	45
Introdução.....	46
Material e Métodos.....	48

Resultados e Discussão.....	53
Referências bibliográficas .....	62
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>65</b>

## RESUMO

TOYOTA. M. **Extratos vegetais e produtos comerciais no manejo da ferrugem e nos mecanismos de defesa do cafeeiro à cercosporiose**. 2008. 66 p. Dissertação (Mestre em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.<sup>1</sup>

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito da aplicação de extratos vegetais e de produtos comerciais contra a ferrugem em lavoura convencional e estudar os mecanismos envolvidos na resposta de defesa em mudas de cafeeiro contra cercosporiose. Os experimentos com ferrugem foram conduzidos no Campus da Universidade Federal de Lavras, em área com cultivar Rubi de 10 anos de idade. Testaram-se os seguintes indutores: extrato de casca de frutos de café (CFC), de folhas de café infectadas com *Hemileia vastatrix* (EFID), a mistura destes entre si e com o indutor de resistência ASM (Acibenzolar-S-metil), fosfito de cobre (doses 5 e 10 mL L<sup>-1</sup>) e Agro-Mos® (doses 2, 5 e 10mL L<sup>-1</sup>). Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados com quatro repetições. Os cafeeiros foram pulverizados mensalmente de fevereiro a maio de 2007. Observou-se que os melhores resultados obtidos entre os extratos foram a mistura do extrato EFID com o ASM e o extrato EFID que proporcionaram reduções na área abaixo da curva de progresso de severidade da doença (AACPS) de 52% e 26%, respectivamente, quando comparados à testemunha. Entre os indutores comerciais, o fosfito de cobre reduziu a AACPS em 81% quando comparado à testemunha. O Agro-Mos apresentou desempenho intermediário quando comparado aos outros tratamentos. Nos testes bioquímicos realizados com folhas provenientes do campo, não houve diferença significativa nos tratamentos em relação a lignina e fenóis totais. Outro experimento foi conduzido com mudas de cafeeiro para avaliar os mecanismos envolvidos de defesa contra *Cercospora coffeicola*. Observou-se que fosfito de cobre e EFID + ASM proporcionaram aumentos na atividade de peroxidases aos 21 e 11 dias, após a pulverização, respectivamente. Plantas tratadas com esses produtos, apresentaram aumentos na atividade de quitinases e β-1,3-glucanases. Observou-se também que houve maior produção de fenóis totais em plantas tratadas com EFID + ASM e fosfito de cobre, quando comparada com a testemunha.

---

<sup>1</sup> **Comitê de Orientação:** Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Orientador) e Mário Sobral de Abreu – UFLA.

## ABSTRACT

TOYOTA, M. **Plant extracts and commercial products for the management of coffee rust and mechanisms of coffee defense against *Cercospora* leaf spot.** 2008. 66 p. Dissertation (Master in Phytopathology) – Federal University of Lavras, Lavras<sup>1</sup>.

The aim of this study was to evaluate the effect of plant extracts and commercial products against rust in a conventional farming system. Furthermore, to assess the defense mechanisms of coffee seedlings against *Cercospora* leaf spot. The rust experiment was conducted in a coffee field (Cultivar Rubi) with 10 year old at the campus of Federal University of Lavras. The following inductors were tested: extract of coffee husks (CFC), extract of leaves of coffee infected with *Hemileia vastatrix* (EFID), the mixture of these with each other and with the inducer of resistance ASM (Acibenzolar-S-methyl), copper phosphite (5 and 10 mL.L<sup>-1</sup>) and Agro-Mos® (doses 2, 5 and 10mL. L<sup>-1</sup>). A randomized blocks design with four replications was used. Coffee trees were sprayed monthly in the period from February until May 2007. The best results among the extracts were provided by a mixture of EFID with ASM and EFID alone, which reduced the area under the disease progress curve (AUDPC) in respectively, 52% and 26%, when compared to the control. Among commercial inductors, copper phosphite reduced the AUDPC up to 81% compared to the control. Agro-Mos® presented intermediate performance compared to other treatments. In biochemical tests with coffee leaves from the field, there was no significant difference among treatments concerning lignin and total phenolics contents. Another experiment was conducted with coffee seedlings to assess defense mechanisms against *Cercospora coffeicola*. It was observed that copper phosphite and EFID + ASM provided increases in the activity of peroxidases at 21 and 11 days after spraying, respectively. Plants treated with these products showed increases in the activities of chitinases and  $\beta$ -1, 3 - glucanases. A higher content of total phenolics was also observed in plants treated with EFID + ASM and copper phosphite, compared to the control.

<sup>1</sup>Guidance Committee: Mario Lucio Vilela de Resende - UFLA (Advisor) and Mario Sobral de Abreu - UFLA.

## INTRODUÇÃO GERAL

O café representa uma das principais fontes de divisas para o Brasil que é o maior produtor e exportador mundial, fechando a safra de 2006/2007 com uma produção de 33,7 milhões de sacas de café beneficiado. Minas Gerais destaca-se como o maior produtor nacional com estimativa de produção em torno de 22 milhões de sacas de café beneficiado para a safra de 2008/2009 e como primeiro produtor de café arábica, sendo responsável por 50,1% do total da produção nacional (Companhia Nacional de Abastecimento, 2008).

A cafeicultura, como qualquer outra cultura, para ser auto-sustentável necessita de um conjunto de práticas de manejo, empregadas de maneira correta e eficiente. Entre essas diversas práticas, pode-se destacar o manejo integrado de doenças de plantas. As doenças foliares do cafeeiro, causadas por ferrugem e cercosporiose estão entre os principais problemas da cafeicultura e são fonte de perdas na produtividade. A ferrugem alaranjada causada por *Hemileia vastatrix* é a principal doença do cafeeiro. Ela foi constatada no Brasil em janeiro de 1970 e logo se disseminou para todas as regiões cafeeiras do país. Atualmente, é encontrada em todas as regiões produtoras de café do mundo. Os principais danos causados pela ferrugem são ocasionados pela queda precoce das folhas e seca dos ramos produtivos, que por consequência não produzem no ano seguinte, diminuindo a produtividade e a qualidade. Essa seca constante dos ramos reduz a longevidade dos cafeeiros, tornando a lavoura gradativamente anti-econômica (Godoy et al., 1997).

Outra doença que vem despontando como problema na cafeicultura é a cercosporiose, conhecida também por “mancha de olho pardo” ou “olho de pomba”, causada por *Cercospora coffeicola*. É uma das doenças mais antigas do cafeeiro, tanto na América do Sul como América Central e encontra-se disseminada por todas as regiões produtoras. Nas regiões altas do Estado do

Espírito Santo e em Minas Gerais, a partir de 1971, ocorreram ataques intensos da doença no campo, chegando a causar perdas na produção de 30% (Carvalho & Chalfoun, 2001). Os prejuízos com a cercosporiose ganharam maior importância econômica com a implantação de lavouras nos cerrados ou em áreas de baixa fertilidade natural, pois há uma grande relação entre o ataque de cercospora e a nutrição mineral das plantas (Pozza et al., 2000).

Atualmente em todo o mundo, onde se pratica uma agricultura econômica, faz-se o uso de pesticidas para o controle de doenças de plantas (Kimati et al., 1997). O uso racional desses produtos tem efeito benéfico para os produtores em curto prazo, no entanto, a longo prazo pode ocorrer seleção de novas raças resistentes dos patógenos, além de promover a contaminação do ambiente e danos à saúde humana. Para contornar esse problema, vários estudos estão sendo realizados visando desenvolver e descobrir métodos alternativos de controle de doenças de plantas.

A indução de resistência em plantas é, certamente, promissora no controle de doenças, devido aos bons resultados que vêm sendo obtidos, inclusive, na diminuição dos custos de produção (Amaral, 2005).

A utilização de produtos comerciais, tais como fertilizantes foliares, como os fosfitos têm ganhado importância no controle de doenças (Datnoff et al., 2001), estando esses produtos entre os citados na literatura como indutores de resistência. Uma outra forma de controle que pode ser utilizada e desperta o interesse dos especialistas da área é o controle de doenças, através da utilização de produtos naturais, com extratos de plantas ou sub-produtos da cadeia produtiva do café, como casca de frutos.

Dessa forma, objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito de extratos vegetais e produtos comerciais contra *Hemileia vastatrix* em cafeeiro, além de estudar os mecanismos envolvidos na resposta de defesa contra *Cercospora coffeicola*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. **Cercospora: doença do cafeeiro também chamada de “olho pardo” ou “olho de pomba**. 2001. (Informe tecnológico, n. 026).

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB.  
**Acompanhamento da safra brasileira**: safra de 2008: primeira estimativa, janeiro/2008. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/Boletim.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2008.

DATNOFF, L. E.; SEEBOLD, K. W.; CORREA-V., F. J. Use of silicon for integrated disease management: reducing fungicide applications and enhancing host plant resistance. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDORFER, G. H. (Ed.). **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Elsevier Science, 2001. p. 171-184.

GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1997. v.2, cap.17, p.184-200.

KIMATI, H.; GIMENEZ-FERNANDES, N.; SOAVE, J.; KUROZAWA, C.; BRIGNANI NETO, F.; BETTIOL, W. **Guia de Fungicidas Agrícolas**: recomendações por cultura. 2. ed. Jaboticabal: Grupo Paulista de Fitopatologia, 1997. v. 1, 225 p.

POZZA, A. A. A.; MARTINEZ, H. E. P.; POZZA, E. A.; CAIXETA, S. L.; ZAMBOLIM, L. Intensidade da mancha de olho pardo em mudas de cafeeiro em função de doses de N e K em solução nutritiva. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 29-33, jan./mar. 2000.

## ARTIGO 1

### EFEITO DE EXTRATOS VEGETAIS NO MANEJO DA FERRUGEM DO CAFEIEIRO

(Preparado de acordo com as normas da revista “Fitopatologia Brasileira”)

Márcia Toyota<sup>1</sup>, Mário Lúcio V. Resende<sup>1</sup>, Pedro M. Ribeiro Júnior<sup>1</sup>, Jerônimo Constantino Borel<sup>1</sup>, Moisés Antônio de Pádua<sup>1</sup>, Renato C. Alvarenga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, CEP 37200-000, Caixa Postal 3037, Lavras, MG, e-mail: mtoyota2005@yahoo.com.br

(Aceito para publicação em / / )

Autora para correspondência: Márcia Toyota

---

Toyota, M. Resende, M. L. V., Ribeiro Júnior, P. M., Borel, J. C., Pádua, M. A. Alvarenga, R. C. Efeito de extratos vegetais no manejo da ferrugem do cafeeiro. Fitopatologia Brasileira.

## RESUMO

Na cafeicultura, a utilização de extratos vegetais em campo é praticamente inexistente e a maioria dos trabalhos têm sido realizados *in vitro* ou em casa-de-vegetação. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito da aplicação de extratos vegetais contra a ferrugem em lavoura convencional. O experimento foi conduzido no Campus da Universidade Federal de Lavras, em área com cultivar Rubi de 10 anos de idade. Testaram-se os seguintes indutores: extrato de casca de frutos de café (CFC), de folhas de café infectadas com *Hemileia vastatrix* (EFID), a mistura destes entre si e com o indutor de resistência ASM (Acibenzolar-S-metil). Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados com quatro repetições. Os cafeeiros foram pulverizados mensalmente de fevereiro a maio de 2007. Observou-se que os melhores resultados obtidos entre os extratos foram a mistura do extrato EFID com o ASM e o extrato EFID que proporcionaram reduções na área abaixo da curva de progresso de severidade da doença (AACPS) de 52% e 26%, respectivamente, quando comparados à testemunha. Nos testes bioquímicos realizados com folhas provenientes do campo, não houve diferença significativa nos tratamentos em relação a lignina e fenóis totais. Nos testes bioquímicos realizados com folhas provenientes do campo, não houve diferença significativa nos tratamentos em relação a lignina e fenóis totais.

**Palavras-chave adicionais:** *Coffea arabica*, EFID, CFC, proteção do cafeeiro, indução de resistência, *Hemileia vastatrix*.

## ABSTRACT

The use of plant extracts in a coffee field is virtually nonexistent and most studies have been conducted either in vitro or in greenhouses. The aim of this study was to evaluate the effect of plant extracts against rust in a conventional farming system. The experiment was conducted in a coffee field (Cultivar Rubi) with 10 year old at the campus of Federal University of Lavras. The following inductors were tested: extract of coffee husks (CFC), extract of leaves of coffee infected with *Hemileia vastatrix* (EFID), the mixture of these with each other and with the inducer of resistance ASM (Acibenzolar-S-methyl. A randomized blocks design with four replications was used. Coffee trees were sprayed monthly in the period from February until May 2007. The best results among the extracts were provided by a mixture of EFID with ASM and EFID alone, which reduced the area under the disease progress curve (AUDPC) in respectively, 52% and 26%, when compared to the control. In biochemical tests with coffee leaves from the field, there was no significant difference among treatments concerning lignin and total phenolics contents.

**Keywords:** *Coffea arabica*, EFID, CFC, coffee protection, induction of resistance, *Hemileia vastatrix*

## INTRODUÇÃO

Segundo Zambolim & Vale (2003), o parque cafeeiro brasileiro é constituído de 4 bilhões de plantas, em sua grande maioria suscetíveis às principais doenças, com destaque para Ferrugem Alaranjada (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.), que é considerada a de maior importância no Brasil devido a sua existência em todas as regiões produtoras e as suas perdas que podem chegar até 45% da produção. Atualmente, essa doença é encontrada em todas as regiões produtoras de café do mundo. Os principais danos causados pela ferrugem são ocasionados pela queda precoce das folhas e seca dos ramos produtivos do cafeeiro que, por consequência, não produzem no ano seguinte, com redução de sua produtividade e qualidade. A seca constante dos ramos reduz a longevidade dos cafeeiros, tornando a lavoura gradativamente anti-econômica (Godoy et al., 1997).

