



ROBERTH JHERSSON DELGADO ORTIZ

**APLICAÇÃO FOLIAR DE COBRE, CÁLCIO E MAGNÉSIO
NA CERCOSPORIOSE E RESPOSTAS DE DEFESA EM
MUDAS DE CAFEEIRO**

**LAVRAS- MG
2023**

ROBERTH JHERSSON DELGADO ORTIZ

**APLICAÇÃO FOLIAR DE COBRE, CÁLCIO E MAGNÉSIO NA CERCOSPORIOSE
E RESPOSTAS DE DEFESA EM MUDAS DE CAFEIEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

PhD. Tharyn Reichel
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2023**

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

Delgado Ortiz, Roberth Jhersson.

Aplicação foliar de cobre, cálcio e magnésio nacercosporiose e
respostas de defesa em mudas de cafeeiro / Roberth Jhersson
Delgado Ortiz. - 2023.

53 p.

Orientador(a): Mário Lúcio Vilela de Resende.

Coorientador(a): Tharyn Reichel.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. café. 2. fitossanidade. 3. nutrição vegetal. I. Vilela de
Resende, Mário Lúcio. II. Reichel, Tharyn. III. Título.

ROBERTH JHERSSON DELGADO ORTIZ

**APLICAÇÃO FOLIAR DE COBRE, CÁLCIO E MAGNÉSIO NA CERCOSPORIOSE
E RESPOSTAS DE DEFESA EM MUDAS DE CAFEEIRO**

**FOLIAR APPLICATION OF COPPER, CALCIUM, AND MAGNESIUM IN COFFEE
LEAF SPOT AND DEFENSE RESPONSES IN COFFEE SEEDLINGS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 10 de julho de 2023.
Ph.D. Mário Lúcio Vilela de Resende UFLA
PhD. Edson Ampelio Pozza UFLA
Dr. Wilder Douglas Santiago EPAMIG

Prof. PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

PhD. Tharyn Reichel
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2023**

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grato pelas experiências que vivi até agora. Saio da minha zona de conforto e encontro enriquecimento em minha vida. Espero que aqueles com quem compartilhei essa fase também tenham sido impactados de alguma forma positiva.

Primeiramente, agradeço a Deus e à própria vida por me guiarem nesse caminho. Agradeço à minha família por seu apoio e fortalecimento, principalmente meus pais Carlos Robert Delgado e Blanca Nubia Ortiz, pois eles me brindaram tudo o amor e suas palavras me encheram de carinho e força.

O estar em um bom lugar, com as pessoas certas tem como resultado uma nova família. Por isso agradeço ao professor Mário Lúcio por ter coragem de me aceitar, ajudar e abrir as portas do seu laboratório. Foi lá, no laboratório de fisiologia do parasitismo, onde encontrei as pessoas certas, que se tornaram minha família no Brasil. Quero deixar registrado os nomes: Deila Magna dos Santos, Tharyn Reichel, Mariana de Lima Santos, Fernanda Rodrigues, Thamires Souza, Lorena Almeida, Dilson Lucas, Lamartine Nobrega filho e todos os ICNs.

Também agradeço aos meus amigos brasileiros e colombianos em Lavras, entre eles Daniela Hoyos, Juan Soto, Lucy Nascimento, Fabiana Lima, Maria Pineda, Milena Andrade. Vocês foram fundamentais em cada momento de fortalecimento, enchendo minha vida de coragem, amor e aprendizado. Agradeço a todos os pesquisadores em geral, pois grandes pesquisas são realizadas por pessoas incríveis. Espero que tudo o que aprendi seja transmitido e, um dia, espero deixar meu próprio legado.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia vegetal.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao INCT-Café UFLA, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A crescente demanda por alimentos produzidos de forma mais sustentável impulsiona a busca por medidas alternativas de manejo de doenças em cultivos agrícolas, como na cultura do cafeeiro (*Coffea arabica*). No entanto, sua produção pode ser afetada pela ocorrência da cercosporiose, doença causada pelo fungo *Cercospora coffeicola*. Uma medida promissora é a ativação de mecanismos de defesa da planta por meio da aplicação de micro e macronutrientes. Este estudo objetivou avaliar o efeito de aplicação de nutrientes contendo diferentes doses de cobre, conjuntamente com cálcio, magnésio e suas combinações, no manejo da cercosporiose em plantas de cafeeiro. Foram realizados experimentos em condições de casa de vegetação com o cultivar Catuaí Vermelho IAC 144. Os tratamentos aplicados foram constituídos por um controle negativo (sem aplicação de nutrientes), um controle positivo (fungicida: piraclostrobina e fluxapiroxade) e seis combinações de sulfato de cobre pentahidratado (Cu) associados ao óxido de magnésio (Mg), óxido de cálcio (Ca), e óxido de cálcio e óxido de magnésio (CaMg) nas proporções de 4:1 e 2:1 (4Cu:1Ca; 4Cu:1Mg; 4Cu:1CaMg; 2Cu:1Ca; 2Cu:1Mg; 2Cu:1CaMg). As plantas foram inoculadas com *C. coffeicola* sete dias após a aplicação dos tratamentos. Posteriormente avaliou-se o progresso da doença e a atividade de enzimas de defesa fenilalanina amônia-liase (PAL), peroxidase (POX) e superóxido dismutase (SOD) nos períodos de 6, 24, 48 e 72 horas após inoculação (hai). Adicionalmente, foram analisados os teores de lignina solúvel, compostos fenólicos totais, clorofila a e b, após 15 dias da aplicação. Os resultados indicaram que a aplicação dos nutrientes resultou na redução do progresso da doença, ressaltando o tratamento 4Cu:1Ca. Além disso, houve aumento na atividade da enzima POX nos tempos avaliados e da enzima PAL apenas 6 hai. A atividade da enzima SOD foi significativamente semelhante nos tratamentos. Observou-se diferença entre a interação de cálcio e magnésio ao avaliar os teores de lignina, entretanto esta diferença não foi constatada nos teores de compostos fenólicos totais nem nos teores das clorofilas. Esses resultados sugerem que a aplicação de nutrientes pode desencadear respostas de defesa nas plantas, incluindo o acúmulo de lignina, que fortalece as paredes celulares e auxilia na resistência de plantas a patógenos.

Palavras-chave: *Café. Fitossanidade. Mecanismos de defesa. Enzimas antioxidantes. Micro e macro nutrientes. Lignificação.*

ABSTRACT

The growing demand for sustainably produced food is driving the search for alternative measures for managing diseases in agricultural crops, such as in coffee cultivation (*Coffea arabica*). However, its production can be affected by the occurrence of cercosporiosis, a disease caused by the fungus *Cercospora coffeicola*. A promising measure is the activation of plant defense mechanisms through the application of micro and macronutrients. This study aimed to evaluate the effect of applying nutrients containing different doses of copper, together with calcium, magnesium, and their combinations, in the management of cercosporiosis in coffee plants. Experiments were conducted under greenhouse conditions using the Catuaí Vermelho IAC 144 cultivar. The applied treatments consisted of a negative control (without nutrient application), a positive control (fungicide: pyraclostrobin and fluxapyroxad), and six combinations of pentahydrated copper sulfate (Cu) associated with magnesium oxide (Mg), calcium oxide (Ca), and calcium oxide and magnesium oxide (CaMg) in the proportions of 4:1 and 2:1 (4Cu1Ca; 4Cu1Mg; 4Cu1CaMg; 2Cu1Ca; 2Cu1Mg; 2Cu1CaMg). The plants were inoculated with *C. coffeicola* seven days after the application of treatments. Subsequently, the disease progress and the activity of defense enzymes phenylalanine ammonia-lyase (PAL), peroxidase (POX), and superoxide dismutase (SOD) were evaluated at 6, 24, 48, and 72 hours after inoculation (hai). Additionally, the levels of soluble lignin, total phenolic compounds, chlorophyll a and b were analyzed at 15 days after application. The results indicated that the application of nutrients resulted in a reduction in the disease progress, with the treatment 4Cu1Ca standing out. Additionally, there was an increase in the activity of the POX enzyme at the evaluated time points, and an increase in PAL enzyme activity only at 6 hai. The SOD enzyme activity was significantly similar across treatments. Differences were observed in the interaction of calcium and magnesium when evaluating lignin levels, although this difference was not observed in total phenolic compound levels nor in the levels of chlorophyll. These results suggest that the application of nutrients can trigger defense responses in plants, including the accumulation of lignin, which strengthens cell walls and assists in plant resistance to pathogens.

Keywords: *Coffee. Plant health. Defense mechanisms. Antioxidant enzymes. Micro and macro nutrients. Lignification.*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 — Progresso de severidade da cercosporiose do cafeeiro em dias após a inoculação (DAI).. 39
- Figura 2 — Taxa de progresso (r) da doença nos tratamentos aplicados no cafeeiro. 39
- Figura 3 — Atividade da enzima PAL, envolvida na rota dos fenilpropanóides, em folhas de *C. arabica* após a aplicação dos tratamentos à base cobre, cálcio e magnésio, avaliados às 6h (A), 24h (B), 48h (C) e 72h (D) após a inoculação do fungo *C. coffeicola*. 40
- Figura 4 — Atividade da enzima POX, envolvida na defesa antioxidante, em folhas de *C. arabica* após a aplicação dos tratamentos à base de cobre, cálcio e magnésio, avaliados às 6h (A), 24h (B), 48h (C) e 72h (D) após a inoculação do patógeno *C. coffeicola*. 41
- Figura 5 — Atividade da enzima SOD, envolvida na limpeza de espécies reativas de oxigênio, em folhas de *C. arabica* após a aplicação dos tratamentos à base de cobre, cálcio e magnésio, avaliados às 6h (A), 24h (B), 48h (C) e 72h (D) após a inoculação do patógeno *C. coffeicola* 42
- Figura 6 — Quantificação de lignina total solúvel e compostos fenólicos solúveis totais em folhas de *C. arabica*, aos 15 dias após a aplicação dos tratamentos à base de cobre, cálcio e magnésio 43
- Figura 7 — Cromatograma da solução-padrão dos compostos clorofila A e B na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. 43
- Figura 8 — Quantificação de clorofila A, B e clorofila total em folhas de *C. arabica*, aos 15 dias após a aplicação dos tratamentos à base de cobre, cálcio e magnésio. 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Tratamentos aplicados em mudas de Catuaí Vermelho IAC 144 conduzidas em casa de vegetação	34
Tabela 2 — Coeficientes de correlação, limite de detecção, quantificação, precisão e exatidão dos padrões Clorofila A e B.	44

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Cultura do café	13
2.2	Cercospora coffeicola	14
2.3	Controle das doenças do cafeeiro	15
2.4	Mecanismos de defesa das plantas	16
2.5	Ativação de indução de resistência por nutrientes	18
2.6	Biossíntese da lignina	20
	REFERÊNCIAS	22
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO	30
	ARTIGO - USO DE NUTRIENTES NO MANEJO DA CERCOSPORIOSE E NAS RESPOSTAS DE DEFESA DO CAFEIEIRO	31

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O café é uma das commodities mais importantes do mundo devido aos seus benefícios econômicos, sociais e ambientais. Cerca de 70% do café consumido globalmente pertence à espécie *Coffea arabica*, cultivada nas Américas e em algumas regiões altas da África e Ásia (OIC, 2023). Os outros 30% do consumo são da espécie *C. canephora*. No Brasil, a área cultivada com café arábica é estimada em 1.809,98 mil hectares, o que corresponde a quase 80% da área total destinada à produção de café. O estado de Minas Gerais possui a maior área plantada, com 1.316,59 mil hectares (CONAB, 2023; OIC, 2023).

A doença cercosporiose causada pelo fungo *Cercospora coffeicola* (BERK; COOKE, 1881) é um dos principais fatores limitantes da produtividade na cafeicultura mundial (POZZA, 2021). Esta doença está presente em todas as áreas de produção e causa perdas significativas, variando entre 20 a 30% da produção total. Além disso, o controle convencional desta doença gera até 20% de custos adicionais para os produtores (PEREIRA *et al.*, 2008). Por isso, é importante desenvolver medidas preventivas com o objetivo de reduzir os danos causados pela cercosporiose (ALZATE, 2015; RAMOS *et al.*, 2022; ZAMBOLIM, 2016).

Promover a indução da resistência das plantas é uma estratégia eficaz para manter baixa incidência de doenças na cafeicultura, especialmente na agricultura orgânica. Essa técnica visa estimular as defesas das plantas, alterando sua composição química, mudando sua anatomia e morfologia dos tecidos (POZZA; POZZA, 2012). Um exemplo é o espessamento das paredes celulares por acúmulo de lignina, suberina calosa e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (GRPH) (SATUA; CARMONA, 2021) que reduz a infecção por patógenos.

A disponibilidade de nutrientes, especialmente micronutrientes, desempenha um papel crucial na proteção das plantas contra patógenos, sendo necessários para o bom funcionamento do sistema de defesa vegetal, participando da síntese de enzimas e proteínas que fortalecem o sistema de defesa vegetal, como as enzimas antioxidantes que combatem o estresse oxidativo causado por patógenos (BEDIN, 2018; PES; ARENHARDT, 2015). Também atuam na bioquímica e na fisiologia das plantas, estimulando a produção de compostos orgânicos, como os fenóis, além da lignina que fortalecem as paredes celulares, dificultando a infecção de patógenos, reduzindo sua capacidade de colonizar a planta (DEMIRBAS, 2004; LIU; LUO; ZHENG, 2018; ZAMBOLIM; VENTURA, 1993).

Vários estudos têm abordado a eficácia de nutrientes, como cálcio, magnésio e cobre, no manejo de doenças em plantas. O cobre desempenha papel fundamental nas células vegetais, participando de reações de oxido redução como a função dos citocromos na fotossíntese e exercendo funções essenciais no metabolismo, proteção contra o estresse oxidativo e catalisando reações enzimáticas. A maior parte do cobre nas plantas está ligada a proteínas, como a enzima CuZn superóxido dismutase (CuZnSOD), e outras moléculas complexas, desempenhando um papel importante na estabilidade e atividade (BROADLEY *et al.*, 2012). O cálcio (Ca) possui importante papel na estabilidade da parede celular e atua como mensageiro secundário na transmissão de sinais bióticos e abióticos (STEINHORST; KUDLA, 2014). O magnésio, por sua vez, é um nutriente essencial, presente na lamela média e componente chave da molécula de clorofila. Além de seu papel estrutural, o magnésio também está envolvido em diversas reações, como a fotossíntese, respiração celular, a síntese de DNA e RNA, e atua como um cofator de muitas enzimas (MARSCHNER, 2012). Todos esses processos estão relacionados à ocorrência de doenças e também influenciam as respostas de defesa da planta contra os patógenos (FUJIKAWA *et al.*, 2021; IMADA *et al.*, 2016; TANG; LUAN, 2017).

O objetivo desse estudo é verificar se a aplicação de nutrientes apresenta potencial de diminuir a cercosporiose em mudas de cafeeiro. Além disso, analisar como esses tratamentos podem ativar as respostas de defesa da planta, por meio da quantificação de enzimas envolvidas na ativação de antioxidantes e de rotas metabólicas como a lignificação e compostos fenólicos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura do café

O café pertence à família botânica Rubiaceae (GBIF, 2021; KRISHNAN *et al.*, 2015), e do gênero *Coffea* que engloba mais de cem espécies, sendo *Coffea arabica* e *C. canephora* as espécies com maior importância econômica., (FERREIRA *et al.*, 2019). *C. arabica* é uma espécie tetraplóide ($2n = 4x = 44$) resultante da hibridação natural entre *C. canephora* e *C. eugenoides*, ambas espécies diplóides ($2n = 2x = 22$) (CHARRIER; BERTHAUD, 1985; LINO *et al.*, 2021).

