

LUCIANO ABI RACHED TANNURI

**USO DO ÁCIDO SALICÍLICO NO MANEJO DE DOENÇAS  
FOLIARES E DA MELOIDOGINOSE DO CAFEIEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

RIO PARANAÍBA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca da Universidade Federal  
de Viçosa - Câmpus Rio Paranaíba

T

T167u Tannuri, Luciano Abi Rached, 1973-  
2018        Uso do ácido salicílico no manejo de doenças foliares e da  
              meloidoginose do cafeeiro / Luciano Abi Rached Tannuri. – Rio  
              Paranaíba, MG, 2018.  
              vi, 46f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Everaldo Antônio Lopes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Resistência de Plantas. 2. *Hemileia vastatrix*. 3.  
*Ascochyta coffeae*. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Fitopatologia. Mestrado em  
Agronomia-Produção Vegetal (Campus CRP). II. Título.

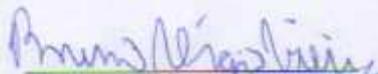
633.73

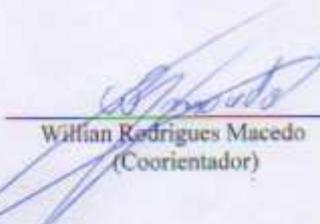
LUCIANO ABI RACHED TANNURI

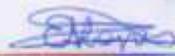
**USO DO ÁCIDO SALICÍLICO NO MANEJO DE  
DOENÇAS FOLIARES E DA MELOIDOGINOSE DO  
CAFEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 09 de novembro de 2018.

  
Bruno Sérgio Vieira

  
Wilfian Rodrigues Macedo  
(Coorientador)

  
Everaldo Antônio Lopes  
(Orientador)

*À minha amada esposa, sempre ao meu lado em todos os momentos;*

*À minha amada família, exemplo e esteio;*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr Everaldo Antônio Lopes, pela amizade, orientação e valorosos ensinamentos conferidos a mim durante esta jornada;

Ao Professor Dr Willian Rodrigues Macedo, pela dedicação, amizade e coorientação na condução deste trabalho;

Ao Professor Dr Bruno Sérgio Vieira, pela participação na banca de defesa.

À Coopadap, por ceder a área experimental.

Aos inestimáveis amigos Hércules e Diego, pelas colaborações no experimento de campo.

Aos grandes amigos Wytallo Márcio, Daniela Souza, Maria Elisa e Danúbia, pela imensurável colaboração com os experimentos.

Aos técnicos de laboratório Jader e Vinícius, incansáveis no dever e sempre dispostos em ajudar.

Aos inesquecíveis amigos que fiz no mestrado, pelo aprendizado, convivência, companheirismo e boas lembranças que levarei.

A todos os professores e funcionários da Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba – MG, por me acolherem calorosamente.

## ÍNDICE

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	2
ARTIGO 1: A APLICAÇÃO DE ÁCIDO SALICÍLICO CONTROLA A FERRUGEM E A MANCHA DE <i>ASCOCHYTA</i> EM CAFEIEIRO.....	4
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
INTRODUÇÃO.....	6
MATERIAL E MÉTODOS.....	7
RESULTADOS.....	11
DISCUSSÃO.....	26
CONCLUSÕES.....	28
ARTIGO 2: ÁCIDO SALICÍLICO REDUZ A REPRODUÇÃO DE <i>MELOIDOGYNE EXIGUA</i> EM MUDAS DE CAFEIEIRO.....	29
RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	30
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
RESULTADOS.....	34
DISCUSSÃO.....	38
CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

## RESUMO

TANNURI, Luciano Abi Rached, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa – *Campus* de Rio Paranaíba, novembro de 2018. **Uso do ácido salicílico no manejo de doenças foliares e da meloidoginose do cafeeiro.** Orientador: Everaldo Antônio Lopes. Coorientador: Willian Rodrigues Macedo.

A aplicação de ácido salicílico em plantas pode induzir resistência a muitos estresses abióticos e bióticos. Entretanto, pouco se sabe sobre o potencial desse biorregulador no controle de patógenos do cafeeiro. Assim, conduzimos experimentos para avaliar o efeito da aplicação de ácido salicílico (AS) no controle de doenças foliares e *Meloidogyne exigua* em plantas de café. O primeiro experimento foi conduzido em uma plantação de café de sete anos de idade para avaliar o efeito da aplicação foliar de AS ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ) sobre doenças foliares de ocorrência natural, em comparação com hidróxido de cobre ( $2 \text{ kg.ha}^{-1}$ ), uma combinação de fungicidas protetores e sistêmicos (tratamento químico padrão) e o controle não-tratado. Cinco aplicações mensais foram realizadas entre Novembro de 2016 a Março de 2017. Avaliações de incidência e severidade de ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e mancha de *Ascochyta* (*Ascochyta coffeae*) foram feitas mensalmente. A atividade da catalase, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e proteínas totais foi avaliado três vezes durante o experimento. A aplicação de AS reduziu ferrugem e mancha de *Ascochyta* em 40 e 37%, respectivamente, com taxas de redução de doença similares àquelas obtidas com o fungicida protetor hidróxido de cobre. As maiores reduções dessas doenças foram alcançadas com a mistura de fungicidas, enquanto que as maiores incidências e severidades das doenças foram observadas em plantas não-tratadas. O AS influenciou positivamente as concentrações de enzimas antioxidantes em relação aos outros tratamentos. O segundo experimento foi conduzido em casa de vegetação com o objetivo de estudar o efeito do AS sobre *M. exigua*. Os seguintes tratamentos foram usados: ácido salicílico ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ), ácido salicílico ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + fluensulfona ( $0.192 \text{ g.planta}^{-1}$ ), fluensulfona ( $0.192 \text{ g.planta}^{-1}$ ), controle não-tratado e inoculado com nematoide e controle não-tratado sem nematoide. Plantas de café foram inoculadas com 5000 ovos de *M. exigua* e foram cultivadas por 95 dias em vasos plásticos de 2 L de capacidade. Três aplicações de AS foram feitas aos 5, 20 e 45 dias após o transplante das plântulas. Aos 46 dias, as enzimas catalase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase foram avaliadas. O ácido salicílico reduziu o número de ovos do nematoides em comparação com a testemunha inoculada. Plantas tratadas com fluensulfona apresentaram sintomas de fitotoxicidade, o que refletiu na concentração das enzimas antioxidantes. Nenhuma diferença foi observada nos níveis das enzimas em plantas tratadas com AS e os controles, provavelmente devido a um estresse hídrico ocorrido durante o experimento.

## ABSTRACT

TANNURI, Luciano Abi Rached, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa – *Campus* de Rio Paranaíba, November, 2018. **Use of salicylic acid on the management of coffee leaf diseases and *Meloidogyne exigua***. Adviser: Everaldo Antônio Lopes. Co-Adviser: Willian Rodrigues Macedo.

The application of salicylic acid on plants may induce resistance to many abiotic and biotic stresses. However, little is known about the potential of this bioregulator on controlling pathogens in coffee plants. Thus, we carried out experiments to assess the effect of the application of salicylic acid (SA) on the control of foliar diseases and *Meloidogyne exigua* in coffee plants. The first experiment was carried out in a seven-year-old coffee plantation to evaluate the effect of foliar application of SA ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ) on naturally occurring foliar diseases, in comparison to copper hydroxide ( $2 \text{ kg.ha}^{-1}$ ), a combination of systemic and protectant fungicides (standard chemical treatment) and a non-treated control. Five monthly applications were performed from November 2016 to March 2017. Evaluations of incidence and severity of rust (*Hemileia vastatrix*) and *Ascochyta* leaf spot (*Ascochyta coffeae*) were done at monthly basis. The content of catalase, ascorbate peroxidase, superoxide dismutase and total proteins were assessed three times during the experiment. The application of SA reduced rust and *Ascochyta* leaf spot by 40% and 37%, respectively, with rates of disease reduction similar to those obtained with the protectant fungicide copper hydroxide. Higher reduction of these diseases was achieved the fungicide mixture, whereas higher incidence and severity was observed in the non-treated plants. The salicylic acid positively influenced the antioxidant enzyme concentrations in relation to the other treatments. The second experiment was carried out in greenhouse with the objective of studying the effect of SA on *M. exigua*. The following treatments were used: salicylic acid ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ), salicylic acid ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + fluensulfone ( $0.192 \text{ g.plant}^{-1}$ ), fluensulfone ( $0.192 \text{ g.plant}^{-1}$ ), non-treated control inoculated with nematode and non-treated control without nematode. Coffee plants were inoculated with 5,000 *M. exigua* eggs and grown for 95 days in 2-L plastic pots. Three applications of SA were made at 5, 20 and 45 days after transplanting the seedlings. At 46 days, the enzymes catalase, ascorbate peroxidase and superoxide dismutase were evaluated. Salicylic acid reduced the number of eggs compared to the inoculated control. Plants treated with fluensulfone showed phytotoxicity symptoms, which reflected the concentrations of antioxidant enzymes. No difference was observed in the enzyme levels in plants treated with AS and the controls, probably due to a water stress during the experiment.

## INTRODUÇÃO GERAL

Desde o dia em que o pastor de ovelhas observou seus animais comendo curiosos frutinhas vermelhas nos campos da Etiópia, muita coisa mudou na história do que viria a ser uma das bebidas mais apreciadas no mundo moderno. Em meados do século XV, os árabes difundiram e levaram o café para os países da Europa, e, com as grandes navegações, o grão rapidamente se espalhou para o restante do mundo. Era uma bebida de custo elevado e que somente os nobres tinham acesso. Mas com a chegada do café no Brasil, a produção começou a ganhar força rapidamente e impulsionou a popularização da bebida (Shie, 2018).

Trazido da Guiana Francesa para Belém, o café passou em seguida a ser cultivado em regiões de altitude do Rio de Janeiro e, posteriormente, nos estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais (Verardi, 2017). Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial do grão, com produção estimada em cerca de 3,3 milhões de toneladas para 2018 (CONAB 2018), em uma área colhida de quase dois milhões de hectares. O estado de Minas Gerais é o maior produtor, com cerca de um milhão e meio de toneladas produzidas em 2016 (IBGE, 2017).

O cafeeiro pode estar sujeito a danos de origem biótica e abiótica, causando estresse às plantas e desencadeando alterações em vários processos fisiológicos, como controle de abertura e fechamento dos estômatos, fotossíntese e respiração. Essas alterações levam ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio, que causam peroxidação lipídica da membrana celular e limitam o desenvolvimento vegetal (Faghani et al., 2015).

Para evitar tais danos, as plantas desenvolveram eficiente sistema composto por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos que neutralizam e reduzem os efeitos nocivos causados pelas espécies reativas de oxigênio (Bilgin, 2010; Afify et al., 2014). As enzimas antioxidantes convertem os radicais superóxido ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água e oxigênio. Para controle destes radicais livres as plantas se utilizam de mecanismos enzimáticos, incluindo: Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD) (Radwan et al., 2010; Taiz & Zeiger, 2013).

A ativação de mecanismos endógenos de defesa de plantas pode ocorrer devido a estímulos bióticos (patógenos ou microrganismos benéficos) e abióticos (Li et al., 2012). O ácido salicílico (AS) é um hormônio vegetal com função primordial de sinalização química que atua em reações de hipersensibilidade em plantas e ativa a indução de resistência sistêmica adquirida (Resende et al., 2003; Li et al., 2012; Taiz & Zeiger, 2013). Devido a isso, a aplicação de AS em plantas pode contribuir para o controle de doenças da parte aérea e do sistema radicular em várias culturas, como, por exemplo, cerejeira (Xu et al., 2008), feijoeiro (Xue et al., 2014), tomateiro (Nikoo et

al., 2014), macieira (Zhang et al., 2016) e maracujazeiro (Silva et al., 2016). No entanto, pouco se sabe sobre o efeito da aplicação de AS no controle de doenças do cafeeiro.

Na cafeicultura, milhares de litros de agrotóxicos são aplicados anualmente, causando elevação dos custos de produção, impactos ambientais e com eficiência de controle nem sempre satisfatória. Diversas opções ao uso dos agroquímicos já foram investigadas pelos cientistas, incluindo os indutores de resistência em plantas. A aplicação de silício e de óleo de citronela aumentam a resistência de plantas de café ao nematoide *Meloidogyne exigua* (Silva, 2009), e aos fungos *Hemileia vastatrix* e *Cercospora coffeicola*, respectivamente (Pereira, 2012). A concentração de enzimas antioxidantes aumenta após a aplicação de silício e de óleo de citronela, a exemplo da peroxidase, indicando possível ação como indutores de resistência em plantas (Silva, 2009; Pereira, 2012).

Em razão do potencial de uso do ácido salicílico na agricultura como agente de indução de resistência, é possível que ocorra redução na intensidade de doenças de cafeeiros tratados com essa substância. Para estudar essa hipótese, avaliamos o efeito da aplicação de ácido salicílico sobre doenças foliares e a meloidoginose do cafeeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afify A.E.M.M.R., Farahat A.A., Al-Sayed A.A., Mahfoud N.A.M. 2014. Antioxidant enzymes as well as oxidant activities involved in defense mechanisms against the root-knot, reniform and citrus nematodes in their host plants. *International Journal of Biotechnology and Food Science*, 2:102-111.

Bilgin D.D. 2010. ROS, oxidative stress and engineering resistance in higher plants. In: Gupta, S.D. (Ed). *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Boca Raton: Science Publishers. 205-227.

CONAB Companhia Nacional de Abastecimento. 2018. Acompanhamento da safra brasileira, v5- Safra 2018-N1- Primeiro levantamento, 73 pp.

Faghani E., Gharechahi J., Komatsu S., Mirzai M., Khavarinejad R.A., Najafi F., Farsad L.K., Salekdeh G.H. 2015. Comparative physiology and proteomic analysis of two wheat genotypes contrasting in drought tolerance. *Journal of Proteomics*. 114:1-15.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2017. Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 20 abril 2017.

Li Y., Zhang Z., Nie Y., Zhang L., Wang Z. 2012. Proteomic analysis of salicylic acid-induced resistance to *Magnaporthe oryzae* in susceptible and resistance rice. *Proteomics*. 12:2340-2354.

Nikoo F.S., Sahebani N., Aminiah H., Mokhtarnejad L., Ghaderi R. 2014. Induction of systemic resistance and defense-related enzymes in tomato plants using *Pseudomonas fluorescens* CHAO and salicylic acid against root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Journal of Plant Protection Research*. 54:283-289.

Pereira R.B., Lucas G.C., Perina F.J., Ribeiro Júnior P.M., Alves E. 2012. Óleo essencial de citronela no controle e na ativação de respostas de defesa do cafeeiro contra a ferrugem e cercosporiose. *Ciência e Agrotecnologia*. 36:383-390

Radwan D.E.M., Fayez K.A., Mahmoud Y.S., Lu G. 2010. Modifications of antioxidant activity and protein composition of bean leaf due to *Bean yellow mosaic virus* infection and salicylic acid treatments. *Acta Physiologiae Plantarum*. 32:891-904.

Resende M.L.V., Salgado S.M.L., Chaves Z.M. 2003. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira*. 28:123-130.

Silva R.V. 2009. Resistência do cafeeiro a *Meloidogyne exigua*: Mecanismos de natureza genética e potencializados pelo silício. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa. 107 pp.

Silva M.S., Silva R.P., Souza A.V.L., Xavier Y.P.M., Oliveira A.C., Coqueiro D.S.O. 2016. Aplicação exógena do ácido salicílico em maracujazeiro-amarelo para o controle do vírus do endurecimento dos frutos. *Arquivos do Instituto Biológico*. 83:1-7.

Taiz L. & Zeiger E. 2013. *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artmed. 820 pp.

Verardi C.A. 2017. Café: origem e tradição. Disponível em: <<http://basilio.fundaj.gov.br/pesquisaescolar/>>. Acesso em: 20 julho 2017.

Xu X.B., Tian S.P. 2008. Salicylic acid alleviated pathogen-induced oxidative stress in harvested sweet cherry fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 49:379-385.

Xue R.F., Wu J., Wang L.F., Wang X.M., Zhu D.Z., Wang S.M. 2014. Salicylic acid enhances resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*. 33:470-476.

Zhang Y., Shi X., Li B., Zhang Q., Liang W., Wang W. 2016. Salicylic acid confers enhanced resistance to *Glomerella* leaf spot in apple. *Plant Physiology and Biochemistry*. 106: 64-77.

Shie T. 2018. História do café. 2018. A origem e trajetória da bebida no mundo. <http://www.graogourmet.com/blog/historia-do-caffe/>. Acesso em 31/07/2018.

## A aplicação de ácido salicílico controla a ferrugem e a mancha de *Ascochyta* em cafeeiro

Autores: TANNURI, L.A.R.; LOPES, E.A.; MACEDO, W.R.

### RESUMO

Um experimento foi conduzido em duplicate em uma plantação de café de sete anos de idade em Rio Paranaíba-MG com o objetivo de avaliar o efeito da aplicação de ácido salicílico (AS, 150 mg.L<sup>-1</sup>) em doenças foliares de ocorrência natural, em comparação com hidróxido de cobre (2 kg.ha<sup>-1</sup>), uma combinação de fungicidas sistêmicos e protetores (tratamento químico padrão) e um controle não tratado. Cinco aplicações mensais foram realizadas entre Novembro de 2016 e Março de 2017. Incidência e severidade de ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e mancha de *Ascochyta* (*Ascochyta coffeae*), desfolha e crescimento de ramos plagiotrópicos foram avaliados mensalmente. A atividade da catalase, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e proteínas totais foi avaliada três vezes durante o experimento. A aplicação de AS reduziu ferrugem e mancha de *Ascochyta* em 40 e 37%, respectivamente, com taxas de redução de doença similares àquelas obtidas com o fungicida protetor hidróxido de cobre. As maiores reduções dessas doenças foram alcançadas com a mistura de fungicidas, enquanto que as maiores incidências e severidades das doenças foram observadas em plantas não-tratadas. O efeito do AS sobre desfolha e crescimento de ramos foi similar ao de plantas tratadas com hidróxido de cobre. No início do experimento, AS influenciou o aumento da concentração de enzimas antioxidantes. Entretanto, com o aumento da intensidade das doenças no campo, essa diferença não foi observada no final do experimento. O AS reduz a intensidade de ferrugem e mancha de *Ascochyta*.

Palavras-chaves: Biorregulador, *Hemileia vastatrix*, *Ascochyta coffeae*, enzimas antioxidantes, agricultura, resistência de plantas, *Coffea arabica*.

## The application of salicylic acid controls coffee rust and *Ascochyta* leaf spot

Autores: TANNURI, L.A.R.; LOPES, E.A.; MACEDO, W.R.