O controle químico da ferrugem mostra-se eficiente e econômico, porém, além do significativo incremento que esses insumos representam no custo de produção, pode acarretar sérias consequências no ecossistema, como o agravamento de outras doenças e pragas do cafeeiro, pelo seu efeito na microbiota e eliminação de inimigos naturais, além de possibilitar a seleção de raças resistentes aos fungicidas aplicados (Guzzo et al., 2001). Além disso, a pressão exercida pela sociedade por produção de alimentos mais seguros e com qualidade ambiental, exige da pesquisa maior empenho em encontrar medidas alternativas de manejo fitossanitário, através de um modelo de sustentabilidade, no qual se deve usar o mínimo de pesticidas possível e produtos de menor toxicidade para combater pragas e doenças.

Nesse contexto, a indução de resistência em plantas contra patógenos representa método alternativo no controle de doenças, o qual ativa os mecanismos de defesa latentes na planta. Resende et al. (2004) e Cavalcanti et al. (2004) citam que a resistência induzida em plantas pode ocorrer por meio do

tratamento com agentes bióticos (microrganismos ou parte desses) ou abióticos como, por exemplo, pelo Acibenzolar-S-metil (ASM). O Acibenzolar-S-metil é um produto que interfere nos processos fisiológicos/bioquímicos das plantas, podendo ativar resistência sistêmica aos agentes patogênicos. Esse ingrediente ativo pertence à classe química benzothiadiazole e é o primeiro representante de uma nova categoria de produtos utilizados na proteção de plantas, também chamados de ativadores de plantas ou indutores de resistência (Knight et al., 1997).

Em relação aos extratos vegetais, são considerados como eliciadores bióticos (Pascholati & Leite, 1995), cuja eficiência no controle de fitopatógenos é observada em diversos patossistemas (Bonaldo et al., 2004; Guzzo et al., 1987). Dentre as opções de manejo, alguns trabalhos citam o uso de extratos vegetais possuidores de substâncias bioativas, capazes de atuarem como indutores de resistência às doenças em plantas (Barguil et al., 2005). Em condições não controladas e sob inóculo natural, Santos et al. (2007) demonstraram que os extratos de folhas de café infectadas com *H. vastatrix* caídas ao solo e cascas de frutos de café reduziram em 31% e 49%, respectivamente, a severidade da ferrugem em cafeeiro quando comparados à testemunha pulverizada com água.

Dessa forma, considerando-se que folhas de café infectadas com *H. vastatrix* caídas ao solo e cascas de frutos de café são materiais vegetais facilmente disponíveis e abundantes em Minas Gerais e a utilização de produtos naturais que compõe as chamadas tecnologias limpas é boa opção ao agricultor, (Potenza, 2004), este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação de extratos de casca de frutos de café (CFC) e de folhas de café infectadas com *H. vastatrix* (EFID), e a mistura destes entre si, e com o indutor de resistência ASM (Acibenzolar-S-metil) contra a ferrugem em lavoura convencional.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção dos Extratos Vegetais**

Os extratos vegetais de folhas de café infectadas por ferrugem (EFID) e de casca de frutos de café (CFC) foram processados no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. É importante salientar que a forma de processamento e a composição dos mesmos encontram-se sob sigilo de patente.

### **Instalação e condução do ensaio**

O ensaio foi instalado e conduzido no campo experimental da Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, no período de janeiro a novembro de 2007. Foi utilizada área, com cafeeiro, da cultivar 'Rubi- MG 1190', com 10 anos de idade, recepado, em espaçamento de 2,5 x 0,70m. A parcela experimental foi composta de oito plantas e consideram-se as quatro plantas centrais como parcelas úteis. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados (DBC), com quatro repetições e oito tratamentos. As plantas foram pulverizadas com intervalo aproximado de 30 dias, nas seguintes datas: 01 de fevereiro, 07 de março, 02 de abril e 04 de maio.

Os tratamentos foram: EFID ( $100\text{g L}^{-1}$ ), CFC ( $100\text{g L}^{-1}$ ), mistura entre EFID e CFC ( $100\text{g L}^{-1}$ ), ASM ( $0,2\text{g L}^{-1}$ ), EFID e ASM ( $100\text{g L}^{-1}$  e  $0,2\text{g L}^{-1}$ ), CFC e ASM ( $100\text{g L}^{-1}$  e  $0,2\text{g L}^{-1}$ ), fungicida padrão (EP+PI) nas dosagens 1,5 e  $1,0\text{L ha}^{-1}$ , aplicados em fevereiro e abril e testemunha sem aplicação. Como fungicida padrão, foi utilizado Epoxiconazol + Piraclostrobin (Opera®). Em todos os tratamentos foi adicionado o espalhante adesivo siliconado Vitaphix®.

A aplicação dos tratamentos foi realizada sempre após as dezesseis horas, em dias com temperatura amena e ventos moderados, pulverizando-se toda a planta até o ponto de escorrimento.

### **Avaliação da doença**

A ferrugem do cafeeiro foi avaliada a cada 30 dias (fevereiro a novembro), coletando-se dados de incidência e severidade utilizando-se escala diagramática preconizada por Cunha et al. (2001). A amostragem para a avaliação foi realizada em oito ramos plagiotrópicos, escolhidos aleatoriamente no terço médio das plantas, quatro de cada lado da linha de plantio. Em cada ramo foi avaliado o 3º ou 4º par de folhas, com total de 16 folhas por planta em amostragem não destrutiva.

Após as avaliações, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) e da incidência (AACPI), para cada tratamento, determinada pela equação proposta por Shaner & Finney (1977):

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} ((Y_i + Y_{i+1}) / 2) * (T_i - T_{i+1})$$

Em que:

AACPD = área abaixo da curva de progresso da doença;

$Y_i$  = proporção da doença na i-ésima observação;

$T_i$  = tempo em dias na i-ésima observação;

n = número de observações.

Plotou-se, também, a proporção de doenças no eixo y e o tempo no eixo x, para representação da epidemia. A análise de variância foi realizada no programa Sisvar®- versão 4.6 (Build 6.1) (Ferreira, 2000). Quando a variável foi significativa no teste de F, as médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

### **Avaliação das características relacionadas à resposta de defesa**

#### **Coleta de tecido vegetal**

Durante a condução do experimento, foram avaliadas características de resposta de defesa das plantas. Para isso, foram coletadas amostras de folhas dos

cafeeiros nas parcelas experimentais aos 5, 10, 20, 30 e 40 dias, após a última pulverização, para a determinação de lignina e fenóis totais. Foram coletadas folhas não expandidas totalmente, no total de 16 folhas por tratamento. Selecionaram-se as mais uniformes possíveis quanto ao tamanho, textura e coloração e as que não apresentaram lesões visíveis. Durante as coletas, as folhas foram protegidas com papel alumínio e colocadas em isopor contendo nitrogênio líquido. No laboratório de Fisiologia do Parasitismo, as folhas foram acondicionadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a preparação dos extratos para a realização das análises bioquímicas.

#### **Preparo de amostras foliares para avaliação de lignina solúvel e fenóis solúveis totais**

O material foliar foi homogeneizado, por meio de almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino em nitrogênio líquido e seco por 6 h em liofilizador L101, marca Liobras.

Uma alíquota de 30 mg do material liofilizado foi transferida para micro tubo de 2 mL, homogeneizada com 1,5 mL de metanol 80% e extraída sob agitação por 15 h em agitador rotativo, protegido da luz e em temperatura ambiente.

O extrato metanólico foi centrifugado a 12.000 g por 5 min e o sobrenadante foi transferido para novo micro tubo, com o qual se realizou a determinação de fenóis solúveis totais. O resíduo foi utilizado para a determinação de lignina.

#### **Fenóis totais**

Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  do extrato metanólico foi misturado a 100  $\mu\text{L}$  de metanol e 150  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25N e mantido em temperatura ambiente por 5 min. Logo após, foram adicionados-se 150  $\mu\text{L}$  de

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M, foram homogeneizados e mantidos por 10 min em temperatura ambiente. Após essa etapa, a mistura foi então homogeneizada com 1 mL de H<sub>2</sub>O, destilada e mantida à temperatura ambiente por uma hora. Os valores de absorvância dessa reação foram determinados a 725 nm em espectrofotômetro e calculados com base na curva de catecol. Os compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente µg de catecol por miligrama de matéria seca (Spanos & Wrolstad, 1990).

### **Lignina**

Um volume de 1,5 mL da água destilada foi adicionado ao resíduo proveniente do item descrito acima, homogeneizado e centrifugado a 12.000 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco a 65 °C por 15 h. Posteriormente, acrescentou-se um volume de 1,5 mL de solução contendo ácido tioglicólico e HCl 2M (proporção de 1:10). Em seguida, os micro tubos foram colocados em gelo, para resfriar rapidamente por 10 min e centrifugados a 12.000 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 1,5 mL de NaOH 0,5 M e mantido em agitador rotativo por 15 h à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 12.000 g por 10 min, o sobrenadante foi transferido para novo micro tubo, adicionando-se ao precipitado 200 µL de HCl concentrado e mantido em câmara fria (4 °C) por 4 h, para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico. A seguir, a mistura foi centrifugada a 10.000 g por 10 min, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em 2 mL de NaOH 0,5 M. A absorvância desta solução foi determinada em espectrofotômetro a 280 nm e os valores calculados com base na curva de lignina, sendo expresso em µg de lignina por grama de matéria seca (adaptado de Doster & Bostock, 1988).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Efeito dos extratos vegetais na intensidade da ferrugem do cafeeiro

O tratamento que proporcionou menor área abaixo da curva de progresso da incidência da doença (AACPI) foi epoxiconazol + piraclostrobina (EP + PI), diferindo estatisticamente dos demais, seguido pela mistura de EFID + ASM e EFID, que não diferiram entre si. Para a área abaixo da curva de progresso da severidade da ferrugem (AACPS), o efeito dos tratamentos foi similar ao observado para a variável AACPI, com efeito significativo dos tratamentos EFID + ASM e EFID. Esta combinação entre EFID + ASM proporcionou redução na AACPS de 52%, enquanto EFID reduziu em 26% quando comparado à testemunha (Tabela 1).

**Tabela 1.** Efeito dos tratamentos sobre a área abaixo da curva de progresso da ferrugem.

TRATAMENTOS <sup>1</sup>	AACPI <sup>2</sup>	AACPS <sup>3</sup>
Fungicida padrão	375,0 a	133,3 a
EFID + ASM	3058,5 b	944,8 b
EFID	3867,3 b	1451,5 b
CFC + ASM	5144,3 c	1907,0 c
CFC	4230,3 c	1501,5 c
EFID + CFC	5109,5 c	1730,0 c
ASM	5115,3 c	1908,8 c
Testemunha	5419,8 c	1971,5 c

<sup>1</sup>ASM – acibenzolar-S-metil; EFID – extrato de folhas de café infectadas com ferrugem; CFC – extrato de casca de frutos de café. <sup>2</sup>Área abaixo da curva de progresso da incidência. <sup>3</sup>Área abaixo da curva de progresso da severidade. Tratamentos com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

Estudos sobre o aumento do controle da doença pelo uso de Acibenzolar-S-metil, associados com extratos ainda não foram relatados, porém, a sua associação com fungicidas foi verificada para alguns patossistemas. Assim, em estudos realizados por Silva et al. (2003) foi verificado que ASM em mistura com mancozeb proporcionou reduções de severidade de *Xanthomonas vesicatoria*, *Oidium lycopersici* e *Septoria lycopersici* em tomateiro. Semelhantemente, Tófoli et al. (2005) verificaram elevado potencial de controle das combinações ASM e chlorotalonil ou mancozeb no controle de *Phytophthora infestans* em batata. No patossistema café-*Hemileia vastatrix*, Costa et al. (2007) observaram que o ASM combinado com o fungicida piraclostrobin ou azoxtrobin foram eficientes no controle da ferrugem, com redução do número de pústulas e área foliar lesionada, quando comparados com a testemunha (água). Dessa forma, no presente trabalho, o ASM provavelmente estimulou maior número de rotas de sinalização para a defesa pela mistura com o extrato EFID e, conseqüentemente, maximizou o potencial da planta em responder à infecção (Resende et al., 2007). O acibenzolar-S-metil utilizado, isoladamente, não apresentou efeito protetor, tal resultado concorda com outros trabalhos (Cavalcanti et al., 2000; Guzzo et al., 2001). Nem sempre o efeito de um composto químico, obtido em laboratório, corresponde à sua performance em campo devido à decomposição do produto em compostos pouco tóxicos, lavagem pela chuva e cobertura desuniforme na folhagem, (Costa et al., 2007).

O efeito do extrato de folhas de cafeeiro infectadas por ferrugem (EFID) na redução da intensidade da ferrugem, comparado ao observado na testemunha, está de acordo com estudos realizados por Guzzo et al. (1987) que supõem a presença de eliciadores envolvidos em respostas de defesa da planta derivados de tecido do cafeeiro infectado por *Hemileia vastatrix*. Urediniósporos do fungo inativados por autoclavagem e preparados em forma de filtrado aquoso.