Atualmente, a cultura do café está presente em uma faixa geográfica localizada entre os dois trópicos, abrangendo regiões tropicais da América do Sul (Brasil e Colômbia), Ásia, Oceania, África, América Central e México (FERREIRA *et al.*, 2019; ICO, 2016). O café representa um produto agrícola que se destaca no comércio e economia internacional e nacional. (LINO *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2013). No mundo aproximadamente 170 países são produtores de café, e na atualidade, principalmente o 70% do café consumido mundialmente é proveniente de países como Brasil, Vietnã, Colômbia e Indonésia. Por sua vez, os principais países consumidores incluem Estados Unidos, União Europeia, Brasil e Japão, que juntos respondem por dois terços da demanda global por café (ALMEIDA; SPERS, 2020; LINO *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2018).

No Brasil, estima-se cerca de 1.481 mil ha de café no país, distribuídas por 1.950 municípios (CONAB, 2023; OIC, 2023). Minas Gerais é o estado responsável por aproximadamente metade da produção de café no país, sendo a espécie mais relevante economicamente *C. arabica*. Algumas das cultivares de *C. arabica* tradicionalmente plantadas no país incluem Bourbon, Catuaí, Catuaí e Mundo Novo (CONAB, 2023; LINO *et al.*, 2021; MONTEIRO; FARAH, 2012).

A produção de café segue um ciclo bienal, no qual as plantas apresentam uma safra mais abundante em um ano e uma safra reduzida no ano seguinte, devido ao alto consumo de nutrientes durante a produção dos frutos. Esse desequilíbrio nutricional durante os anos de alta produção pode tornar as plantas mais suscetíveis a doenças (MESQUITA *et al.*, 2016).

A susceptibilidade na espécie *C. arabica* a doenças é devido a sua base genética estreita, que está associada à autogamia resultando em uma menor variabilidade genética dentro da espécie (CAIXETA; PESTANA; PESTANA, 2015). Esse fato pode dificultar o melhoramento das plantas e os genes de resistência a doenças (DE MELO *et al.*, 2021).

2.2 *Cercospora coffeicola*

O fungo *Cercospora coffeicola* é o agente etiológico da cercosporiose na cultura do café (BERK; COOKE, 1881). Pertencente à família Mycosphaerellaceae, ordem Ascomycota (Index fungorum, 2020), este fungo pode se disseminar por meio de fatores bióticos e abióticos (CONAB, 2023; OIC, 2023). A infecção ocorre quando as condições necessárias são favoráveis, como umidade adequada e temperatura ideal de 24°C (COELHO *et al.*, 2011; CUSTÓDIO *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2019). Os esporos do patógeno emitem o tubo germinativo que penetram as folhas através dos estômatos (COELHO *et al.*, 2011;

ECHANDI; AGRICULTURA) ou diretamente nas folhas (CASTAÑO, 1956; COELHO *et al.*, 2011; PAULA *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2011). Uma vez dentro da planta, *C. coffeicola* coloniza as câmaras subestomáticas ou ferimentos e invade os tecidos adjacentes, onde o fungo produz os conídios, iniciando assim o ciclo da doença (CASTAÑO, 1956; COELHO *et al.*, 2011).

Os sintomas da doença nas folhas do cafeeiro são caracterizados por pequenas manchas necróticas, constituídas por um centro de cor clara circundado por um anel marrom e bordas amarelas. No entanto, existem casos atípicos em que as lesões são escuras sem apresentar o halo amarelado (LAGE DE *et al.*, 2016). À medida que as manchas aumentam de tamanho elas se tornam necróticas. Além das folhas, o fungo pode infectar os frutos, resultando em aceleração do amadurecimento, queda prematura dos frutos e redução da sua qualidade em termos físicos como organoléuticos da bebida (PAULA *et al.*, 2015).

Durante o processo da doença, *Cercospora* produz uma fitotoxina chamada cercosporina, que apresenta ativação fotoquímica. Exposta à luz, essa molécula absorve a energia e é convertida em um estado ativado energeticamente, em seguida reage com o oxigênio, resultando na geração de espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio molecular ($^1\text{O}_2$) e superóxido (O_2^-) (DAUB; EHRENSHAFT, 2003; LAGE DE *et al.*, 2016). Essas espécies reativas de oxigênio desempenham um papel importante na colonização e desenvolvimento do fungo nas folhas.

Em sentido oposto, a planta hospedeira também desempenha um papel na regulação do desenvolvimento e crescimento do fungo através por produzir sinais químicos, como açúcares, compostos fenólicos e metabólitos voláteis, bem como sinais físicos. Esses sinais podem afetar o crescimento do fungo nas superfícies das folhas (DEAN, 1997).

2.3 Controle das doenças do cafeeiro

No controle das doenças no cultivo do café, várias estratégias são adotadas, incluindo o uso de cultivares resistentes, o controle físico, controle cultural, e controle químico. No entanto, na produção de café orgânico, o uso de produtos orgânicos no Brasil está sujeito a leis e regulamentos, de acordo com a Lei nº. 10.831, de 23 de dezembro de 2003, no art. 1º o sistema orgânico de produção proíbe o uso de substâncias sintéticas em qualquer fase do processo produtivo, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização (BRASIL, 2021, 2003).

Essas regulamentações visam assegurar que o café orgânico seja produzido de acordo com práticas sustentáveis e que atendam aos requisitos de certificação orgânica. Portanto, os produtores de café orgânico devem seguir métodos de controle de doenças que estejam de acordo com tais regulamentações, procurando utilizar alternativas naturais e sustentáveis. Nesse contexto, uma das opções viáveis é a aplicação de insumos minerais (NCAT, 2019).

Os micronutrientes apesar de serem usados em menor quantidade que os macronutrientes, desempenham um papel fundamental na indução de resistência, sendo responsáveis pela ativação enzimática (MARTIN; MARSCHNER, 1988; HUGER, et al., 2012). Um dos nutrientes minerais amplamente utilizados no manejo de plantações suscetíveis a doenças é o cobre. O cobre atua em rotas metabólicas para a produção de compostos de resistência a penetração do patógeno (GUO *et al.*, 2010), e diretamente como fungicida e bactericida dependendo de doses e fontes utilizadas (CARVALHO; CUNHA; SILVA, 2011).

O cobre é absorvido pela planta na forma de cátion Cu^{2+} , desempenha uma função na ativação de enzimas em diversos processos fisiológicos. Por exemplo, o cobre presente nas isoenzimas como a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), desempenham um papel importante como sistemas de varredura para neutralizar os radicais de oxigênio tóxicos, protegendo assim as membranas. Além disso, está envolvido na formação da parede celular, síntese de DNA e RNA e metabolismo de proteínas (KIRKBY; RÖMHELD, 2007). Também atua na resistência das plantas às doenças (POZZA; POZZA, 2012; POZZA; POZZA, 2023).

Nos produtos à base de sulfato de cobre, são adicionados óxidos básicos, como o óxido de cálcio (CaO) e o óxido de magnésio (MgO). Esses produtos são escolhidos por sua capacidade de tolerar metais pesados e neutralizar a acidez do meio (CESARINO *et al.*, 2012). O cálcio (Ca), é um elemento que desempenha um papel estrutural na planta, sendo componente da parede celular, membrana celular, participa na divisão celular e alongamento, além de servir como mensageiro secundário em respostas de defesa, participa no balanço cátion-ânion e em processos de secreção (HAWKESFORD *et al.*, 2012). Por outro lado, o magnésio (Mg) é um elemento nutricional fundamental da molécula de clorofila, é também essencial para o funcionamento das células nas plantas pois ativa a maioria das enzimas vegetais necessárias para o crescimento, ao mesmo tempo que contribui para a síntese de proteínas, fosforilação e fotossínteses (ÁLVARO, 2020; HAWKESFORD *et al.*, 2012).

2.4 Mecanismos de defesa das plantas

As plantas desenvolveram uma série de estratégias de defesa para proteger-se contra patógenos, estes mecanismos incluem barreiras estruturais, e a produção de compostos de defesa pré-formados. Esses mecanismos de defesa incluem receptores que reconhecem as classes de patógenos por meio de elicitores patogênicos ou sinais de estresse, os quais posteriormente geram respostas de defesa induzidas e nas respostas de sinalização de defesa, culminando na resistência do hospedeiro (ZHANG *et al.*, 2020).

A resistência no hospedeiro, refere-se à capacidade das plantas em resistir ou limitar o crescimento e disseminação de patógenos. Essa resistência ocorre de diversas maneiras, como a ativação de mecanismos de defesa, a indução de respostas de sinalização, redução de compostos antimicrobianos e a modificação da estrutura celular (JONES; DANGL, 2006).

As barreiras de defesa das plantas apresentam três linhas: na primeira linha, as plantas utilizam barreiras físicas, que incluem a cutícula das folhas, compostas por cutina e ceras, e a parede celular, composta por celulose, hemicelulose, pectina e proteínas (SOMERVILLE *et al.*, 2004; TABASSUM; BLILOU, 2022). Esses compostos atuam como barreiras extracelulares, impedindo a penetração e colonização de patógenos (MIEDES *et al.*, 2014).

Na segunda linha de defesa, é composta por metabólitos secundários, como proteínas antimicrobianas e substâncias químicas, como fitoanticipinas. Essa resposta é ativada quando um organismo invade o apoplasto e libera enzimas que degradam a parede celular (OSBOURN, 1996; TABASSUM; BLILOU, 2022; TIERENS *et al.*, 2001). O acúmulo de ácido salicílico (SA) nesse espaço resulta em mudanças no pH, criando um gradiente que desencadeia a ativação de sinais de oxigênio reativo (EROs) e componentes moleculares associados a danos (DAMP) (LIM *et al.*, 2020). Esses sinais podem ser detectados por células vizinhas, estimulando a síntese de fitoalexinas, que têm a função de inibir o metabolismo do patógeno (RANATHUNGE; STEUDLE; LAFITTE, 2005).

A terceira linha de defesa é ativada quando os fitopatógenos quebram as barreiras estruturais e atingem os apoplastos. Neste tipo de interação planta-patógeno, a defesa segue um modelo de três etapas conhecido como modelo zig-zag. Essas etapas incluem a imunidade desencadeada pelo padrão molecular associado ao patógeno (PAMP) (PAMP-triggered immunity, PTI), a suscetibilidade desencadeada por efetores (effector-triggered susceptibility, ETS) e imunidade desencadeada por efetores (effector-triggered immunity, ETI), sendo este modelo proposto por Jones e Dangl (2006).

Na defesa das plantas, no PTI é detectada a presença de patógenos e consequentemente, a sobreposição na sinalização imunológica é mediada por receptores imunológicos intracelulares (PRR), localizados na superfície da célula vegetal (NGOU *et al.*, 2021; YUAN *et al.*, 2021), que quando são detectados por receptores, geram várias alterações moleculares e fisiológicas (GAO *et al.*, 2021; JONES; DANGL, 2006). Esses receptores envolvem processos como o acúmulo de Ca^{2+} , ativação proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), produção de EROs, regulação transcricional e deposição de barreiras físicas para fortalecimento celular (GAO *et al.*, 2021; KLYMIUK *et al.*, 2021).

Ao ocorrer uma infecção fúngica em uma planta, várias proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) são acionadas, as quais são peças fundamentais no sistema de defesa das plantas contra patógenos. Essas proteínas têm funções essenciais na resposta imunológica das plantas e na ativação de mecanismos de defesa. Dentre essas enzimas, se encontram as peroxidases, enzimas envolvidas na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que podem ter efeitos tóxicos sobre os fungos. No entanto, para manter as EROs em níveis compatíveis com o hospedeiro, ocorre a produção de enzimas relacionadas à detoxificação de compostos tóxicos gerados durante a interação planta-fungo. Entre as enzimas antioxidantes incluem-se a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), peroxidase (POX, EC 1.11.1.X), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) (AGRIOS, 2005; CARVAJAL, 2019).

Além disso, o reconhecimento de moléculas por meio dos receptores de reconhecimento padrão provoca a ativação de vários metabólitos secundários. Foram estabelecidos diversos critérios para classificar os compostos secundários, devido à sua complexidade na área de imunidade das plantas, incluindo aspectos relacionados à sua síntese, fitoquímicos envolvida na defesa, produção de fitoalexinas, fitoanticipinas, sintetização de precursores comuns para a sinalização celular, e formação de estruturas de defesa e mecanismos de ação (ANJALI *et al.*, 2023).

2.5 Ativação de indução de resistência por nutrientes

Nutrição mineral balanceada possui papel crucial no metabolismo, crescimento e desenvolvimento das plantas, além de influenciar a resistência a doenças em diferentes níveis (LAGE DE *et al.*, 2016; POZZA; POZZA, 2012; TIERENS *et al.*, 2001). Alguns nutrientes como o cobre, cálcio e magnésio, possuem função no sistema de defesa nas plantas, promovendo a lignificação, fortalecimento da parede celular formação de papilas, estímulo a

explosão oxidativa, acúmulo de fitoalexinas e a ativação de proteínas relacionadas à patogênese (PRP), como quitinases, β -1,3-glucanase e peroxidases (LIANG; ZHANG, 2018; POZZA; POZZA, 2012; ZAMBOLIM; VENTURA, 1993).

Os nutrientes aplicados de maneira foliar entram em contato com o polímero de lignina presente nas paredes das células vegetais. Esse polímero possui grupos funcionais, como hidroxila, carboxila, que tem como função a proteção e seleção de substâncias (LIU; LUO; ZHENG, 2018). A presença de estes grupos permite interações físicas e químicas com outras moléculas, uma função ao se ligar a vários íons e formar ligações cruzadas com outros compostos, fortalecendo a estrutura da parede celular e tornando-a menos permeável a agentes externos. Assim ao interagir a lignina da parede celular com o Cu^{2+} (BHUIYAN *et al.*, 2007; DEMIRBAS, 2004), reduz a concentração da molécula no citoplasma e liga a molécula na parede celular para estimular o acúmulo de lignina (LIU; LUO; ZHENG, 2018).

O cobre, como micronutriente e sendo um metal pesado, ao entrar em contato com a parede celular, estimula a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como os radicais de superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e radicais hidroxilo (OH^{\cdot}) (FOYER *et al.*, 1997; HENRY; YADETA; COAKER, 2013; IMADA *et al.*, 2016; LEUNG *et al.*, 2014). Desta forma, as EROs podem servir como sinalização para a síntese de compostos fenólicos. Por outro lado, os compostos fenólicos participam da eliminação da EROs, doando elétrons ou hidrogênios para neutralizar as EROs, e assim evitar danos estruturais devido à superprodução de EROs, os fenóis também podem atuar como agentes captadores de radicais livres (BABU *et al.*, 2003; CHEYNIER *et al.*, 2013; KOVÁČIK; BAČKOR, 2007). As EROs desempenham um papel na ativação de respostas sistêmicas e locais de defesa, como a indução de genes proteicos relacionados à patogênese (PR) (HENRY; YADETA; COAKER, 2013; IMADA *et al.*, 2016).

O cálcio desempenha um papel crucial no fortalecimento da resistência vegetal (GUO *et al.*, 2010), permitindo a seletividade e integridade das membranas como um cátion divalente (Ca^{+2}) (JONES; LUNT, 1967; TYAGI *et al.*, 2022). Igualmente, o cálcio está relacionado no aumento das atividades de enzimas antioxidantes, que desempenham um papel na estabilização do acúmulo excessivo de EROs (CARAFOLI; CROMPTON, 1978; LIANG; WANG, 2013; LIANG; ZHANG, 2018). O cálcio também atua como mensageiro no citosol, desempenhando um papel importante na transdução de sinais no metabolismo fisiológico e

bioquímico vegetal (BUSH, 1995; DOLATABADIAN *et al.*, 2013; HEPLER, 2005; LIANG; ZHANG, 2018).

No que diz respeito ao magnésio nas células, ele é reconhecido como um nutriente essencial, sendo um componente da lamela média e constituinte da molécula de clorofila. Além disso o magnésio atua como cofator de uma ampla gama de enzimas (TANG; LUAN, 2017), e se relaciona na reação de transferência de energia, respiração, e na formação DNA e de RNA (GAO *et al.*, 2021).