### ABSTRACT

An experiment was carried out in duplicate in a seven-year-old coffee plantation field in Rio Paranaíba-MG aiming to assess the effect of foliar application of salicylic acid (SA, 150 mg.L<sup>-1</sup>) on naturally occurring foliar diseases, in comparison to copper hydroxide (2 kg.ha<sup>-1</sup>), a combination of systemic and protectant fungicides (standard chemical treatment) and a non-treated control. Five monthly applications were performed from November 2016 to March 2017. Rust (*Hemileia vastatrix*) and *Ascochyta* leaf spot (*Ascochyta coffeae*) incidence and severity, defoliation and growth of plagiotropic branches were evaluated monthly. The activity of catalase, ascorbate peroxidase, superoxide dismutase and total proteins were assessed three times during the experiment. The application of SA reduced rust and *Ascochyta* leaf spot by 40% and 37%, respectively, with rates of disease reduction similar to those obtained with the protectant fungicide copper hydroxide. Higher reduction of these diseases was achieved the fungicide mixture, whereas higher incidence and severity was observed in the non-treated plants. The effect of SA on defoliation and branch growth was similar to those observed in plants treated with copper hydroxide. At the beginning of the experiment, SA influenced the increase of the concentration of antioxidant enzymes. However, with the increase of diseases intensity in the field, this difference was not observed at the end of the experiment. Salicylic acid reduces the intensity of rust and *Ascochyta* leaf spot.

Keywords: Bioregulator, *Hemileia vastatrix*, *Ascochyta coffeae*, antioxidant enzymes, agriculture, plant resistance, SAR, ROS, *Coffea arabica*.

## INTRODUÇÃO

Várias doenças acometem o cafeeiro, causando enormes prejuízos à cultura (Matiello et al., 2015; Mesquita et al., 2016). A ferrugem, causada por *Hemileia vastatrix*, e a cercosporiose, induzida por *Cercospora coffeicola*, são enfermidades que ocorrem em todas as áreas de cultivo do cafeeiro no Brasil (Rena et al., 1986; Zambolim et al., 2005). Em regiões de altitude, o complexo de mancha de *Ascochyta* e *Phoma* (*Ascochyta coffeae* e *Phoma* spp.) e a mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, também são doenças responsáveis por prejuízos aos cafeicultores (Salgado & Pfenning, 2000; Matiello et al., 2012).

Inúmeros esforços são feitos todos os anos na tentativa de mitigar os danos causados por esses patógenos. Apesar de sua importância no manejo integrado de doenças do cafeeiro, a aplicação de agrotóxicos aumenta em mais de 10% os custos de produção (CONAB, 2017) e representa riscos ao meio ambiente e à saúde humana. Por isso, diversos produtos alternativos têm sido estudados em substituição aos defensivos agrícola (Carvalho et al., 2012), como, por exemplo, os indutores de resistência em plantas (Bonaldo et al., 2005; Barros et al., 2010).

O ácido salicílico é um hormônio vegetal fenólico que atua como sinalizador que ativa defesas da planta contra agentes bióticos (Resende et al., 2003; Sánches et al., 2010; Taiz et al., 2017). As aplicações desse biorregulador aumentam a ação da ascorbato peroxidase em *Arabidopsis* (Csiszár et al., 2018), da catalase em morangueiro (Asghari & Hasanlooe, 2015) e da peroxidase em feijoeiro (Campos et al., 2004). Essas enzimas estão envolvidas no combate às espécies reativas de oxigênio, resultantes de estresse causado por agentes bióticos ou abióticos (Jiang & Zhang, 2002; Gill & Tuteja, 2010).

A aplicação de ácido salicílico induz a resistência de plantas a várias doenças, como, por exemplo, a antracnose do feijoeiro (Campos et al., 2004), o tombamento de plântulas de pepino causada por *Pythium* sp. (Bertoncelli et al., 2015), o mosaico do pepino (Luo et al., 2011), o vírus do endurecimento dos frutos no maracujazeiro (Silva et al., 2016), a hérnia das crucíferas em brócolis (Lovelock et al., 2012). Óleo de citronela, acibenzolar-S-metil e proteína harpina são exemplos de produtos capazes de induzir resistência de cafeeiros a fitopatógenos (Costa et al., 2007; Galdeano et al., 2010; Pereira et al., 2012). No entanto, pouco se sabe sobre o potencial da aplicação exógena do ácido salicílico como indutor de resistência a doenças do cafeeiro. Assim, estudamos neste trabalho o efeito do ácido salicílico no manejo de doenças foliares do cafeeiro em condições de campo.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em duplicata em lavoura de café (*Coffea arabica*) cv. Topázio entre 23 de novembro de 2016 e 25 de março de 2017, na Estação Experimental da COOPADAP em Rio Paranaíba, MG, Brasil (19°11'29.0" S e 46°09'41.1" W) a 1.050m de altitude. As plantas tinham sete anos de idade, 2 m de altura e o espaçamento da cultura era de 3,8 x 0,7 m. A lavoura não era irrigada e apresentava carga pendente baixa, com produção de 651,6 kg ha<sup>-1</sup> em 2017. Os tratamentos foram dispostos em blocos casualizados com cinco repetições. As parcelas experimentais foram caracterizadas por uma fileira de café de 30 m, com aproximadamente 42 plantas. As avaliações foram feitas em ramos marcados de quatro plantas centrais em cada parcela, sendo quatro ramos no lado do sol poente e quatro ramos do lado do sol nascente. Dados pluviométricos e de temperatura foram coletados em estação meteorológica em área próxima ao experimento, onde a temperatura média registrada durante o experimento foi de 21,36 °C e a precipitação média mensal foi de 204,4mm (Figura 1).

Os cafeeiros foram tratados com ácido salicílico, hidróxido de cobre (fungicida protetor usado para controle de doenças fúngicas e bacterianas do cafeeiro), além de aplicações de fungicidas usados como padrão dos produtores do Cerrado mineiro (Tabela 1). Parcelas não tratadas foram mantidas como controle negativo. Cinco aplicações foram realizadas durante o período chuvoso, iniciando-se em novembro de 2016 com término em março de 2017 (Tabela 1). Os tratos culturais foram realizados em todas as parcelas quando necessário, exceto pela aplicação de fungicidas.

As aplicações foram feitas por turbo atomizador tratorizado (Jacto, modelo Arbus 2.000), equipado com pontas tipo cone e volume de calda usado foi de 400 L ha<sup>-1</sup>. Tomou-se o devido cuidado para evitar as contaminações das parcelas e a sequência utilizada em cada aplicação foi: ácido salicílico - hidróxido de cobre – fungicidas.

As doenças foliares que ocorreram naturalmente durante o experimento foram avaliadas mensalmente, por cinco vezes, 30 dias após as aplicações dos produtos. Apenas ferrugem (*Hemilea vastatrix*) e a mancha de *Ascochyta* (*Phoma tarda*, = *Ascochyta coffeae*) foram observadas durante o experimento. A intensidade dessas doenças foi quantificada com base nas escalas de severidade de ferrugem (Capucho et al., 2011) e de mancha de *Phoma/Ascochyta* (Salgado et al., 2009). A incidência foi determinada pelo número de folhas atacadas pela doença em relação ao número de folhas sadias em cada ramo. Nos ramos marcados, cada folha foi analisada e comparada com as escalas individualmente e, posteriormente, fez-se a média de cada parcela com todas as folhas analisadas. Os dados de severidade e incidência nas faces poente e nascente foram analisados de

forma separada. O percentual de desfolha foi avaliado nas parcelas, contando-se o número de folhas caídas em relação ao número total de folhas que o ramo deveria ter, com base no número de entrenós. Além disso, o número de entrenós também foi avaliado como indicador de crescimento das plantas.

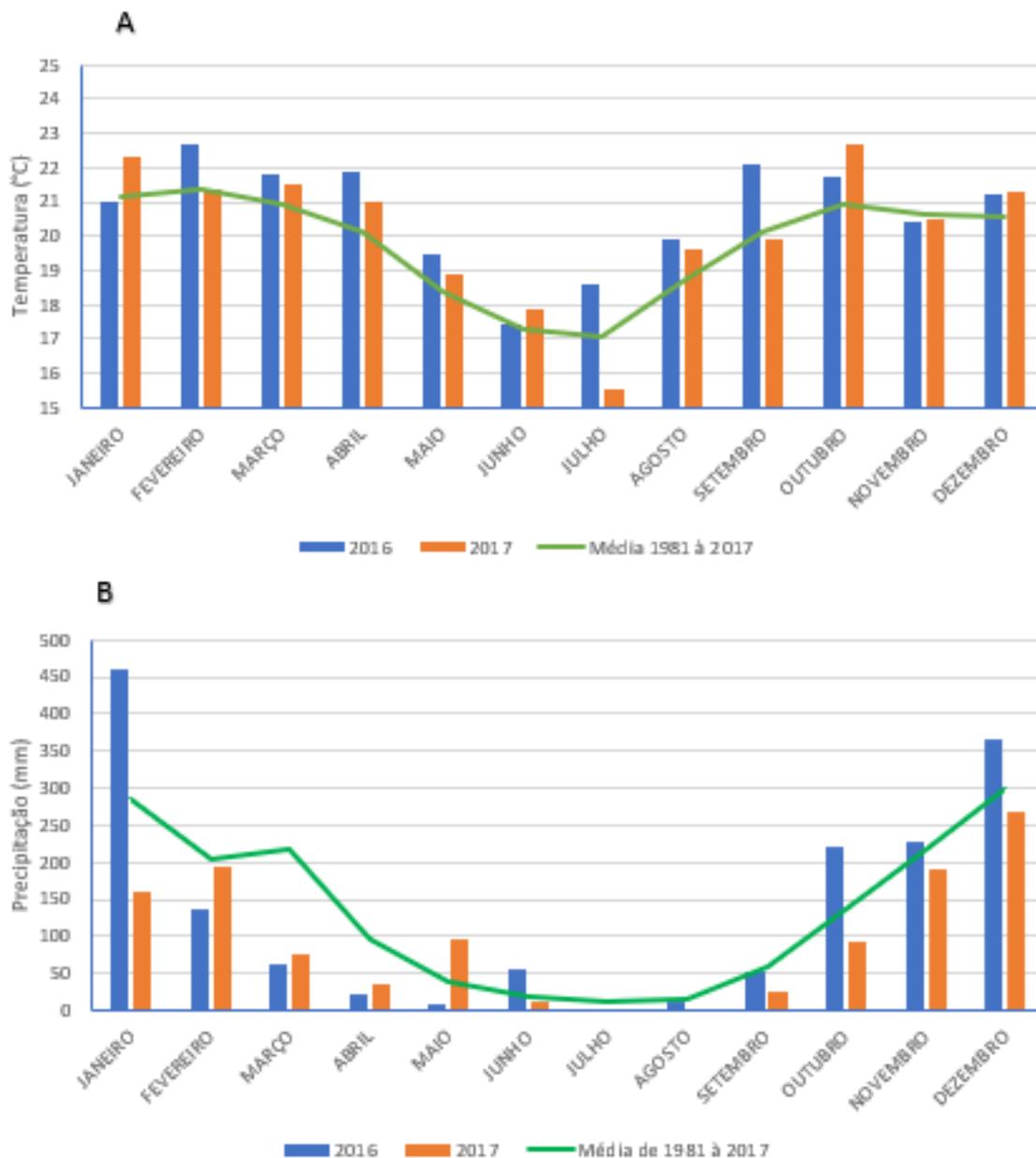


Figura 1 - Temperatura média mensal (°C - A) e precipitação (mm – B) na Estação Experimental da COOPADAP em Rio Paranaíba, Brasil, nos anos de 2016 e 2017 e média mensal de 1981 a 2017.

Tabela 1 – Relação de tratamentos usado no manejo de doenças foliares do cafeeiro.

Tratamento	Época de aplicação				
	24/11/2016	19/12/2016	24/01/2017	22/02/2017	21/03/2017
Testemunha	Não tratada	Não tratada	Não tratada	Não tratada	Não tratada
Hidróxido de Cobre (HC)	2 kg ha <sup>-1</sup>	2 kg ha <sup>-1</sup>	2 kg ha <sup>-1</sup>	2 kg ha <sup>-1</sup>	2 kg ha <sup>-1</sup>
Ácido Salicílico	150 mg L <sup>-1</sup>	150 mg L <sup>-1</sup>	150 mg L <sup>-1</sup>	150 mg L <sup>-1</sup>	150 mg L <sup>-1</sup>
Fungicidas	150 g ha <sup>-1</sup> de boscalida* – 2 kg ha <sup>-1</sup> de HC	1 L ha <sup>-1</sup> de piraclostrobina + epoxiconazol <sup>§</sup> – 2 kg ha <sup>-1</sup> de HC	1 L ha <sup>-1</sup> de piraclostrobina + epoxiconazol <sup>§</sup> – 2 kg ha <sup>-1</sup> de HC	150 g ha <sup>-1</sup> de boscalida* – 2 kg ha <sup>-1</sup> de HC	1 L ha <sup>-1</sup> de piraclostrobina + epoxiconazol <sup>§</sup> – 2 kg ha <sup>-1</sup> de HC

\*Cantus<sup>®</sup>; §Opera<sup>®</sup>.

### *Análises metabólicas*

Três análises foram realizadas durante o período experimental. Folhas foram coletadas de ramos distintos aos marcados para avaliações de doenças e de desfolha. A primeira coleta ocorreu um dia após a primeira aplicação dos produtos no cafeeiro, com o objetivo de avaliar a atividade enzimática inicial das plantas. A segunda foi realizada um dia após a terceira aplicação, objetivando avaliar o comportamento enzimático no meio do tratamento e a terceira coleta se deu no dia seguinte à última aplicação dos produtos, para se conhecer a atividade enzimática no final de todo os tratamentos. Duas folhas completamente expandidas e sem sintomas de doenças ou injúrias foram retiradas no segundo par de ramos localizados no terço médio das plantas.

As folhas foram acondicionadas em tubos Falcon de 50 mL, mantidos no interior de caixas de isopor contendo gelo e, posteriormente, levadas até o laboratório para processamento. No mesmo dia da coleta, foram quantificadas as proteínas totais solúveis e a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). Para a extração das proteínas solúveis, aproximadamente 100 mg de tecido vegetal foram macerados em nitrogênio líquido e, em seguida, em 1,5 mL de tampão Tris-HCl. O material macerado foi centrifugado

durante 10 min a 6000 g. Em uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram acrescentados 3 mL do reativo de Bradford (LGC Biotecnologia), deixando em repouso por 5 min a temperatura ambiente. A leitura colorimétrica da reação foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm. A concentração de proteína solúvel foi calculada a partir da curva padrão construída com albumina soro bovina (BSA) (Bradford, 1976).

Para a determinação da atividade das enzimas, extrato enzimático bruto foi preparado a partir de 200 mg de material vegetal fresco. As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido, seguido da adição de 1500  $\mu\text{L}$  do meio de extração (750  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 200 mM e pH 7,8, ainda 15  $\mu\text{L}$  de ácido etilenodiamino (EDTA) 10 mM, acrescido de 150  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 200 mM e 585  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q). A amostra foi vertida em eppendorf de 2 mL e centrifugada a 12 000 rpm por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em gelo até o momento das leituras (Sperotto et al., 2014).

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Beauchamp & Fridovich (1971) e Gianngiopolitis & Reis (1977), e os resultados representam a quantidade de enzima capaz de inibir 50% da fotoinibição nitroblue tetrazolium, em espectrofotômetro no comprimento de onda de 560 nm, expressos em  $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

Para determinação da CAT, utilizou-se uma alíquota de 12,5  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático e seguiu-se os procedimentos descritos por Havir & McHale (1987) e Anderson et al. (1995). A atividade da enzima foi determinada pela mensuração da redução na absorbância das amostras a 240 nm, em decorrência do consumo do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com leituras com duração total de 60s com intervalos de 10 em 10s, sendo observado o decréscimo na absorbância. Para os cálculos considerou-se o resultado da diferença entre a última leitura da primeira. As leituras foram feitas com rapidez, pois o  $\text{H}_2\text{O}_2$  desencadeia o processo de redução pela enzima ao entrar em contato com a amostra. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$

A atividade da APX foi avaliada a partir de alíquota de 12,5  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático, de acordo com método descrito por Nakano e Asada (1981), e a atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$ . Para todas as enzimas e proteínas totais solúveis, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis Evolution 300 – Thermo Scientific.

### *Análises estatísticas*

Os dados de severidade das doenças foram convertidos para área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Campbell & Madden, 1990). Devido à homogeneidade de

variância entre as replicatas, os dados foram analisados conjuntamente em esquema fatorial 4x2, sendo os fatores: Produtos (Testemunha, Ácido Salicílico, Cobre e Fungicidas) x Experimento (Replicata 1 e Replicata 2). As médias foram submetidas a análise de variância (ANOVA,  $p < 0,05$ ) e, posteriormente, submetidas ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os efeitos dos tratamentos sobre a atividade enzimática foram submetidos à ANOVA e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os dados de severidade da mancha de *Ascochyta* – face poente foram transformados para  $\sqrt{x}$ , enquanto que os de desfolha – face poente e concentração de catalase foram transformados por Box-Cox, com lambda de 0,4 e 0,7, respectivamente. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do pacote estatístico Speed Stat (Carvalho & Mendes, 2017).

## RESULTADOS

De maneira geral, o ácido salicílico reduziu as doenças em todas as avaliações quando comparadas à testemunha não tratada. A redução da severidade e incidência de ferrugem foi de aproximadamente 40 e 45%, respectivamente (Figuras 2 e 3), em comparação com a testemunha não tratada e foi similar à aplicação de cobre. O tratamento químico padrão com fungicidas sistêmicos e protetores reduziu em 85% a severidade e em 83% a incidência da doença (Figuras 2 e 3).

O pico máximo de severidade e incidência da ferrugem foi de 1,23% e 34%, em média, considerando ambas as faces das plantas e ocorreu entre os 95 e 126 dias após o início das aplicações, ocorrendo redução da intensidade da doença após esse período (Figuras 4 e 5). Aos 161 dias da aplicação, na última avaliação, o tratamento com fungicidas apresentou o menor índice de ferrugem, cerca de 50 vezes menor que a testemunha, enquanto que o ácido salicílico ficou em níveis próximos ao tratamento de hidróxido de cobre, reduzindo em 50% e 40% respectivamente, quando comparados à testemunha. (Figura 6).

O ácido salicílico reduziu a desfolha entre 44 e 49% quando comparado a testemunha não tratada, que teve o maior índice de desfolha dos experimentos, chegando a mais de 45% aos 161 dias da aplicação. O tratamento com menor índice de desfolha foi o com fungicidas, com níveis menores que 5%. O hidróxido de cobre foi semelhante ao ácido salicílico, entretanto ambos ficaram bem abaixo do tratamento com fungicidas (Figura 7).