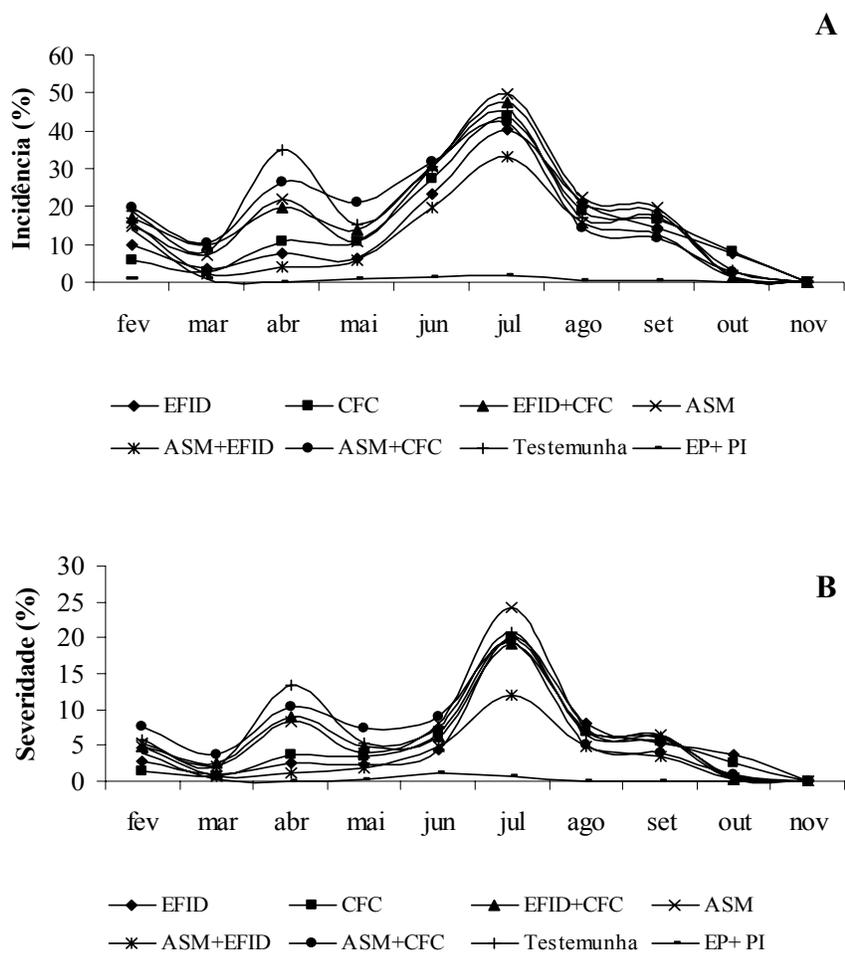
Induziram, ainda, proteção contra *H. vastatrix* em cafeeiros, cujas folhas foram previamente pulverizadas.

Santos et. al. (2007), ao estudarem, os mesmos extratos vegetais (EFID e CFC) para ferrugem, cercospora e mancha de phoma, em cafeeiro orgânico, obtiveram resultados semelhantes. A incidência da ferrugem nos cafeeiros pulverizados com EFID e CFC foi menor do que na testemunha pulverizada com água. O tratamento EFID proporcionou área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS), 31% inferior ao observado na testemunha pulverizada com água, porém, o CFC reduziu em 49% a AACPS da ferrugem, o que não foi observado no presente trabalho, cuja redução foi de 23% na área abaixo da curva de progresso da severidade da ferrugem.

Barguil et al. (2005), em um de seus primeiros estudos com o EFID, observaram redução de 38% na severidade da mancha foliar causada por *Phoma costarricensis* Echandi, quando comparada com a testemunha inoculada. Em outro trabalho, Amaral (2005) confirma esse resultado, onde verificou-se redução de 37% no progresso da cercosporiose em mudas de cafeeiro e, segundo o mesmo autor, o efeito de eliciadores presentes no extrato preparado com folhas de cafeeiro infectadas com ferrugem foi evidenciado quando verificou que plantas pulverizadas com extrato de folhas saudáveis proporcionaram severidade da doença semelhante à testemunha não pulverizada.

Para a curva de progresso da incidência e severidade da ferrugem ao longo dos meses, os tratamentos com a mistura EFID + ASM e o tratamento padrão epoxiconazol + piraclostrobina apresentaram menor severidade da doença, (Figura 2B). Observa-se que, durante a época das aplicações (fevereiro, março, abril e maio), o tratamento com EFID + ASM reduziu a intensidade da ferrugem. A partir de maio, entretanto, houve aumento significativo na severidade da doença com pico de 12% em julho. Dessa forma, sugere-se testar intervalos menores entre as pulverizações e aumentar o número de aplicações

para os produtos EFID + ASM, com o intuito de se observar reduções mais significativas nos índices da doença, pois a literatura é inexistente em informações pertinentes ao número de aplicações para esses produtos.



**Figura 2** Curva de progresso da incidência (A) e da severidade (B) da ferrugem do cafeeiro em função dos tratamentos. ASM – acibenzolar-S-metil; EP+ PI – Epxiconazol + Piraclostrobiná; EFID-extrato de folha de café infectadas com ferrugem; CFC-extrato de casca de frutos de café.

### Determinação de lignina e compostos fenólicos totais

Os teores de lignina e fenóis totais dos tratamentos EFID e da mistura entre EFID + ASM, não diferiram da testemunha e dos demais tratamentos. Não foi encontrada nenhuma correlação entre teor de lignina e compostos fenólicos totais com AACPS ou AACPI (Tabela 2).

**Tabela 2.** Correlação entre teor de lignina, compostos fenólicos totais, AACPS e AACPI em folhas de café.

Variáveis	AACPS	AACPI
Lignina	0,0833 <sup>ns</sup>	0,1146 <sup>ns</sup>
Fenóis totais	0,1114 <sup>ns</sup>	0,0941 <sup>ns</sup>

Correlação com base no coeficiente de correlação de Pearson; <sup>ns</sup>Não significativo.

A distribuição e a localização dos fenóis nas plantas não são conhecidas claramente. Observa-se, no entanto, que as quantidades variam de acordo com os órgãos, a idade, o estágio de desenvolvimento das plantas e as condições climáticas (Salgado, 2004).

A formação de lignina torna a parede celular das células vegetais rígidas e seu principal papel nos vegetais é a sustentação da planta. Sua resistência física e estabilidade química desempenham papel secundário, porém, importante como proteção celular contra insetos, por ser indigerível por esses organismos, além de frequentemente também estar associada ao bloqueio do crescimento de patógenos (Taiz & Zeiger, 2004).

Nojosa (2003) observou que folhas de cafeeiro, fisiologicamente mais velhas, apresentaram maior quantidade de lignina, que comprova que há correlação direta com a resistência contra *Phoma costarricensis*. Provavelmente, não houve diferenças e correlações significativas para os teores de lignina e fenóis devido ao fato das amostragens (coletas) serem realizadas com folhas

ainda não totalmente expandidas. Segundo Rengel et al. (1993), ao avaliarem, o acúmulo de fenóis e lignina por plantas de trigo infectadas com *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* Walker, sob diferentes doses de Mn no solo, mencionaram que, mesmo que os aumentos dos teores de lignina e fenóis se relacionassem, positivamente, com a resistência do trigo ao mal-do-pé, o parâmetro de resistência do hospedeiro eram as concentrações de fenóis e lignina no ponto de infecção e não aos teores totais desses compostos nos tecidos.

No presente estudo, os resultados obtidos demonstraram que a adição do Acibenzolar-S-metil (ASM) ao extrato EFID e o extrato EFID puro reduziram a incidência da ferrugem, comparativamente, aos percentuais de doenças observados na testemunha.

A mistura de EFID + ASM e o extrato EFID reduziram a severidade da ferrugem em 52% e 26%, respectivamente, quando comparados á testemunha.

Os tratamentos não promoveram lignificação e nem alteraram o teor de compostos fenólicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, D. R. **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais**. 2005. 96 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- BARGUIL, B. M.; RESENDE, M. L. V.; RESENDE, R. S.; BESERRA JUNIOR, J. E. A.; SALGADO, S. L. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 535-537, set./out. 2005.
- BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TESSMANN, D. J.; SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 128-134, mar./abr. 2004.
- CAVALCANTI, L. S. **Indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb. em plântulas de cacaueteiro por Benzotiadiazole (bth)**. 2000. 82 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- CAVALCANTI, F. R.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; PEREIRA, R. B.; ZACARONI, A. B.; VILLAS BOAS, C. H.; RESENDE, M. L. V. Natural extracts induce lignification on cocoa and tomato leaves In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS, 2.; SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: Ufla, 2004. p. 107.
- COSTA, M. J. N.; ZAMBOLIM, L.; RODRIGUES, F. A. Avaliação de produtos alternativos no controle da ferrugem do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 150-155, jan./fev. 2007.
- CUNHA, R. L.; POZZA, E. A.; DIAS, W. P.; BARRETTI, P. B. **Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para avaliar a severidade da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro**. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Resumos...** Brasília: Embrapa, 2001. p. 77-78.
- DOSTER, M. A.; BOSTOCK, R. M. Quantification of lignin formation in almond bark in response to wounding and infection by *Phytophthora* species. **Phytopathology**, St. Paul, v.78, n. 4, p. 473-477, Apr. 1988.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programa e Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: KIMATI, H.; BERGAMINI FILHO, A.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 184-200.

GUZZO, S. D.; CASTRO, R. M. de; KYDA, K.; MARTINS, E. M. F. Ação protetora do acibenzolar- S- methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 89-94, jan./jun. 2001.

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F.; MORAES, W. B. C. Induced protection of coffee plants to *Hemileia vastatrix*. I. Partial purification of the extracellular inducer from heat-killed urediniospores of the pathogen. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 4, p. 377-385, dez. 1987.

KNIGHT, S. C.; ANTHONY, V. M.; BRADY, A. M.; GREENLAND, A. J.; HEANEY, MURRAY, D.C.; POWELL, K. A.; SCHULTZ, M. A.; SPINKS, C. A.; WORTHINGTON, P. A.; YOULE, D. Rationale and perspectives on the development of fungicides. **Annual Phytopathology**, Palo alto, v. 35, p. 349-372, 1997.

NOJOSA, G. B. de A. **Efeito de indutores na resistência de *Coffea arabica* L. a *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. e *Phoma costarricensis* Echandi**. 2003. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: princípios e Conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995.

POTENZA, M. R. Produtos naturais para o controle de pragas. Reunião ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO – CAFÉ, 10., 2004, Mococa. **Anais...** Mococa: Instituto Biológico, 2004. v. 10, p. 89-100.

RENGEL, Z., GRAHAM, R. D., PEDLER, J. F. Manganese and accumulation of phenolics and lignin as related to differential resistance of wheat genotypes to the take all fungus. **Plant and soil**, Dordrecht, v. 151, n. 2, p. 255-263, Apr. 1993.

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. In: THE INTERNATIONAL JOINT WORKSHOP ON PR-PROTEINS AND INDUCED RESISTANCE. 2004, Elsinore, Demark. **Abstract Book...** Elsinore: Universitas Friburgenis, 2004. p. 79.

SALGADO, P. R. **Fenóis totais no cafeeiro em razão das fases de frutificação e do clima**. 2004. 60 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SANTOS, F.; SOUZA, P.; RESENDE, M. L.V.; POZZA, E. A.; MIRANDA, J. C.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; MANERBA, F. C. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 59-63, jan./fev. 2007.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n. 8, p. 1183-1186, Aug. 1977.

SILVA, L. H. C. P.; RESENDE, M. L. V.; SOUZA, R. M.; CAMPOS, J. R. Efeito do indutor de resistência acibenzolar-S-methyl na proteção contra *Xanthomonas vesicatoria*, *Oidium lycopersici* e *Septoria lycopersici* em tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, n. 3, p. 244-248, jul./set. 2003.

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

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J.; FERRERIRA, M. R.; GARCIA JÚNIOR, O. Ação de acibenzolar-s-methyl isolado e em mistura com fungicidas no controle da requeima da batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 749-753, jul./set. 2005.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. Estratégias múltiplas no manejo integrado de doenças do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA-MANEJO INTEGRADO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 36., 2003, Uberlândia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 137-153, jan./fev. 2003.

## ARTIGO 2

### EFEITO DE PRODUTOS COMERCIAIS NO MANEJO DA FERRUGEM DO CAFEIRO

(Preparado de acordo com as normas da revista “Fitopatologia Brasileira”)

Márcia Toyota<sup>1</sup>, Mário Lúcio V. Resende<sup>1</sup>, Pedro M. Ribeiro Júnior<sup>1</sup>, Jerônimo Constantino Borel<sup>1</sup>, Moisés Antônio de Pádua<sup>1</sup>, Renato C. Alvarenga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, CEP 37200-000, Caixa Postal 3037, Lavras, MG, e-mail: mtoyota2005@yahoo.com.br

(Aceito para publicação em / / )

Autora para correspondência: Márcia Toyota

---

Toyota, M. Resende, M. L. V., Ribeiro Júnior, P. M., Borel, J. C., Pádua, M. A. Alvarenga, R. C. Efeito de produtos comerciais no manejo da ferrugem do cafeeiro. Fitopatologia Brasileira.

## RESUMO

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar o efeito da aplicação de fosfito de cobre, Agro-Mos® e acibenzolar-S-metil (ASM) contra a ferrugem em lavoura convencional. O experimento foi conduzido no Campus da Universidade Federal de Lavras, em área com cultivar Rubi de 10 anos de idade. Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados com quatro repetições. Os cafeeiros foram pulverizados mensalmente de fevereiro a maio de 2007. Entre os indutores comerciais, o fosfito de cobre reduziu a área abaixo da curva de progresso de severidade da doença (AACPS) em 81% quando comparado à testemunha. O Agro-Mos apresentou desempenho intermediário quando comparado aos outros tratamentos. Nos testes bioquímicos realizados com folhas provenientes do campo, não houve diferença significativa nos tratamentos em relação a lignina e fenóis totais.

**Palavras-chave adicionais:** proteção do cafeeiro, produto alternativo, indução de resistência, *Hemileia vastatrix*, fosfito de cobre, Agro-Mos, Acibenzolar-S-metil.

## ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effect of copper phosphite, Agro-Mos<sup>®</sup> and acibenzolar-S-methyl (ASM) applied against coffee rust in conventional farming. The rust experiment was conducted in a coffee field (Cultivar Rubi) with 10 year old at the campus of Federal University of Lavras. A randomized blocks design with four replications was used. Coffee trees were sprayed monthly in the period from February until May 2007. Among commercial inducers, copper phosphite reduced the area under the disease progress curve (AUDPC) up to 81% compared to the control. Agro-Mos<sup>®</sup> presented intermediate performance compared to other treatments. In biochemical tests with coffee leaves from the field, there was no significant difference among treatments concerning lignin and total phenolics contents.

**Keywords:** Coffee protection, alternative products, induction of resistance, *Hemileia vastatrix*, copper phosphite, Agro-Mos, Acibenzolar-S-methyl.

## INTRODUÇÃO

A ferrugem, causada pelo agente etiológico *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., é considerada a principal doença do cafeeiro. Essa doença provoca queda precoce das folhas, com menor florada, menor formação de chumbinhos e, também, ocorre seca dos ramos plagiotrópicos, o que compromete em mais de 50% a produção do cafeeiro (Zambolim et al., 1997).

O controle da ferrugem tem sido realizado, na grande maioria dos casos, por meio de pulverização das plantas com fungicidas protetores e sistêmicos. Além dessa prática ser onerosa, promove a degradação dos recursos naturais, problemas de intoxicação de aplicadores de defensivos agrícolas, aumento dos riscos da presença de resíduos nos produtos colhidos, assim como o surgimento de raças resistentes do patógeno. Com o intuito de evitar a maioria desses problemas, tem-se buscado práticas de manejo de doenças mais racionais, como fungicidas de menores custos e baixa toxicidade (Zambolim & Vale, 1999).

Diante desse contexto, a indução de resistência em plantas pode ser uma medida promissora de controle, juntamente com outras tradicionalmente utilizadas e pode compor adequado manejo da doença.

A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes que existem nas plantas em resposta a tratamentos com agentes bióticos ou abióticos, representados por barreiras bioquímicas ou estruturais, que aumentam a resistência geral da planta (Uknes et al., 1996). Resende et al. (2004) e Cavalcanti et al. (2004) citam que a resistência induzida em plantas pode ocorrer por meio do tratamento com agentes bióticos (microrganismos ou parte destes) ou abióticos. O Acibenzolar-S-metil (ASM), considerado indutor abiótico, possui propriedades de elicitar respostas de resistência em plantas contra amplo espectro de patógenos (Knight et al., 1997).

A utilização de produtos comerciais, tais como fertilizantes foliares, como os fosfitos e o Agro-Mos® têm assumido importância no controle de

doenças. O fosfito é comercializado há algum tempo na forma de etil fosfonato (Fosetyl-Al) e, recentemente, como sal de potássio, sendo indicado no controle dos fungos do gênero *Phytophthora* e dos fungos de podridões do colo, raiz, tronco e frutos. Na forma de sal de potássio, o fosfito parece ter o mesmo efeito que o Fosetyl-Al, fungicida recomendado para o controle de oomicetos como *Phytium* spp e *Phytophthora* spp. Alguns autores acreditam que o fosfito, além da ação direta sobre o patógeno, também apresenta ação indireta e induz resposta de defesa na planta (Smile et al., 1989; Jackson et al., 2000). Existem vários relatos da utilização de fosfitos como indutores de resistência em patossistemas diferentes, entretanto, tal atuação ainda é questionada, não havendo, em muitos desses relatos, evidências concretas de respostas de defesa ativadas pelos sais de fosfito (Reuveni et al., 1994). Em relação ao Agro-Mos®, esse é um indutor com ação em diferentes patossistemas vegetais, cujo princípio ativo é um manano-oligossacarídeo fosforilado proveniente da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e atua de duas formas no controle de doenças de plantas: impede a fixação de patógenos sobre os tecidos das plantas, através do filme formado pelo princípio ativo e promove reação não específica a patógenos, à indução de resistência sistêmica – ISR (Fazenda Arizona, 2008).

Dessa maneira o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência do fosfito de cobre, Agro-Mos® e ASM no manejo da ferrugem do cafeeiro em lavoura convencional.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção dos Produtos Comerciais

Os produtos utilizados foram fosfito de cobre (Fulland®), adquirido junto à Empresa Sudoeste (Araxá-MG), Agro-Mos® adquirido da Empresa Improcrop do Brasil (Curitiba-PR) e ASM – Acibenzolar-S-metil (Bion® 500wg) da Syngenta Proteção de Cultivos (São Paulo-SP).

### Instalação e condução do ensaio

O ensaio foi instalado e conduzido no campo experimental da Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, no período de janeiro a novembro de 2007. Foi utilizada área, com cafeeiro, da cultivar ‘Rubi- MG 1190’, com 10 anos de idade, recepado, em espaçamento de 2,5 x 0,70m. A parcela experimental foi composta de oito plantas e consideram-se as quatro plantas centrais como parcela útil. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados (DBC), com quatro repetições e oito tratamentos (Tabela 1). Os seguintes tratamentos foram avaliados:

**Tabela 1.** Tratamentos aplicados em lavoura cafeeira, cv ‘Rubi-MG 1190’, com 10 anos de idade, UFLA, Lavras-MG, 2008.

Tratamentos	Dosagem	Aplicações
1. Fosfito de Cobre (FC5)	5mL L <sup>-1</sup>	Fevereiro, março, abril e maio
2. Fosfito de Cobre (FC10)	10mL L <sup>-1</sup>	Fevereiro, março, abril e maio
3. Agro-Mos (AM2)	2mL L <sup>-1</sup>	Fevereiro, março, abril e maio
4. Agro-Mos (AM5)	5mL L <sup>-1</sup>	Fevereiro, março, abril e maio
5. Agro-Mos (AM10)	10mL L <sup>-1</sup>	Fevereiro, março, abril e maio
6- ASM	0,2g L <sup>-1</sup>	Fevereiro, março, abril e maio
7. Fungicida Padrão (EP+PI) *	1,5 + 1,0 L ha <sup>-1</sup>	Fevereiro e abril
8. Testemunha		

\* Epoxiconazole + Pyraclostrobin. Obs.: Em todos os tratamentos foi adicionado o espalhante adesivo siliconado Vitaphix®.

A aplicação dos tratamentos foi realizada sempre após às 16 horas, em dias com temperatura amena e ventos moderados, pulverizando toda a planta até o ponto de escorrimento.

### **Avaliação da doença**

A ferrugem do cafeeiro foi avaliada a cada 30 dias (fevereiro a novembro), coletando dados de incidência e severidade, utilizando-se escala diagramática preconizada por Cunha et al., (2001). A amostragem para a avaliação foi realizada em oito ramos plagiotrópicos, escolhidos aleatoriamente no terço médio das plantas, quatro de cada lado da linha de plantio. Em cada ramo foram avaliados o 3º ou 4º par de folhas, totalizando 16 folhas por planta em amostragem não destrutiva.

### **Cálculo e plotagem da curva de progresso**

Após dez avaliações, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) e da incidência (AACPI) para cada tratamento, determinada pela equação proposta por Shanner & Finney (1977):

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} ((Y_i + Y_{i+1}) / 2) * (T_i - T_{i+1})$$

Em que:

AACPD = área abaixo da curva de progresso da doença;

$Y_i$  = proporção da doença na i-ésima observação;

$T_i$  = tempo em dias na i-ésima observação;

n = número de observações.

Plotou-se, também, a proporção de doenças no eixo y e o tempo no eixo x, para representação da epidemia.

## **Análise Estatística**

A análise de variância foi realizada no programa Sisvar®- versão 4,6 (Ferreira, 2000). Quando a variável foi significativa no teste de F, as médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

## **Avaliação das características relacionadas à resposta de defesa**

### **Coleta de tecido vegetal**

Durante a condução do experimento, foram avaliadas características de resposta de defesa das plantas. Para isso, foram coletadas amostras de folhas dos cafeeiros nas parcelas experimentais aos 5, 10, 20, 30 e 40 dias, após a última pulverização, para determinação de lignina e fenóis totais. Foram coletadas folhas não expandidas totalmente, no total de 16 folhas por tratamento. Selecionaram-se as mais uniformes possíveis, quanto ao tamanho, textura e coloração e as que não apresentaram lesões visíveis. Durante as coletas, as folhas foram protegidas com papel alumínio e colocadas em isopor contendo nitrogênio líquido. No laboratório de Fisiologia do Parasitismo, as folhas foram acondicionadas em freezer a -80°C, até a preparação dos extratos para as análises bioquímicas.

### **Preparo de extratos foliares para avaliação de lignina solúvel e fenóis solúveis totais**

O material foliar foi homogeneizado, por meio de almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino em nitrogênio líquido e seco por 6 h em liofilizador L101, marca Liobras.

Uma alíquota de 30 mg do material liofilizado foi transferida para micro tubo de 2 mL e homogeneizada com 1,5 mL de metanol 80% e extraída sob

agitação por 15 h em agitador rotativo, protegido da luz e em temperatura ambiente.

O extrato metanólico foi centrifugado a 12.000 g por 5 min e o sobrenadante foi transferido para novo micro tubo, com o qual se realizou a determinação de fenóis solúveis totais. O resíduo foi utilizado para a determinação de lignina.

#### **Determinação de fenóis totais**

Uma alíquota de 50 µL do extrato metanólico foi misturada a 100 µL de metanol a 80% e 150 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25N e mantido em temperatura ambiente por 5 min. Logo após, foram adicionados-se 150 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M, homogeneizados -se e mantidos por 10 min em temperatura ambiente. Após essa etapa, a mistura foi homogeneizada com 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada e mantida à temperatura ambiente por uma hora. Os valores de absorbância dessa reação foram determinados a 725 nm em espectrofotômetro e calculados com base na curva de catecol. Os compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente µg de catecol por miligrama de matéria seca (Spanos & Wrolstad, 1990).

#### **Determinação de Lignina**

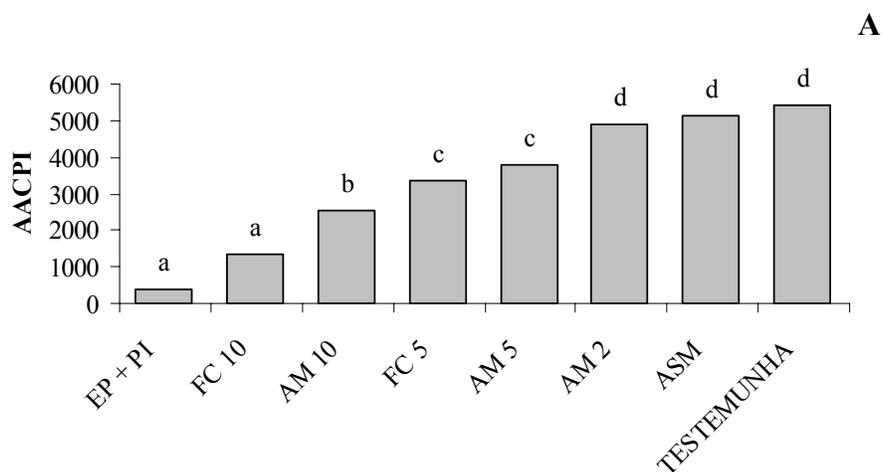
Um volume de 1,5 mL da água destilada foi adicionado ao resíduo proveniente do item descrito acima, homogeneizado e centrifugado a 12.000 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco a 65 °C por 15 h. Posteriormente, acrescentou-se um volume de 1,5 mL de solução contendo ácido tioglicólico e HCl 2M (proporção de 1:10). Em seguida, os micro tubos foram colocados em gelo para resfriar rapidamente por 10 min e centrifugados a 12.000 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 1,5 mL de NaOH 0,5 M e mantido em agitador rotativo por 15 h

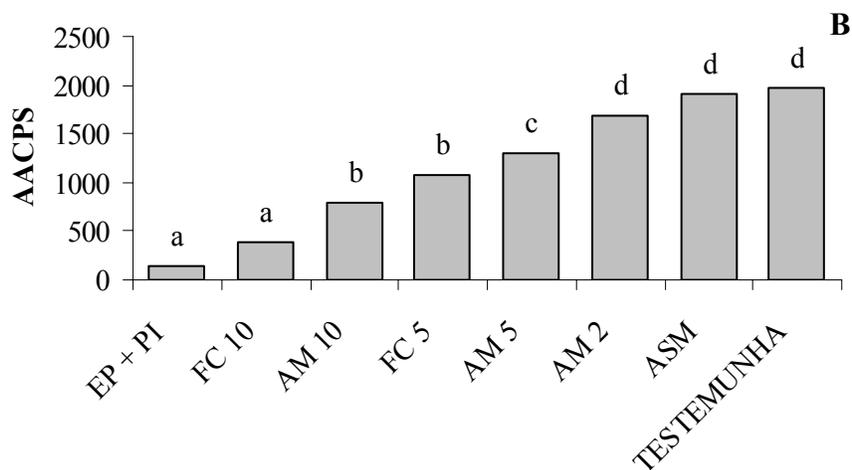
à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 12.000 g por 10 min, o sobrenadante foi transferido para novo micro tubo, adicionando-se ao precipitado 200 µL de HCl concentrado e mantido em câmara fria (4 °C) por 4 h, para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico. A seguir, a mistura foi centrifugada a 10.000 g por 10 min, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em 2 mL de NaOH 0,5 M. A absorbância dessa solução foi determinada em espectrofotômetro a 280 nm e os valores calculados com base na curva de lignina, sendo expressos em µg de lignina por grama de matéria seca (adaptado de Doster & Bostock, 1988).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Efeito dos produtos comerciais na intensidade da ferrugem

A incidência da ferrugem nos cafeeiros pulverizados com o fosfito de cobre (FC10) foi menor do que na testemunha e semelhante, estatisticamente, ao tratamento padrão - Epoxiconazol + Piraclostrobina. O FC10 proporcionou redução na área abaixo da curva de progresso de incidência da ferrugem (AACPI) de 75% quando comparada com a testemunha (Figura 1A). O efeito do tratamento na severidade foi similar à variável incidência, o que evidencia efeito significativo desse tratamento. A área abaixo da curva de progresso de severidade (AACPS) foi inferior à testemunha em 81% (Figura 1B).