No ingresso dos nutrientes ao citoplasma celular, se tem identificadas várias famílias de proteínas nomeadas como canais de íons e outros transportadores que contribuem para o transporte de Ca^{2+} e Mg^{2+} através de membranas plasmáticas e membranas intracelulares. A coordenação desses sistemas de transporte, tanto em nível celular e vegetal, regula a nutrição de Ca^{2+} e Mg^{2+} e assegura o controle adequado do Ca^{2+} como segundo mensageiro em resposta a diversos sinais ambientais e de desenvolvimento (TANG; LUAN, 2017). Estes macronutrientes também foram classificados como elicitores que estimulam o reforço de defesa por meio das respostas de defesa de plantas (DEWEN *et al.*, 2017; FUJIKAWA *et al.*, 2021), pode se mencionar a aplicação foliar de óxido de metal como MgO ou CaO, os quais induziram respostas de defesa (IMADA *et al.*, 2016).

2.6 Biossíntese da lignina

Sob estresse em plantas, ocorre um acúmulo significativo de lignina na parede celular, com um acúmulo de íons de hidrogênio (H^+) (FERRAZ; PAULO, 2019). A biossíntese e a acumulação de lignina, forma uma barreira protetora básica contra a disseminação de patógenos, reduzindo a ação de enzimas e toxinas fúngicas (LIU; LUO; ZHENG, 2018; MIEDES *et al.*, 2014; SANTIAGO; BARROS-RIOS; MALVAR, 2013; YU *et al.*, 2021).

A síntese da lignina ocorre através da via dos fenilpropanóides, que compreende três processos principais: (i) biossíntese de monômeros da lignina, (ii) transporte (iii) e polimerização. A fenilalanina é a molécula que promove a biossíntese de lignina, essa molécula é desanimada pela enzima fenilalanina amoni-liase (PAL, EC 4.3.1.24), gerando ácido cinâmico. Após ocorrem uma série de etapas, incluindo hidroxilação, metilação e redução, que resultam na formação dos monômeros de lignina (álcool sinálico unidade S; álcool coniferyil unidade G y *p*-álcool coumarina unidade H) no citoplasma. Esses monômeros são transportados para o apoplasto por meio das enzimas peroxidase (POX, EC

1.11.1.X) e lacase (LAC, EC 1.10.3.2). E finalmente, a lignina é polimerizada na parede celular secundária (FERRAZ; PAULO, 2019; LIU; LUO; ZHENG, 2018).

A fenilalanina amônia-liase (PAL), presente no primeiro passo da biossíntese dos fenilpropanóides, catalisa a desaminação da fenilalanina em ácido cinâmico, e juntamente com C4H (Cinamato-4-hidroxilase) e ácido 4-cumárico: CoA ligase (4CL), é essencial para a síntese de todos os fenilpropanóides (BHUIYAN *et al.*, 2007).

A enzima cinamil álcool desidrogenase (CAD, EC 1.1.1.195) catalisa o último estágio da síntese da lignina, converte os aldeídos em monolignóis (cumarílico, coniferílico e sinapílico) (CHABANNES *et al.*, 2001). A formação do álcool p-cumarílico (lignina H) requer a atividade das enzimas PAL, C4H, 4CL, CCR e CAD. Já a síntese do álcool coniferílico (lignina G) requer essas cinco enzimas, além de HCT, C3H e CCoAOMT. E para síntese do álcool sinapílico (lignina S) requer as dez enzimas mencionadas, mais F5H e catecol O-metiltransferase (FERRAZ; PAULO, 2019).

A oxidação dos monolignóis é mediada pela enzima peroxidase (POX, EC 1.11.1.7), que utiliza o peróxido de hidrogênio como substrato (MIEDES *et al.*, 2014). Após a oxidação dos monolignóis ocorre a polimerização, etapa final da biossíntese da lignina, depositada nas paredes celulares vegetais (GUO *et al.*, 2010). Embora ascorbato, glutatona, tocoferol e carotenóides possam eliminar as EROs de forma não enzimática, enzimas como superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.X), ascorbato peroxidase (APX) e a catalase (CAT) são mais eficientes neste processo (YOLCU *et al.*, 2016). O equilíbrio entre as atividades de SOD, APX e CAT nas células é crucial na regulação do nível de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio em estado estacionário (MITTLER, 2002).

Estudos anteriores revelaram que os tratamentos com cobre afetam simultaneamente o metabolismo da lignina e as atividades das peroxidases (POXs). Em rabanetes, por exemplo, o tratamento com cobre inibiu o alongamento radicular, mas aumentou as atividades das POXs catiônicas e aniônicas. Da mesma forma, em plantas de feijão e arroz, o tratamento com cobre resultou em maior produção de lignina (EI KHAING *et al.*, 2014; LIN; CHEN; LIU, 2005).

Portanto, concordando com as afirmações de (MARSCHNER, 1986), a parede celular desempenha um papel importante na resposta aos metais pesados, atuando como sequestrador de íons. No entanto, a síntese de lignina pode ser afetada. Além disso, o cálcio e o magnésio também desempenham papéis significativos na acumulação de lignina. O cálcio está associado à estabilidade da parede celular e à síntese de lignina, enquanto o magnésio é

essencial para a atividade de várias enzimas envolvidas na biossíntese da lignina (ÁLVARO, 2020; HAWKESFORD *et al.*, 2012; JONES; LUNT, 1967; TANG; LUAN, 2017).

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. HOW PLANTS DEFEND THEMSELVES AGAINST PATHOGENS. **Plant Pathology**, p. 207–248, 1 jan. 2005.

ALMEIDA, L. F. de.; SPERS, E. E. **Coffee Consumption and Industry Strategies in Brazil**. [s.l.] Elsevier, 2020.

ÁLVARO, G. J. **El magnesio y su importancia en el crecimiento vegetal**. Disponível em: <<https://www.fertibox.net/single-post/magnesio-agricultura>>.

ALZATE, N. O. Importancia del gen sh3 y su relación con la resistencia a la enfermedad roya del caféto *Hemileia vastatrix* bajo la modalidad de compilación bibliográfica. p. 88, 2015. Disponível em: <<http://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/3385/1/4585204.pdf>>.

ANJALI; KUMAR, S.; KORRA, T.; THAKUR, R.; ARUTSELVAN, R.; KASHYAP, A. S.; NEHELA, Y.; CHAPLYGIN, V.; MINKINA, T.; KESWANI, C. Role of plant secondary metabolites in defence and transcriptional regulation in response to biotic stress. **Plant Stress**, v. 8, p. 100154, 1 jun. 2023.

BABU, T. S.; AKHTAR, T. A.; LAMPI, M. A.; TRIPURANTHAKAM, S.; DIXON, D. G.; GREENBERG, B. M. Similar Stress Responses are Elicited by Copper and Ultraviolet Radiation in the Aquatic Plant *Lemna gibba*: Implication of Reactive Oxygen Species as Common Signals. **Plant and Cell Physiology**, v. 44, n. 12, p. 1320–1329, 15 dez. 2003.

BEDIN, E. Aplicações foliares de cobre no manejo da ferrugem-asiática da soja. p. 89, 2018.

BERK; COOKE. *Cercospora coffeicola*. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=191536>>.

BHUIYAN, N. H.; LIU, Weiping.; LIU, Guosheng.; SELVARAJ, Gopalan.; WEI, Yangdou.; KING, John. Transcriptional regulation of genes involved in the pathways of biosynthesis and supply of methyl units in response to powdery mildew attack and abiotic stresses in wheat. **Plant Molecular Biology**, v. 64, n. 3, p. 305–318, 4 jun. 2007.

BRASIL. **PORTARIA Nº 52, DE 15 DE MARÇO DE 2021 - PORTARIA Nº 52, DE 15 DE MARÇO DE 2021 - DOU - Imprensa Nacional 2021.**

BRASIL, P. da R. **Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências**. Brasil. 2003.

- BROADLEY, M.; BROWN, P.; CAKMAK, I.; RENGEL, Z.; ZHAO, F. Function of Nutrients. *Em: Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 191–248.
- BUSH, D. S. Calcium Regulation in Plant Cells and its Role in Signaling. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 46, n. 1, p. 95–122, jun. 1995.
- CAIXETA, E. T.; PESTANA, K. N.; PESTANA, R. N. Melhoria do Cafeeiro: Ênfase Na Aplicação Dos Marcadores Moleculares. **Tópicos Especiais em Produção Vegetal V**, p. 154–179, 2015.
- CARAFOLI, E.; CROMPTON, M. The Regulation of Intracellular Calcium. *Em: [s.l.: s.n.]*. p. 151–216.
- CARVAJAL, C. C. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. **Medicina Legal de Costa Rica**, v. 36, n. 1, p. 91–100, 2019.
- CARVALHO, V. L. de; CUNHA, R. L. da; SILVA, N. R. N. **Mancha de Phoma do cafeeiro**. [s.l.: s.n.].
- CESARINO, I.; ARAÚJO, P.; DOMINGUES, A. P.; MAZZAFERA, P. An overview of lignin metabolism and its effect on biomass recalcitrance. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 35, n. 4, p. 303–311, 2012.
- CHABANNES, M.; BARAKATE, A.; LAPIERRE, C.; MARITA, J. M.; RALPH, J.; PEAN, M.; DANOUN, S.; HALPIN, C.; GRIMA-PETTENATI, J.; BOUDET, A. M. Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants. **The Plant Journal**, v. 28, n. 3, p. 257–270, 23 dez. 2001.
- CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. **Clasificación botánica del café**. 1985.
- CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K. M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant physiology and biochemistry : PPB**, v. 72, p. 1–20, nov. 2013.
- COELHO, A. G. Souza.; RODRIGUES, F. Ávila.; MAFFIA, L. Antônio.; MIZUBUTI, E. S. Gomide. Infection Process of *Cercospora coffeicola* on Coffee Leaf. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 1, p. 6–11, jan. 2011.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de café**. [s.l.: s.n.]. . Acesso em: 27 maio. 2023.
- CUSTÓDIO, A. A. de P.; POZZA, E. A.; GUIMARÃES, S. da S. C.; KOSHIKUMO, É. S. M.; HOYOS, J. M. A.; SOUZA, P. E. de. Comparison and validation of diagrammatic scales for brown eye spots in coffee tree leaves. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1067–1076, dez. 2011.
- DAUB, M. E.; EHRENSHAFT, M. The Photoactivated Cercospora Toxin Cercosporin: Contributions to Plant Disease and Fundamental Biology. **https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.461**, v. 38, p. 461–490, 28 nov. 2003.

DE MELO, V.; FILHO, Elias.; MEDINA, Bayron.; ZAMBOLIM, Laércio.; AVELINO, Jacques.; LIZARDO, Cristhian.; BARQUERO, Miguel.; PÉREZ, Quisqueya.; CHOCOOJ, Mario.; GRANDE, Julio.; BOLAÑOS, Roger.; GÓMEZ, René.; OBIN, Dulce. **Estado del arte sobre el conocimiento de razas, monitoreo y control de la roya del café en los países de PROMECAFE.** [s.l: s.n.]

DEAN, R. A. SIGNAL PATHWAYS AND APPRESSORIUM MORPHOGENESIS. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, n. 1, p. 211–234, set. 1997.

DEMIRBAS, A. Adsorption of lead and cadmium ions in aqueous solutions onto modified lignin from alkali glycerol delignification. **Journal of Hazardous Materials**, v. 109, n. 1–3, p. 221–226, jun. 2004.

DEWEN, Q.; YIJIE, D.; YI, Z.; SHUPENG, L.; FACHAO, S. Plant Immunity Inducer Development and Application. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 30, n. 5, p. 355–360, maio 2017.

DOLATABADIAN, A.; SANAVY, S. A. M. M.; GHOLAMHOSEINI, M.; JOGHAN, A. K.; MAJDI, M.; KASHKOOLI, A. B. The role of calcium in improving photosynthesis and related physiological and biochemical attributes of spring wheat subjected to simulated acid rain. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 19, n. 2, p. 189–198, 22 abr. 2013.

ECHANDI, T.; AGRICULTURA), I. (Instituto I. de C. para la. La chasparria de los cafetos causada por el hongo *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke. v. 2, p. 54–57, 1959.

EI KHAING, E.; ABIDIN MIOR AHMAD, Z.; MUIYUN, W.; RAZI ISMAIL, M. Effects of Silicon, Copper and Zinc Applications on Sheath Blight Disease Severity on Rice. **World Journal of Agricultural Research**, v. 2, n. 6, p. 309–314, 21 nov. 2014.

FERRAZ, A.; PAULO, U. D. S. Biossíntese e deposição de lignina nas paredes celulares. 2019.

FERREIRA, T.; SHULER, J.; GUIMARÃES, R.; FARAH, A. CHAPTER 1. Introduction to Coffee Plant and Genetics. *Em: Coffee*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2019. p. 1–25.

FOYER, C. H.; LOPEZ-DELGADO, H.; DAT, J. F.; SCOTT, I. M. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. **Physiologia Plantarum**, v. 100, n. 2, p. 241–254, jun. 1997.

FUJIKAWA, I.; TAKEHARA, Y.; OTA, M.; IMADA, K.; SASAKI, K.; KAJIHARA, H.; SAKAI, S.; JOGAIHAH, S.; ITO, S. Magnesium oxide induces immunity against Fusarium wilt by triggering the jasmonic acid signaling pathway in tomato. **Journal of Biotechnology**, v. 325, p. 100–108, jan. 2021.

GAO, M.; HE, Y.; YIN, X.; ZHONG, X.; YAN, B.; WU, Y.; CHEN, J.; LI, X.; ZHAI, K.; HUANG, Y.; GONG, X.; CHANG, H.; XIE, S.; LIU, J.; YUE, J.; XU, J.; ZHANG, G.; DENG, Y.; WANG, E.; THARREAU, D.; WANG, G.-L.; YANG, W.; HE, Z. Ca²⁺ sensor-mediated ROS scavenging suppresses rice immunity and is exploited by a fungal effector. **Cell**, v. 184, n. 21, p. 5391–5404.e17, 2021.

GBIF, *C. arabica* L. in S. GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset. 2021.

GUO, X. Y.; ZUO, Y. B.; WANG, B. R.; LI, J. M.; MA, Y. B. Toxicity and accumulation of copper and nickel in maize plants cropped on calcareous and acidic field soils. **Plant and Soil**, v. 333, n. 1–2, p. 365–373, 30 ago. 2010.

HAWKESFORD, M.; HORST, W.; KICHEY, T.; LAMBERS, H.; SCHJOERRING, J.; MØLLER, I. S.; WHITE, P. Functions of Macronutrients. *Em: Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 135–189.

HENRY, E.; YADETA, K. A.; COAKER, G. Recognition of bacterial plant pathogens: local, systemic and transgenerational immunity. **New Phytologist**, v. 199, n. 4, p. 908–915, 20 set. 2013.

HEPLER, P. K. Calcium: A Central Regulator of Plant Growth and Development. **The Plant Cell**, v. 17, n. 8, p. 2142–2155, ago. 2005.

HUBER, DON & RÖMHELD, VOLKER & WEINMANN, MARKUS. Relationship between Nutrition, Plant Diseases and Pests. 10.1016/B978-0-12-384905-2.00010-8. 2012.

ICO, I. C. O. Total production by exporting countries. 2016.

IMADA, K.; SAKAI, S.; KAJIHARA, H.; TANAKA, S.; ITO, S. Magnesium oxide nanoparticles induce systemic resistance in tomato against bacterial wilt disease. **Plant Pathology**, v. 65, n. 4, p. 551–560, maio 2016.

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

JONES, R. G. W.; LUNT, O. R. The function of calcium in plants. **The Botanical Review**, v. 33, n. 4, p. 407–426, out. 1967.

KIRKBY, E. A.; RÖMHELD, V. Micronutrientes na fisiologia de plantas- Funções, Absorção e Mobilidade. **Informações agronômicas**, v. 118, n. 2, p. 1–24, 2007.

KLYMIUK, V.; COAKER, G.; FAHIMA, T.; POZNIAK, C. J. Tandem Protein Kinases Emerge as New Regulators of Plant Immunity. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 34, n. 10, p. 1094–1102, out. 2021.

KOVÁČIK, J.; BAČKOR, M. Phenylalanine Ammonia-Lyase and Phenolic Compounds in Chamomile Tolerance to Cadmium and Copper Excess. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 185, n. 1–4, p. 185–193, 18 set. 2007.