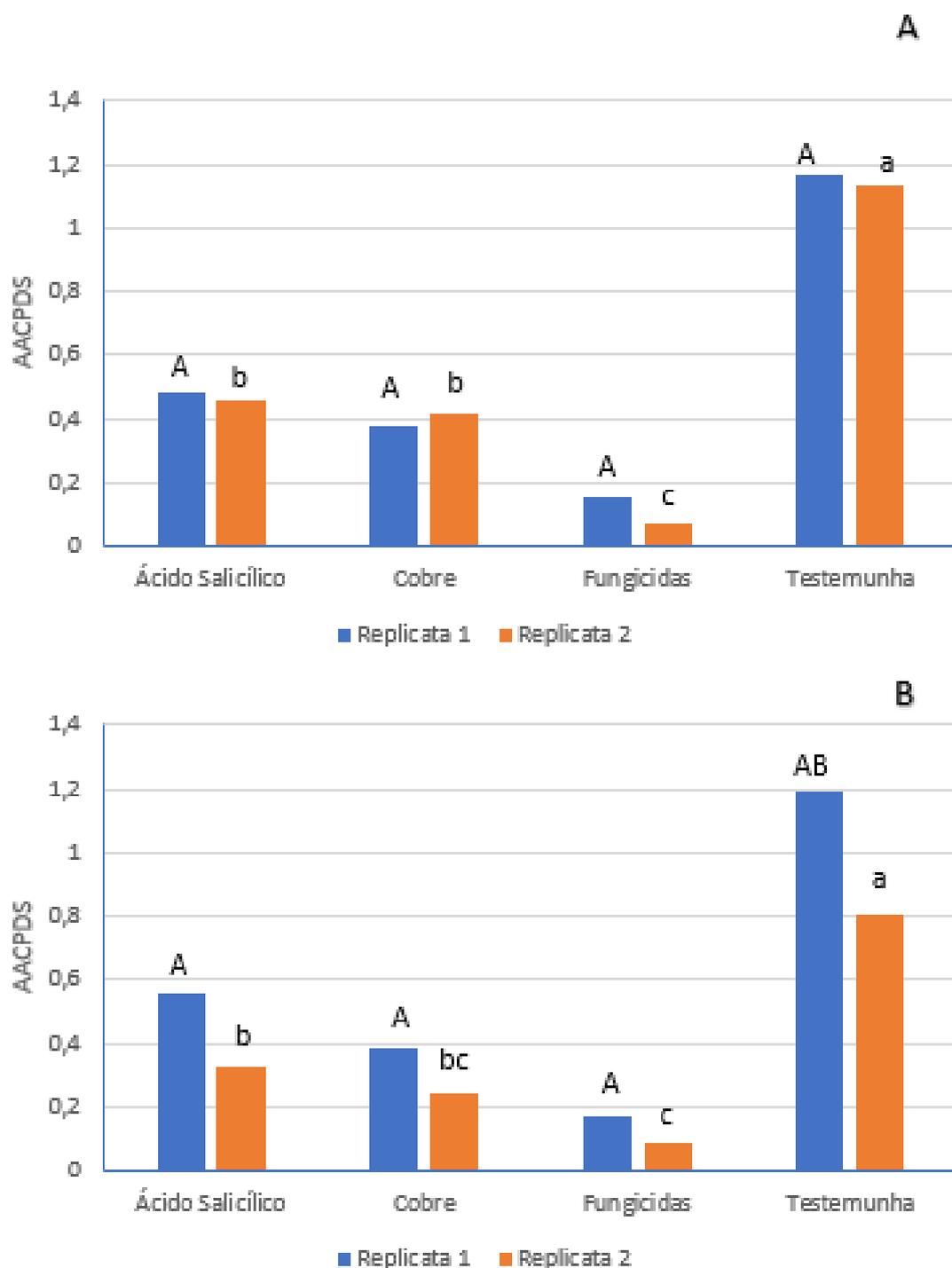


Figura 2 - Área abaixo da curva de progresso da doença para severidade (AACPDS) de ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix*, em folhas das faces poente (A) e nascente (B) e tratadas com cinco aplicações de ácido salicílico ( $150 \text{ mg L}^{-1}$ ), hidróxido de cobre ( $2 \text{ kg ha}^{-1}$ ) e fungicidas químicos incluindo boscalida, hidróxido de cobre e a mistura piraclostrobina + epoxiconazol. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,001$ , para A e B). Letras maiúsculas comparam entre si as replicatas 1 e 2 pelo teste F ( $A=0,42$ ;  $B=3,44$ ).

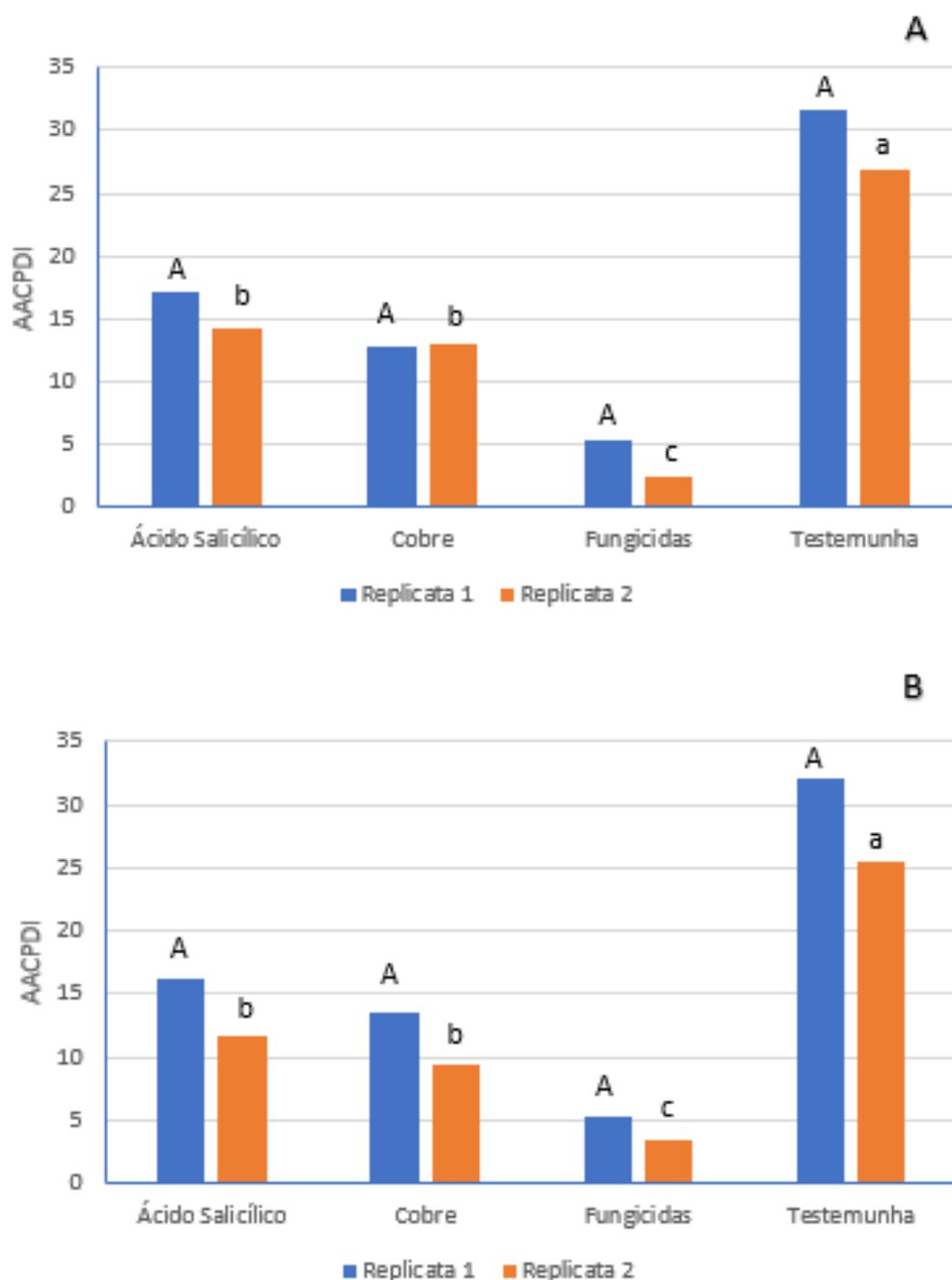


Figura 3 - Área abaixo da curva de progresso da doença para incidência (AACPDI) de ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix*, em folhas das faces poente (A) e nascente (B) e tratadas com cinco aplicações de ácido salicílico ( $150 \text{ mg L}^{-1}$ ), hidróxido de cobre ( $2 \text{ kg ha}^{-1}$ ) e fungicidas químicos incluindo boscalida, hidróxido de cobre e a mistura piraclostrobina + epoxiconazol. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,001$ , para A e B). Letras maiúsculas comparam entre si as replicatas 1 e 2 pelo teste F ( $A=0,18$ ;  $B=0,38$ ).

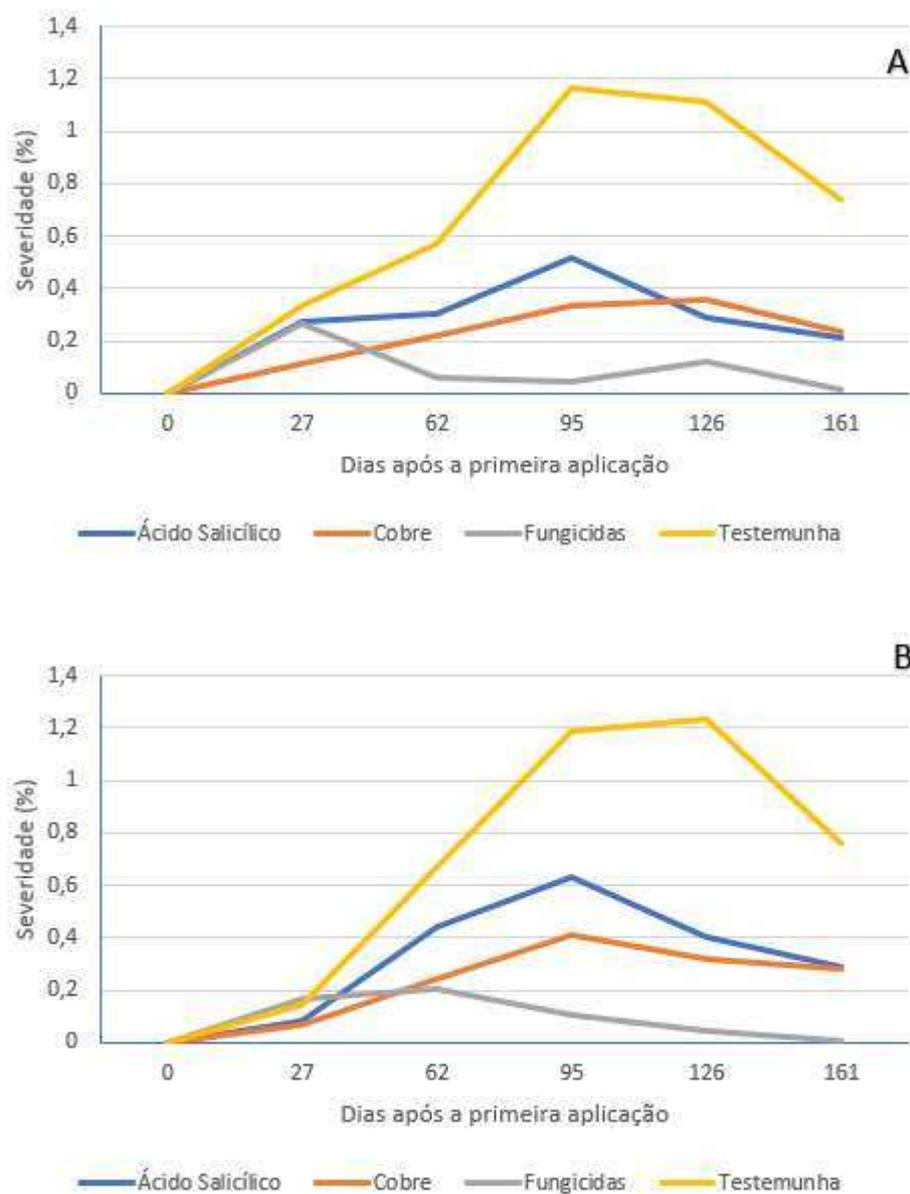


Figura 4 – Evolução da severidade de *Hemilea vastatrix* nos lados poente (A) e nascente (B) dos tratamentos: ácido salicílico (150 mg.L<sup>-1</sup>), hidróxido de cobre (2 Kg.ha<sup>-1</sup>) e fungicidas químicos incluindo boscalida, hidróxido de cobre e a mistura piraclostrobina + epoxiconazol.

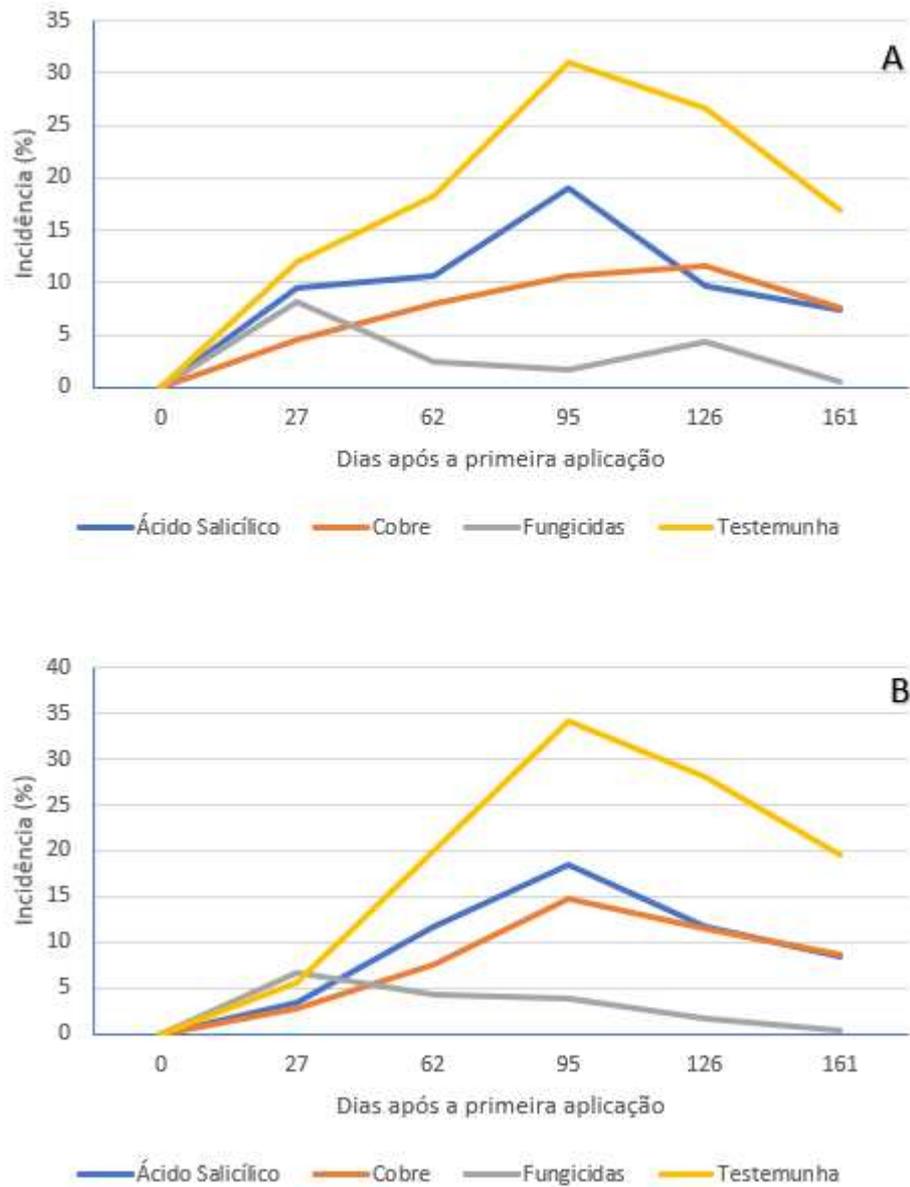


Figura 5 – Evolução incidência de *Hemilea vastatrix* nos lados poente (A) e nascente (B) dos tratamentos: ácido salicílico ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ), hidróxido de cobre ( $2 \text{ Kg.ha}^{-1}$ ) e fungicidas químicos incluindo boscalida, hidróxido de cobre e a mistura piraclostrobina + epoxiconazol.

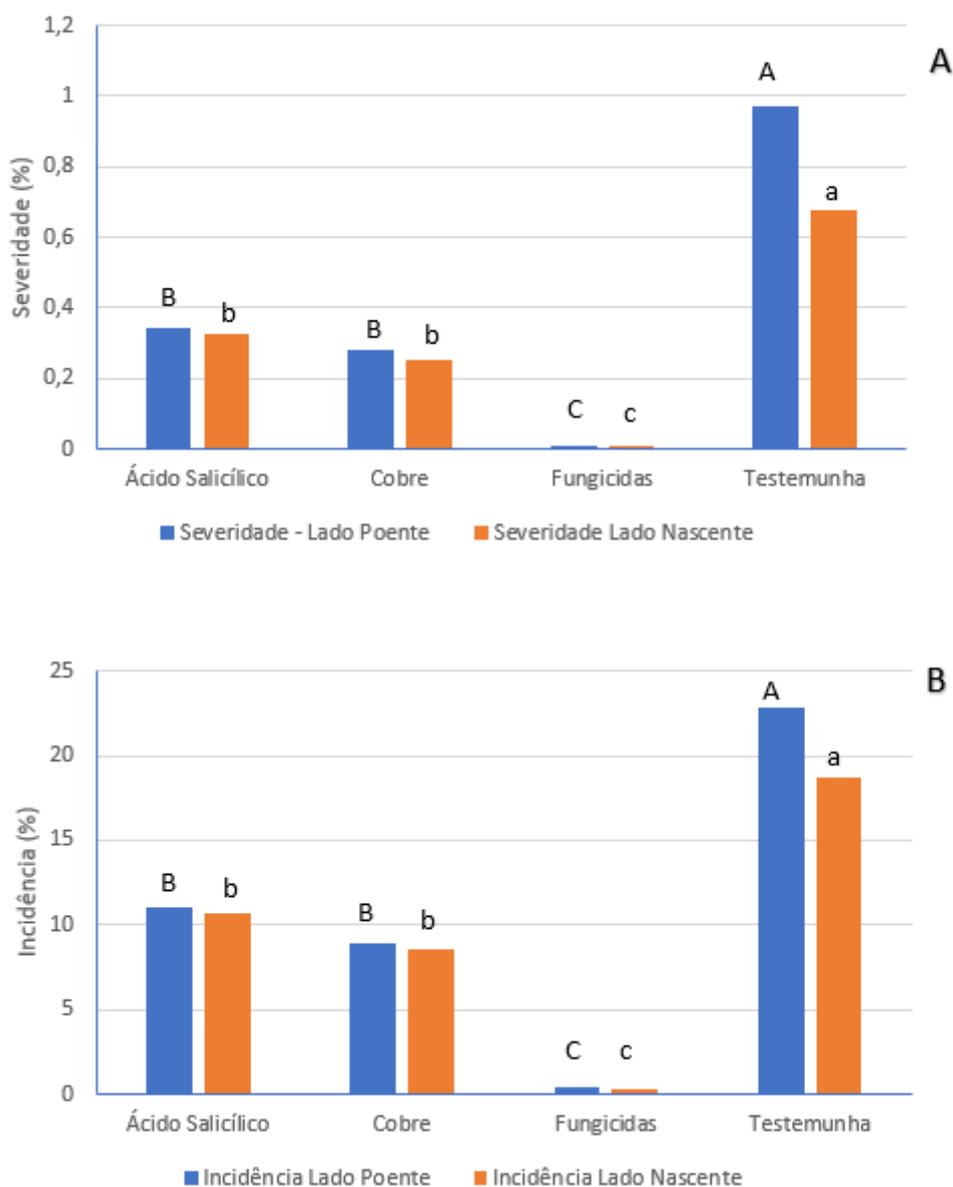


Figura 6 – Médias marginais das replicatas 1 e 2 da Severidade (A) e Incidência (B) de *Hemileia vastatrix* nos cafeeiros aos 161 dias da primeira aplicação de ácido salicílico ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ), hidróxido de cobre ( $2 \text{ Kg.ha}^{-1}$ ) e fungicidas químicos incluindo boscalida, hidróxido de cobre e a mistura piraclostrobina + epoxiconazol. Médias seguidas de mesma letra minúscula comparam o lado nascente e médias seguidas de mesma letra maiúscula comparam o lado poente não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,001$ ). Dados de incidência- lado nascente e incidência lado poente foram transformados por BoxCox, com lambdas de -0,1 e 0,4 respectivamente, severidade-lado nascente, transformados por raiz(x). No gráfico os dados estão sem transformação.