**Figura 1.** Área abaixo da curva de progresso de incidência da doença (AACPI) (A) e da severidade (AACPS) (B). Tratamentos com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott ( $P < 0,05$ ). ASM – acibenzolar-S-metil; EP + PI – Epoxiconazol + Piraclostrobina; FC - fosfito de cobre; AM – Agro-Mos. O número após cada sigla representa a dosagem utilizada em mL.L<sup>-1</sup>.

Vários trabalhos também relatam a eficiência de fosfitos em reduzir doenças em plantas, principalmente, doenças causadas por oomycetos (Foster et al., 1998). Destes estudos, porém, muitos foram realizados com fosfitos de potássio, sendo praticamente inexistentes os estudos com fosfito de cobre. Bizi (2006) avaliou o efeito de vários produtos químicos não fungicidas no controle de mofo cinzento (*Botrytis cinérea*) e oídio (*Oidium* sp) em mudas de eucalipto (*Eucalyptus benthamii*). A autora observou que o fosfito de cobre na dose de 0,1mL mL<sup>-1</sup> apresentou menor valor de severidade (2,05) de mofo cinzento, diferindo estatisticamente da testemunha (2,63), entretanto, esse produto não foi eficiente em controlar oídio. A ineficiência do fosfito de cobre pode estar relacionada à sensibilidade das mudas de eucalipto, que apresentaram fitotoxidez quando aplicadas doses recomendadas para o controle desta doença. Assim,

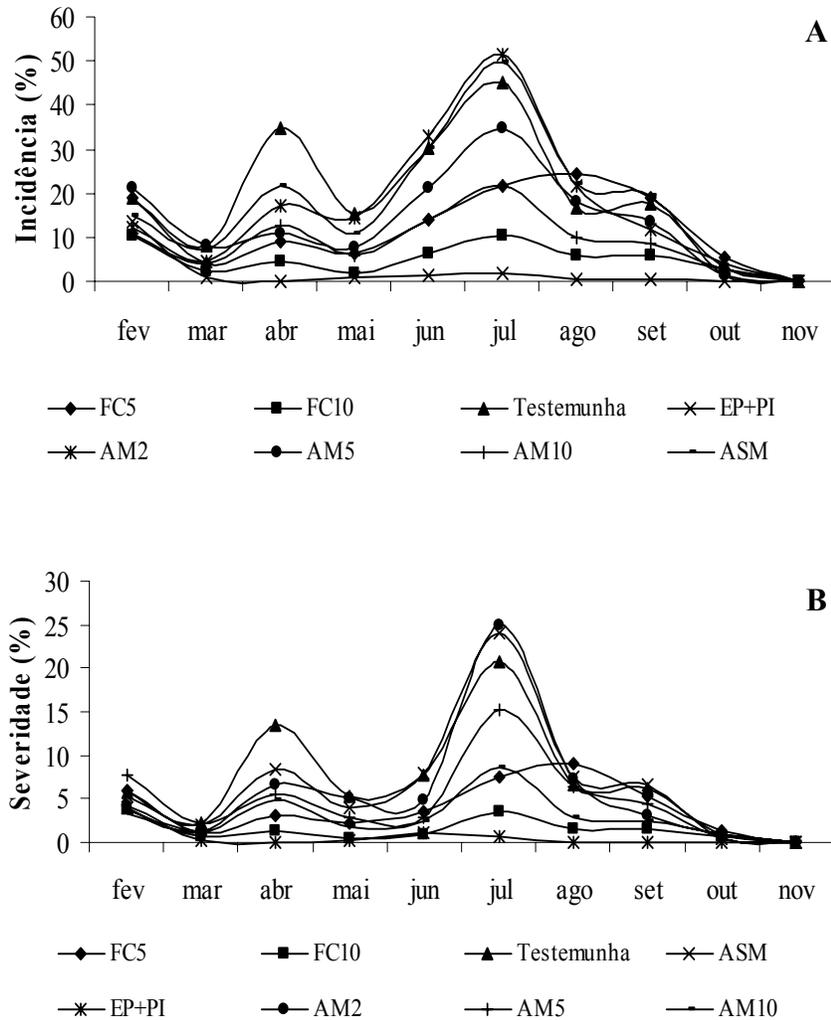
doses mais baixas foram testadas até o desaparecimento da fitotoxidez, tornando os produtos menos eficientes.

No presente trabalho, o tratamento AM 10 (Agro-Mos 10mL L<sup>-1</sup>), apesar de proporcionar área abaixo da curva de progresso de incidência (AACPI) e severidade (AACPS) da ferrugem de 53% e 60%, respectivamente, em relação à testemunha, apresentou fitotoxidez. Para os tratamentos AM 5 e AM 2 não ocorreu fitotoxidez, porém, não houve diferenças estatísticas para o tratamento AM 2 quando comparado com a testemunha (Figura 1 A e B). Assim, tornam-se necessários estudos com doses entre 10mL L<sup>-1</sup> e 5mL L<sup>-1</sup>. O Agro-Mos® já vem sendo utilizado no manejo de doenças em culturas como manga, uva e em tratamentos pós-colheita de mamão e manga e tem apresentado bons resultados. Assim, Dantas et al. (2004) estudaram o efeito de indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita e verificaram que o Agro-Mos foi eficiente no controle da antracnose, com redução na incidência em torno de 70% quando comparado à testemunha em tratamentos pré e pós-colheita. Gomes et al. (2007) avaliaram o efeito de fosfito de potássio e de Agro-Mos na proteção de duas cultivares, 'Itália' e 'Cabernet Sauvignon', de uva contra o mildio e oídio. Tanto o fosfito de potássio quanto o Agro-Mos (aplicação a cada 7 dias), reduziram a severidade de oídio em 51% e 52%, respectivamente, quando comparados à testemunha, nas duas cultivares., O Agro-Mos® no intervalo de 15 dias de aplicação e o fosfito de potássio reduziram a severidade de mildio em 29% e 40%, respectivamente, na cultivar 'Cabernet Sauvignon'.

O Acibenzolar-S-metil não apresentou efeito protetor (Figura 1 A e B), tal resultado concorda com outros trabalhos (Cavalcanti et al., 2000; Guzzo et al., 2001). Nem sempre o efeito de um composto químico, obtido em laboratório, corresponde à sua performance em campo devido à decomposição do produto em compostos pouco tóxicos, lavagem pela chuva e cobertura desuniforme na folhagem (Costa et al., 2007).

De acordo com a curva de progresso da doença, o mês de julho apresentou maior intensidade da ferrugem (Figura 2 A e B).

Na maioria das regiões produtoras, a curva de progresso da ferrugem, segue padrão bem definido, com pico máximo em junho e decrescendo em seguida, devido à queda prematura de folhas provocada pela colheita, senescência natural e também devido à alta severidade provocada pela própria doença nos anos agrícolas de alta produção (Vale et al., 2004). Chalfoun et al. (2001), observaram que a ocorrência na modificação das curvas de progresso da ferrugem e nas condições climáticas entre os anos de 1991 a 1995 são atribuídas pela ocorrência de temperaturas médias próximas à ideal para a ocorrência e progresso da doença, bem como a ocorrência de chuvas ocasionais, em frequência e intensidade suficientes para permitir o seu progresso, principalmente, durante os meses de abril a julho (outono/inverno). No presente estudo, no entanto, a curva de progresso da intensidade da ferrugem, ao longo dos meses para o tratamento com fosfito de cobre 10 (FC10), manteve-se sempre abaixo de 10% e 5%, para a incidência e severidade, respectivamente, mesmo com picos em julho (Figura 2 A e B). Assim, pode-se comparar a eficiência do FC 10 com o tratamento padrão que, ao longo dos meses, também apresentou baixa intensidade da doença.



**Figura 2** Curva do progresso da incidência (A) e da severidade da ferrugem do cafeeiro em função dos tratamentos (B). ASM – acibenzolar-S-metil; EP + PI – Epoxiconazol + Piraclostrobina; FC - fosfito de cobre; AM – Agro-Mos. O número após cada sigla representa a dosagem utilizada em mL L<sup>-1</sup>.

### Determinação de lignina e compostos fenólicos totais

Os teores de lignina e compostos fenólicos totais do tratamento com fosfito de cobre 10 (FC10), não diferiram dos demais tratamentos. Não foi

encontrada nenhuma correlação entre teor de lignina e compostos fenólicos totais ou AACPS ou AACPI (Tabela 2).

**Tabela 2.** Correlação entre teor de lignina, compostos fenólicos totais, AACPS e AACPI em folhas de café.

Variáveis	AACPS	AACPI
Lignina	0,0928 <sup>ns</sup>	0,0458 <sup>ns</sup>
Fenóis totais	-0,2495 <sup>ns</sup>	-0,2549 <sup>ns</sup>

Correlação com base no coeficiente de correlação de Pearson; <sup>ns</sup> Não significativo.

Provavelmente, não houve diferenças e correlações significativas para os teores de lignina e fenóis devido ao fato das amostragens (coletas) serem realizadas com folhas ainda não totalmente expandidas.

Nem todos os fenóis têm função conhecida e alguns deles parecem atuar como simples intermediários do metabolismo da planta (Beckman, 2000). Compostos fenólicos, porém, nas células vegetais, em alta concentração ou quando oxidados de fenóis simples à quinonas, podem constituir-se em componente de defesa do vegetal contra fatores externos (Pascholati & Leite, 1995). Nojosa (2003) observou que folhas de cafeeiro fisiologicamente mais velhas apresentaram maior quantidade de lignina, o qual tem correlação direta com a resistência contra *Phoma costaricensis*. Segundo Rengel et al. (1993), avaliando o acúmulo de fenóis e lignina em plantas de trigo infectadas com *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* Walker, sob diferentes doses de Mn no solo, verificaram que, mesmo que se os aumentos dos teores de lignina e fenóis se relacionassem positivamente com a resistência do trigo ao mal-do-pé, o parâmetro de resistência do hospedeiro eram as concentrações de fenóis e de lignina no ponto de infecção e não aos teores totais desses compostos nos tecidos.

No presente estudo, os resultados obtidos demonstraram que o fosfito de cobre (FC 10) reduziu a incidência da ferrugem em 75% em relação aos percentuais de doenças observados na testemunha.

Nos testes bioquímicos realizados com folhas provenientes do campo, não houve diferença significativa nos tratamentos em relação a lignina e fenóis totais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BECKMAN, C. H. Phenolics-Storing cells: Keys to programmed cell death and periderm formation in disease resistance and in general defence responses in plants? **Physiological Molecular Plant Pathology**, v. 57, p. 101-110, 2000.

BIZI, R. M. **Alternativas de controle de mofo-cinza e oídio em mudas de eucalipto**. 2006. 80 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CAVALCANTI, L. S. **Indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb. em plântulas de cacaueteiro por Benzotiadiazole (BTH)**. 2000. 82 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CAVALCANTI, F. R.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; PEREIRA, R. B.; ZACARONI, A. B.; VILLAS BOAS, C. H.; RESENDE, M. L.V. Natural extracts induce lignification on cocoa and tomato leaves In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS, 2.; SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: Ufla, 2004. p. 107.

CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. L.; PEREIRA, M. C. Efeito de alterações climáticas sobre o progresso da ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) no cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 5, p. 1248-1252, set. 2001.

COSTA, M. J. N.; ZAMBOLIM, L.; RODRIGUES, F. A. Avaliação de produtos alternativos no controle da ferrugem do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 150-155, jan./fev. 2007.

CUNHA, R. L.; POZZA, E. A.; DIAS, W. P.; BARRETTI, P. B. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para avaliar a severidade da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Resumos...** Brasília: Embrapa, 2001. p. 77-78.

DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R. S. B.; SILVA, R. L. X. da. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, Brasília, v. 30, p. 314-319, 2004.

DOSTER, M. A.; BOSTOCK, R. M. Quantification of lignin formation in almond bark in response to wounding and infection by *Phytophthora* species. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, p. 473-477, 1988.

FAZENDA ARIZONA. **AgroMos 2000**: entendendo o modo de ação. Disponível em: <<http://www.fazendaarizona.com/textos/agromos2000.htm>>. Acesso em: 16 fev. 2008.

FERREIRA, D. F. SISVAR – Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows, versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FOSTER, H.; ADASCAVEG, J. E.; KIM, D. H.; STHANGELINE, M. E.; Efect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility of pepper to *Phytophthora* root and crown rot in hydroponic culture. **Plant Disease**, St. Paul, v. 82, n. 10, p. 1165-1171, Oct. 1988.

GOMES, E. C. S.; PEREZ, J. O.; BARBOSA, J.; NASCIMENTO, E. F.; AGUIAR, I. F. Efeito de indutores de resistência na proteção de uva 'Itália' e uva de vinho 'Cabernet Sauvignon' contra o oídio e o míldio no Vale do São Francisco. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 2., 2007, João Pessoa. **CONNENPI 2007...** João Pessoa: REDENET/CEFET-PB, 2007.