KRISHNAN, S.; RANKER, T. A.; DAVIS, A. P.; RAKOTOMALALA, J.-J. Current status of coffee genetic resources: implications for conservation – case study in Madagascar. **Acta Horticulturae**, n. 1101, p. 15–20, set. 2015.

LAGE DE, C. C. Andrade.; VICENTIN, R. Pereira.; COSTA, J. Rodrigues.; PERINA, F. José.; RESENDE, M. L. V. de.; ALVES, Eduardo. Alterations in antioxidant metabolism in coffee leaves infected by *Cercospora coffeicola*. **Ciência Rural**, v. 46, n. 10, p. 1764–1770, 27 jun. 2016.

LEUNG, Y. H.; NG, A. M. C.; XU, X.; SHEN, Z.; GETHINGS, L. A.; WONG, M. T.; CHAN, C. M. N.; GUO, M. Y.; NG, Y. H.; DJURIŠIĆ, A. B.; LEE, P. K. H.; CHAN, W. K.;

- YU, L. H.; PHILLIPS, D. L.; MA, A. P. Y.; LEUNG, F. C. C. Mechanisms of Antibacterial Activity of MgO: Non-ROS Mediated Toxicity of MgO Nanoparticles Towards *Escherichia coli*. **Small**, v. 10, n. 6, p. 1171–1183, mar. 2014.
- LIANG, C.; WANG, W. Antioxidant response of soybean seedlings to joint stress of lanthanum and acid rain. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 11, p. 8182–8191, 8 nov. 2013.
- LIANG, C.; ZHANG, B. Effect of exogenous calcium on growth, nutrients uptake and plasma membrane H⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase activities in soybean (*Glycine max*) seedlings under simulated acid rain stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 165, n. September, p. 261–269, 2018.
- LIM, G.-H.; LIU, H.; YU, K.; LIU, R.; SHINE, M. B.; FERNANDEZ, J.; BURCH-SMITH, T.; MOBLEY, J. K.; MCLETCHIE, N.; KACHROO, A.; KACHROO, P. The plant cuticle regulates apoplastic transport of salicylic acid during systemic acquired resistance. **Science Advances**, v. 6, n. 19, 8 maio 2020.
- LIN, C. C.; CHEN, L. M.; LIU, Z. H. Rapid effect of copper on lignin biosynthesis in soybean roots. **Plant Science**, v. 168, n. 3, p. 855–861, 1 mar. 2005.
- LINO, J. F.; TEIXEIRA CAIXETA, E.; FATIMA CANIATO, F.; SETOTAW, T.; CÉSAR SANT'ANA, G.; MARIA FERREIRA, L. Genetic Diversity of *Coffea arabica*. **Genetic Variation**, 2021.
- LIU, Q.; LUO, L.; ZHENG, L. Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 335, 24 jan. 2018.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**, Horst Marschner Academic Press. London. GB, 1986.
- MARSCHNER, P. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. [s.l.] Elsevier, 2012.
- MARTIN, M. H.; MARSCHNER, H. The Mineral Nutrition of Higher Plants. **The Journal of Ecology**, v. 76, n. 4, p. 1250, dez. 1988.
- MESQUITA, C. M. de.; REZENDE, J. Eudes.; CARVALHO, J. Silva.; JÚNIOR, M. A. Fabri. Manual do café: Manejo de Cafezais Em Produção. **Emater-Mg**, p. 72, 2016.
- MIEDES, E.; VANHOLME, R.; BOERJAN, W.; MOLINA, A. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 5 ago. 2014.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405–410, set. 2002.
- MONTEIRO, M. C.; FARAH, A. Chlorogenic acids in Brazilian *Coffea arabica* cultivars from various consecutive crops. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 611–614, set. 2012.
- NCAT. ATTRA-Agricultura Sustentable. Hoja de Datos: Manejo Orgánico de Plagas. n. 1-800-411-3222, p. 4, 2019.

NGOU, B. P. M.; AHN, H.-K.; DING, P.; JONES, J. D. G. Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. **Nature**, 10 mar. 2021.

OIC. **Relatório sobre o mercado de café – abril de 2023**. Disponível em:

<http://www.consorciopesquisacafe.com.br/images/stories/noticias/2021/2023/Abril/relatorio_oic_abril_2023.pdf>. Acesso em: 27 maio. 2023.

OLIVEIRA, M. N. V.; SANTOS, T. M. A.; VALE, H. M. M.; DELVAUX, J. C.; CORDERO, A. P.; FERREIRA, A. B.; MIGUEL, P. S. B.; TÓTOLA, M. R.; COSTA, M. D.; MORAES, C. A.; BORGES, A. C. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 221–230, abr. 2013.

OSBOURN, A. E. Peformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. **The Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1821, out. 1996.

PAULA, P. V. A. A. de; POZZA, E. A.; SANTOS, L. A.; TEIXEIRA, O. H. S.; PAULA, J. C. A. FORMAS DE PENETRAÇÃO DO GÊNERO CERCOSPORA. **Nucleus**, v. 12, n. 2, p. 271–280, 30 out. 2015. Disponível em:

<<http://www.nucleus.feituverava.com.br/index.php/nucleus/article/view/1399/1929>>. Acesso em: 15 set. 2023.

PEREIRA, C. S.; GUIMARÃES, R. J.; POZZA, E. A.; SILVA, A. A. da. Controle da cercosporiose e da ferrugem do cafeeiro com extrato etanólico de própolis. **Revista Ceres**, v. 55, n. 5, p. 369–376, 2008.

PES, L. Z.; ARENHARDT, M. H. **Fisiologia vegetal**. [s.l.: s.n.] 81 p.

POZZA, E. A. Diagnose e controle de doenças. *Em*: CARVALHO RODRIGUES, G.; DOMINGHETTI FERREIRA, A.; VINÍCIUS TEIXEIRA, A.; BOTELHO, C. E.; CARVALHO, J. P. F. **Cafecultura do Cerrado**. 22. ed. [s.l.: s.n.]p. 564.

POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A. **A Nutrição Mineral no Manejo de Doenças de Plantas**. Viçosa: Nutrição no manejo de doenças de plantas, 2012. 177–212 p.

POZZA, E. A. .; POZZA, A. A. A. Coffee plant diseases affected by nutritional balance. *Coffee Science - ISSN 1984-3909*, [S. l.], v. 18, p. e182086, 2023. DOI: 10.25186/v18i.2086. Disponível em:

<http://www.coffeescience.ufla.br/index.php/Coffeescience/article/view/2086>. Acesso em: 21 sep. 2023.

RAMOS, J. B.; RESENDE, M. L. V. de; BOTELHO, D. M. dos S.; PEREIRA, R. C. M.; REICHEL, T.; BALIEIRO, A. A. F.; BOTEAGA, G. P.; ABRAHÃO, J. C. de R. Screening coffee genotypes for brown eye spot resistance in Brazil. **PLOS ONE**, v. 17, n. 1, p. e0258822, 31 jan. 2022. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0258822>>.

RANATHUNGE, K.; STEUDLE, E.; LAFITTE, R. Blockage of apoplastic bypass-flow of water in rice roots by insoluble salt precipitates analogous to a Pfeffer cell. **Plant, Cell and Environment**, v. 28, n. 2, p. 121–133, fev. 2005.

SANTIAGO, R.; BARROS-RIOS, J.; MALVAR, R. Impact of Cell Wall Composition on Maize Resistance to Pests and Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 6960–6980, 27 mar. 2013.

SATUA, F.; CARMONA, M. **Defensa de las plantas: Sistema inmune inducible.**

Disponível em: <https://herbariofitopatologia.agro.uba.ar/?page_id=6097>. Acesso em: 9 maio. 2022.

SILVA, J. P.; MENDEZ, G. L.; LOMBANA, J.; MARRUGO, D. G.; CORREA-TURIZO, R. Physicochemical Characterization of Spent Coffee Ground (*Coffea arabica* L) and its Antioxidant Evaluation. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 16, n. SPL, p. 220–225, 10 nov. 2018.

SOMERVILLE, C.; BAUER, S.; BRININSTOOL, G.; FACETTE, M.; HAMANN, T.; MILNE, J.; OSBORNE, E.; PAREDEZ, A.; PERSSON, S.; RAAB, T.; OTHERS. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. **Science**, v. 306, n. 5705, p. 2206–2211, 2004.

SOUZA, A. G. C.; RODRIGUES, F. Á.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Infection Process of *Cercospora coffeicola* on Coffee Leaf. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 1, p. 6–11, jan. 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0434.2010.01710.x>>.

SOUZA, P. A. Vale.; RESENDE, M. L. Vilela.; BOTELHO, D. M. dos S.; POZZA, E. A.; OGOSHI, C.; MONTEIRO, A. C. A.; COSTA, B. H. G.; VASCONCELOS, V. A. M. Temperature, incubation time and virulence of *Cercospora coffeicola* in the production of cercosporin. **Journal of Phytopathology**, v. 167, n. 7–8, p. 371–379, 21 ago. 2019.

STEINHORST, L.; KUDLA, J. Signaling in cells and organisms — calcium holds the line. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 22, p. 14–21, dez. 2014.

TABASSUM, N.; BLILOU, I. Cell-to-Cell Communication During Plant-Pathogen Interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 35, n. 2, p. 98–108, fev. 2022.

TANG, R.-J.; LUAN, S. Regulation of calcium and magnesium homeostasis in plants: from transporters to signaling network. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 39, p. 97–105, out. 2017.

TIERENS, K. F. M.-J.; THOMMA, B. P. H. J.; BROUWER, M.; SCHMIDT, J.; KISTNER, K.; PORZEL, A.; MAUCH-MANI, B.; CAMMUE, B. P. A.; BROEKAERT, W. F. Study of the Role of Antimicrobial Glucosinolate-Derived Isothiocyanates in Resistance of Arabidopsis to Microbial Pathogens. **Plant Physiology**, v. 125, n. 4, p. 1688–1699, 1 abr. 2001.

TYAGI, P.; SINGH, A.; GUPTA, A.; PRASAD, M.; RANJAN, R. Mechanism and function of salicylate in plant toward biotic stress tolerance. **Emerging Plant Growth Regulators in Agriculture**, p. 131–164, 1 jan. 2022.

YOLCU, S.; OZDEMIR, F.; GÜLER, A.; BOR, M. Histone acetylation influences the transcriptional activation of POX in *Beta vulgaris* L. and *Beta maritima* L. under salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 100, p. 37–46, mar. 2016.

YU, M.; WANG, M.; GYALPO, T.; BASANG, Y. Stem lodging resistance in hullless barley: Transcriptome and metabolome analysis of lignin biosynthesis pathways in contrasting genotypes. **Genomics**, v. 113, n. 1, p. 935–943, jan. 2021.

YUAN, M.; JIANG, Z.; BI, G.; NOMURA, K.; LIU, M.; WANG, Y.; CAI, B.; ZHOU, J.-M.; HE, S. Y.; XIN, X.-F. Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. **Nature**, 10 mar. 2021.

ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 1, p. 1–8, 25 fev. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40858-016-0065-9>>.

ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A. Resistência a doenças induzida pela nutrição mineral das plantas. **Revisão anual de patologias de plantas**, v. 1, n. 2, p. 275–318, 1993.

ZHANG, J.; COAKER, G.; ZHOU, J.-M.; DONG, X. Plant Immune Mechanisms: From Reductionistic to Holistic Points of View. **Molecular Plant**, v. 13, n. 10, p. 1358–1378, out. 2020.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

**ARTIGO - USO DE NUTRIENTES NO MANEJO DA CERCOSPORIOSE E NAS
RESPOSTAS DE DEFESA DO CAFEIRO**

Preliminary version manuscript written according to the guidelines provided by the journal
PHYTOPARASITICA, ISSN 0334-2123 available at:

<https://www.springer.com/journal/12600/submission-guidelines>

USO DE NUTRIENTES NO MANEJO DA CERCOSPORIOSE E NAS RESPOSTAS DE DEFESA DO CAFEIEIRO

Roberth Delgado Ortiz (0000-0003-0338-8541), Mario Lúcio Vilela de Resende, Tharyn Reichel, Deila Magna dos Santos Botelho, Wilder Douglas Santiago.

Roberth Delgado Ortiz, Mario Lúcio Vilela de Resende Tharyn Reichel, Deila Magna dos Santos. Laboratório Fisiologia do Parasitismo, Fitopatologia. Universidade Federal de Lavras. Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos, s/n. Caixa Postal 3037 - CEP: 37203-202 - Lavras/MG - Brasil.

Abstract

A aplicação de nutrientes na agricultura tem um impacto significativo na ativação de mecanismos de defesa das plantas. No cafeeiro, a cercosporiose representa um importante desafio resultando em perdas na produção. Desta forma, o presente estudo, visou analisar os efeitos da aplicação de cobre, cálcio e magnésio no manejo da cercosporiose e nas respostas de defesa do cafeeiro. Para isso, mudas da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 foram pulverizadas com seis combinações de sulfato de cobre pentahidratado (Cu) associados a óxido de magnésio (MgO), óxido de cálcio (CaO), e óxido de cálcio e óxido de magnésio (CaMg) nas proporções de 4:1 e 2:1 (4CuSO₄:1CaO; 4CuSO₄:1MgO; 4CuSO₄:1CaO+MgO; 2CuSO₄:1CaO; 2CuSO₄:1MgO; 2CuSO₄:1CaO+MgO) além do controle positivo (fungicida: piraclostrobina e fluxapiraxade) e controle negativo (plantas sem aplicação de produtos), totalizando oito tratamentos. Sete dias após a aplicação dos tratamentos, as plantas foram inoculadas com conídios de *Cercospora coffeicola*. Posteriormente foi avaliada a severidade da cercosporiose, e a atividade de enzimas de defesa fenilalanina amônia-liase (PAL), peroxidase (POX), e superóxido dismutase (SOD) as 6, 24, 48 e 72 horas após inoculação (hai). Adicionalmente, foram analisados os teores de lignina solúvel, compostos fenólicos solúveis totais, clorofila a e b aos 15 dias após a aplicação. Plantas pulverizadas com o tratamento 4CuSO₄:1CaO apresentaram menor desenvolvimento da doença em comparação com os demais tratamentos. Além disso, esse tratamento apresentou maior atividade antioxidante após a inoculação do patógeno. Os resultados do presente estudo ressaltam a importância de considerar a interação entre nutrientes no cultivo do cafeeiro para o manejo da cercosporiose, além de fornecer a resposta de defesa na planta.

Keywords *Coffea arabica*, *Cercospora coffeicola*, defesa vegetal, micronutrientes e macronutrientes.

Introdução

Uma das medidas de controle de doenças é a aplicação de nutrientes, que dentre as diversas formas de atuação, podem ativar mecanismos de defesa da planta, o que é de grande relevância na agricultura, especialmente na agricultura orgânica. A nutrição equilibrada de plantas fortalece seu sistema de defesa natural, tornando-as mais resistentes a patógenos e reduzindo a incidência de doenças (POZZA; POZZA, 2023). Esta estratégia pode ser adotada no cafeeiro visando enfoque no manejo de doenças, principalmente na cafeicultura orgânica (GBIF, 2021). O café é considerado como uma das commodities mais importantes, com produção de aproximadamente 168,5 milhões de sacas (CONAB, 2023; OIC, 2023). No entanto, a produção cafeeira mundial pode ser limitada pela ocorrência de doenças como a cercosporiose, causada por *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke (DE RESENDE et al., 2021; SOUZA et al., 2019).

C. coffeicola é um fungo necrotrófico que se dispersa principalmente através de esporos e infecta diferentes partes da planta, como folhas, e frutos (BOTELHO et al., 2019; BOTELHO SANTOS et al., 2009). A cercosporiose causa manchas foliares caracterizadas por lesões circulares de cor marrom, o que pode resultar em desfolhação prematura, com isso causa perdas significativas na produção, qualidade dos grãos e da bebida (BOTELHO et al., 2019; LIMA et al., 2012). O controle de *C. coffeicola* é um desafio na produção de café, pois

pode desenvolver resistência a fungicidas além de sobreviver nos restos da cultura do cafeeiro como nas folhas e a desfolha, caule e grãos (COELHO et al., 2011; LAGE DE et al., 2016; SOUZA et al., 2019; DOS SANTOS et al., 2022).