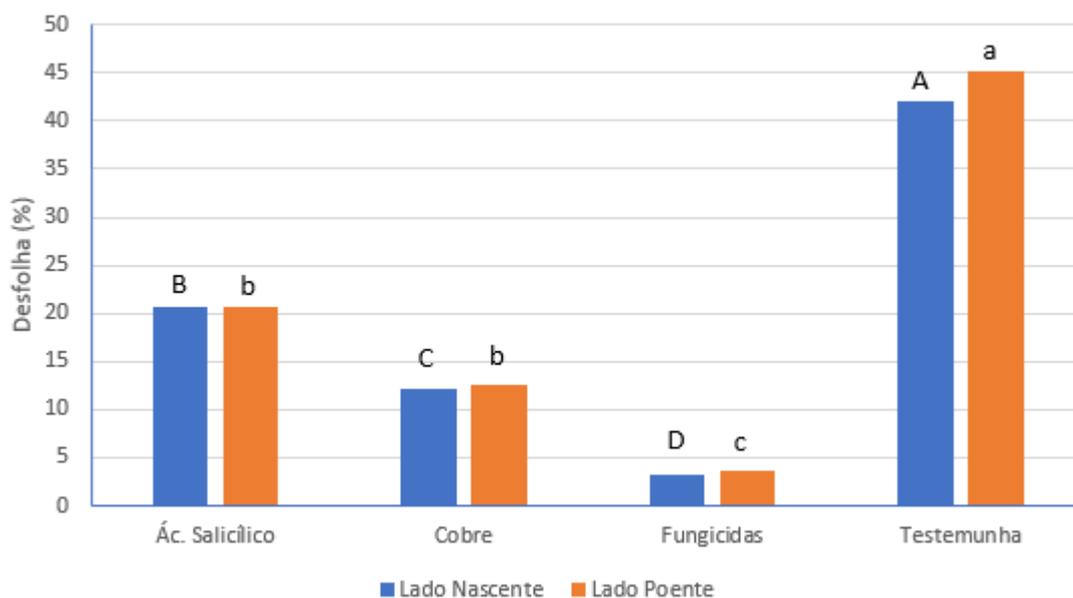


Figura 7 – Médias marginais das replicatas 1 e 2 do percentual de desfolha dos cafeeiros aos 161 dias da primeira aplicação de ácido salicílico ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ), hidróxido de cobre ( $2 \text{ Kg.ha}^{-1}$ ) e fungicidas químicos incluindo boscalida, hidróxido de cobre e a mistura piraclostrobina + epoxiconazol. Médias seguidas de mesma letra minúscula comparam o lado poente e não diferem entre si pelo teste de Tukey (pvalor experimento = 0,471; pvalor tratamento <0,001; pvalor interação = 0,912). Médias seguidas de mesma letra maiúscula comparam o lado nascente e não diferem entre si pelo teste de Tukey (pvalor experimento = 0,062; pvalor tratamento <0,001; pvalor interação=0,442). Dados do lado poente foram transformados por Box Cox, com lambda de 0,4, no gráfico, os dados são originais.

Para mancha de *Ascochyta*, o ácido salicílico reduziu a severidade e incidência do patógeno em aproximadamente 37% e 36%, respectivamente (Figuras 8 e 9), em comparação com a testemunha não tratada e foi similar à aplicação do hidróxido de cobre. O tratamento químico padrão com fungicidas sistêmicos e protetores reduziu em 59% a severidade e em 61% a incidência da doença (Figuras 8 e 9).

O pico máximo de severidade e incidência da mancha de *Ascochyta* foi de 0,4% e 10,36% considerando ambas as faces das plantas e ocorreu aos 126 dias após o início das aplicações, ocorrendo redução da intensidade da doença após esse período; entretanto, houve diferença entre as faces avaliadas (Figuras 10 e 11).

Aos 161 dias da aplicação, na última avaliação, o tratamento com fungicidas apresentou a menor incidência do patógeno, cerca de 12 vezes menor que a testemunha, enquanto que o ácido salicílico ficou em níveis próximos ao tratamento de hidróxido de cobre, reduzindo em cinco vezes a severidade e três vezes a incidência, respectivamente, quando comparados à testemunha (Figura 12).

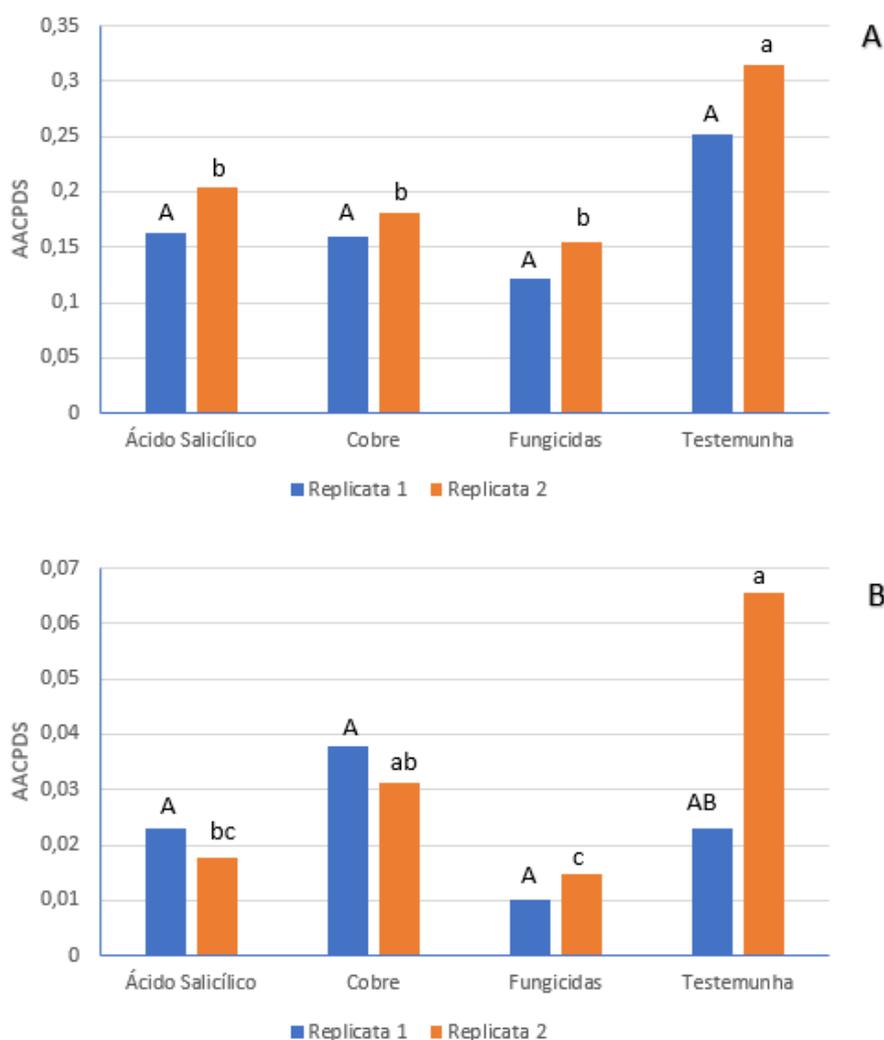


Figura 8- Área abaixo da curva de progresso da doença para severidade (AACPDS) da mancha de *Ascochyta*, causada por *Ascochyta coffeae*, em folhas das faces poente (A) e nascente (B) e tratadas com cinco aplicações de ácido salicílico ( $150 \text{ mg L}^{-1}$ ), hidróxido de cobre ( $2 \text{ kg ha}^{-1}$ ) e fungicidas químicos incluindo boscalida, hidróxido de cobre e a mistura piraclostrobina + epoxiconazol. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,001$ , para A e B). Letras maiúsculas comparam entre si as replicatas 1 e 2 pelo teste F ( $A=0,27$ ;  $B=5,78$ ). Severidade-Lado Poente (A), transformados por  $\text{raiz}(x)$ . Médias originais são apresentadas no gráfico.

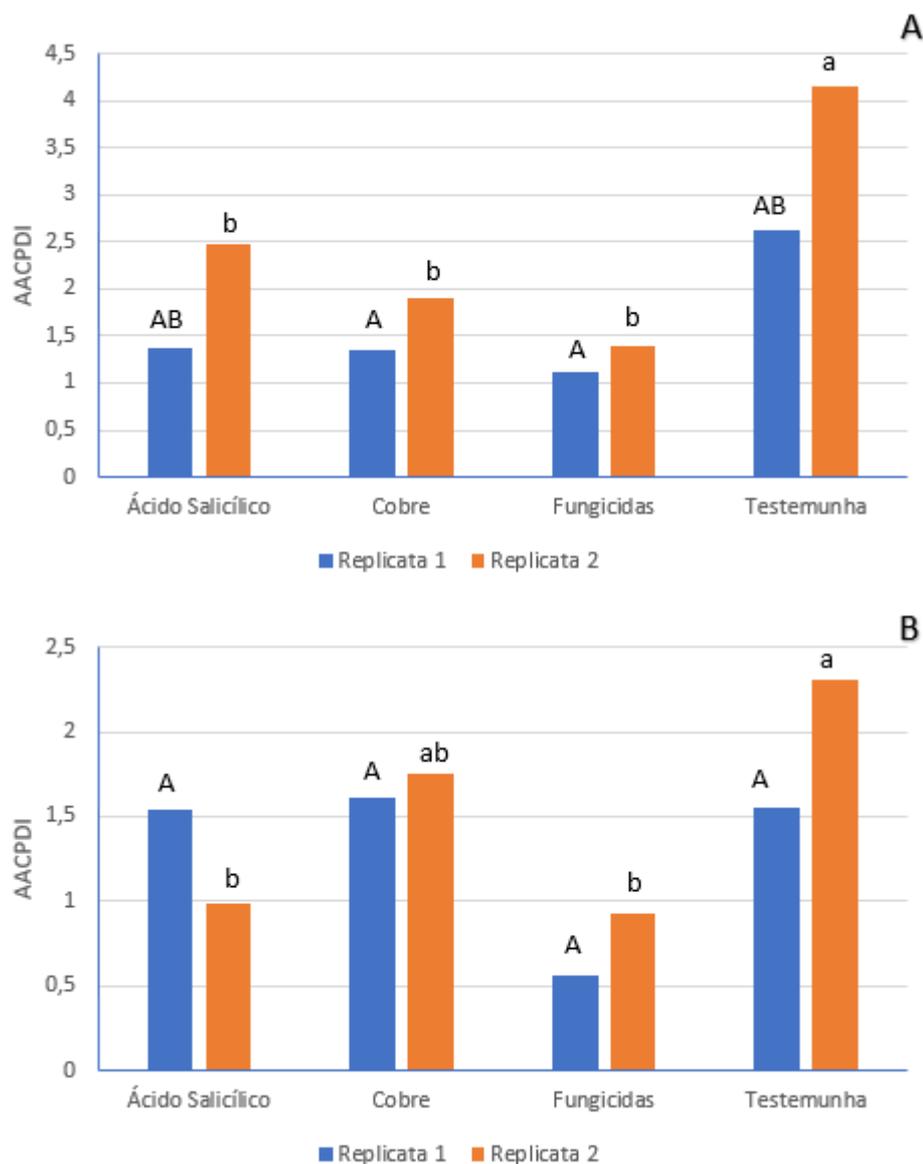


Figura 9 - Área abaixo da curva de progresso da doença para incidência (AACPDI) da mancha de *Ascochyta*, causada por *Ascochyta coffeae*, em folhas das faces poente (A) e nascente (B) e tratadas com cinco aplicações de ácido salicílico ( $150 \text{ mg L}^{-1}$ ), hidróxido de cobre ( $2 \text{ kg ha}^{-1}$ ) e fungicidas químicos incluindo boscalida, hidróxido de cobre e a mistura piraclostrobina + epoxiconazol. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,001$ , para A e B). Letras maiúsculas comparam entre si as replicatas 1 e 2 pelo teste F ( $A=1,01$ ;  $B=1,76$ ).

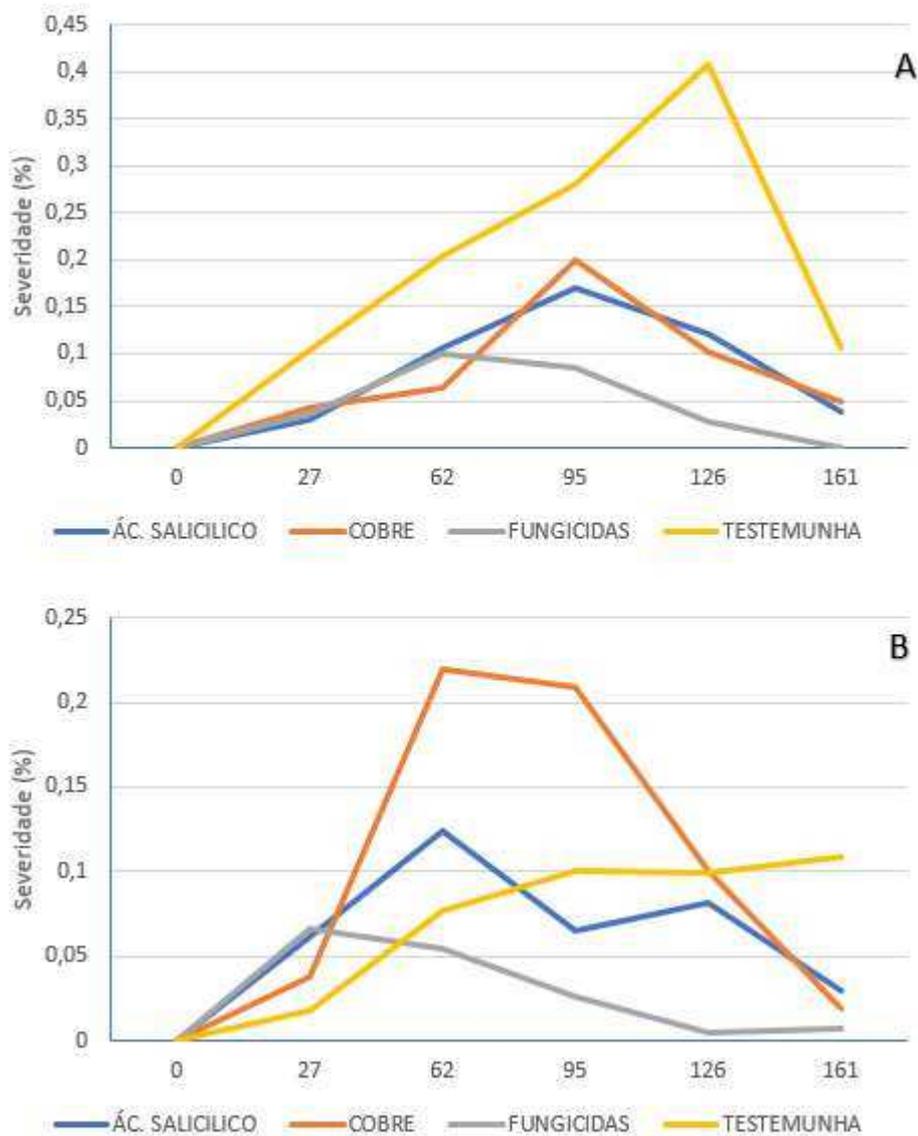


Figura 10 – Evolução da severidade da mancha de *Ascochyta* nos lados poente (A) e nascente (B) dos tratamentos: ácido salicílico ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ), hidróxido de cobre ( $2 \text{ Kg.ha}^{-1}$ ) e fungicidas químicos incluindo boscalida, hidróxido de cobre e a mistura piraclostrobina + epoxiconazol.