GUZZO, S. D.; CASTRO, R.M. DE; KYDA, K.; MARTINS, E. M. F. Ação protetora do acibenzolar-Smethylem plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 89-94, jan./jun. 2001.

JACKSON, T. J.; BURGESS, T.; COLQHOUN, I.; HARDY, G. E. S. Action of the fungicide phosphate on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 49, n. 1, p. 147-154, Jan. 2000.

KNIGHT, S.C.; ANTHONY, V. M.; BRADY, A. M.; GREENLAND, A. J.; HEANEY, MURRAY, D. C.; POWELL, K. A.; SCHULTZ, M. A.; SPINKS, C. A.; WORTHINGTON, P. A.; YOULE, D. Rationale and perspectives on the development of fungicides. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 349-372, 1997.

NOJOSA, G. B. de A. **Efeito de indutores na resistência de *Coffea arabica* L. a *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. e *Phoma costarricensis* Echandi.** 2003. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 1995. v. 1.

RENGEL, Z.; GRAHAM, R. D.; PEDLER, J. F. Manganese and accumulation of phenolics and lignin as related to differential resistance of wheat genotypes to the take all fungus. **Plant and soil**, Dordrecht, v. 151, n. 2, p. 255-263, Apr. 1993.

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. In: THE INTERNATIONAL JOINT WORKSHOP ON PR-PROTEINS AND INDUCED RESISTANCE. 2004, Elsinore. **Abstract Book...** Elsinore: Universitas Friburgensis, 2004. p. 79.

REUVENI, R.; AGAPOV, V.; REUVENI, M. Foliar spray of phosphates induces growth increase and systemic resistance to *Puccinia sorghi* in maize. **Plant Pathology**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 245-250, Apr. 1994.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n. 80, p. 1183-1186, Aug. 1977.

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

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

UKNES, S.; MORRIS, S.; VERNOOIJ, B.; AND RYALS, J. The role of benzoic acid derivatives in systemic acquired resistance. In: ROMERO, J. T.; SAUNDERS, J. A.; BARBOSA, P. (Eds.). **Recent Advances in Phytochemistry. Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions**. New York: Plenum, 1996.

VALE, F. X. R.; JESUS JUNIOR, W. C.; ZAMBOLIM, L. **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perfil, 2004. 532 p.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; PEREIRA, A. A.; CHAVES, G. M. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Eds.) **Controle de doenças de plantas**. Viçosa, MG: Suprema, 1997. p. 83-180.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. Princípios de Fitopatologia. In: \_\_\_\_\_. **Curso de Proteção de Plantas: módulo 5**. Brasília: ABEAS, 1999.

### ARTIGO 3

## **DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS NA RESPOSTA DE DEFESA DE CAFEIEIRO CONTRA *Cercospora coffeicola* INDUZIDOS POR FOSFITO DE COBRE E ACIBENZOLAR-S-METIL EM MISTURA COM EXTRATO VEGETAL**

(Preparado de acordo com as normas da revista “Fitopatologia Brasileira”)

Márcia Toyota<sup>1</sup>, Mário Lúcio V. Resende<sup>1</sup>, Pedro M. Ribeiro Júnior<sup>2</sup>, Daniel R. Amaral<sup>1</sup>, Jadir B. Pinheiro<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, CEP 37200-000, Caixa postal 3037, Lavras, MG, Brasil,  
e-mail: mtoyota2005@yahoo.com.br;  
(Aceito para publicação em / / )

Autora para correspondência: Márcia Toyota

---

Toyota, M., Resende, M. L. V., Ribeiro Junior, P. M., Amaral, D. R., Pinheiro, J. B. Determinação da atividade de enzimas na resposta de defesa de cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* induzidos por fosfito de cobre e acibenzolar-s-metil em mistura com extrato vegetal. Fitopatologia Brasileira.

## RESUMO

O presente trabalho visou estudar os mecanismos envolvidos na resposta de defesa de plantas de café tratadas com a mistura EFID + ASM e fosfito de cobre (Fulland®) contra *Cercospora coffeicola*. Observou-se que fosfito de cobre e EFID + ASM proporcionaram aumentos na atividade de peroxidases aos 21 e 11 dias, após a pulverização, respectivamente. Plantas tratadas com esses produtos, apresentaram aumentos na atividade de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases. Quanto ao teor de lignina, não houve diferença significativa nos tratamentos. Observou-se também que houve maior produção de fenóis totais em plantas tratadas com EFID + ASM e fosfito de cobre, quando comparada com a testemunha.

**Palavras – chave adicionais:** *Coffea arabica*, cercosporiose, peroxidase, quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, lignina, fenóis totais.

## **ABSTRACT**

This investigation was aimed at studying the mechanisms of defense involved in the response of coffee plants treated with a mixture of EFID + ASM and copper phosphite (Fulland®) against *Cercospora coffeicola*. The treatments were selected according to experiments conducted previously. The experiment was conducted at the Plant Pathology Department of UFLA. It was observed that copper phosphite and EFID + ASM provided increases in the activity of peroxidases at 21 and 11 days after spraying, respectively. Plants treated with these products showed increases in the activities of chitinases and  $\beta$ -1, 3 - glucanases. As to the content of lignin, there was no significant difference among treatments. A higher content of total phenolics was also observed in plants treated with EFID + ASM and copper phosphite, compared to the control.

**Keywords:** *Coffea arabica*, cercosporiose, peroxidase, chitinase,  $\beta$ -1, 3 - glucanase, lignin, total phenols.

## INTRODUÇÃO

A cercosporiose ou "mancha-de-olho-pardo", causada por *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke, é uma das principais doenças da fase de viveiro da cultura do café (*Coffea arabica* L.). e possui como características a desfolha, redução no desenvolvimento e raquitismo, tornando-se impróprias para o plantio.

A crescente preocupação com a qualidade ambiental e padrões de produção agrícola, além do aumento da demanda por produtos saudáveis, tem levado à busca de informações por práticas de produção favoráveis à conservação e qualidade do meio ambiente (Campanhola & Bettioli, 2003). Neste contexto, destacam-se os métodos de controle alternativos de doenças em plantas, como o uso de indutores ou eliciadores com objetivo de induzir a Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) (Mazaro, 2007).

A RSA pode ser conceituada como um mecanismo de defesa induzido por agentes bióticos ou abióticos como, por exemplo, ácido salicílico e seu análogo acibenzolar-S-metil (ASM), que conferem proteção à planta a um amplo espectro de microorganismos (Durrant & Dong, 2004). A resposta das plantas pode ser, por exemplo, o acúmulo de fitoalexinas, lignina, peroxidases e de proteínas relacionadas à patogênese (Pascholati, 1998).

Os extratos vegetais são considerados como eliciadores bióticos (Pascholati & Leite, 1995), cuja eficiência no controle de fitopatógenos é observada em diversos patossistemas (Bonaldi et al., 2004; Guzzo et al, 1987). Extratos aquosos de folhas de café infectadas com *Hemileia vastatrix* foram eficazes no controle de *Phoma costaricensis*, em experimentos com folhas destacadas, em que aplicação preventiva do extrato promoveu proteção contra o supracitado patógeno, com 28% na diminuição na porcentagem da doença em relação à testemunha inoculada (Barguil, 2004).

Avanços nas pesquisas com resistência induzida em plantas são acompanhados pelo surgimento de novos produtos comerciais que apresentam maior eficácia, estabilidade e menor impacto ao ambiente, sendo capazes de propiciar melhora na produtividade agrícola, devido à redução de perdas ocasionadas por patógenos e, em alguns casos, incrementos no desenvolvimento vegetativo (Resende et al., 2006). O ASM foi o primeiro indutor de resistência liberado para uso comercial (Lyon & Newton, 1997) e, atualmente, muitos outros produtos já estão disponíveis no mercado ou em fase de pesquisa (Resende et al., 2006). Dentre esses produtos comerciais, a utilização de fosfitos apresenta importância no controle de doenças. O fosfito é comercializado há algum tempo na forma de etil fosfonato (Fosetyl-Al) e, recentemente, como sal de potássio, com indicação para o controle dos fungos do gênero *Phytophthora* e dos fungos de podridões do colo, raiz, tronco e frutos. São poucos, contudo, os trabalhos realizados com fosfito de cobre no manejo de doenças em plantas (McDonald, 2001).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de fosfito de cobre e extrato de folhas de café infectadas com *H. vastatrix* (EFID) em mistura com acibenzolar-S-metil sobre as atividades de proteínas PR, quitinase, peroxidase e beta-1,3-glucanase, além de fenóis totais e a deposição de lignina em folhas de mudas de cafeeiro.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo do Departamento de Fitopatologia da UFLA, Lavras - MG.

É importante salientar que a forma de processamento do extrato vegetal de folhas de café infectadas por ferrugem (EFID) e a composição do mesmo encontra-se sob sigilo de patente. O fosfito de cobre (Fulland®) foi adquirido junto à Empresa Sudoeste (Araxá-MG) e ASM – Acibenzolar-S-metil (Bion® 500wg) da Syngenta Proteção de Cultivos (São Paulo-SP).

### **Caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa**

Para a determinação dos mecanismos, foram utilizadas mudas de café cultivar ‘Mundo Novo’ com 90 dias de idade. Esse experimento foi realizado em casa de vegetação, com o intuito de fornecer material foliar para a determinação das atividades das enzimas peroxidase de guaicol (POX; EC 1.11.1.7), quitinase (CHI; EC 3.2.1.14),  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU; EC 3.2.1.6), além da deposição de lignina solúvel e fenóis solúveis totais nos seguintes tratamentos: ASM (0,2g L<sup>-1</sup>), mistura entre EFID e ASM (100g L<sup>-1</sup> e 0,2g L<sup>-1</sup>) e Fosfito de cobre - Fulland® (10mL L<sup>-1</sup>) inoculados e não inoculados com *C. coffeicola*, além de duas testemunhas: uma inoculada com *C. coffeicola* e não pulverizada com os tratamentos e outra absoluta (plantas pulverizadas somente com água).

Foram utilizadas 3 repetições de 3 plantas cada por tempo de coleta por tratamento. A inoculação do patógeno foi realizada com 6 dias e as coletas das amostras foliares foram realizadas nos tempos 0, 0,25, 0,5, 1, 3, 7, 11, 14 e 21 dias após a aplicação do eliciador. As amostras coletadas foram protegidas com papel alumínio, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer a -80°C, até o preparo dos extratos para as análises bioquímicas.

### **Preparo de extratos foliares para avaliação de proteínas totais e atividade de peroxidase de guaiacol, quitinase e $\beta$ -1,3-glucanase**

A partir dos tecidos foliares coletados, procedeu-se à maceração dos mesmos em nitrogênio líquido, por meio de almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, adicionou-se o tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, durante 3 minutos (10mL de tampão para cada grama de amostra) sobre banho de gelo. Após filtração em pano de trama fina, a solução foi centrifugada a 12000 g por 15 min e o sobrenadante foi usado como fonte enzimática. Todos os procedimentos para obtenção do extrato enzimático foram executados em 0-4°C.

#### **Proteínas Totais**

O nível de proteína total solúvel foi aferido com a utilização de um padrão de albumina sérica bovina (BSA) ajustado para 100 $\mu$ L do extrato enzimático, conforme ensaio de Bradford (1976).

#### **Peroxidase de guaiacol (POX; EC 1.11.1.7)**

A atividade de peroxidases de guaiacol (POX) foi determinada pela adição de 100 $\mu$ L do extrato enzimático ajustado para 2 mL de solução, contendo 900 $\mu$ L de acetato de sódio 50 mM pH 5,2, 500 $\mu$ L de guaiacol 20mM e 500 $\mu$ L peróxido de hidrogênio 60 mM. Após incubação em 30°C por 10 min, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 480 nm (Urbanek et al., 1991). Uma unidade POX foi expressa como variação de 1 OD<sub>480</sub> por miligrama de proteína solúvel por minuto ( $\Delta$  <sub>480nm</sub> mgP<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>).

#### **Quitinase (CHI; EC 3.2.1.14)**

Atividade de quitinases foi determinada pela adição de 100 $\mu$ L do extrato enzimático ajustado para 320 $\mu$ L de uma solução com acetato de sódio 50mM pH

5,2 e 70 $\mu$ L de CM-Chitin-RBV (2mg mL<sup>-1</sup>), um substrato específico para quitinases fornecido por LOEWE Biochemica GmbH, em micro-placas de 96 cavidades, com volume de 350 $\mu$ L por cavidade. Após incubação a 35°C por 80 min., as amostras foram acidificadas com 50 $\mu$ L de HCl 0,5N, resfriadas em banho de gelo por 10 min e centrifugadas (1450g por 10 min) a 4°C.

Uma alíquota de 200 $\mu$ L do sobrenadante de cada amostra foi transferida para nova micro-placa para leitura em 492nm, em um leitor EIA-compatível (Wirth & Wolf, 1990). A atividade CHI foi expressa pela variação de 1 OD<sub>492</sub> por miligrama de proteína solúvel por minuto ( $\Delta$  <sub>492nm</sub> mgP<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>).

#### **$\beta$ -1,3-glucanase (GLU; EC 3.2.1.6)**

A atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase foi medida de modo análogo ao da quitinase, apenas com substituição do substrato para CM-Curdlan-RBB (4 mg mL<sup>-1</sup>; LOEWE Biochemica GmbH). Para promover ação hidrolítica de  $\beta$ -1,3-glucanase foi adotado tempo de incubação de 35°C por 80 min. As amostras foram submetidas a um mix de 5'' e, posteriormente, medidas fotometricamente em filtro de 620 nm de um leitor EIA (Wirth & Wolf, 1990). A atividade GLU foi expressa pela variação de 1 OD<sub>620</sub> por miligrama de proteína solúvel por minuto ( $\Delta$  <sub>620nm</sub> mgP<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>).