A produção e qualidade do café são influenciadas por fatores genéticos, fisiológicos, edafoclimáticos e nutricionais (ALVES; GUIMARÃES, 2010). As situações de estresse, e em conjunto à nutrição são fatores que alteram a fisiologia da planta e com isso a capacidade fotossintética. A presença de clorofilas nas folhas é um dos principais fatores que determinam a eficiência fotossintética das plantas, estes pigmentos, são os encarregados da conversão da radiação luminosa em energia, na forma de ATP e NADPH (STREIT et al., 2005; NOGUEIRA et al., 2013). Além disso, se conhece a participação dos nutrientes como cobre e magnésio no papel da fotossíntese (ÁLVARO, 2020; FERRAZ; PAULO, 2019).

O equilíbrio adequado dos nutrientes minerais desempenha papel fundamental nos processos de metabolismo, crescimento, desenvolvimento e resistência das plantas a doenças (BROADLEY et al., 2012; LAGE DE et al., 2016; POZZA; POZZA, 2012). A presença de nutrientes como o cobre, cálcio e magnésio, estão envolvidos no fortalecimento dos mecanismos de defesa vegetal, podendo atuar nos processos de lignificação, explosão oxidativa, acúmulo de fitoalexinas e ativação de proteínas relacionadas à detoxificação, como as peroxidases (POX, EC 1.11.1.7) (ÁLVARO, 2020; GAO et al., 2021; GUO et al., 2010; LIANG; ZHANG, 2018). Essa ativação dos mecanismos de defesa da planta, visa limitar o crescimento ou a disseminação do patógeno (JONES; DANGL, 2006; TABASSUM; BLILOU, 2022; ZHANG et al., 2020).

Na ativação da resistência nas plantas, é crucial compreender que a parede celular desempenha uma função primordial nesse processo, pois é nela que os nutrientes entram em contato com a planta (ANJALI et al., 2023; FERRAZ; PAULO, 2019; LIU; LUO; ZHENG, 2018; MARSCHNER, 2012; STEINHORST; KUDLA, 2014). Especificamente, a lignina é a molécula que pode ligar-se a íons de metais pesados, como o Cu^{2+} ou óxidos metálicos, estimulando a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), por meio das peroxidases, que atuam como sinalizadores na rota dos fenilpropanóides (BHUIYAN et al., 2007; FERRAZ; PAULO, 2019; FOYER et al., 1997; IMADA et al., 2016; LEUNG et al., 2014; LIU; LUO; ZHENG, 2018).

Na rota dos fenilpropanóides, a fenilalanina é a molécula precursora e a enzima fenilalanina amônia-liase (PAL, EC 4.3.1.24), atua como catalisadora inicial é responsável da formação de trans-cinamato, que é um composto precursor importante na síntese de lignina, flavonoides e outros metabólitos secundários (AGRIOS, 2005; BHUIYAN et al., 2007; CARVAJAL, 2019; LIU; LUO; ZHENG, 2018). Ao ocorrer uma infecção fúngica na planta, a rota dos fenilpropanóides é ativada juntamente com as proteínas relacionadas à patogênese (PRPs), como sistema de defesa das plantas contra patógenos (ANJALI et al., 2023; CARVAJAL, 2019), desenvolvendo produção de EROs que apresentam efeitos tóxicos para os fungos (TYAGI et al., 2022). No entanto, para evitar que o nível de EROs atinja níveis prejudiciais para o hospedeiro, ocorre a produção de enzimas relacionadas à detoxificação de compostos gerados durante a interação planta-fungo. Entre as enzimas antioxidantes, estão a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), peroxidases, entre outras, responsáveis por manter o equilíbrio redox e proteger os tecidos vegetais contra os danos oxidativos (AGRIOS, 2005; ANJALI et al., 2023; CARVAJAL, 2019; MIEDES et al., 2014; YOLCU et al., 2016). Compreender os mecanismos subjacentes a essa forma de resistência é crucial para o desenvolvimento de estratégias de manejo de doenças mais sustentáveis e eficazes,

visando proteger as plantas contra uma ampla gama de patógenos, especificamente aqueles que limitam a produção desde a diminuição da capacidade fotossintética do cafeeiro como a cercosporiose do cafeeiro. Neste estudo, o objetivo é analisar o uso dos nutrientes cobre, cálcio e magnésio na ativação de respostas de defesa no cafeeiro contra a cercosporiose.

Material e métodos

Material vegetal

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia (DFP) na Universidade Federal de Lavras (UFLA), utilizando-se mudas de cafeeiro da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 com três pares de folhas totalmente expandidas. Foram realizados dois experimentos em delineamento experimental de blocos casualizados, foram aplicados oito tratamentos e três repetições, sendo cada parcela experimental constituída por duas plântulas. A incidência e severidade da doença foram avaliadas nos dois experimentos e para as análises bioquímicas foram utilizadas as amostras do último experimento.

Tratamentos

Os tratamentos foram constituídos por um controle negativo (sem aplicação de nutrientes), um controle positivo (fungicida piraclostrobina e fluxapiroxade) e seis associações de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -Cu) com óxido de magnésio (MgO), óxido de cálcio (CaO), óxido de cálcio e óxido de magnésio (Geox[®] CaMg), nas proporções de 4:1 e 2:1, conforme detalhado na Tabela 1. Foi realizada uma única aplicação dos tratamentos nas plântulas de cafeeiro.

Tabela 1 — Tratamentos aplicados em mudas de Catuaí Vermelho IAC 144 conduzidas em casa de vegetação

TRATAMENTOS	QUANTIDADE	DOSE	PROPORÇÃO
1- Controle negativo	---	---	---
2-Controle positivo (Piraclostrobina; Fluxapiroxade)	---	1L.ha ⁻¹	---
3-Sulfato de cobre (Cu) + óxido de cálcio (CaO)	8 g.L ⁻¹ + 2 g.L ⁻¹	3,2Kg.ha ⁻¹ + 0,8Kg.ha ⁻¹	4 CuSO4: 1CaO
4-Sulfato de cobre (Cu) + óxido de magnésio (MgO)	8 g.L ⁻¹ + 2 g.L ⁻¹	3,2Kg.ha ⁻¹ + 0,8Kg.ha ⁻¹	4 CuSO4: 1 MgO
5-Sulfato de cobre (Cu) + Geox (32% Ca + 14% Mg)	8 g.L ⁻¹ + 2 g.L ⁻¹	3,2Kg.ha ⁻¹ + 0,8Kg.ha ⁻¹	4CuSO4: 1CaO+MgO
6-Sulfato de cobre (Cu) + óxido de cálcio (CaO)	4 g.L ⁻¹ + 2 g.L ⁻¹	1,6Kg.ha ⁻¹ + 0,8Kg.ha ⁻¹	2CuSO4: 1CaO
7-Sulfato de cobre (Cu) + óxido de magnésio (MgO)	4 g.L ⁻¹ + 2 g.L ⁻¹	1,6Kg.ha ⁻¹ + 0,8Kg.ha ⁻¹	2CuSO4: 1MgO
8-Sulfato de cobre (Cu) + Geox (32% Ca + 14% Mg)	4 g.L ⁻¹ + 2 g.L ⁻¹	1,6Kg.ha ⁻¹ + 0,8Kg.ha ⁻¹	2CuSO4: 1CaO+MgO

Inoculação de *C. coffeicola*.

Para a inoculação de *C. coffeicola* utilizou-se o isolado CML 2984 proveniente do município de Bonfinópolis de Minas (MG), que está depositado na Coleção Micológica de Lavras (CML). As colônias do fungo foram replicadas em placas de Petri contendo meio batata dextrose agar (BDA) e incubadas em uma câmara Bio-Oxygen Demand (BOD) à 25°C, com fotoperíodo de 12 horas durante 7 dias. A obtenção de esporos dos isolados selecionados seguiu a metodologia adaptada de Souza et al. (2019). Discos de micélio foram macerados em 400 µL de água destilada e transferidos em Erlenmeyer contendo 20 mL de meio de cultura V8 líquido (100 mL de V8 em 900 mL de água destilada), sendo agitados a 100 rpm durante 10 dias. Em seguida, o líquido contendo o micélio foi vertido em placas contendo meio ágar-água e mantido em uma incubadora BOD, com fotoperíodo de 12 h a 25°C. Após aproximadamente 5 dias de incubação foram adicionados 10 mL de água destilada para realizar a raspagem dos conídios. A suspensão obtida foi filtrada, visualizada em câmara de Neubauer e calibrada a uma concentração de $5,1 \times 10^4$ conídios por mL. Posteriormente, o inóculo foi pulverizado nas folhas.

Severidade da cercosporiose

A avaliação da severidade da cercosporiose foi realizada de acordo com a escala diagramática descrita por (CUSTÓDIO et al., 2011). As avaliações foram realizadas a cada 8 dias a partir do surgimento dos primeiros sinais da doença, totalizando seis avaliações. A avaliação foi realizada em um par de folhas, correspondentes ao terceiro par de folhas totalmente expandidas, localizadas no terço médio de duas plantas por cada parcela. As amostragens foram não destrutivas, preservando a integridade das plantas durante o processo de avaliação.

Taxa de progresso da cercosporiose (r)

A taxa de progresso da doença foi calculada utilizando-se a equação proposta por (CAMPBELL; MADDEN, 1990) adaptada para cada tratamento. Os cálculos foram realizados com base nos dados obtidos a partir da média da severidade da doença dos dois experimentos realizados.

$$r = \left(\frac{Y_f}{T_f} - \frac{Y_i}{T_i} \right)$$

Em que: r: Taxa de desenvolvimento. Tf: Tempo final. Ti: Tempo inicial. Yf: Porcentagem da doença no tempo final. Yi: Porcentagem da doença no tempo inicial.

Área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS)

A partir das médias de severidade da cercosporiose foi calculada a AACPS conforme a equação proposta por (SHANER; FINNEY, 1977). Posteriormente, com a finalidade de obter resultados mais consistentes e representativos, calculou-se a média dos resultados obtidos nos dois experimentos conduzidos.

$$AACPS = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{Y_1 + Y_{i-1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Em que: AACPD = área abaixo da curva de progresso da doença; n: número total de avaliações; yi: proporção da doença na i-ésima observação e ti = tempo em dias na i-ésima observação.

Coleta e preparo das amostras

Foram feitas parcelas adicionais compostas por seis plantas para cada tratamento, a fim de realizar a análise bioquímica correspondente. Para a análise da atividade enzimática, foram coletadas amostras às 6, 24, 48 e 72 horas após a inoculação. Para a análise de compostos fenólicos, lignina e clorofila, foram coletadas amostras aos 15 dias após a aplicação dos tratamentos. Em cada experimento de análise bioquímico foram coletados o primeiro par de folhas totalmente expandidas de cada planta da parcela experimental e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em um freezer a -80°C para posteriores análises bioquímicas.

Análises de atividade enzimática

Para preparar os extratos enzimáticos foram utilizados 200 mg de tecido foliar macerados e homogeneizados com polivinilpirrolidona (PVP) 1% e 1 mL do tampão de extração (fosfato de potássio 100 mM; pH 7,0). Após a centrifugação das amostras (14000 rpm a 4°C), coletou-se o sobrenadante para determinar a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POX), seguindo o protocolo descrito de (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998). A concentração de proteína total foi quantificada utilizando-se o método de (BRADFORD, 1976).

A determinação da atividade da enzima PAL foi realizada seguindo a metodologia descrita por (ZUCKER, 1965). Em uma solução de 200 μL foram adicionados 5 μL do extrato enzimático, 145 μL Tris-HCl 50 mM (pH 8,8) e L-fenilalanina 50 mM. A solução foi incubada a 37°C por 20 minutos e as leituras de absorbância foram realizadas a 280 nm. Para calcular a atividade, foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $1,235 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

A atividade da POX foi determinada seguindo a metodologia de (URBANEK et al., 1991), que utiliza a oxidação do guaiacol como substrato. Para isso, foram adicionados 40 μL do extrato enzimático a uma solução de 160 μL contendo fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), guaiacol 30 mM e peróxido de hidrogênio 11,46 mM. A solução foi incubada a 30°C por 2 minutos e posteriormente quantificadas a 480 nm. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de $1,235 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ de acordo com (CHANCE; MAEHLI, 1955).

A atividade da enzima SOD foi avaliada de acordo com o método modificado de (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). Para a reação, diluiu-se o extrato enzimático com o tampão de extração em uma proporção 1:25. Em seguida, foram adicionados 30 μL da amostra a 153 mL da solução contendo fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), metionina 70 mM, EDTA 0,1 μM , NBT 1 mM e riboflavina 2 μM . As amostras foram expostas à luz branca por 15 minutos e as leituras da reação foram realizadas a 560 nm. A atividade da SOD foi quantificada com base na inibição de 50% da redução do NBT e expressa como uma unidade de atividade enzimática SOD.

Compostos fenólicos solúveis totais e lignina solúvel

A quantificação de compostos fenólicos solúveis totais e da lignina solúvel foi realizada de acordo com a metodologia descrita por (SPANOS; WROLSTAD, 1990), com modificações conforme (REICHEL et al., 2021).

O tecido foliar foi macerado e liofilizado, sendo utilizados 30 mg de amostra homogeneizados com 1,2 mL de metanol a 80%. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação dos teores de compostos fenólicos solúveis totais, enquanto o resíduo foi usado para a quantificação da lignina solúvel.

Para a quantificação de compostos fenólicos, adicionou-se o reagente Folin-Ciocalteu (0,25M, Na₂CO₃ (1 M) e água destilada. O volume total da reação foi de 200 µL. A solução foi medida na absorbância de 725 nm no espectrofotômetro (BioTek® PowerWave XS).

Para a quantificação de lignina foi utilizado o protocolo modificado de (MONTIES, 1994; HARBORNE, 1989). O resíduo das amostras foi mantido a 45°C em estufa overnight. Posteriormente adicionou-se 1,5 ml da solução de ácido tioglicólico e HCl (2M) (proporção 1:10), as amostras permaneceram em banho-maria por 4 horas. As amostras foram centrifugadas e no sobrenadante adicionou-se NaOH (0,5 M). As amostras permaneceram em um agitador orbital shaker a 100 rpm overnight. Após uma nova centrifugação, o sobrenadante foi homogeneizado com HCl, e armazenado a 4° C por 4 horas. Após outra centrifugação, o precipitado foi homogeneizado com NaOH (0,5 M) e utilizou-se 200 µl por amostra. A absorbância foi medida a 280 nm. Os valores foram calculados com base na curva padrão de lignina e expressos em µg de lignina por miligrama de massa seca (DOSTER, 1988).

Determinação de clorofila A e B por HPLC-UV

As análises foram realizadas no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do café (INCT-Café) e da Universidade Federal de Lavras – UFLA. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e uma alíquota de 0,1g foi utilizada para extração em 10 mL de metanol grau analítico para HPLC (Merck®). As amostras foram agitadas manualmente utilizando gral com pistilo por 60 segundos. Posteriormente, o material foi filtrado em membranas de 0,45 µm (Milipore®) e injetadas diretamente no sistema cromatográfico (LICHTENTHALER E BUSCHMANN, 2001).

As análises foram realizadas em um HPLC (Shimadzu®), equipado com bomba quaternária de alta pressão modelo LC-20AT, degaseificador modelo DGU-20A5, interface modelo CBM-20A, injetor automático modelo SIL-20A-HT e detector UV-Vis (SPD-20A). A coluna empregada foi a Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) conectada a uma pré-coluna XDB-C18 (4,6 x 12,5 mm, 5 µm). As análises cromatográficas foram realizadas conforme protocolos adaptados de (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001; LOURENÇO-LOPES et al., 2022; MENDES; CARTAXANA; BROTAS, 2007; NAKAMURA; WATANABE, 1998). Os padrões de Clorofila A e B foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Merck®).