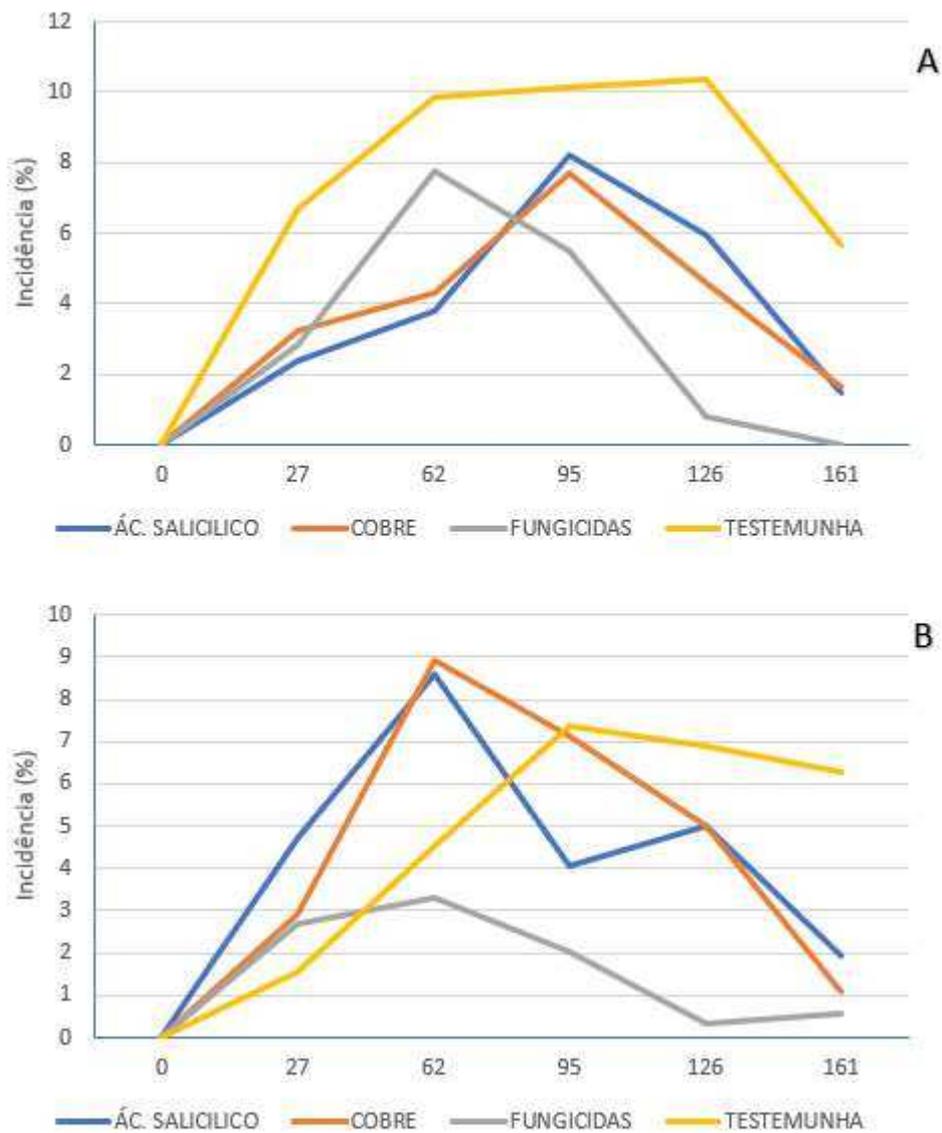


Figura 11 – Evolução da incidência da mancha de *Ascochyta* nos lados poente (A) e nascente (B) dos tratamentos: ácido salicílico ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ), hidróxido de cobre ( $2 \text{ Kg.ha}^{-1}$ ) e fungicidas químicos incluindo boscalida, hidróxido de cobre e a mistura piraclostrobina + epoxiconazol.

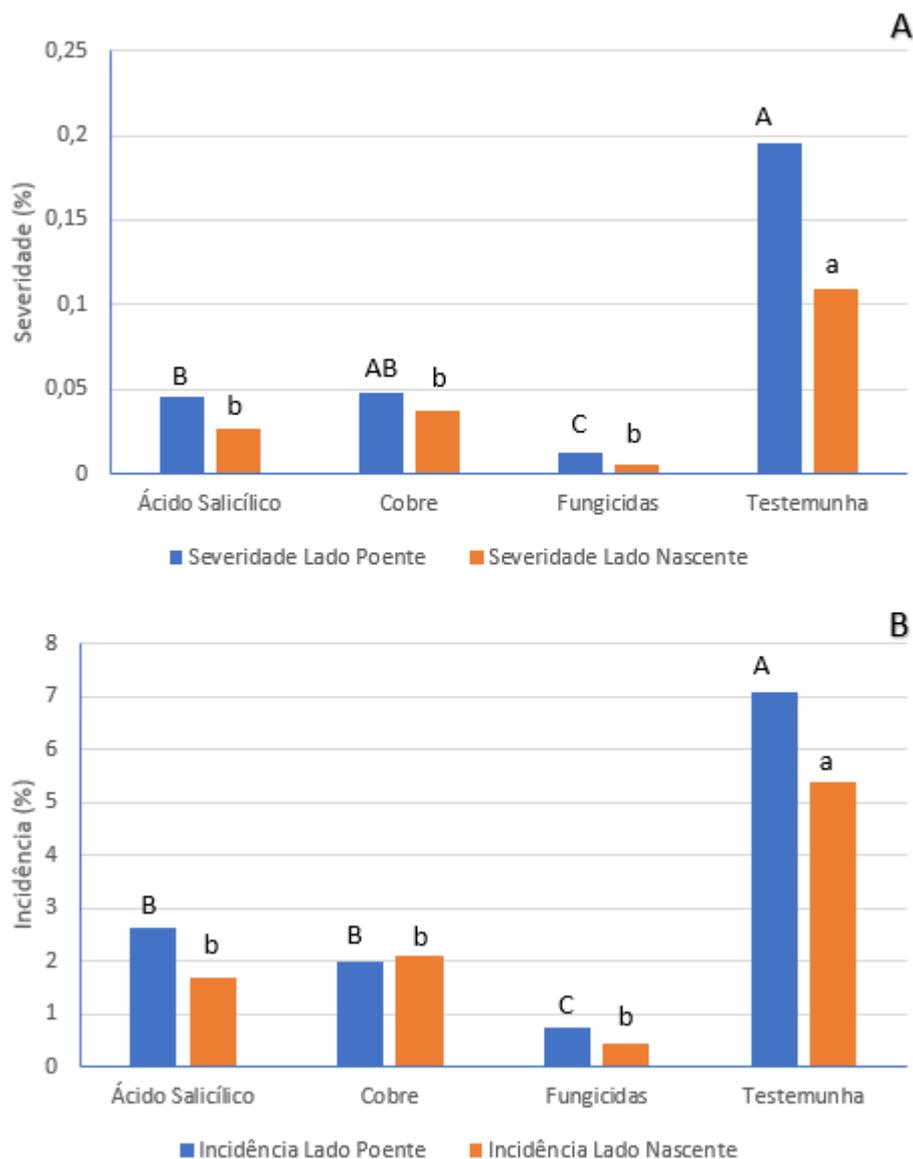


Figura 12 – Médias marginais das replicatas 1 e 2 da Severidade (A) e Incidência (B) da mancha de *Ascochyta* nos cafeeiros aos 161 dias da primeira aplicação de ácido salicílico ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ), hidróxido de cobre ( $2 \text{ Kg.ha}^{-1}$ ) e fungicidas químicos incluindo boscalida, hidróxido de cobre e a mistura piraclostrobina + epoxiconazol. Médias seguidas de mesma letra minúscula comparam o lado nascente e médias seguidas de mesma letra maiúscula comparam o lado poente não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,001$ ). Dados de incidência e severidade - lado poente foram transformados por transformados por raiz(x). Médias originais são apresentadas no gráfico.

A aplicação de ácido salicílico alterou a concentração de proteínas totais solúveis e enzimas em cafeeiros. Após a primeira aplicação, plantas tratadas com ácido salicílico tinham níveis inferiores de proteínas totais solúveis, chegando à metade dos níveis observados em plantas tratadas com os demais tratamentos (Figura 13). Em contrapartida, os níveis de ascorbato peroxidase, catalase e superóxido dismutase em plantas tratadas com ácido salicílico foram mais que o dobro dos demais tratamentos (Figura 14). Esta diferença diminuiu na segunda avaliação, mas manteve a tendência de comportamento em relação à avaliação anterior. Na última avaliação, não foram observadas diferenças entre os tratamentos (Figura 15). Os demais tratamentos se comportaram de forma inversa ao ácido salicílico, com níveis de proteínas totais solúveis altas no início das avaliações e baixos níveis de superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase, sem diferenças estatísticas entre eles. Ao longo das demais avaliações os níveis das enzimas e proteínas totais solúveis foram se equiparando entre todos os tratamentos, chegando na última avaliação

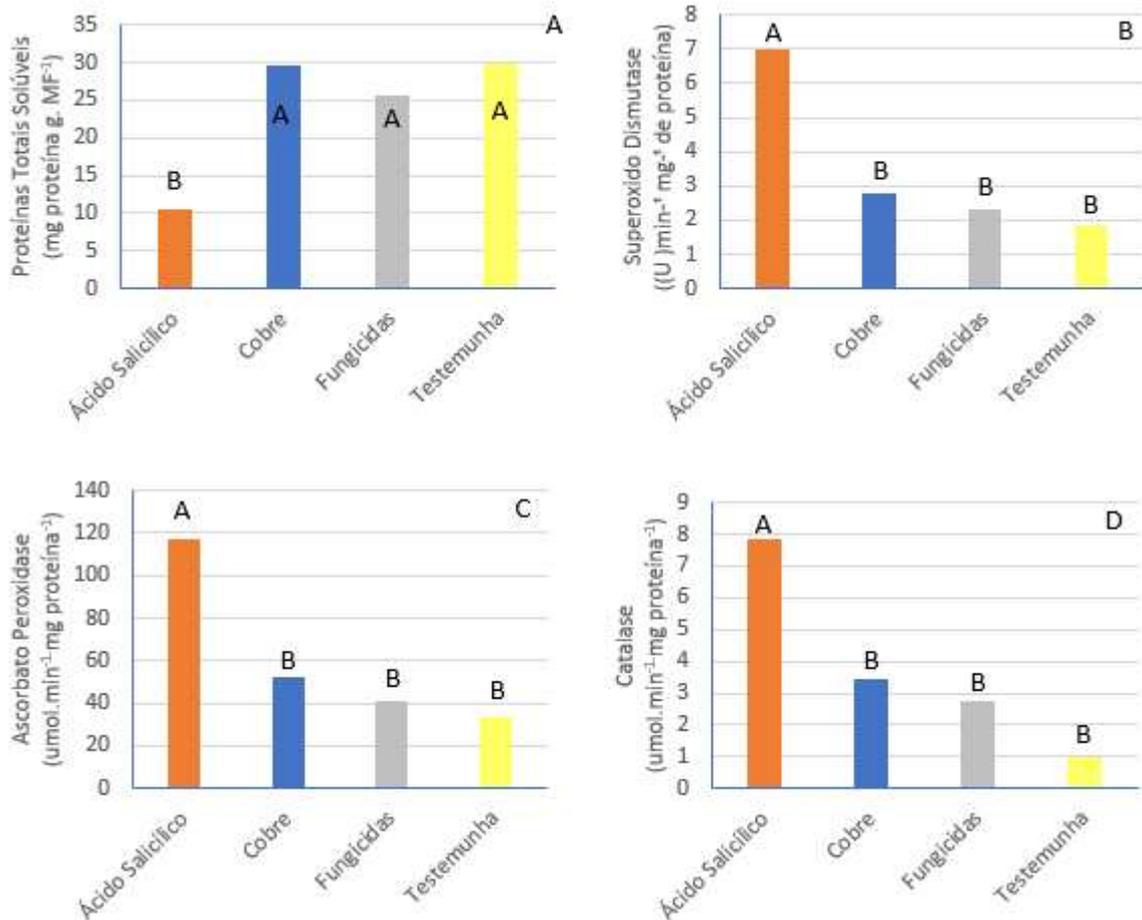


Figura 13 – Concentração de proteínas totais solúveis (A, em mg proteína.g de matéria fresca<sup>-1</sup>), superóxido dismutase (B, em U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína), ascorbato peroxidase (C, em  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$ ) e catalase (D, em  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$ ) em cafeeiros tratados com ácido salicílico (150 mg.L<sup>-1</sup>), hidróxido de cobre (2 Kg.ha<sup>-1</sup>), e fungicidas químicos incluindo boscalida, hidróxido de cobre e a mistura piraclostrobina + epoxiconazol. Avaliação realizada em 25/11/2016, um dia após a aplicação dos produtos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (A, p<0,001 e F=10,52; B, p<0,001 e F=150,64, C, p<0,001 e F=116,96, D, p=0,04 e F=3,81). Dados de catalase transformados por BoxCox com lambda de 0,7, médias originais são apresentadas.

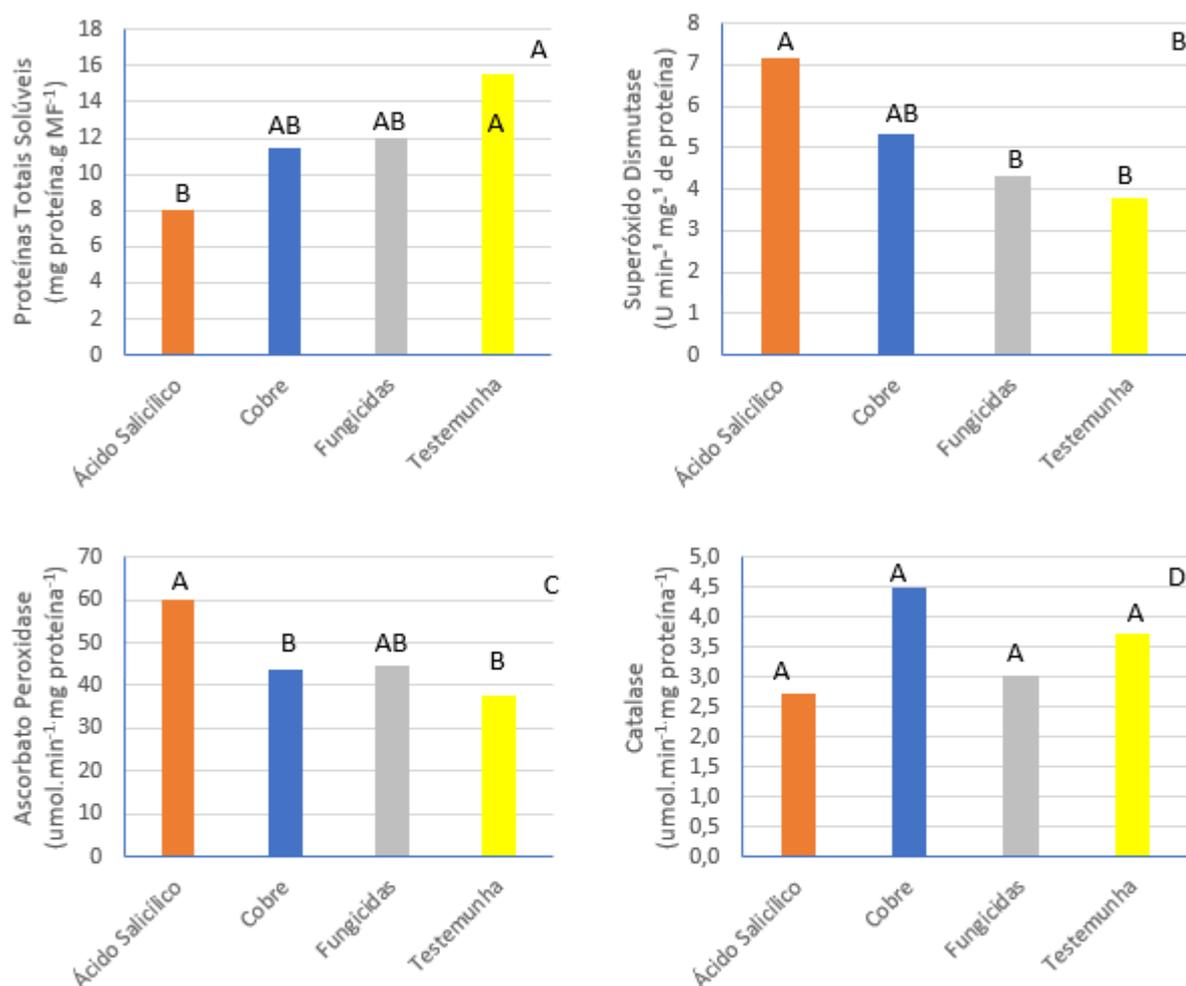


Figura 14 – Concentração de proteínas totais (A, em mg proteína.g de matéria fresca<sup>-1</sup>), superóxido dismutase (B, em U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína), ascorbato peroxidase (C, em  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$ ) e catalase (D, em  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$ ) em cafeeiros tratados com ácido salicílico (150 mg.L<sup>-1</sup>), hidróxido de cobre (2 Kg.ha<sup>-1</sup>), e fungicidas químicos incluindo boscalida, hidróxido de cobre e a mistura piraclostrobina + epoxiconazol. Avaliação realizada em 25/01/2017, um dia após

a aplicação dos produtos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (A,  $p=0,035$  e  $F=3,98$ ; B,  $p<0,008$  e  $F=6,37$ , C,  $p<0,013$  e  $F=5,71$ , D,  $p=0,930$  e  $F=0,15$ ).