Todos os ensaios enzimáticos foram conduzidos em triplicatas.

#### **Preparo de amostras foliares para avaliação de lignina solúvel e 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 12 h (Liofilizador L101, marca Liobras). Uma alíquota de 30 mg do material liofilizado foi transferida para micro tubo de 2 mL e homogeneizada com 1,5 mL de metanol a 80% e mantida sob agitação por 15 h

em agitador rotativo, protegido da luz à temperatura ambiente. A solução foi centrifugada a 12.000 g por 5 min. O sobrenadante (extrato metanólico) foi transferido para novo micro tubo, com o qual se realizou a determinação de fenóis solúveis totais, enquanto o resíduo sólido foi utilizado para determinação de lignina solúvel.

### **Determinação de lignina solúvel**

Foi adicionado ao resíduo sólido 1,5 mL de metanol 80%, homogeneizado e centrifugado a 12.000g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco a 65°C por 15 h. Posteriormente foram acrescentados 1,5mL de solução de ácido tioglicólico:HCl 2M (1:10). Em seguida, agitaram-se suavemente os micro tubos para hidratar o resíduo e esses foram colocados em banho-maria a 100°C por 4 horas.

Posteriormente, os micro-tubos foram centrifugados a 10.000g por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,5mL de água ultra pura e novamente centrifugado a 10.000g por 10 min.

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 1,5 mL de NaOH 0,5M e mantido em agitador rotativo por 15 h à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 10.000g por 10 min e o sobrenadante transferido para novo micro tubo, onde foi adicionado 200 µL de HCl concentrado. A suspensão obtida foi mantida em câmara fria (4°C) por 4 h para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico.

A seguir, a mistura foi centrifugada a 10.000g por 10 min, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensão em 2 mL de NaOH 0,5M.

A absorbância desta solução foi determinada em espectrofotômetro a 280 nm e os valores calculados com base na curva de lignina, sendo expressos em µg de lignina solúvel por miligrama de matéria seca (adaptado de Doster & Bostock, 1988).

### **Determinação de fenóis solúveis totais**

Alíquota de 150 $\mu$ L do extrato metanólico foi misturada a 150 $\mu$ L do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25N por 5 min, homogeneizada com 150 $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M por 10 min e diluída com 1 mL de água ultra pura à temperatura ambiente por uma hora.

Os valores de absorbância dessa reação foram determinados a 725 nm em espectrofotômetro e calculados com base na curva de catecol. Os compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente  $\mu$ g de catecol por miligrama de matéria seca (Spanos & Wrolstad, 1990).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

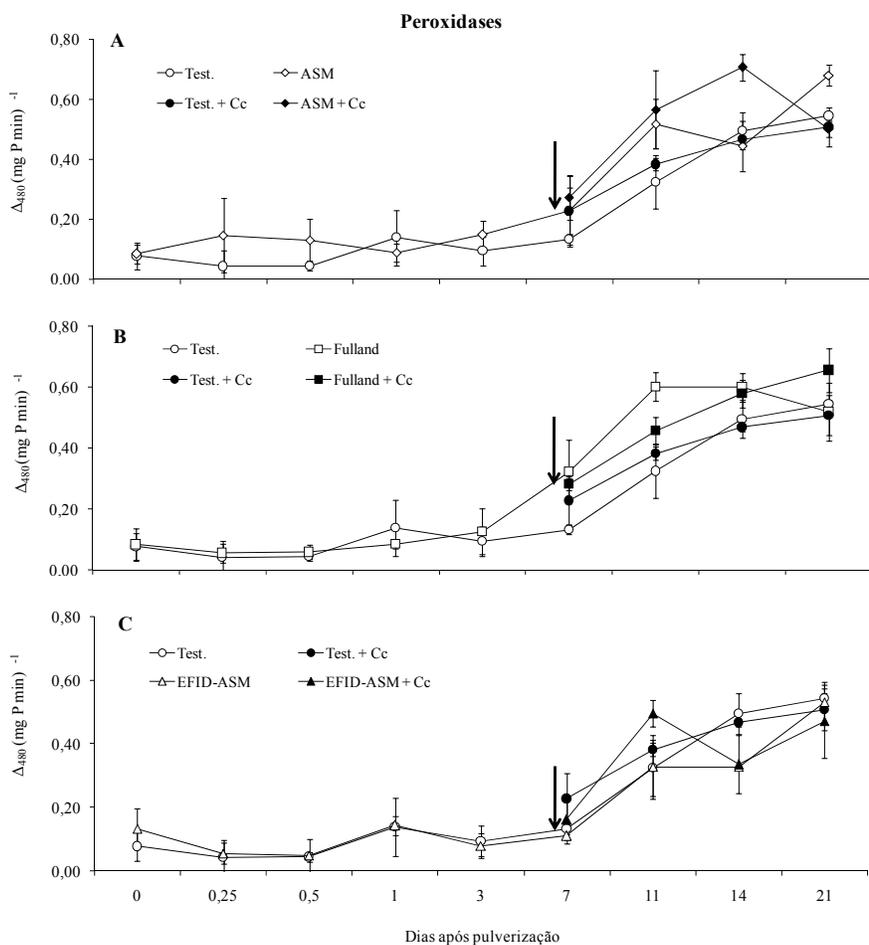
### Peroxidase de guaicol (POX; EC 1.11.1.7)

A atividade de peroxidases em plantas tratadas com ASM e inoculadas com *C. coffeicola* foi maior em relação à testemunha, aos 11 e 14 dias após a pulverização, cerca de 151 e 80% superior, respectivamente, enquanto que plantas tratadas com o ASM, sem inoculação, apresentaram a maior atividade dessa enzima aos 21 dias após a pulverização (Figura 1 A). Resultados semelhantes foram observados por Amaral (2005), em estudo com o mesmo patossistema, em que a atividade da peroxidase em plantas tratadas com ASM e inoculadas com o patógeno, apresentaram pico aos 15 dias após a pulverização. Em alguns patossistemas, esse pico de atividade ocorre antes dos 15 dias. Em plantas de tomate tratadas com ASM sem inoculação e inoculadas, o pico de produção da peroxidase ocorreu aos 9 dias (Ribeiro Júnior et al., 2004). Os tratamentos com ASM inoculado e sem inoculação foram superiores aos observados na testemunha absoluta e inoculada (Figura 1 A).

As plantas pulverizadas com fosfito de cobre apresentaram o máximo de atividade da peroxidases aos 11 dias após a aplicação do produto. A produção dessa enzima, entretanto, decresceu até os 21 dias após a pulverização. Para o tratamento fosfito de cobre com inoculação do patógeno, a produção da peroxidase aumentou linearmente, com pico aos 21 dias após a pulverização (Figura 1 B). Segundo Nojosa (2003), a atividade de peroxidases em plantas tratadas com os produtos ASM, AS (ácido salicílico) e fosfito de potássio, isoladamente e inoculadas com *Hemileia vastatrix*, apresentaram atividade superior às testemunhas absoluta e inoculada. Ribeiro Júnior et al. (2005), contudo, observaram que o fosfito de potássio não apresentou efeito sobre a atividade dessa enzima em mudas de cacaueiro contra *Verticillium dahliae*.

A atividade de peroxidases em folhas de mudas de café, após tratamento com EFID + ASM e inoculadas com o patógeno, apresentou pico de produção

aos 11 dias após a aplicação do produto. Aos 21 dias, porém, não houve diferença com as testemunhas absoluta e inoculada (Figura 1 C). As peroxidases de plantas participam em diversos processos fisiológicos, dentre eles a formação de lignina. A atividade desta enzima é frequentemente aumentada em resposta aos estresses, ataque de patógenos e tratamentos com indutores, sendo a proteção celular contra reações oxidativas também uma das principais funções das enzimas (Anterola & Lewis, 2002).



**Figura 1.** Atividade de peroxidases de guaiacol (POX), A, B e C, em folhas de mudas de cafeeiro, após tratamentos com: ASM – acibenzolar-S-metil, Fulland e EFID e ASM em mistura, comparados com a testemunha. Setas indicam inoculação com *Cercospora coffeicola* (Cc) 6 dias após pulverização. Barras de erros indicam desvio padrão da média.

### Quitinase (CHI; EC 3.2.1.14) e $\beta$ -1,3-glucanase (GLU; EC 3.2.1.6)

Os tratamentos ASM e EFID + ASM, sem inoculação e com inoculação de *C. coffeicol*, apresentaram aumento na atividade de quitinases, com pico aos 21 dias após a pulverização, em relação à testemunha inoculada e absoluta (Figura 2 A e 2C). Plantas pulverizadas com fosfito de cobre apresentaram pico

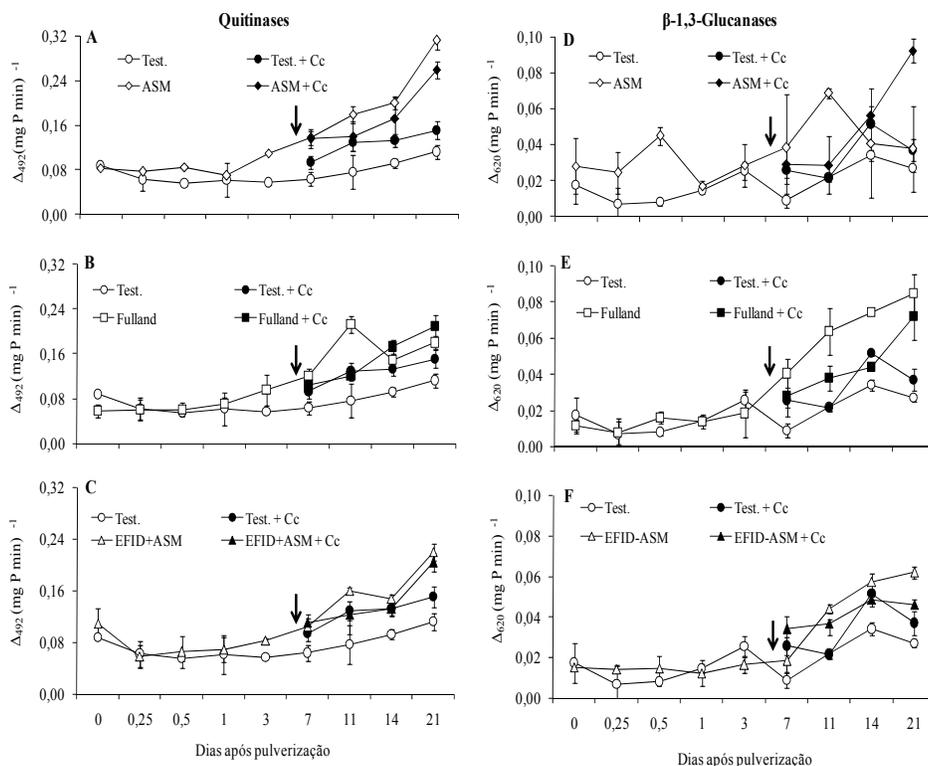
da atividade dessa enzima aos 11 dias após a pulverização. Aos 14 dias, no entanto, após a pulverização, não houve diferenças deste produto em relação às testemunhas inoculada e absoluta e Fulland inoculado (Figura 2 B).

Em plantas tratadas com ASM verificou-se maior atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase aos 0,5 dias e 11 dias após a pulverização. O tratamento ASM com inoculação do patógeno apresentou pico aos 21 dias após a pulverização. O fosfito de cobre induziu a atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases a partir do sexto dia após a pulverização. Plantas tratadas com fosfito de cobre e inoculadas, também, induziram a produção dessa enzima, apresentando maior atividade aos 21 dias após a pulverização (Figura 2 E).

Em relação ao tratamento EFID + ASM, a atividade da enzima apresentou aumento a partir de 11 dias após a pulverização (Figura 2 F). Não foi observada mudança na atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases na testemunha absoluta (Figura 2).

Em plantas de feijão tratadas com ASM também foi relatado aumento da atividade das quitinases e das  $\beta$ -1,3-glucanases, sendo que o aumento destas enzimas foi maior quando receberam o indutor ASM, porém, decorridos 14 dias o nível de atividade retornava a valores próximos ao controle (Kuhn, 2007).

Entre as proteínas-RPs mais pesquisadas estão as  $\beta$ -1,3-glucanases e as quitinases, que apresentam atividade antimicrobiana hidrolítica com quebra de polímeros estruturais presentes na parede dos patógenos, sendo expressas na RSA, associadas à cascata de sinais do ácido salicílico, o qual é o sinalizador para a expressão dessas proteínas relacionadas à patogenicidade (Glazebrook, 2005, citado por Mazaro, 2007).