Para a construção das curvas analíticas foi realizada a diluição de uma solução-estoque, contendo os padrões (160 µg.mL⁻¹ de Clorofila A e 200 µg.mL⁻¹ de clorofila B). Todas as soluções foram preparadas em metanol e foram sonificadas em ultrassom. A partir dessa solução-estoque, a faixa de construção das curvas analíticas foi preparada variando a concentração de 0,25 a 50 µg.mL⁻¹.

As amostras e os padrões foram eluídos em modo isocrático (100% metanol) à 40°C. O comprimento de onda utilizado foi de 665 nm para clorofila A e 652 nm para clorofila B, fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e volume de injeção de

20 µL. As injeções dos padrões e das amostras foram realizadas em triplicata, sendo a identidade do analito confirmada pelo tempo de retenção e o perfil do pico da amostra, comparado ao do padrão.

Foram realizados procedimentos para padronização/validação do método utilizado, sendo avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2011). A linearidade foi expressa por meio da equação da reta e o respectivo coeficiente de determinação (R²). Para LD e LQ, foram considerados os parâmetros relativos à curva analítica construída. Para a determinação dos limites, foram utilizadas as seguintes relações: LD = 3 x (s/S) e LQ = 10 x (s/S), em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica. A precisão foi realizada pela precisão intermediária. Para isso, foi realizada a análise, em 5 dias diferentes, de soluções-padrão referentes a três níveis de concentração (0,5; 10; 50 µg.mL⁻¹), sendo estimado o CV ao final das sucessivas repetições (CV (%) = (s/CMD) x 100, em que, s = estimativa do desvio-padrão; CMD = concentração média determinada). A exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação utilizando 3 amostras, escolhidas aleatoriamente, sendo essas fortificadas com padrões dos analitos em 3 níveis de concentrações diferentes (0,5; 10; 50 µg.mL⁻¹). A recuperação foi determinada considerando a seguinte equação:

$$\% \text{ recuperação} = [(concentração \text{ medida}) / (concentração \text{ esperada})] \times 100$$

$$Clorofila \text{ total} = Clorofila \text{ a} + Clorofila \text{ b}$$

Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para a avaliação da doença foi realizado o teste Tukey a 5% de significância. Os dados bioquímicos foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SAS versão 9.0 (Institute Inc., Cary, NC, USA) e os gráficos foram obtidos no software SigmaPlot versão 12.0.

Resultados

Taxa do progresso da cercosporiose (r)

A severidade da doença difere entre os tratamentos avaliados ao longo do período de avaliação tanto do experimento 1 quanto do experimento 2 (Fig. 1A e 1B), indicando progresso da doença ao longo do tempo. No entanto, ao calcular a taxa de progresso da doença (r) não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (Fig. 2A), indicando taxa de progresso da cercosporiose semelhante nos tratamentos aplicados. Os resultados indicam uma variação entre 0,06 e 0,1 unidades de crescimento da doença.

Figura 0—1 Progresso de severidade da cercosporiose do cafeeiro em dias após a inoculação (DAI). A). Primeiro experimento B). Segundo experimento.

Figura 0—2 Taxa de progresso (r) da doença nos tratamentos aplicados no cafeeiro, onde r é a taxa que determina o crescimento da curva. B). Área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) para os diferentes tratamentos. Letras minúsculas diferentes nas bar indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os tratamentos aplicados.

Área abaixo da curva de progresso da severidade da cercosporiose

Na avaliação da área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS), foram observadas diferenças significativas. O controle negativo (testemunha) apresentou o maior valor na AACPS (572,05), enquanto plantas pulverizadas com cobre, cálcio e magnésio nas proporções de 4:1 (4CuSO₄:1CaO; 4CuSO₄:1MgO; 4CuSO₄:1CaO+MgO); 2:1 (2CuSO₄:1CaO; 2CuSO₄:1MgO) e o controle positivo (Fungicida) apresentaram menor AACPS da cercosporiose (AACPS 199,36 a 348,6), representando controle de aproximadamente 39 - 65% quando comparado ao controle negativo (Fig. 2B). O aumento significativo da AACPS no controle negativo é devido a suscetibilidade das plantas de cafeeiro à cercosporiose.

Análises de atividade enzimática

A atividade enzimática foi avaliada em diferentes tempos após a inoculação de *C. coffeicola* para todos os tratamentos, exceto no tratamento controle positivo (fungicida) uma vez que o modo de atuação é diretamente

sobre o patógeno, interferindo nos processos metabólicos do fungo, não possuindo a capacidade de induzir resistência e fortalecimento nas plantas.

Foram observadas diferenças significativas na atividade da enzima PAL nos tratamentos as 6 hai (Fig. 3A). Os tratamentos $2\text{CuSO}_4:1\text{CaO}$ e $2\text{CuSO}_4:1\text{CuO}+\text{MgO}$ apresentaram menor atividade da PAL, enquanto o tratamento $2\text{CuSO}_4:1\text{MgO}$ apresentou a maior atividade às 6 hai. No entanto, nos demais tempos avaliados (24 h, 48 h e 72 h), não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Fig. 3B, C e D).

Figura 0—3 Atividade da enzima PAL, envolvida na rota dos fenilpropanóides, em folhas de C. arabica após a aplicação dos tratamentos à base cobre, cálcio e magnésio, avaliados às 6h (A), 24h (B), 48h (C) e 72h (D) após a inoculação do fungo C. coffeicola. Letras minúsculas diferentes nas barras indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os tratamentos aplicados.

Foram observadas diferenças significativas na atividade da enzima POX ao longo dos tempos avaliados. As 6 hai, plantas pulverizadas com o tratamento $4\text{CuSO}_4:1\text{CaO}$ apresentaram a maior atividade enzimática em comparação com as dos demais tratamentos. Por outro lado, destaca-se a baixa atividade enzimática nos tratamentos $2\text{CuSO}_4:1\text{CaO}$ e $2\text{CuSO}_4:1\text{MgO}$ (Fig. 4A).

Foi observada redução na atividade da POX na maioria dos tratamentos as 24 hai, com exceção do controle negativo, que apresentou a maior atividade da POX, Plantas pulverizadas com os tratamentos $4\text{CuSO}_4:1\text{MgO}$ e $2\text{CuSO}_4:1\text{CaO}$ apresentaram baixa atividade enzimática (Fig. 4B).

Comparando a atividade da enzima ao longo do tempo de coleta, constatou-se queda acentuada de atividade as 48 hai em todos os tratamentos avaliados. Nesse tempo, o tratamento $4\text{CuSO}_4:1\text{CaO}$ e $4\text{CuSO}_4:1\text{CaO}+\text{MgO}$ foram os de maior atividade enzimática, enquanto o tratamento $2\text{CuSO}_4:1\text{CaO}$ foi o de menor atividade (Fig. 4C).

No último tempo de quantificação da POX, as 72 hai, o tratamento com maior atividade foi $4\text{Cu}1\text{CaMg}$ seguido por o controle negativo, com atividade semelhante nos dois últimos tempos avaliados. Por outro lado, os tratamentos $4\text{CuSO}_4:1\text{CaO}$, $4\text{CuSO}_4:1\text{MgO}$ e $2\text{CuSO}_4:1\text{MgO}$ apresentaram menor atividade às 72 hai (Fig. 4D). Esses resultados indicam que a atividade da POX em plantas de café é influenciada pelo tempo após a inoculação do patógeno e pelos tratamentos aplicados.

Figura 0—4 Atividade da enzima POX, envolvida na defesa antioxidante, em folhas de C. arabica após a aplicação dos tratamentos à base de cobre, cálcio e magnésio, avaliados às 6h (A), 24h (B), 48h (C) e 72h (D) após a inoculação do patógeno C. coffeicola. Letras minúsculas diferentes nas barras indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os tratamentos aplicados.

Não houve um efeito significativo em plantas pulverizadas com os diferentes tratamentos na atividade da enzima SOD quantificadas em tempos distintos após a inoculação (Fig. 5).

Figura 0—5 Atividade da enzima SOD, envolvida na limpeza de espécies reativas de oxigênio, em folhas de C. arabica após a aplicação dos tratamentos à base de cobre, cálcio e magnésio, avaliados às 6h (A), 24h (B), 48h (C) e 72h (D) após a inoculação do patógeno C. coffeicola. Letras minúsculas iguais nas barras indicam que não são significativamente diferentes (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os tratamentos aplicados.

Em relação aos teores de compostos fenólicos solúveis totais (Fig. 6A), os tratamentos avaliados foram estatisticamente semelhantes entre si, com valores variando entre 6,24 e 7,05 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ de matéria seca. Esses resultados indicam que os diferentes tratamentos compostos por combinação de nutrientes não modificaram significativamente os níveis de compostos fenólicos em mudas de café durante o tempo avaliado.

Figura 0—6 Quantificação de lignina total solúvel e compostos fenólicos solúveis totais em folhas de *C. arabica*, aos 15 dias após a aplicação dos tratamentos à base de cobre, cálcio e magnésio. A) Quantificação dos compostos fenólicos totais expressa em μg de compostos fenólicos totais por mg de matéria seca. B) Quantificação da lignina total solúvel expressa em μg de lignina por miligrama de massa seca. Letras minúsculas diferentes nas barras indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os tratamentos aplicados

Para os teores de lignina solúvel foram observadas diferenças significativas (Fig. 6B). O tratamento $4\text{CuSO}_4:1\text{MgO}$ apresentou o maior conteúdo de lignina ($8,87 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de matéria seca), apresentando uma diferença de 36,77% em relação do tratamento $4\text{CuSO}_4:1\text{CaO}$ ($5,6 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) o qual apresentou o menor teor de lignina solúvel dentre os tratamentos testados. Além disso, o tratamento $4\text{CuSO}_4:1\text{MgO}$, em relação ao controle negativo apresentou um incremento de 29,34%. Enquanto os demais tratamentos apresentaram teores semelhantes (entre $6,1$ e $7,39 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de matéria seca).

Clorofila A, B e total

Os teores de clorofila A e clorofila B foram quantificados utilizando HPLC-UV, onde foram obtidos os tempos médios de retenção dos padrões de clorofila A e B. O tempo médio de retenção para a clorofila A foi de $11,13 \pm 0,61$ minutos, enquanto para a clorofila B foi de $21,87 \pm 0,75$ minutos (Fig. 7).

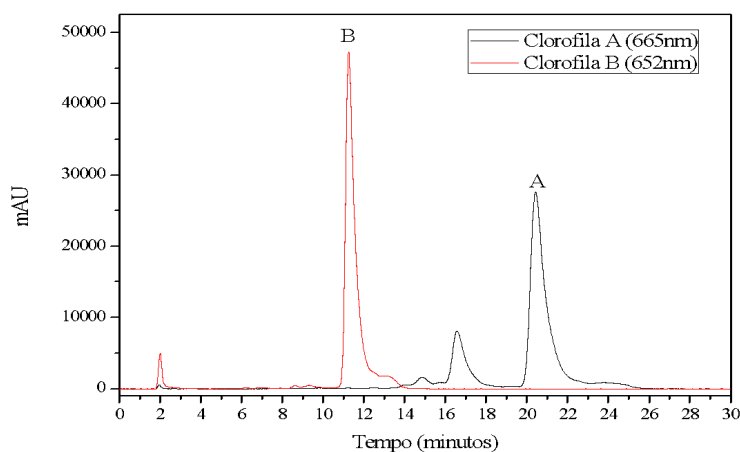


Figura 0—7 Cromatograma da solução-padrão dos compostos clorofila A e B na concentração de $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Os coeficientes de correlação, LD, LQ, coeficiente de variância (CV) e exatidão (recuperação) obtidos para o método analítico empregado estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 0—1 Coeficientes de correlação, limite de detecção, quantificação, precisão e exatidão dos padrões Clorofila A e B.

Parâmetros	Clorofila A	Clorofila B
r^2	0,99999	0,99998
LD (mg.g ⁻¹)	0,049	0,022
LQ (mg.g ⁻¹)	0,165	0,072
Recuperação (%)	80 a 105	85 a 108
CV (%)	1,14 a 2,13	0,97 a 3,46

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos aplicados em relação à concentração de clorofila A e clorofila B, indicando que possivelmente os tratamentos pulverizados em mudas de cafeeiro não influenciaram significativamente na composição desses pigmentos nas folhas do cafeeiro (Fig. 8). A concentração média de clorofila A variou de 5,66 e 6,8 mg.g⁻¹, enquanto a concentração média de clorofila B apresentou valores entre 2,7 e 3,3 mg.g⁻¹ massa fresca.

Figura 0—8 Quantificação de clorofila A, B e clorofila total em folhas de C. arabica, aos 15 dias após a aplicação dos tratamentos à base de cobre, cálcio e magnésio. Letras minúsculas iguais nas barras indicam que não são significativamente diferentes (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os tratamentos aplicados para cada tipo de clorofila. Letras minúsculas iguais nas barras indicam que não são significativamente diferentes na soma da clorofila total (teste de Tukey; $p \leq 0,05$).

Discussão

Efeito dos nutrientes no manejo da cercosporiose

Foi observada uma diferença na taxa de desenvolvimento do patógeno em relação à área abaixo da curva, onde a taxa de desenvolvimento se refere à velocidade ou ritmo de crescimento do patógeno em folhas de café pulverizadas com diferentes tratamentos aplicados. O patógeno se desenvolveu em um patossistema favorável para causar a doença, com taxas de crescimento semelhantes. No entanto, por outro lado, foi observada uma diferença no acúmulo da doença ao longo do tempo, que é representada pela AACPS, onde as associações de cobre, cálcio e magnésio resultou em redução do progresso da severidade da cercosporiose, com destaque para o tratamento cobre e cálcio na proporção de 4:1 (4CuSO₄:1CaO). Esses resultados indicam que a influência da aplicação destes nutrientes na capacidade das plantas de enfrentar doenças patogênicas é fortalecida quando há uma proporção adequada de micro e macronutrientes nas células das plantas (MARSCHNER, 2012). A presença de cátions Ca²⁺ no tecido foliar, respeitando a quantidade ideal de potássio (K) no conteúdo celular, inibe drasticamente a ação de enzimas pectolíticas produzidas por fungos fitopatogênicos, cuja função é dissolver a lamela média da parede celular. Além disso, na lamela média, retículo endoplasmático e nos vacúolos são encontradas altas concentrações de Ca, comprovando a sua importância para a integridade dos tecidos vegetais (MARSCHNER, 1995). Já o cobre desempenha papel essencial na proteção das plantas contra oomicetos, fungos e bactérias (GRAHAM; DEWDNEY; YONCE, 2011). De acordo com Shabbir e colaboradores, (2020), a aplicação foliar de nutrientes, como o cobre, tem a capacidade de ser retido na parede celular e proporcionar respostas diante de situações de estresse abiótico. A planta utiliza a capacidade de reter íons de cobre, como também do cálcio e magnésio na parede celular para desencadear respostas oxidativas por meio das EROs como resposta ao estresse (BROADLEY et al., 2012). Vale ressaltar que as altas concentrações dessas EROs podem resultar em danos às membranas da planta (AMEH; SAYES, 2019; SHABBIR et al., 2020), mas essa produção de EROs nas células das plantas pode modificar o ambiente do patógeno, e as plantas apresentam adaptações para tolerar a toxicidade dessas EROs. Essas respostas culminam na ativação de rotas metabólicas secundárias e na lignificação, que auxiliam na defesa contra os patógenos (BROADLEY et al., 2012).

Aplicação de cobre em plantas de arroz, reduz a severidade da queima-da-bainha causada por *Rhizoctonia solani* em arroz (EI KHAING et al., 2014) e o cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) em plantas de tomate (BAŞTAŞ, 2014). Na cultura do café (CUNHA; MENDES; CHALFOUN, 2004), constataram a eficácia de diferentes fontes de cobre como oxicloreto de cobre, sulfato de cobre e calda Vicosa no controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*). Existem estudos que comprovam a existência de plantas que acumulam metais pesados na parede celular como estratégia de criar toxicidade, estas são chamadas como hiperacumuladoras de metais pesados, que utilizam elementos como o cobre seletivamente. Essas plantas têm a capacidade de inibir relações parasitárias ao acumular os metais pesados gerando zonas tóxicas para patógenos (GONZÁLEZ-MENDOZA; ZAPATA-PÉREZ, 2008). Além disso, é importante destacar a necessidade de futuras pesquisas sobre espécies hiperacumuladoras e se o café apresenta esta característica, pois auxiliarão a aprofundar a compreensão sobre o papel do cobre como agente direto na ação contra patógenos.