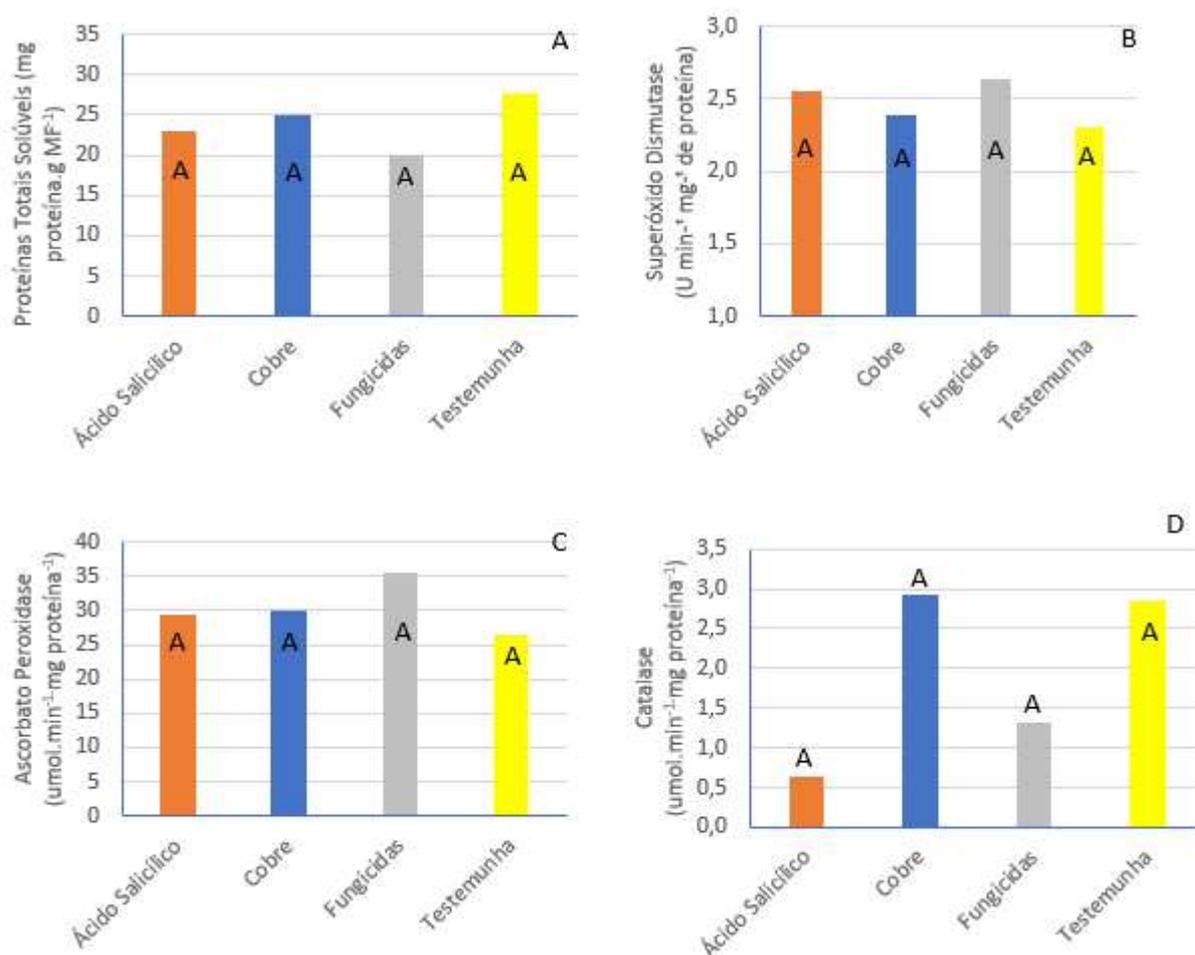


Figura 15 – Concentração de proteínas totais solúveis (A, em mg proteína.g de matéria fresca<sup>-1</sup>), superóxido dismutase (B, em U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína), ascorbato peroxidase (C, em μmol.min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>) e catalase (D, em μmol.min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>) em cafeeiros tratados com ácido salicílico (150 mg.L<sup>-1</sup>), hidróxido de cobre (2 Kg.ha<sup>-1</sup>), e fungicidas químicos incluindo boscalida, hidróxido de cobre e a mistura piraclostrobina + epoxiconazol. Avaliação realizada em 22/03/2017 um dia após a aplicação dos produtos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (A,  $p=0,614$  e  $F=0,62$ ; B,  $p=0,906$  e  $F=0,18$ , C,  $p=0,467$  e  $F=0,91$ , D,  $p=0,752$  e  $F=0,41$ ).

O crescimento do cafeeiro foi maior no tratamento com a combinação de fungicida sistêmicos e químicos, adotada como padrão dos cafeicultores da região do Alto Paranaíba - MG, seguido da aplicação de hidróxido de cobre e ácido salicílico, enquanto que na testemunha foi observada o menor número de entrenós por ramo (Figura 16).

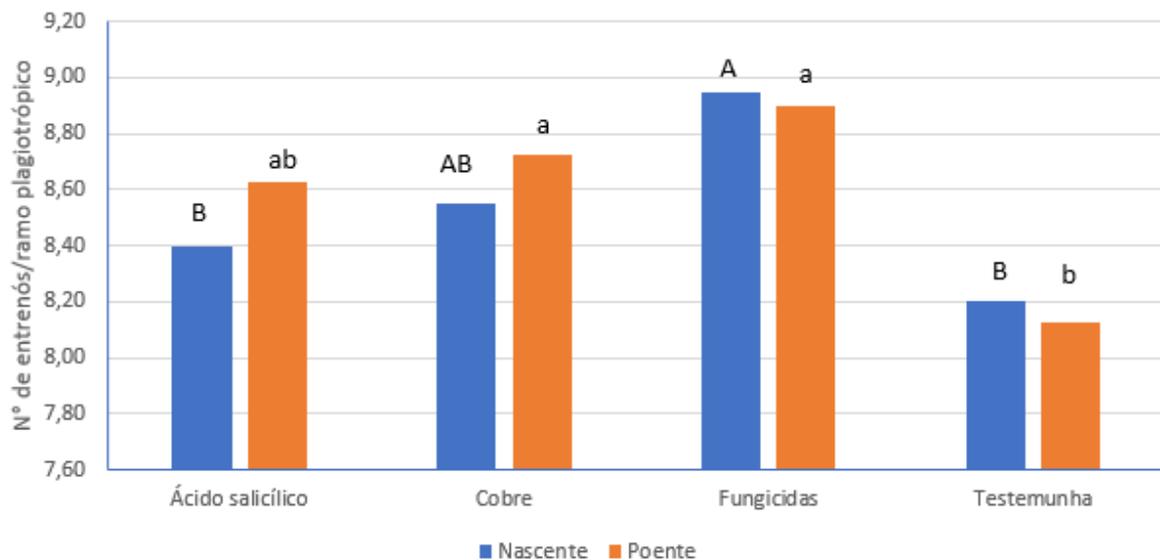


Figura 16 – Médias marginais das replicatas 1 e 2 do número de entrenós por ramo plagiotrópico dos cafeeiros aos 161 dias da primeira aplicação de ácido salicílico ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ), hidróxido de cobre ( $2 \text{ Kg.ha}^{-1}$ ) e fungicidas químicos incluindo boscalida, hidróxido de cobre e a mistura piraclostrobina + epoxiconazol. Médias seguidas de mesma letra minúscula comparam o lado poente e não diferem entre si pelo teste de Tukey (pvalor experimento = 0,789; pvalor tratamento = 0,003; pvalor interação = 0,962). Médias seguidas de mesma letra maiúscula comparam o lado nascente e não diferem entre si pelo teste de Tukey (pvalor experimento = 0,499; pvalor tratamento < 0,001; pvalor interação = 0,706).

## DISCUSSÃO

O ácido salicílico reduz a intensidade da ferrugem e da mancha de *Ascochyta* do cafeeiro em níveis similares àqueles observados no uso do hidróxido de cobre, fungicida protetor comumente utilizado em lavouras no Brasil. Os cúpricos são fungicidas de contato, inibem a germinação dos esporos e a penetração do fungo, portanto devem ser aplicados anteriormente ao aparecimento de sintomas de doenças na planta (Zambolim et al., 1995; Osorio et al., 2011). Com relação ao ácido salicílico, dados deste trabalho sugerem que sua aplicação também seja de forma preventiva, pois deve sinalizar a planta a produzir defesas e compostos bioquímicos para que estes estejam em concentrações adequadas nos tecidos saudáveis, proporcionando condições de impedir ou limitar o ataque de agentes externos (Schwan-Estrada et al., 2011). Possivelmente, plantas tratadas

com ácido salicílico tiveram seus mecanismos de defesa ativados, reduzindo o estabelecimento dos fungos nos tecidos do hospedeiro (Delaney et al., 1994; Vlot et al., 2009, De Sá, 2010; Kumar, 2014). É evidente que este biorregulador não é o único responsável pelas respostas de sinalização para a resistência sistêmica adquirida, mas ele é parte intrínseca de uma rede que envolvem outros hormônios neste processo (Klessig et al., 2018). Após a primeira aplicação do ácido salicílico, o consumo de proteínas foi maior, proporcionando o aumento na produção das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, peroxidase e catalase, corroborando com os resultados encontrados por Hasmussen et al. (1991). Com isso, o cafeeiro passou a combater as espécies reativas de oxigênio e ativar mecanismos de resistência contra os fitopatógenos (Herrera-Vásquez et al., 2015).

A incidência de ferrugem e mancha de *Ascochyta* em plantas tratadas com ácido salicílico foi similar àquelas tratadas com hidróxido de cobre e a combinação de fungicidas sistêmicos e protetores usada como tratamento químico padrão. Assim, é possível inferir que a sinalização induzida pelo ácido salicílico foi eficiente em limitar a formação de lesões em folhas naturalmente inoculadas. Por sua vez, a redução da severidade da ferrugem e da mancha de *Ascochyta* causada pela aplicação da combinação de fungicidas deve-se ao fato de que a boscalida e a mistura piraclostrobina + epoxiconazol agem de forma sistêmica, reduzindo o tamanho das lesões já formadas (Bartlett et al., 2002; Honorato Junior et al., 2015). O ácido salicílico e o hidróxido de cobre atuaram, portanto, limitando o número de lesões iniciais. No entanto, uma vez formadas, esses produtos não possuem capacidade de reduzir a severidade da ferrugem e da mancha de *Ascochyta*.

Com o aumento da intensidade da ferrugem e da mancha de *Ascochyta* ao longo do experimento, o processo de sinalização induzido pelo ácido salicílico foi menos evidente. Possivelmente, isso ocorreu devido ao aumento das doenças foliares que promoveram espécies reativas de oxigênio, e, conseqüentemente, também sinalizaram para a planta estimular seus mecanismos de defesa. (De Wit, 2007; Deuner et al., 2008). Plantas sob ataque de patógenos podem hidrolizar glucosídeos inativos de ácido salicílico em ácido salicílico livre, desencadeando o processo de sinalização para defesa sistêmica adquirida (Fu & Dong, 2013).

A intensidade de doenças atingiu o pico máximo entre 90 e 126 dias da primeira aplicação com números muito próximos aos citados por outros autores em anos de baixa carga (Meira et al., 2008; Zambolim, 2016). Apesar das chuvas neste período estarem abaixo da média, a umidade presente na área foi suficiente para o desenvolvimento das doenças analisadas, pois havia orvalho nas folhas pelas manhãs, associado ao fato das temperaturas estarem ligeiramente acima da média histórica, em condições de desenvolvimento para *H. vastatrix* (Nutman & Roberts, 1963; Vale et

al., 2000; Fernandes, 2007) e *A. coffeae* (Chalfoun et al., 2000). A partir deste período, houve redução da intensidade de doenças, principalmente como consequência do aumento da desfolha, pois, cafeeiros com altos índices de ferrugem induzem a abscisão foliar (CUNHA et al, 2004).

A ausência de outras doenças e a menor intensidade de ferrugem e mancha de *Ascochyta* na área experimental podem ser explicadas pelo menor volume de chuvas nos meses anteriores à instalação do experimento, diminuindo-se assim a fonte de inóculo associado a baixa carga pendente das plantas. O volume de chuvas entre os meses de novembro a março foi, em média, 16,4% menor do que a precipitação média durante o mesmo período considerando a série histórica de 1981 a 2017, que totaliza 1.222 milímetros para o período. A ocorrência de chuvas favorece a germinação de *H. vastatrix* e *A. coffeae* (Godoy et al., 1997). Além disso, a intensidade de doenças foliares em cafeeiros é maior em plantas com carga alta (Costa et al., 2006), principalmente a ferrugem, devido à menor concentração de potássio nas folhas (Carvalho et al., 1996).

A aplicação de ácido salicílico não altera o crescimento do cafeeiro, medido pelo número de entrenós dos ramos plagiotrópicos, em comparação com plantas não tratadas e com hidróxido de cobre. O maior crescimento foi observado na combinação de fungicidas, pois proporcionaram um ótimo controle da ferrugem, além do epoxiconazole juntamente com a piraclostrobina incrementar a fotossíntese e otimizar o sistema antioxidante do cafeeiro. (Honorato Junior et al., 2015) associados aos efeitos fisiológicos benéficos das estrobirulinas, como ação direta na nitrato redutase, regulação dos estômatos e atividade fotossintética (Bartlett et al., 2002). Em razão da ativação de mecanismos de resistência das plantas pela aplicação do biorregulador, era possível que a planta tivesse menor quantidade de energia disponível para crescimento e, com isso, tivesse crescimento reduzido, uma vez que os efeitos do ácido salicílico variam positivamente ou negativamente em cada espécie (Rivas-San Vicente & Plasencia, 2011). Em experimentos futuros, dados de produção podem indicar se a sinalização induzida pela aplicação de ácido salicílico não interfere na produção de grãos.

## CONCLUSÕES

O ácido salicílico diminuiu em 40% e 37%, respectivamente, a intensidade da ferrugem e da mancha de *Ascochyta* em cafeeiro em condições de campo em cafeeiros com baixa carga pendente.

A atividade das enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e catalase é alterada pela aplicação de ácido salicílico.

## Ácido salicílico reduz a reprodução de *Meloidogyne exigua* em cafeeiro.

TANNURI, L.A.R., LOPES, E.A., MACEDO, W.R., DIAS, W.M.L.

### RESUMO

*Meloidogyne exigua* é a principal espécie de nematoide encontrada nos cafeeiros brasileiros. Vários esforços são necessários para minimizar os danos causados por esse nematoide, incluindo a adoção de medidas ambientalmente sustentáveis, como a aplicação de indutores e resistência. O ácido salicílico (AS) é um hormônio vegetal que induz resistência sistêmica adquirida em plantas e seus benefícios já foram relatados em várias culturas. Entretanto, o conhecimento sobre o potencial de uso deste biorregulador no controle de *M. exigua* em café é escasso. Assim, conduzimos um experimento em condições de casa de vegetação para avaliar o efeito da aplicação foliar de AS no controle de *M. exigua* em café (*Coffea arabica* cv. Catuaí IAC 144). As plantas foram cultivadas em vasos de 2-L pots e submetidas aos seguintes tratamentos: AS (150 mg.L<sup>-1</sup>), fluensulfona (0,192 mg.planta<sup>-1</sup>), fluensulfona (0,192 mg.planta<sup>-1</sup>) + AS (150 mg.L<sup>-1</sup>), controle não tratado inoculado com *M. exigua* e controle não tratado sem inoculação. O ácido salicílico foi pulverizado nas folhas aos 5, 20 e 45 dias após o transplante (DAT) das plântulas. Um dia após o transplante, as plantas foram inoculadas com 5000 ovos do nematoide. As proteínas totais solúveis, catalase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase foram avaliadas aos 45 DAT. A altura das plantas, massa das raízes e número de ovos de *M. exigua* foram avaliados aos 95 DAT. AS não teve efeito na altura de plantas e massa das raízes, mas reduziu o número de ovos de *M. exigua* em comparação com o controle. Fluensulfona causou fitotoxicidade em plantas de café, o que resultou em menor massa de raízes e altura de plantas. AS proteínas totais solúveis e as enzimas antioxidantes foram influenciadas pela fluensulfona, enquanto que os tratamentos com AS não diferiram dos controles, provavelmente devido a um estresse hídrico ocorrido durante o experimento (aos 20 DAT). O ácido salicílico reduz a reprodução de *M. exigua* em café Catuaí IAC 144.

Palavras-chaves: *Coffea arabica*, enzimas antioxidantes, hormônios vegetais, indutor de resistência, nematoide de galhas.

## Salicylic acid reduces the reproduction of *Meloidogyne exigua* in coffee plants

TANNURI, L.A.R., LOPES, E.A., MACEDO, W.R., DIAS, W.M.L.

### ABSTRACT

*Meloidogyne exigua* is the main plant-parasitic species found in Brazilian coffee plantations. Several efforts are needed to minimize the damages caused by this nematode, including the adoption of eco-friendly approaches such as the application of resistance inducers. Salicylic acid (SA) is a plant hormone that induces the systemic resistance acquired in plants and its benefits have already been related in several crops. However, the knowledge about the potential of the use of this bioregulator on the control of *M. exigua* in coffee is scarce. Thus, we carried out an experiment under glasshouse conditions to assess the effect of foliar spraying of SA on the control of *M. exigua* in coffee (*Coffea arabica* cv. Catuaí IAC 144). Plants were grown in 2-L pots and submitted to the following treatments: SA (150 mg.L<sup>-1</sup>), fluensulfone (0.192 mg.plant<sup>-1</sup>), fluensulfone (0.192 mg.plant<sup>-1</sup>) + SA (150 mg.L<sup>-1</sup>), non-treated control inoculated with *M. exigua* and non-treated control without inoculation. SA was sprayed on the leaves at 5, 20 and 45 days after transplanting (DAT) the seedlings. At 1 DAT, plants were inoculated with 5,000 eggs of the nematode. Total soluble proteins, catalase, ascorbate peroxidase and superoxide dismutase were evaluated at 45 DAT. Plant height, fresh root mass and number of *M. exigua* eggs were evaluated at 95 DAT. SA had no effect on plant height and fresh root mass but reduced the number of eggs of *M. exigua* in comparison to the control. Fluensulfone caused phytotoxicity in coffee plants, which resulted in lower root mass and plant height. Total soluble proteins and antioxidant enzymes were influenced by fluensulfone, whereas treatments with salicylic acid did not differ from controls, probably due to a water stress during the experiment (at 20 DAT). Salicylic acid reduces the reproduction of *M. exigua* in coffee Catuaí IAC 144.

Keywords: *Coffea arabica*, antioxidant enzymes, plant hormones, resistance inducer, root-knot nematode.

## INTRODUÇÃO

Fitonematoides do gênero *Meloidogyne* causam danos em várias culturas agrícolas em todo o mundo (Ferraz & Brown, 2016) e dezessete espécies desse gênero podem parasitar o cafeeiro (Carneiro & Cofcewicz, 2008). No Brasil, *Meloidogyne exigua* é a espécie com maior dispersão (Salgado et al., 2011), sendo relatada em todos os estados produtores de café arábica. A produção de plantas parasitadas por *M. exigua* pode ser reduzida em 45% (Barbosa et al., 2004) e o manejo deste nematoide envolve a integração de várias medidas de controle (Huang, et al., 1983; Marcuzzo et al., 2000; Campos & Silva, 2008). Com a crescente demanda na redução da dependência de nematicidas químicos, muitos métodos naturais têm sido pesquisados incluindo o uso de indutores de resistência (Amaral et al., 2002; Salgado & Campos, 2003).

A aplicação de indutores de resistência de plantas pode reduzir a população de fitonematoides em várias culturas, a exemplo da cana de açúcar (Assunção et al., 2010), tomate (Silva et al. 2004), soja (Rocha et al., 2000, Lee et al., 2017), café (Salgado et al., 2007) dentre outras. Vários indutores químicos ou biológicos podem incitar resistência de plantas, incluindo o ácido salicílico. Este fitormônio tem papel fundamental na sinalização das plantas contra agentes bióticos e abióticos, induzindo a resistência sistêmica adquirida, regulando proteínas de resistência e promovendo a expressão gênica de defesa (Durrant & Dong, 2004; Vlot et al., 2010).

O ataque de fitopatógenos ou a presença de outros agentes estressores podem fazer com que as plantas produzam espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo: peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), superóxido ( $O_2^-$ ) e o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) (Cros & Jones, 1991). As ROS, quando em excesso, podem reagir com moléculas biológicas podendo causar danos irreversíveis que podem levar à morte celular (Barbosa et al., 2014).

Complexos mecanismos para diminuir os danos causados pelas ROS são utilizados pelas plantas através de várias enzimas, dentre elas a catalase, a peroxidase e superóxido dismutase. As concentrações dessas enzimas podem ser influenciadas pela presença de nematoides, variando em função da espécie, sua população inicial e planta hospedeira (Afify et al., 2014).