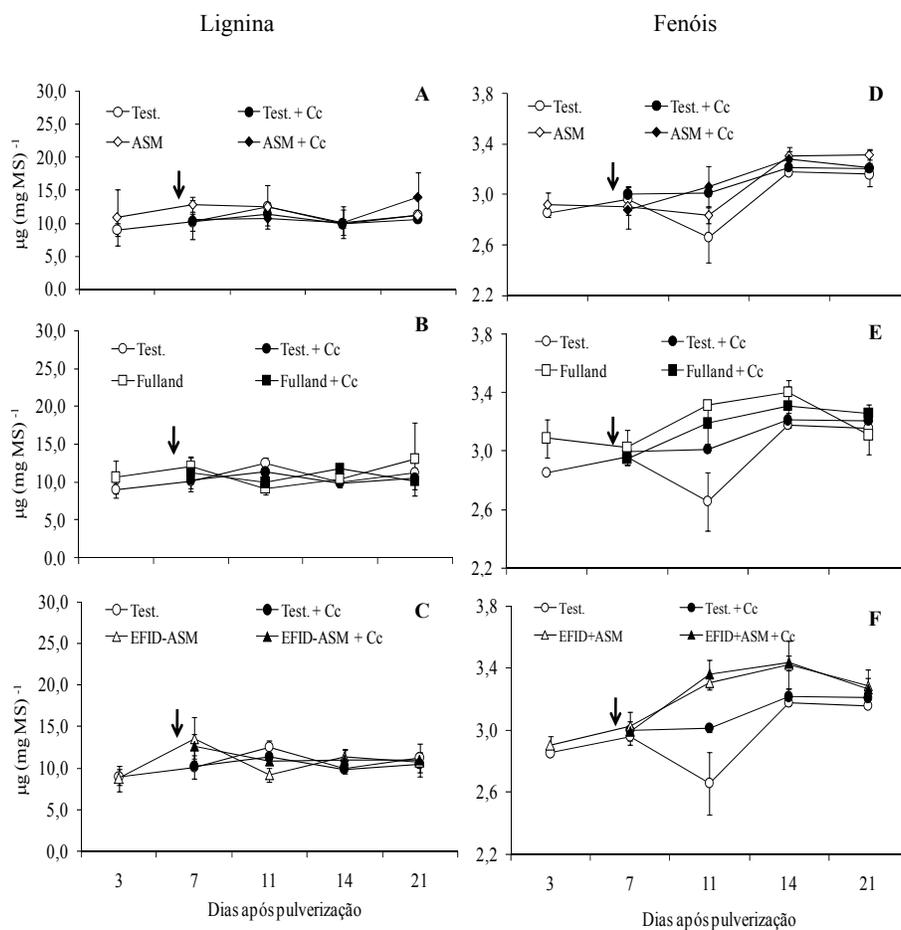
**Figura 2.** Atividade de quitinases (CHI), A, B e C, e de  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU), D, E e F, em folhas de mudas de cafeeiro, após tratamentos com: ASM – acibenzolar-S-metil, Fulland e EFID e ASM em mistura, comparados com a testemunha. Setas indicam inoculação com *Cercospora coffeicola* (Cc) 6 dias após pulverização. Barras de erros indicam desvio padrão da média.

### Lignina solúvel e Fenóis totais

A lignina é uma macromolécula fenólica, altamente complexa, sendo o segundo composto mais abundante nos tecidos vegetais. Sua estrutura ainda não é totalmente conhecida em função das dificuldades no processo de extração, mas acredita-se que ela seja originada da polimerização enzimática de monômeros de coniferil, sinapil e  $p$ -cumaril álcoois (Dence & Lin, 1992; Taiz & Zeiger, 1998). Os compostos testados não proporcionaram diferença significativa para o teor de lignina solúvel em ácido em nenhuma das datas onde foram realizadas as coletas

de tecidos (Figura 3 A, B e C). Alves et al. (2006), semelhantemente, não observaram diferenças entre teores de lignina em cafeeiros inoculados e não inoculados, tratados com ASM ou extrato de casca de café. Em outro estudo, Ribeiro Júnior et al (2006) observaram que o fosfito de potássio ( $1,25 \text{ mL.L}^{-1}$ ) não aumentou o conteúdo de lignina no patossistema cacau-*Verticillium dahliae*, não diferindo, estatisticamente, dos demais tratamentos, incluindo o ASM.

Em folhas de mudas de café inoculadas e não inoculadas com *C. coffeicola* e pulverizadas com ASM e fosfito de cobre não foram observadas diferenças no acúmulo de fenóis totais, em relação à testemunha inoculada e absoluta (Figura 3D e 3 E). Plantas tratadas com EFID + ASM, inoculadas e não inoculadas, apresentaram maior acúmulo de fenóis aos 14 dias após a pulverização (Figura 3 F).

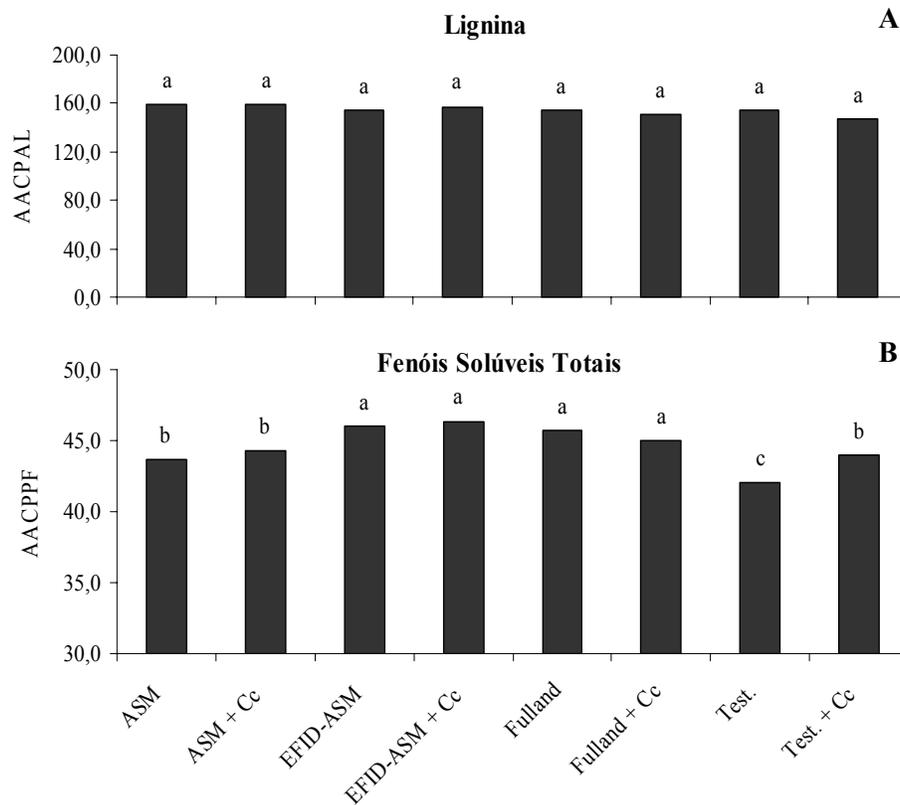


**Figura 3.** Acúmulo de lignina solúvel em ácido tioglicólico ( $\mu\text{g mg}^{-1} \text{MS}^{-1}$ ), A, B e C, e de fenóis solúveis totais ( $\mu\text{g de catecol mg}^{-1} \text{MS}^{-1}$ ), D, E e F, em folhas de mudas de cafeeiro, após tratamentos com: ASM – acibenzolar-S-metil, Fullland e EFID e ASM em mistura, comparados com a testemunha. Setas indicam inoculação com *Cercospora coffeicola* (Cc) 6 dias após pulverização. Barras de erros indicam desvio padrão da média.

Para a área abaixo da curva do progresso do acúmulo de lignina (AAPAL), entretanto, o indutor padrão (ASM), Fullland® e EFID + ASM não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos estudados (Figura 4 A).

Em relação a AACP da produção de fenóis, os tratamentos pulverizados com fosfito de cobre e EFID + ASM, com e sem inoculação de *C. coffeicola*,

apresentaram maior área abaixo da curva de progresso com diferenças estatísticas para os demais tratamentos (Figura 4 B).



**Figura 4.** Área abaixo da curva do progresso do acúmulo de lignina - AACPAL (A) e área abaixo da curva do progresso da produção de fenóis – AACPPF (B) em folhas de mudas de cafeeiro, após tratamentos com: ASM – acibenzolar-S-metil, e EFID e ASM em mistura comparados com a testemunha. “Cc” indica inoculação com *Cercospora coffeicola* 6 dias após pulverização. Médias com mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

Os compostos fenólicos estão entre os produtos do metabolismo secundário mais diversificados nas plantas. Muitos participam ou realizam

funções fisiológicas importantes nas plantas, como composição de lignina e defesa contra diversos estresses, incluindo patógenos fúngicos (Sánchez et al., 2000; Nicholson & Hammersmidt, 1992; Bennet & Wallsgrove, 1994; Kosuge, 1969, citados por Nojosa, 2003).

No presente estudo o fosfito de cobre e a mistura entre EFID + ASM foram capazes de promover o aumento na atividade de peroxidases e de duas proteínas relacionadas à patogênese (quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases), além de proporcionar maior produção de fenóis totais em mudas de cafeeiro.

Quanto ao teor de lignina, não houve diferença significativa nos tratamentos

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E.; PEREIRA, R. B.; FERREIRA, J. B.; BOREL, J. C.; RESENDE, M. L.V. Inibição da germinação de conídios de *Cercospora coffeicola* sob diferentes doses do extrato de casca de café e óleo essencial de tomilho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 307, ago. 2006. Suplemento.

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

BARGUIL, B. M. **Indução de resistência e reação de cultivares *Coffea arabica* L. a *Phoma costarricensis* Echandi**. 2004. 64 p. Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TESSMANN, D. J.; SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 128-134, mar./abr. 2004.

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**, Washington, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003, 279 p.

DOSTER, M.A.; BOSTOCK, R. M. Quantification of lignin formation in almond bark in response to wounding and infection by *Phytophthora* species. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 4, p. 473-477, Apr. 1988.

DENCE, C. W.; LIN, S. Y. Introduction. In: **Methods in lignin chemistry**. LIN, S.Y.; DENCE, C. W. Berlin: Springer-Verlag, 1992. p. 1-19.

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

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F.; MORAES, W. B. C. Induced protection of coffee plants to *Hemileia vastatrix*. I. Partial purification of the extracellular

inducer from heat-killed urediniospores of the pathogen. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 4, p. 377-385, dez. 1987.

KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção.** 2007. 140 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

LYON, G. D.; NEWTON, A. C. Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies? **Plant Pathology**, v. 46, p. 636-641, 1997.

MAZARO, S. M. **Indução de resistência à doenças em morangueiro pelo uso de elicitores.** 2007. Tese (Doutorado)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MCDONALD, A. E.; GRANT, B. R.; PLAXTON, W. C. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, n. 10, p. 1505-1519, 2001.

NOJOSA, G. B. de A. **Efeito de indutores na resistência de *Coffea arabica* L. a *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. e *Phoma costarricensis* Echandi.** 2003. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PASCHOLATI, S. F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos.** Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos.** 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 1995. v. 1. p.417-453.

RESENDE, M. L. V.; ARAUJO, D. V.; COSTA, J. C. B.; DEUNER, C. C.; FERREIRA, J. B.; MUNIZ, M. F.S.; REIS, S. N.; SANTOS, F. S.; CAVALCANTI, L. S.; NOJOSA, G. B. A. Produtos comerciais à base de bioindutores de resistência em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 14, p. 361-380, 2006.

RIBEIRO-JÚNIOR, P. M.; PEREIRA, R. B.; CAVALCANTI, F. R.; ZACCARONI, A. B.; RESENDE, M. L. V. Lignificação induzida por extratos

naturais e produtos comerciais em tomateiro infectado por *Xantomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 261, ago. 2004. Suplemento.

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

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

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologia Plantarum**, Warsaw, v. 13, n. 1, p. 43-50, 1991.

WIRTH, S. J.; WOLF, G. A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 12, n. 3/4, p. 197-205, Dec. 1990.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A intensa utilização de pesticidas, além do significativo incremento que estes insumos representam no custo de produção, pode resultar em diversas alterações ecológicas como o desequilíbrio ambiental, contaminação do solo/água e a seleção de pragas e patógenos resistentes. Ademais, a pressão exercida pela sociedade por uma produção de alimentos mais seguros e com qualidade ambiental tem exigido da pesquisa maior empenho em encontrar medidas alternativas de manejo fitossanitário, através de um modelo de sustentabilidade no qual se deve usar o mínimo de pesticidas possível e produtos de menor toxicidade para combater pragas e doenças. Uma opção de manejo que pode ser utilizada é o controle de doenças através da utilização de produtos naturais com extratos de plantas ou sub-produtos da cadeia produtiva do café, como casca de frutos. Assim, o grupo de pesquisa liderado pelo Prof. PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende busca alternativas através de estudos de diferentes formulações a base de extratos, em diferentes patossistemas, com o objetivo de potencializar os efeitos destes extratos com efeito comprovado, como o caso da formulação EFID. Também, busca-se inovar tecnologias de aplicação, através de combinações de extratos vegetais com produtos comerciais, como o indutor de resistência ASM e micronutrientes, a fim de promover maior eficiência em diversos patossistemas.

No presente estudo, o extrato EFID, a mistura entre EFID e ASM e o fertilizante foliar-Fosfito de cobre (Fulland) na dose de 10mL/L proporcionaram menor intensidade de ferrugem do cafeeiro em lavoura convencional. Estes produtos foram responsáveis em aumentar as atividades de proteínas relacionadas à patogênese (peroxidase, quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase), além de promoverem aumentos significativos no teor de fenóis totais, sendo informações

de grande valia para inferir que são capazes de induzir resistência em plantas de café.

Apesar de resultados promissores, faz-se necessário à realização de novos experimentos em campo considerando o tempo das avaliações com variação de doses do produto e/ou número de aplicações. Podem-se testar novas misturas entre fosfito de cobre e outros produtos comerciais e/ou extratos vegetais. Para os estudos dos mecanismos bioquímicos da resposta de defesa torna-se necessário definir época e idade fisiológica do material vegetal para a amostragem, além de especificar quais compostos fenólicos a serem analisados, como por exemplo, o ácido clorogênico. . Neste trabalho, a caracterização dos mecanismos de resposta de defesa da planta foi realizada em casa de vegetação com o patossistema *Cercospora coffeicola* – café, pois é considerado modelo mais fácil de se estudar experimentalmente. Entretanto, novos trabalhos, com o objetivo de verificar os mecanismos de ataque e defesa na interação planta-patógeno, devem ser realizados com a aplicação desses produtos na presença de *Hemileia vastatrix*.