Efeito dos tratamentos na atividade enzimática

A atividade das enzimas relacionadas a respostas de defesa da planta foi influenciada pelos tratamentos aplicados. As diferentes proporções de cobre, cálcio e magnésio possivelmente desencadeiam a atividade das enzimas, com enfoque especial para nutriente cobre que é um elemento de transição redox ativo com funções na

fotosíntese, respiração e atua também na proteção contra estresse oxidativo (BROADLEY et al., 2012, THAKUR; SOHAL, 2013, SHABBIR et al., 2020). O excesso de espécies reativas de oxigênio é regulado por um sistema de desintoxicação celular, composto por mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014; HUANG et al., 2019). Entre os antioxidantes enzimáticos incluem principalmente superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e glutatona peroxidase (GPX) (HUANG et al., 2019). Além dos antioxidantes enzimáticos, é importante ressaltar a presença de antioxidantes não enzimáticos, como compostos fenólicos e certos minerais, com destaque do cobre, zinco, selênio e magnésio. Já os minerais, como cobre, zinco, selênio e magnésio, desempenham funções importantes na atividade antioxidante da planta, auxiliando na neutralização de radicais livres e na manutenção do equilíbrio celular (BARBOSA et al., 2010). Sendo assim, a presença de micronutrientes como Cu neste experimento, influenciou no desenvolvimento e redução da doença, e também na ativação da atividade enzimática da planta. No entanto, os tratamentos não diferiram significativamente na atividade antioxidante enzimática da SOD após a inoculação do patógeno.

A quantificação da atividade de enzimas também possui importância na avaliação de doenças, pois relacionando análises bioquímicas e a observação de sintomas, é possível determinar não apenas a presença e severidade da doença, mas também analisa mudanças fisiológicas e bioquímicas que ocorrem na planta em resposta à infecção (CARVAJAL, 2019; JONES; DANGL, 2006; TABASSUM; BLILOU, 2022). Os resultados indicam variação na atividade das enzimas de acordo com as diferentes proporções dos nutrientes que foram aplicados, e que esta atividade pode estar relacionada aos processos de infecção após inoculação do patógeno. Ao avaliar os tratamentos, observou-se principalmente aumento na atividade da enzima POX. Para a enzima PAL, plantas de cafeeiro pulverizadas com nutrientes apresentaram variação na atividade somente o tempo inicial de coleta (6 hai) e a atividade da enzima SOD foi semelhante tanto entre os tratamentos quanto nos tempos de coleta. A PAL é precursora da rota dos fenilpropanóides, e a SOD é uma enzima antioxidante, ambas são cruciais na proteção das células frente fatores de estresse bióticos e abióticos (FRANCO et al., 2022; REICHEL et al., 2021).

De acordo com (HUANG et al., 2019), as EROs desempenham papel importante na produção de compostos estruturais relacionados à defesa, ativados quando as plantas respondem ao ataque de patógenos, tanto local quanto sistemicamente. Além disso, essas moléculas também estão envolvidas na formação da lignina, servindo como substrato para peroxidases e na via dos fenilpropanóides (FERRAZ; PAULO, 2019; MIEDES et al., 2014).

Efeitos dos tratamentos nos compostos fenólicos solúveis totais

Neste experimento, não foram observadas diferenças na produção de compostos fenólicos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos de nutrientes. Esses compostos são geralmente produzidos em resposta a estímulos de estresse biótico e abiótico. Na presença de patógenos ou ambientes adversos, o acúmulo de esses compostos pode ser transitória, ou acumulativa durante um período de tempo em resposta a um estímulo específico. Geralmente, numa planta infectada por um patógeno pode aumentar temporariamente a produção de compostos fenólicos para combater a infecção (SHALABY; HORWITZ, 2015). Uma das possíveis indicações deste trabalho é comparar a diferença dessa produção incluindo um tratamento sem inoculação, essencial para diferenciar os valores de quantificação dos compostos fenólicos após inoculação.

Quando as plantas são expostas a altos níveis de cobre, como também a compostos que contém cal (Óxido de cálcio), podem aumentar a produção de compostos fenólicos como parte de sua resposta de tolerância. Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes, ajudando a neutralizar os radicais livres e protegendo as células (ABEGAZ; KINFE, 2019; ROBSON; HARTLEY; JARVIS, 1981).

A quantificação dos compostos fenólicos obtida, pode estar relacionada com a baixa atividade da enzima PAL, que desempenha papel fundamental na rota dos fenilpropanóides e está envolvida na produção de compostos secundários relacionados à defesa das plantas (Thangavelu et al., 2003). Sob condições de estresse, os metabólitos secundários das plantas aumentam e atuam como moléculas sinalizadoras para aumentar a expressão de genes relacionados à defesa (ABEGAZ; KINFE, 2019; ANJALI et al., 2023).

Além disso, Uhse; Djamei, (2018) e Osbourn (1996), mencionam que em alguns fungos fitopatogênicos, evoluíram enzimas detoxificantes que podem interferir na atividade dos mecanismos das defesas constitutivas ou induzidas da planta contra o ataque fúngico. Especialmente em fungos necrotróficos, como é o caso de *C. coffeicola*, que são conhecidos por secretar enzimas que podem suprimir a resposta antioxidante das plantas hospedeiras. Essas enzimas secretadas pelos fungos podem inibir ou diminuir a atividade das enzimas antioxidantes, como SOD e POX, ou as enzimas de resposta de defesa como a PAL que desempenha um papel fundamental na formação de compostos fenólicos e outros compostos de defesa nas plantas (UHSE; DJAMEI, 2018).

Efeitos na lignina

A variação na lignificação entre o tratamento com cobre e magnésio e o tratamento com cobre e cálcio pode ser atribuída ao comportamento distinto do magnésio e do cálcio em relação ao cobre. Essa diferença pode resultar em uma maior lignificação devido ao estresse causado pelo cobre. Possivelmente o cálcio e o magnésio podem ter capacidades distintas quando se trata de capturar átomos de cobre nas partículas dos produtos. tal suposição se baseia em pesquisas anteriores em que o cálcio e o magnésio foram utilizados como agentes de desintoxicação de metais (cobre, zinco, alumínio e sódio) (KINRAIDE; PEDLER; PARKER, 2004). Foi observado que o cálcio atua como um fator que pode diminuir a toxicidade do cobre nas células vegetais ao formar complexos com ele (BARCOS ARIAS, 2015). Além disso, o cálcio desempenha um papel importante na regulação da absorção e transporte de cobre nas raízes das plantas, afetando sua distribuição nos tecidos vegetais (MENGEL et al., 2001). Outros íons, como magnésio, sódio e potássio, podem competir com o cobre pelos sítios de ligação na interface organismo-água, o que também pode reduzir a atividade do cobre livre (LOCK et al., 2007). De acordo com Lock et al., (2007), estudos tem demonstrado que o magnésio pode reduzir a toxicidade do cobre em diferentes culturas como cevada, feijão-caupi, trigo e videira, evidenciando o comportamento diferencial dessas plantas em relação ao magnésio.

O cobre é considerado um indicador adequado do estado nutricional das plantas, pois até mesmo uma deficiência leve desse micronutriente pode resultar em uma diminuição na lignificação (ROBSON; HARTLEY; JARVIS, 1981). Adicionalmente, o cálcio e o magnésio, desempenham um papel importante na manutenção da estabilidade da membrana e integridade dos tecidos vegetais, atuando como barreiras físicas contra patógenos invasores (LONGCHAMP; ANGELI; CASTREC-ROUELLE, 2016).

Efeito na clorofila

O cobre é um elemento de transição redox-ativa que tem função primordial nas fotossínteses, respiração e na proteção antagonista do estresse (BROADLEY et al., 2012). Cerca de cem proteínas contêm cobre como micronutriente e aproximadamente metade delas estão localizadas no cloroplasto, onde se unem para formar a plastocianina e participam das reações fotossintéticas. No presente estudo não foram observadas mudanças significativas no conteúdo de clorofila. Droppa; Norman e Horvath (1984), nos seus estudos avaliaram a concentração de clorofilas e a atividade fotossintética, eles encontraram uma forte relação entre a concentração de cobre nas folhas e a atividade do fotossistema I, e nos seus resultados indicaram que a atividade do fotossistema I, geralmente é menor ao se encontrar uma deficiência de Cu. Concluindo que a concentração de clorofila, é apenas ligeiramente afetada pela concentração de cobre nas folhas (BROADLEY et al., 2012b; DROPPA; NORMAN; HORVATH, 1984). Devido a essa relação, os tratamentos aplicados na pesquisa não resultaram em diferenças significativas na concentração de clorofilas, conforme observado.

É importante considerar, conforme observado por Franco e seu equipe (2022), que as duas formas redox do cobre, Cu^+ e Cu^{2+} , são capazes de afetar o fluxo de elétrons na cadeia de transporte fotossintético (THOUNAOJAM et al., 2012). Além disso, a presença de cobre em excesso pode resultar em toxicidade para os pigmentos e o processo de fotossíntese das plantas, aumentando a geração de espécies reativas de oxigênio, conforme observado em pesquisas como as de Cook *et al.* (1998) e Carvalho *et al.* (2022).

Conclusões

A aplicação dos tratamentos à base de cobre, cálcio e magnésio teve um impacto no manejo da cercosporiose do cafeeiro. Destaca-se o tratamento composto por cobre e cálcio na proporção 4:1 ($4\text{CuSO}_4:1\text{CaO}$), que apresentou menor progresso da doença em comparação com os outros tratamentos. Além disso, estimulou aumento na atividade da enzima POX após a inoculação do patógeno *C. coffeicola*, sugerindo maior capacidade de estabilizar a planta sob estresse oxidativo.

Em resumo, os resultados concluem que os produtos à base de nutrientes podem ter efeitos significativos na atividade enzimática e nos teores de lignina solúvel nas folhas de *C. arabica*. Essas descobertas destacam a importância de considerar os nutrientes e sua interação no cultivo do cafeeiro para melhorar a resposta de defesa da planta contra a cercosporiose. No entanto, são necessárias pesquisas mais aprofundadas para compreender a ativação da defesa da planta quando exposta a nutrientes, abordando aspectos moleculares, bioquímicos e fisiológicos. Além disso, é importante entender os mecanismos subjacentes à aplicação desses tratamentos e avaliar seus efeitos a longo prazo em relação às doenças.

Acknowledgements

Agradecimentos ao órgão de fomento como a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao INCT-Café UFLA.

REFERÊNCIAS

- ABEGAZ, B. M.; KINFE, H. H. Secondary metabolites, their structural diversity, bioactivity, and ecological functions: An overview. **Physical Sciences Reviews**, v. 4, n. 6, 27 maio 2019.
- AGRIOS, G. N. HOW PLANTS DEFEND THEMSELVES AGAINST PATHOGENS. **Plant Pathology**, p. 207–248, 1 jan. 2005.
- ÁLVARO, G. J. **El magnesio y su importancia en el crecimiento vegetal**. 2020. Disponível em: <<https://www.fertibox.net/single-post/magnesio-agricultura>>.
- ALVES, J.D.; GUIMARÃES, R.J. Sintomas de desordens fisiológicas em cafeeiro. In: GUIMARÃES, R.J.; MENDES, A.N.G.; BALIZA, D.P. (Ed.). *Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas*. Lavras: UFLA, p.169-215. 2010.
- AMEH, T.; SAYES, C. M. The potential exposure and hazards of copper nanoparticles: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 71, p. 103220, 1 out. 2019.
- ANJALI; KUMAR, S.; KORRA, T.; THAKUR, R.; ARUTSELVAN, R.; KASHYAP, A. S.; NEHELA, Y.; CHAPLYGIN, V.; MINKINA, T.; KESWANI, C. Role of plant secondary metabolites in defence and transcriptional regulation in response to biotic stress. **Plant Stress**, v. 8, p. 100154, 1 jun. 2023.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. de C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.
- BARCOS ARIAS, M. S. Determinación de la influencia de calcio, cobre y boro en el desarrollo de plantas micropropagadas de banano variedad Williams, e inoculadas con conidias y concentrado crudo tóxico de *Mycosphaerella fijiensis*. 2015.
- BAŞTAŞ, K. **Effects on Tomato Bacterial Canker of Resistance Inducers and Copper Compounds in Greenhouse** Selçuk Journal of Agriculture and Food Sciences Selçuk University, Faculty of Agriculture, Alaeddin Keykubat Campus Selçuklu-Konya / Türkiye. Selçuk University, 2014.
- BERK; COOKE. *Cercospora coffeicola*. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=191536>>.
- BHUIYAN, N. H.; LIU, Weiping.; LIU, Guosheng.; SELVARAJ, Gopalan.; WEI, Yangdou.; KING, John. Transcriptional regulation of genes involved in the pathways of biosynthesis and supply of methyl units in response to powdery mildew attack and abiotic stresses in wheat. **Plant Molecular Biology**, v. 64, n. 3, p. 305–318, 4 jun. 2007.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-Aeration Following Hypoxia or Anoxia Leads to Activation of the Antioxidative Defense System in Roots of Wheat Seedlings. **Plant physiology**, v. 116, n. 2, p. 651–658, 1 fev. 1998.
- BOTELHO, D. M. dos S.; RESENDE, M. L. V. de; REZENDE, J. C. de; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; ANDRADE, C. C. L. de; ALVES, E.; AMARAL, D. C. Difference between isolates from brown eye spot and black spot lesions in coffee plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, 2019.
- BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BRASIL. **PORTARIA Nº 52, DE 15 DE MARÇO DE 2021 - PORTARIA Nº 52, DE 15 DE MARÇO DE 2021 - DOU - Imprensa Nacional**. 2021.
- BRASIL, P. da R. **Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências** Brasil. 2003.
- BROADLEY, M.; BROWN, P.; ÇAKMAK, I.; RENGEL, Z.; ZHAO, F. Function of Nutrients. *Em: Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 191–248.
- CAMPBELL, C. D.; MADDEN, L. V. Introduction to plant disease epidemiology. New York: J. Willey, 1990. 532 p.