Muitos estudos já evidenciaram o potencial de aplicações exógenas de ácido salicílico em outras culturas, influenciando nas enzimas antioxidantes e reduzindo significativamente os níveis de vários patógenos. Entretanto, este conhecimento ainda é incipiente na cultura do cafeeiro, necessitando-se assim indispensável a investigação dos efeitos deste fitormônio em cafeeiros inoculados com *M. exigua*, bem como sua influência nas enzimas antioxidantes.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em duplicata, em casa de vegetação. Cafeeiros cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 foram inoculados com *Meloidogyne exigua* e tratados com ácido salicílico ( $150 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido salicílico ( $150 \text{ mg L}^{-1} + \text{fluensulfona } 0,192 \text{ ml planta}^{-1}$ ), fluensulfona ( $0,192 \text{ ml por planta}$ ), plantas não tratadas e inoculadas com *M. exigua* e plantas não tratadas e não inoculadas foram mantidas como testemunha.

Vasos plásticos de 2 L de capacidade foram preenchidos com substrato composto pela mistura solo e areia (1:1, v:v), previamente autoclavada a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 h. O solo de cada vaso foi corrigido com 0,723 grama de fosfato monoamônico (MAP). Em seguida, plântulas de cafeeiro cv. IAC Catuaí Vermelho 144, suscetível a nematoides, foram transplantadas com quatro pares de folhas em cada vaso, no dia 30 de janeiro de 2018. No dia seguinte ao transplante, as plantas foram inoculadas com 5.000 ovos de *M. exigua*, extraídos de raízes de cafeeiros infectados pelo método de Boneti & Ferraz (1981).

O nematicida fluensulfona foi aplicado ao solo logo após o transplante das plântulas e antes da inoculação dos nematoides. Para isso, diluiu-se 100 mL do produto comercial em um litro de água, e aplicou-se 4 mL dessa diluição por vaso. As plantas foram pulverizadas com ácido salicílico aos cinco dias após o transplante, repetindo-se a aplicação aos 20 e aos 45 dias, totalizando três aplicações. Estas datas foram escolhidas em função das fases do ciclo do nematoide, para que fossem próximas à eclosão, penetração e reprodução do patógeno. O ácido salicílico foi aplicado com pulverizador costal equipado com ponta tipo leque modelo Magno Jet AD 110-02. Em cada aplicação do biorregulador, os vasos foram retirados da casa de vegetação para evitar a contaminação das demais parcelas por deriva.

Amostras de folhas foram coletadas um dia após a terceira aplicação do ácido salicílico para determinação das concentrações de proteínas totais solúveis (PTS), catalase (CAT), Ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD). As folhas foram acondicionadas em tubos Falcon, mantidos no interior de caixas de isopor contendo gelo e posteriormente levadas até o laboratório para processamento. No mesmo dia da coleta, foram quantificadas as proteínas totais solúveis e a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). Para a extração das proteínas solúveis, aproximadamente 100 mg de tecido vegetal foram macerados em nitrogênio líquido e, em seguida, em 1,5 mL de tampão Tris-HCl. O material macerado foi centrifugado durante 10 min a 6000 g. Em uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram acrescentados 3 mL do reativo de Bradford (LGC Biotecnologia), deixando em repouso por 5 min a temperatura ambiente. A leitura colorimétrica da reação foi realizada em

espectrofotômetro a 595 nm. A concentração de proteína solúvel foi calculada a partir da curva padrão construída com albumina soro bovina (BSA) (Bradford, 1976).

Para a determinação da atividade das enzimas, extrato enzimático bruto foi preparado a partir de 200 mg de material vegetal fresco. As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido, seguido da adição de 1500  $\mu\text{L}$  do meio de extração (750  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 200 mM e pH 7,8, ainda 15  $\mu\text{L}$  de ácido etilenodiamino (EDTA) 10 mM, acrescido de 150  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 200 mM e 585  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q). A amostra foi vertida em eppendorf de 2 mL e centrifugada a 12 000 rpm por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em gelo até o momento das leituras (Sperotto et al., 2014).

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Beauchamp & Fridovich (1971) e Gianngiopolitis & Reis (1977). Os resultados representam a quantidade de enzima capaz de inibir 50% da fotoinibição nitroblue tetrazolium, em espectrofotômetro no comprimento de onda de 560 nm, expressos em  $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

Para determinação da CAT, utilizou-se uma alíquota de 12,5  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático e seguiu-se os procedimentos descritos por Havir & McHale (1987) e Anderson et al (1995). A atividade da enzima foi determinada pela mensuração da redução na absorbância das amostras a 240 nm, em decorrência do consumo do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com leituras com duração total de 60s com intervalos de 10 em 10s, sendo observado o decréscimo na absorbância. Para os cálculos considerou-se o resultado da diferença entre a última leitura da primeira. As leituras foram feitas com rapidez, pois o  $\text{H}_2\text{O}_2$  desencadeia o processo de redução pela enzima ao entrar em contato com a amostra. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$

A atividade da APX foi avaliada a partir de alíquota de 12,5  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático, pelo método descrito por Nakano e Asada (1981) e a atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$ . Para todas as enzimas e proteínas totais solúveis, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis Evolution 300 – Thermo Scientific.

Após 95 dias de experimento, mediu-se a altura das plantas com auxílio de trena. Neste mesmo dia, a parte aérea foi separada das raízes e descartada. As raízes foram lavadas para a retirada de resíduos de solo e pesadas. Os ovos foram extraídos das raízes (Boneti & Ferraz, 1981) e contados em câmara de Peters.

Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado com nove repetições. A parcela experimental foi representada por um vaso com uma planta.

Além da irrigação, não foram feitos tratamentos culturais durante o período de condução do experimento. Aproximadamente aos 20 dias do transplante das mudas, as plantas sofreram estresse hídrico de cinco dias; no entanto, a irrigação foi retomada normalmente logo em seguida.

#### *Análises estatísticas*

Os dados foram submetidos à análise de variância ( $p < 0,05$ ) e, quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) com uso do pacote estatístico Speed Stat (Carvalho & Mendes, 2017)

## **RESULTADOS**

A aplicação de ácido salicílico reduziu em cerca de 10 vezes a quantidade de ovos de *M. exigua* por planta, enquanto que a redução com fluensulfona foi de aproximadamente três vezes, quando comparados com a testemunha inoculada (Figura 1). Nenhuma galha ou ovo foi observado na testemunha não inoculada, comprovando que não houve contaminação entre as parcelas.

Plantas tratadas com fluensulfona tiveram sintomas de fitotoxicidade. Conseqüentemente, a altura e a massa das raízes das plantas foram reduzidas em mais de 15% e 60% respectivamente, quando comparados com a testemunha não inoculada e não tratada (Figura 2). A aplicação de ácido salicílico não reduziu a altura e a massa das raízes, sendo similares à testemunha sem nematoide (Figura 2).

A aplicação de ácido salicílico e fluensulfona não alterou a concentração da catalase nas plantas (Figura 3). Os níveis de proteínas totais solúveis chegaram a cerca de quinze vezes maiores em plantas tratadas com fluensulfona, quando comparados ao ácido salicílico sozinho (Figura 3 A). Em contrapartida, os níveis de superóxido dismutase foram cerca de dez vezes menores nos tratamentos que receberam o nematicida quando comparados ao biorregulador. (Figura 3 B). A concentração de ascorbato peroxidase em plantas que receberam ácido salicílico foi até cinco vezes maior nos cafeeiros com fluensulfona (Figura 3C). A aplicação de ácido salicílico apenas não alterou as concentrações de PTS, SOD, APX e CAT, quando comparado com os tratamentos com e sem *M. exigua*. (Figura 3).

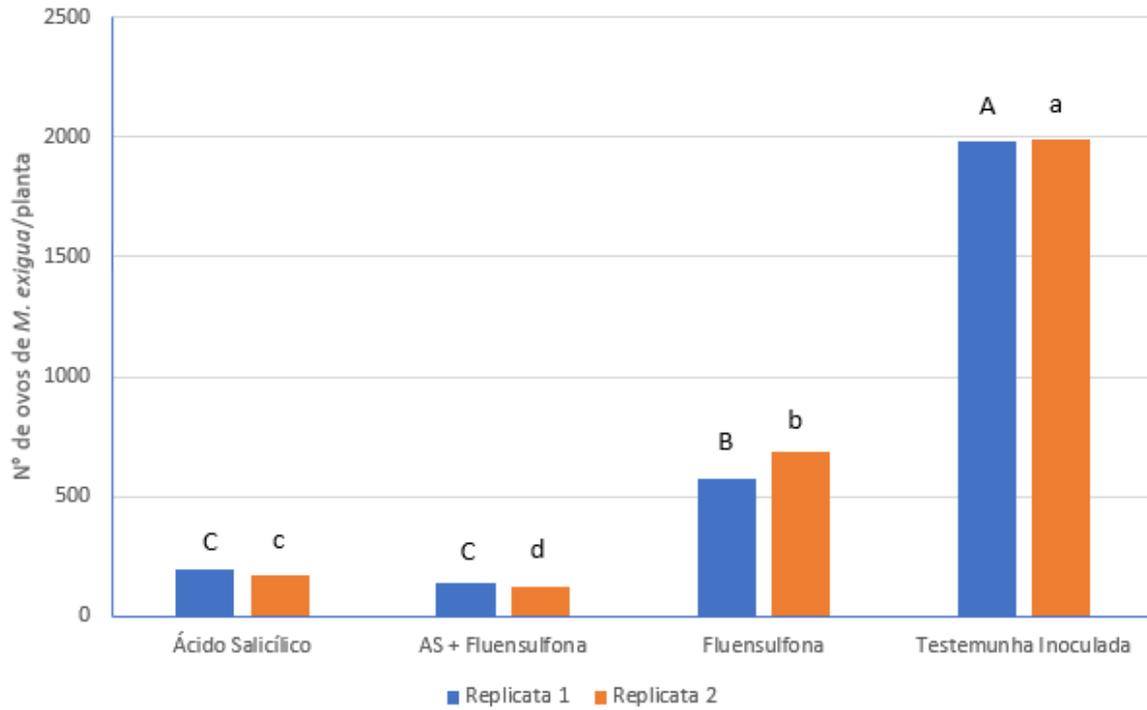


Figura 1: Número de ovos de *Meloidogyne exigua* por cafeeiros tratados com: ácido salicílico (150 mg.L<sup>-1</sup>), ácido salicílico (150 mg.L<sup>-1</sup>)+fluensulfona (0,192 mL.planta<sup>-1</sup>), fluensulfona (0,192 mL.planta<sup>-1</sup>) e testemunha inoculada. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na replicata 1 e de mesma letra minúscula na replicata 2 não diferem entre si pelo teste de Tukey (p1<0,001 e p2<0,001).

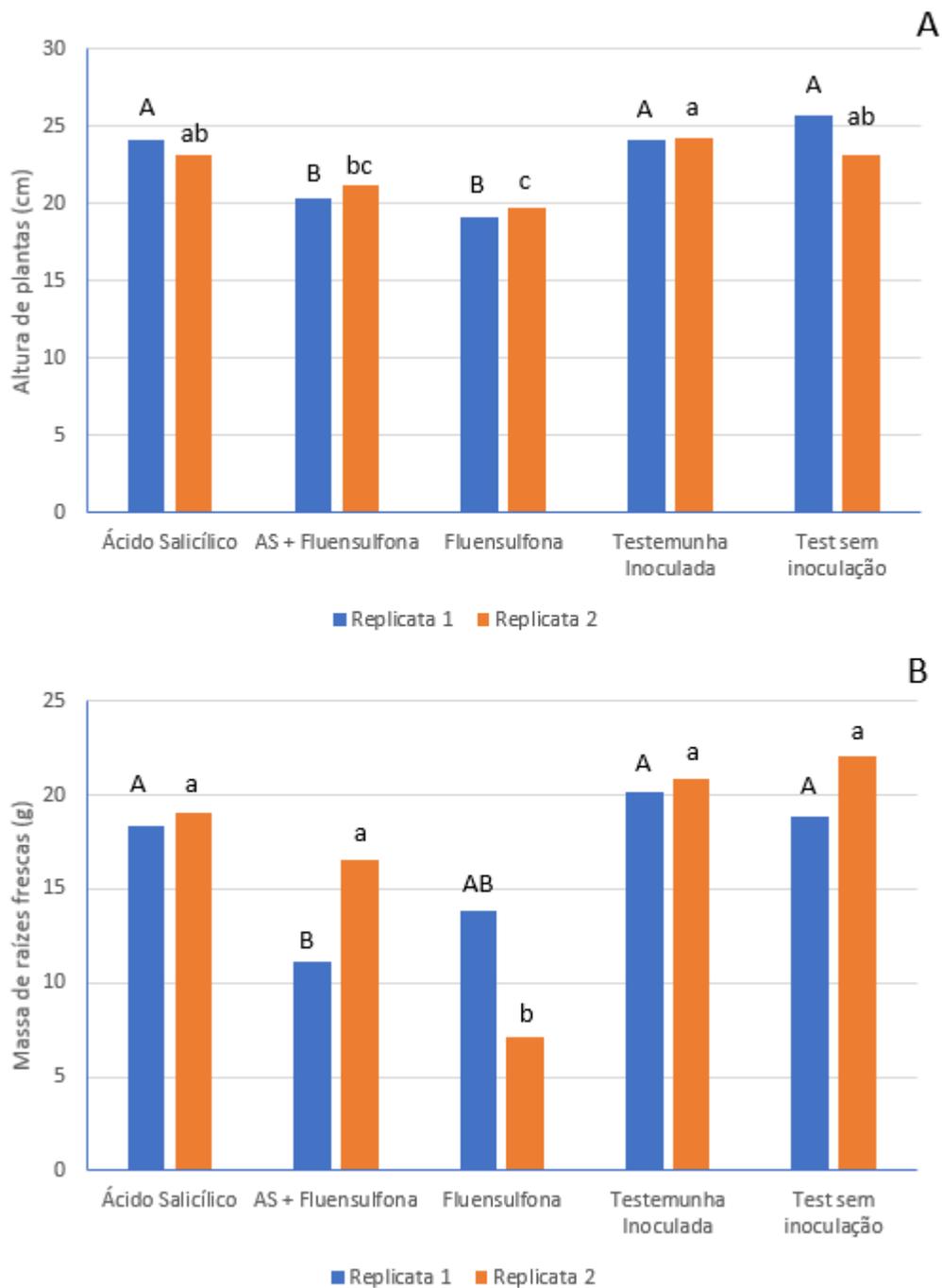


Figura 2: Altura (A) e massa de raízes frescas (B) de cafeeiros tratados com: : ácido salicílico ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ), ácido salicílico ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ )+fluensulfona ( $0,192 \text{ mL.planta}^{-1}$ ), fluensulfona ( $0,192 \text{ mL.planta}^{-1}$ ), testemunha inoculada e testemunha sem inoculação, aos 90 dias após a inoculação com *Meloidogyne exigua*. Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na replicata 1, e médias seguidas de mesma letra minúscula, na replicata 2, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p_1 < 0,001$ ;  $p_2 < 0,001$ ).

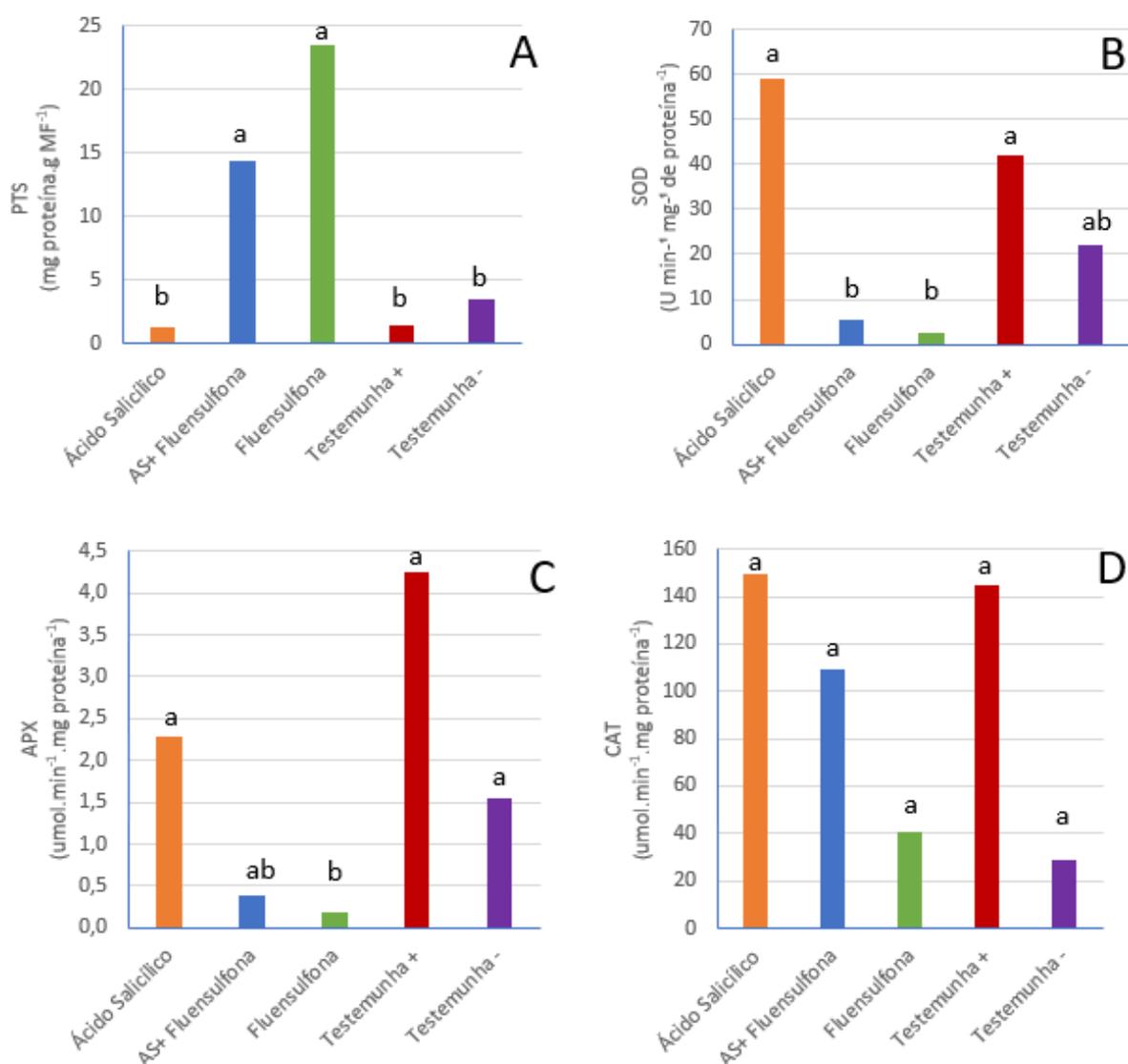


Figura 3: Concentração de proteínas totais solúveis (A, em mg proteína.g de matéria fresca<sup>-1</sup>), superóxido dismutase (B, em U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína<sup>-1</sup>), ascorbato peroxidase (C, em μmol.min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>) e catalase (D, em μmol.min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>), para os tratamentos: : ácido salicílico (150 mg.L<sup>-1</sup>), ácido salicílico (150 mg.L<sup>-1</sup>)+fluensulfona (0,192 mL.planta<sup>-1</sup>), fluensulfona (0,192 mL.planta<sup>-1</sup>), testemunha inoculada e testemunha sem inoculação, no dia seguinte a última aplicação dos produtos (46 dias após a inoculação). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (pPTS<0,001, pSOD<0,001, pAPX=0,006, pCAT=0,062)

## DISCUSSÃO

O ácido salicílico reduz a reprodução de *M. exigua* em cafeeiro. O contato direto desta substância inibe a eclosão e mata juvenis de segundo estágio do nematoide (Salgado et al., 2007). No entanto, como não houve aplicação do produto diretamente sobre os nematoides, é mais provável que a inibição na reprodução pode ter sido efeito de indução de resistência. A aplicação de ácido salicílico na parte aérea aumenta a concentração de proteínas do grupo PR relacionadas com a patogênese (Ryals et al., 1994), induzindo vários mecanismos de defesa (Klessing & Malamy, 1994), tal como observado na redução de *M. incognita* em quiabeiros (Nandi et al., 2003) e redução de *M. javanica* em tomateiros, tanto por aplicação via encharcamento de solo (Molinari et al., 2014), quanto pulverizado na parte aérea (Naserinasab et al., 2011).