- CARVAJAL, C. C. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. **Medicina Legal de Costa Rica**, v. 36, n. 1, p. 91–100, 2019.
- CARVALHO, C. A.; POZZA, E. A.; DE SOUZA, P. E.; POZZA, A. A. A.; DE RESENDE, M. L. V.; PORTO, A. C. M.; BALIEIRO, A. A. F.; PEREZ, C. D. P.; DOS SANTOS BOTELHO, D. M. Nanoparticles in the management of brown eye spot in coffee. **European Journal of Plant Pathology**, v. 163, n. 3, p. 767–774, 7 jul. 2022.
- CARVALHO, V. L. de; CUNHA, R. L. da; SILVA, N. R. N. **Mancha de Phoma do cafeeiro**. [s.l.: s.n.].
- CHANCE, B.; MAEHLI, A. C. [136] Assay of catalases and peroxidases. *Em*: [s.l.: s.n.]p. 764–775.
- COELHO, A. G. Souza.; RODRIGUES, F. Ávila.; MAFFIA, L. Antônio.; MIZUBUTI, E. S. Gomide. Infection Process of *Cercospora coffeicola* on Coffee Leaf. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 1, p. 6–11, jan. 2011.
- GBIF *COFFEA ARABICA* L IN SECRETARIAT. GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset. 2021.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de café**. [s.l.: s.n.]. . Acesso em: 27 maio. 2023.
- COOK, C. M.; KOSTIDOU, A.; VARDAKA, E.; LANARAS, T. Effects of copper on the growth, photosynthesis and nutrient concentrations of Phaseolus plants. **Photosynthetica**, v. 34, n. 2, p. 179–193, 1 jan. 1998.
- CUNHA, R. L. da; MENDES, A. N. G.; CHALFOUN, S. M. Controle químico da ferrugem do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e seus efeitos na produção e preservação do enfolhamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 5, p. 990–996, out. 2004.
- CUSTÓDIO, A. A. de P.; POZZA, E. A.; GUIMARÃES, S. da S. C.; KOSHIKUMO, É. S. M.; HOYOS, J. M. A.; SOUZA, P. E. de. Comparison and validation of diagrammatic scales for brown eye spots in coffee tree leaves. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1067–1076, dez. 2011.
- DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, 2 dez. 2014.
- DE RESENDE, M.L.V.; POZZA, E.A.; REICHEL, T.; BOTELHO, D.M.S. Strategies for Coffee Leaf Rust Management in Organic Crop Systems. *Agronomy* 2021, 11, 1865. <https://doi.org/10.3390/agronomy1109186>
- DOSTER, M. A. Quantification of Lignin Formation in Almond Bark in Response to Wounding and Infection by Phytophthora Species. **Phytopathology**, v. 78, n. 4, p. 473, 1988.
- DROPPA, M.; NORMAN, T.; HORVATH, G. **Effects of Cu Deficiency on Photosynthetic Electron Transport on JSTOR**. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/23551>>. Acesso em: 7 jun. 2023.
- EI KHAING, E.; ABIDIN MIOR AHMAD, Z.; MUIYUN, W.; RAZI ISMAIL, M. Effects of Silicon, Copper and Zinc Applications on Sheath Blight Disease Severity on Rice. **World Journal of Agricultural Research**, v. 2, n. 6, p. 309–314, 21 nov. 2014.
- FERRAZ, A.; PAULO, U. D. S. Biossíntese e deposição de lignina nas paredes celulares. 2019.
- FERREIRA, T.; SHULER, J.; GUIMARÃES, R.; FARAH, A. CHAPTER 1. Introduction to Coffee Plant and Genetics. *Em*: **Coffee**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2019. p. 1–25.
- FOYER, C. H.; LOPEZ-DELGADO, H.; DAT, J. F.; SCOTT, I. M. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. **Physiologia Plantarum**, v. 100, n. 2, p. 241–254, jun. 1997.
- FRANCO, A.; BUOSO, S.; ZANIN, L.; PINTON, R.; TOMASI, N. Copper Toxicity in Maize: The Severity of the Stress is Reduced Depending on the Applied Fe-Chelating Agent. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 3, p. 1567–1581, 1 mar. 2022.
- GAO, M.; HE, Y.; YIN, X.; ZHONG, X.; YAN, B.; WU, Y.; CHEN, J.; LI, X.; ZHAI, K.; HUANG, Y.; GONG, X.; CHANG, H.; XIE, S.; LIU, J.; YUE, J.; XU, J.; ZHANG, G.; DENG, Y.; WANG, E.; THARREAU, D.; WANG, G.-L.; YANG, W.; HE, Z. Ca²⁺ sensor-mediated ROS scavenging suppresses rice immunity and is exploited by a fungal effector. **Cell**, v. 184, n. 21, p. 5391–5404.e17, 2021.

- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309–314, 1 fev. 1977.
- GONZÁLEZ-MENDOZA, D.; ZAPATA-PÉREZ, O. Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. **Boletín de la Sociedad Botánica de México**, v. 82, p. 53–61, 2008.
- GRAHAM, J. H.; DEWDNEY, M. M.; YONCE, A. D. Comparison of copper formulations for control of citrus canker on “Hamlin” orange. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 124, p. 79–84, 2011.
- GUO, X. Y.; ZUO, Y. B.; WANG, B. R.; LI, J. M.; MA, Y. B. Toxicity and accumulation of copper and nickel in maize plants cropped on calcareous and acidic field soils. **Plant and Soil**, v. 333, n. 1–2, p. 365–373, 30 ago. 2010.
- HARBORNE, J. B. **Methods in Plant Biochemistry**. [s.l: s.n.]v. 1552 p.
- HUANG, H.; ULLAH, F.; ZHOU, D.-X.; YI, M.; ZHAO, Y. Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 25 jun. 2019.
- ICO, I. C. O. Total production by exporting countries. 2016.
- IMADA, K.; SAKAI, S.; KAJIHARA, H.; TANAKA, S.; ITO, S. Magnesium oxide nanoparticles induce systemic resistance in tomato against bacterial wilt disease. **Plant Pathology**, v. 65, n. 4, p. 551–560, maio 2016.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, nov. 2006.
- JONES, R. G. W.; LUNT, O. R. The function of calcium in plants. **The Botanical Review**, v. 33, n. 4, p. 407–426, out. 1967.
- KINRAIDE, T. B.; PEDLER, J. F.; PARKER, D. R. Relative effectiveness of calcium and magnesium in the alleviation of rhizotoxicity in wheat induced by copper, zinc, aluminum, sodium, and low pH. **Plant and Soil**, v. 259, n. 1/2, p. 201–208, fev. 2004.
- KIRKBY, E. A.; RÖMHELD, V. Micronutrientes na fisiologia de plantas- Funções, Absorção e Mobilidade. **Informações agronômicas**, v. 118, n. 2, p. 1–24, 2007.
- LAGE DE, C. C. Andrade.; VICENTIN, R. Pereira.; COSTA, J. Rodrigues.; PERINA, F. José.; RESENDE, M. L. V. de.; ALVES, Eduardo. Alterations in antioxidant metabolism in coffee leaves infected by *Cercospora coffeicola*. **Ciência Rural**, v. 46, n. 10, p. 1764–1770, 27 jun. 2016.
- LEUNG, Y. H.; NG, A. M. C.; XU, X.; SHEN, Z.; GETHINGS, L. A.; WONG, M. T.; CHAN, C. M. N.; GUO, M. Y.; NG, Y. H.; DJURIŠIĆ, A. B.; LEE, P. K. H.; CHAN, W. K.; YU, L. H.; PHILLIPS, D. L.; MA, A. P. Y.; LEUNG, F. C. C. Mechanisms of Antibacterial Activity of MgO: Non-ROS Mediated Toxicity of MgO Nanoparticles Towards *Escherichia coli*. **Small**, v. 10, n. 6, p. 1171–1183, mar. 2014.
- LIANG, C.; WANG, W. Antioxidant response of soybean seedlings to joint stress of lanthanum and acid rain. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 11, p. 8182–8191, 8 nov. 2013.
- LIANG, C.; ZHANG, B. Effect of exogenous calcium on growth, nutrients uptake and plasma membrane H⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase activities in soybean (*Glycine max*) seedlings under simulated acid rain stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 165, n. September, p. 261–269, 2018.
- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. F4.3.1-F4.3.8, ago. 2001.
- LIMA, L.M., POZZA, E.A., AND SILVA SANTOS, F. Relationship between incidence of brown eye spot of coffee cherries and the chemical composition of coffee beans. *J. Phytopathol.* 160: 209–211. 2012.
- LIU, Q.; LUO, L.; ZHENG, L. Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 335, 24 jan. 2018.
- LOCK, K.; CRIEL, P.; DE SCHAMPHELAERE, K. A. C.; VAN EECKHOUT, H.; JANSSEN, C. R. Influence of calcium, magnesium, sodium, potassium and pH on copper toxicity to barley (*Hordeum vulgare*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 68, n. 2, p. 299–304, out. 2007.

- LONGCHAMP, M.; ANGELI, N.; CASTREC-ROUELLE, M. Effects on the accumulation of calcium, magnesium, iron, manganese, copper and zinc of adding the two inorganic forms of selenium to solution cultures of *Zea mays*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 98, p. 128–137, jan. 2016.
- LOURENÇO-LOPES, C.; FRAGA-CORRAL, M.; GARCIA-PEREZ, P.; CARREIRA-CASAI, A.; SILVA, A.; SIMAL-GANDARA, J.; PRIETO, M. A. A HPLC-DAD method for identifying and estimating the content of fucoxanthin, β -carotene and chlorophyll a in brown algal extracts. **Food Chemistry Advances**, v. 1, p. 100095, out. 2022.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**, Horst Marschner Academic Press. London. GB, 1986.
- MARSCHNER, P. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. [s.l.] Elsevier, 2012.
- MENDES, C. R.; CARTAXANA, P.; BROTAS, V. HPLC determination of phytoplankton and microphytobenthos pigments: comparing resolution and sensitivity of a C 18 and a C 8 method. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 5, n. 10, p. 363–370, out. 2007.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E. A.; KOSEGARTEN, H.; APPEL, T. Principles of Plant Nutrition. **Principles of Plant Nutrition**, v. 5, p. 849, 2001.
- MIEDES, E.; VANHOLME, R.; BOERJAN, W.; MOLINA, A. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 5 ago. 2014.
- MONTEIRO, M. C.; FARAH, A. Chlorogenic acids in Brazilian *Coffea arabica* cultivars from various consecutive crops. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 611–614, set. 2012.
- MONTIES, B. Chemical assesment of lignin biodegradation some qualitative and quantitative aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2–3, p. 277–283, 1 mar. 1994.
- NAKAMURA, A.; WATANABE, T. HPLC determination of photosynthetic pigments during greening of etiolated barley leaves. **FEBS Letters**, v. 426, n. 2, p. 201–204, 17 abr. 1998.
- NOGUEIRA, O.; MARTINS, D.; TOMAZ, A.; ANDRADE, V.; PASSOS RENATO R. "Teor de nitrogênio, clorofila e relação clorofila-carotenoide em café arábica em solo submetido a diferentes corretivos de acidez." Revista Brasileira de Ciências Agrárias, vol. 8, no. 3. pp.390-395. 2013. Redalyc, <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=119028125006>
- OIC. **Relatório sobre o mercado de café – abril de 2023**. Disponível em: <http://www.consorcioquesquisacafe.com.br/images/stories/noticias/2021/2023/Abril/relatorio_oic_abril_2023.pdf>. Acesso em: 27 maio. 2023.
- OSBOURN, A. E. Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. **The Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1821, out. 1996.
- POZZA, E. A. Diagnose e controle de doenças. Em: CARVALHO RODRIGUES, G.; DOMINGHETTI FERREIRA, A.; VINÍCIUS TEIXEIRA, A.; BOTELHO, C. E.; CARVALHO, J. P. F. **Cafecultura do Cerrado**. 22. ed. [s.l: s.n.]p. 564.
- POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A. **A Nutrição Mineral no Manejo de Doenças de Plantas**. Viçosa: Nutrição no manejo de doenças de plantas, 2012. 177–212 p.
- POZZA, E. A. ; POZZA, A. A. A. Coffee plant diseases affected by nutritional balance. *Coffee Science* - ISSN 1984-3909, [S. l.], v. 18, p. e182086. DOI: 10.25186/v18i.2086. Disponível em: <https://coffeescience.ufla.br/index.php/Coffeescience/article/view/2086>. 2023
- REICHEL, T.; DE RESENDE, M. L. V.; MONTEIRO, A. C. A.; FREITAS, N. C.; DOS SANTOS BOTELHO, D. M. Constitutive Defense Strategy of Coffee Under Field Conditions: A Comparative Assessment of Resistant and Susceptible Cultivars to Rust. **Molecular Biotechnology** 2021 64:3, v. 64, n. 3, p. 263–277, 30 set. 2021.
- ROBSON, A. D.; HARTLEY, R. D.; JARVIS, S. C. Effect of Copper Deficiency on Phenolic and Other Constituents of Wheat Cell Walls on JSTOR. **The New Phytologist**, v. 89, n. 3, p. 361–371, 1981.
- SANTOS BOTELHO, M. D.; POZZA AMPÉLIO, E.; ALVES, E.; NETO, A. E. F.; ALVES RODRIGUES, P. J.; BARBOSA, D.; MELO DE CASTRO, D. Anatomical and physiological aspects of coffee seedlings (*Coffea arabica* L.) with brown eye spot (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cook.) cultivated with silicic acid. **Coffee Science - ISSN 1984-3909**, v. 4, n. 2, p. 93–99, 2009.

DOS SANTOS BOTELHO, D.M., DE RESENDE, M.L.V., TEIXEIRA, A.R. et al. Cercosporin production by *Cercospora coffeicola* isolates: spectrophotometry and HPLC quantification and image analysis. *Chem. Pap.* 76, 2567–2572, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01965-5>

SAS. https://www.sas.com/pt_br/legal/copyright.html Accessed: 2023.

SHABBIR, Z.; SARDAR, A.; SHABBIR, A.; ABBAS, G.; SHAMSHAD, S.; KHALID, S.; NATASHA; MURTAZA, G.; DUMAT, C.; SHAHID, M. Copper uptake, essentiality, toxicity, detoxification and risk assessment in soil-plant environment. **Chemosphere**, v. 259, p. 127436, nov. 2020.

SHALABY, S.; HORWITZ, B. A. Plant phenolic compounds and oxidative stress: integrated signals in fungal-plant interactions. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 347–357, 19 ago. 2015.

SHANER, G.; FINNEY, R. R. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slowmildewing in knox wheat. *Em: Phytopathology*. [s.l: s.n.].p. 1052–1056.

SILVA, J. P.; MENDEZ, G. L.; LOMBANA, J.; MARRUGO, D. G.; CORREA-TURIZO, R. Physicochemical Characterization of Spent Coffee Ground (*Coffea arabica* L) and its Antioxidant Evaluation. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 16, n. SPL, p. 220–225, 10 nov. 2018.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. [s.l.] Wiley, 2011.

SOUZA, P. A. Vale.; RESENDE, M. L. Vilela.; BOTELHO, D. M. dos S.; POZZA, E. A.; OGOSHI, C.; MONTEIRO, A. C. A.; COSTA, B. H. G.; VASCONCELOS, V. A. M. Temperature, incubation time and virulence of *Cercospora coffeicola* in the production of cercosporin. **Journal of Phytopathology**, v. 167, n. 7–8, p. 371–379, 21 ago. 2019.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson Seedless grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 7, p. 1565–1571, 1 jul. 1990.

STEINHORST, L.; KUDLA, J. Signaling in cells and organisms — calcium holds the line. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 22, p. 14–21, dez. 2014.

STREIT, N. M.; PEDROLO CANTERLE, L.; WEBER DO CANTO, M.; HYCHECK H. L. H. As Clorofilas. *Ciência Rural*; 35(3):748-755. ISSN: 0103-8478. 2005. Disponível en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33135343>

TABASSUM, N.; BLILOU, I. Cell-to-Cell Communication During Plant-Pathogen Interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 35, n. 2, p. 98–108, fev. 2022.

THOUNAOJAM, T. C.; PANDA, P.; MAZUMDAR, P.; KUMAR, D.; SHARMA, G. D.; SAHOO, L.; SANJIB, P. Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 53, p. 33–39, abr. 2012.

TYAGI, P.; SINGH, A.; GUPTA, A.; PRASAD, M.; RANJAN, R. Mechanism and function of salicylate in plant toward biotic stress tolerance. **Emerging Plant Growth Regulators in Agriculture**, p. 131–164, 1 jan. 2022.

UHSE, S.; DJAMEI, A. Effectors of plant-colonizing fungi and beyond. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 6, 1 jun. 2018.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA LODZ (POLAND). CENTRE OF MICROBIOLOGY AND VIROLOGY, DEPT. OF PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY), K. (Polish A. of S. **Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase** *Acta Physiologiae Plantarum (Poland)*1991.

YOLCU, S.; OZDEMIR, F.; GÜLER, A.; BOR, M. Histone acetylation influences the transcriptional activation of POX in *Beta vulgaris* L. and *Beta maritima* L. under salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 100, p. 37–46, mar. 2016.

YU, M.; WANG, M.; GYALPO, T.; BASANG, Y. Stem lodging resistance in hullless barley: Transcriptome and metabolome analysis of lignin biosynthesis pathways in contrasting genotypes. **Genomics**, v. 113, n. 1, p. 935–943, jan. 2021.

ZHANG, J.; COAKER, G.; ZHOU, J.-M.; DONG, X. Plant Immune Mechanisms: From Reductionistic to Holistic Points of View. **Molecular Plant**, v. 13, n. 10, p. 1358–1378, out. 2020.

ZUCKER, M. Induction of Phenylalanine Deaminase by Light and Its Relation to Chlorogenic Acid Synthesis in Potato Tuber Tissue. **Plant physiology**, v. 40, n. 5, p. 779–784, set. 1965.