Plantas sob estresses bióticos ou abióticos acumulam espécies reativas de oxigênio (Baxter et al., 2013) e um complexo de enzimas antioxidantes auxilia na degradação das ROS, como por exemplo, a catalase, a ascorbato peroxidase e a superóxido dismutase (Caversan et al., 2012; Taiz et al., 2017). De forma geral, os níveis das enzimas estudadas foram similares em plantas tratadas com ácido salicílico e as testemunhas inoculadas e não inoculadas. Esperava-se encontrar níveis maiores de enzimas antioxidantes nas plantas com ácido salicílico e na testemunha inoculada em relação as plantas sem inoculação, conforme resultados obtidos por Silva et al. (2010), que encontraram níveis de peroxidase 39,9% maiores em cafeeiros Catuai 144 e 31,3% maiores em IAPAR 59, inoculados com *M. exigua*. Oliveira et al. (2012) também relataram o aumento de superóxido dismutase e peroxidase em caupi inoculado com *M. incognita*. Provavelmente, estes resultados não foram encontrados neste trabalho devido ao estresse hídrico sofrido inicialmente, influenciando diretamente as concentrações de enzimas antioxidantes no café (Fortunato et al., 2011).

A fitotoxicidade causada por fluensulfona pode ser explicada pelas condições específicas que o experimento foi montado, com solo muito arenoso e ausência de matéria orgânica. A lenta biodegradação do nematicida e as condições de baixa persistência no solo (pouca argila) fizeram com que o produto se acumulasse em condições tóxicas à planta (Cabrera-Hidalgo et al., 2015). Os altos níveis de proteínas totais solúveis, associados às baixas concentrações encontradas de SOD e APX, demonstram elevado grau de estresse que a planta estava submetida (Bowler et al., 1992). O controle pelo nematicida ficou abaixo do esperado, podendo ser pela baixa eficiência do produto sobre *M. exigua*, ou, mais provável, devido à morte de muitas raízes em função da fitotoxicidade e, com isso, a planta absorveu menores quantidades do produto.

## CONCLUSÃO

A aplicação foliar de ácido salicílico aos 5, 20 e 45 dias após o transplante de cafeeiro cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 reduz a reprodução de *M. exigua* e não limita o crescimento da planta.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afify A.E.M.M.R, Farahat A.A., Al-Sayeed A.A., Mahfoud N.A.M. 2014. Antioxidant enzymes as well as oxidant activities involved in defense mechanisms against the root knot, reniforme and citrus nematodes in their host plants. International Journal of Biology and Food Science. 2(6):102-111.

Amaral D.R., Oliveira D.F., Campos V.P., Carvalho D.A. 2002. Efeito de alguns extratos vegetais na eclosão, mobilidade, mortalidade e patogenicidade de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. Nematologia Brasileira. 26(1):43-48.

Anderson M.D., Prasad T.K., Stewart T.R. 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyl of maize seedlings. Plant Physiology. 109:1247-1257.

Ashgari M., Hasanlooe A.R. 2015. Interaction effects of salicylic acid and methyl jasmonate on total antioxidant content, catalase and peroxidase enzymes activity in “Sabrosa” strawberry fruit during storage. Scientia Horticulturae. 1-6.

Assunção A., Santos L.C., Rocha M.R., Reis A.J.S., Teixeira R.A., Lima F.S.O. 2010. Efeito de indutores de resistência sobre *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Nematologia Brasileira. 34(1):56-62.

Barbosa D.H.S.G., Vieira H.D., Souza R.M., Viana A.P., Silva C.P. 2004. Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. Nematologia Brasileira. 28 (1)49-54.

Barbosa M.R., Silva M.M.A., Willadinoll L., Ulisses C., Camara T.R. 2014. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. Ciência Rural. 44:453-460.

Barros F.C., Sagata E., Ferreira L.C.C., Juliatti F.C. 2010. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. Bioscience Journal. 26:231-239

- Bartlett D.W., Clough J.M., Godwin J.R., Hall A.A., Hamer M., Parr-Dobrzanski B. 2002. Review, The strobirulin fungicides. *Pest Management Science*. 58:649-662.
- Baxter A., Mittler R., Suzuki N. 2013. ROS as key players in plant stress signaling. *Journal of Experimental Botany*. 65(5):1129-1240.
- Beauchamp C., Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 44:276-287.
- Bertoncelli D.J., Mazaro S.M., Rocha R.C.D.S., Possenti J.C., Rey M.S., Zorzzi I.C. 2015. Ácido salicílico na indução de resistência a doenças do pepino e controle de *Pythium* sp. *In vitro*. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. 14:124-131.
- Bonaldo S.M., Pascholati S.F., Romeiro R.S. 2005. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ. 11-28.
- Bowler C., Montagu M.V., Inzé D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology. Plant Molecular Biology*. 43:83-116.
- Bradford M.M. 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Cabrera-Hidalgo A.J., Moctezuma E.V., Mendoza N.M. 2015. Efecto del fluensulfone sobre la movilidad in vitro, y la reproducción y agallamiento de *nacobbus aberrans* en microparcels. *Nematropica*. 45:59-71.
- Campbell C.L., Madden L.V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. New York: Wiley. 532 pp.
- Campos A.D., Ferreira, A.G., Hampe M.M.V., Antunes I.F., Brancão, N., Silveira E.P., Osório E.A., Augustin E. 2004. Atividade da peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 39:637-643.
- Campos V.P., Silva J.R.C. 2008. Management of *Meloidogyne* spp. in coffee plantations. In: SOUZA R.M. (eds) Plant parasitic nematodes of coffee. 149-164.
- Capucho A.S., Zambolim L., Duarte H.S.S., Vaz, G.R.O. 2010. Development and validation of a standard area diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea arabica* and *C. canephora*. *Plant Pathology*. 60:1144–1150.
- Carneiro R.M.D.G., Cofcewicz E.T. 2008. Taxonomy of Coffee-Parasitic Root Knot Nematodes, *Meloidogyne* spp. *Plant-Parasitic Nematodes of Coffee*. 87-122.
- Carvalho, A.M.X., Meneds, F.Q. 2017. SPEED Stat: a minimalist and intuitive spreadsheet program for classical experimental statistics. *Anais da 62ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria*. 333pp.

Carvalho V.L., Chalfoun S.M., Castro H.A., Carvalho V.D. 1996. Influência da produção na incidência da ferrugem do cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 31:401-405.

Carvalho V.L., Cunha R.L., Silva N.R.N. 2012. Alternativas de controle de doenças do cafeeiro. *Coffee Science*. 7:42-49.

Caversan A., Passaia G., Rosa S.B., Ribeiro C.W., Lazzarotto F., Margis-Pinheiro M. 2012. Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*. 35:1011-1019.

Chalfoun S.M., Carvalho V.L., Angélico C.L. 2000. Simpósio de pesquisas dos cafés do Brasil. 2:1490pp

CONAB - Compêndio de Estudos Conab / Companhia Nacional de Abastecimento. 2017. v.12, A cultura do café: Análise dos custos de produção e da rentabilidade nos anos-safra 2008 a 2017. Brasília-DF: Conab. 19 pp.

Costa M.J.N., Zambolim L., Rodrigues F.A. 2007. Avaliação de produtos alternativos no controle da ferrugem do cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 32:150-155.

Costa M.J.N., Zambolim L., Rodrigues F.A. 2006. Efeito dos níveis de desbaste dos frutos do cafeeiro na incidência de ferrugem, no teor de nutrientes, carboidratos e açúcares redutores. *Fitopatologia Brasileira*. 31:564-571.

Cros A.R., Jones O.T. 1991. Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1057:281-298.

Csiszár J., Brunner S., Horváth E., Bela K., Ködmön R.R., Gallé A., Hurton Á., Papdi C., Sza Bados L., Tari. 2018. I. Exogenously applied salicylic acid maintains redox homeostasis in salt-stressed *Arabidopsis* gr1 mutants expressing cytosolic roGFP1. *Nature. Plant Growth Regulation*. doi.org/10.1007/s10725-018-0420-6.

Cunha R.L., Mendes A.N.G., Chalfoun S.M. 2004. Controle químico da ferrugem do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e seus efeitos na produção e preservação do enfolhamento. *Ciência agrotecnologia*. 28:990-996.

De Sá M.F.B. 2010. Avaliação do papel dos ácidos salicílico, abscísico e jasmônico na interação *Coffea arabica* – *Hemileia vastatrix*: Implementação de um método de análise. Dissertação de mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.

De Wit P.J. 2007. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Science*. Doi: 10.1007/s00018-007-7284-7. 64:2726-2732.

Delaney T.P., Uknes S., Vornoi B., Friedrich L., Weymann K., Negrotto D., Gaffney T., Gut-Rella M., Kessmann H., Ward E., Ryalst J. A. 1994. Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance. *Science*. 266:1247-1250.

Deuner S., Alves J.D., Fries D.D., Zanadrea I., Lima A.A., Henrique P.C., Goulart P.F.P. 2008. Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro, *Revista Ceres*. 55(2):135-140.

Durrant W.E., Dong X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*. doi: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421. 185-209.

Fernandes R.C. 2007. Reavaliação do ciclo de vida de *Hemileia vastatrix* no Brasil. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa.

Ferraz L.C.C.B., Brown D.J.F. 2016. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. Manaus: NORMA EDITORA. II. ISBN: 978-85-99031-26-1. 251 pp.

Fortunato A.S., Goulao L.F., Rodrigues A.N., Jackson P., Partelli F.L., Ribeiro A.I., Ramalho J.C. 2011. Sistema antioxidativo de *Coffea* sp. Na capacidade de aclimação a estresse simultâneo de frio e seca. Simpósio de pesquisas dos cafés do Brasil. Resumos expandidos.

Freitas M.L.O. 2017. Epidemiologia e controle da mancha aureolada do cafeeiro. Tese de doutorado, Universidade Federal de Lavras.

Fu Z.Q., Dong X. 2013. Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology*. 10.1146/annurev-arplant-042811-105606. 64:839-863.

Galdeano D.M., Guzzo S. D., Patrício F. R. A., Harakava R. 2010. Proteção do cafeeiro contra cercosporiose por acibenzolar-S-metil e proteína harpina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 45:686-692.

Giannopolitis I., Reis S.K. 1997. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*. 59:309-314.

Gill S.S., Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48:909-930.

Godoy C.V., Bergamin Filho A., Salgado C.L. 1997. In: Kimati H., Amorim L., Bergamin Filho A., Camargo L.E.A., Rezende J.A.M. Manual de Fitopatologia, volume 2, Doenças de plantas cultivadas. 178-193.

Havir E.A., McHale N.A. 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*. 84:450-455.

Herrera-Vásquez A., Sallinas P., Holluigue L. 2015. Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Frontiers in Plant Science*. doi:10.3389/fpls.2015.00171.

Honorato Junior J., Zambolim L., Aucique-Pérez, C.E., Resende, R.S., Rodrigues F.A. 2015. Photosynthetic and antioxidative alterations in coffee leaves caused by epoxiconazole and

pyraclostrobin sprays and *Hemileia vastatrix* infection. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 123:31-39.

Honorato Junior J., Zambolim L., Duarte H.S.S, Aucique-Pérez C.E., Rodrigues F.A. 2015. Effects of epoxiconazole and pyraclostrobin fungicides in the infection process of *Hemileia vastatrix* on coffee leaves as determined by chlorophyll a fluorescence imaging. *Journal of Phytopathology*. 163(11-12): 968-977.

Honorato Junior J., Zambolim L., Lopes U.N., Lopes U.P., Duarte H.S.S. 2015. DMI and QoI fungicides for the control of coffee leaf rust. *Australasian Plant Pathology*. 44(5):575-581.

Huang S. P., Resende I. C., Souza P. E., Campos V. P. 1983. Effect of aldicarb, ethoprop, and carbofuran on control of coffee root-knot nematode, *Meloidogyne exigua*. *Journal of Nematology*. Volume 15, N°4.

Jiang M, Zhang J. 2002. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany*. 53:2401-2410.

Klessig D.F., Choi H.W., Dempsey D.A. 2018. Systemic acquired resistance and salicylic acid: Past, present and future. *Molecular plant-microbe interactions*. doi: /10.94/MPMI-03-18-0067-CR.

Klessig D.F., Malamy J.1994. The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology* 26:1439–1458.

Kumar D. 2014. Salicylic acid signaling in disease resistance, *Plant Science*. dx.doi.org/10.1011/j.plantsci.2014.04.014. 228:127-134.

Lee M.W., Huffaker A., Crippen D. 2007. Plant elicitor peptides promote plant defenses against nematodes in soybean. *Molecular Plant Pathology*. doi: 10.1111/mpp.12570. 19(4):858-869

Lovelock D.A., Donald C.E., Conlan X.A., Cahill D.M. 2013. Salicylic acid suppression of clubroot in broccoli (*Brassicae oleracea* var. *italica*) caused by the obligate biotroph *Plasmodiophora brassicae*. *Australasian Plant Pathology*. 42:141-153.

Luo Y., Shang J., Zhao P., Xi D., Yuan S., Lin H. 2011. Application of jasmonic acid followed by salicylic acid inhibits *Cucumber mosaic virus* replication. *The Plant Pathology Journal*. 27(1):53-58.

Marcuzzo K.V., Santos M.A., Juliatti F.C., Melo B., Severino B.M. 2000. Uso de nematicidas no controle de *Meloidogyne incognita* e *M. exigua* em cafeeiro, no município de Indianópolis, MG. Simpósio de pesquisas dos cafés do Brasil. Poços de Caldas, MG, Resumos expandidos. 389 pp.

Matiello J. B., Krohling C. A., Barros U. V. 2012. Avaliação de locais de maior ocorrência de *Phoma/Ascochyta* em cafeeiros, na cafeicultura de montanha. In: 38° CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS.

Matiello J.B., Santinato R., Almeida S.R., Garcia A.W.R. 2015. Cultura de café no Brasil. Manual de recomendações. 317-354

Meira C.A.A., Rodrigues L.H.A., Moraes S.A. 2008. Análise da epidemia de ferrugem do cafeeiro com árvore de decisão. *Tropical plant pathology*. 33(2):114-124.

Mesquita C.M., Rezende J.E., Carvalho J.S., Fabri Junior, M.A., Moraes N.C., Dias P.T., Carvalho R.M., Araújo W.G. 2016. Manual do café: distúrbios fisiológicos, pragas e doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Belo Horizonte: EMATER-MG. 44-59.

Molinari S., Fanelli E., Leonetti P. 2014. Expression of tomato salicylic acid (SA)-responsive pathogenesis-related genes in *Mi-1* mediated and AS-induced resistance to root-knot nematodes. *Molecular Plant Pathology*. 15(3):255–264.

Nakano Y., Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*. 22:867-880.

Nandi B., Kundu K., Banerjee N., Babu S.P.S. 2003. Salicylic acid-induced suppression of *Meloidogyne incognita* infestation of okra and cowpea. *Nematology*. 5(5):747-752.

Naserinasab F., Sahebani N., Etebarian H.R. 2011. Biological control of *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum* BI and salicylic acid on tomato. *African Journal of Food Science*. 5(3):276 – 280.

Nutman F.J., Roberts F.M. 1963. Studies on the biology of *Hemileia vastatrix* Berk & Br. *Transactions of British Mycological Society*. 46(1):27-44.

Oliveira J.T.A., Andrade N.C., Martins-Miranda, A.S., Soares A.A., Gondim, D.M.F., Araújo Filho J.H., Freire Filho F.R., Vasconcelos I.M. 2012. Differential expression of antioxidant enzymes and PR-proteins in compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 51:145-152.

Osorio C.A.R., Giraldo C.A.S., Ardila M.A.C., Bustamante A.L.G. 2011. La hoya del cafeto en Colombia, impacto, manejo y costos del control, resultados de investigación. *Boletín Técnico Cenicafe*. 51 pp.

Pereira R. B., Lucas G.C., Perina F.J., Ribeiro Junior P.M., Alves E. 2012. Óleo essencial de citronela no controle e na ativação de respostas de defesa do cafeeiro contra a ferrugem e cercosporiose. *Ciência agrotecnologia*. 36:383-390.

Rasmussen J.B., Hammerschmidt R, Zook M.N. 1991. Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiology*. 97:1342–1347.

Rena A. B., Malavolta E., Rocha M., Yamada T. 1986. Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: POTAFOS.

Resende M.L.V., Salgado S.M.L., Chaves Z.M. 2003. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira*. 28:123-130.

Rivas-San Vicente M., Plasencia J. 2011. Salicylic acid beyond defense: its role in plant growth and development. *Journal of experimental botany*. 62:3321-3338.

Rocha M.R., Castro R.M., Pina R.C., Martini A.L. 2000. Efeito do acibenzolar-s-methyl (benzothiadiazole), como indutor de resistência sistêmica em soja (*glycine max* cv. ftcrystalina), sobre *heterodera glycines*. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 30(2):35-38.

Ryals J., Uknes S., Ward E. 1994. Systemic acquired resistance. *Plant Physiology*. 104:1109–1112.

Salgado M., Pereira R.T.G., Pozza E.A., Pfenning L.H. 2005. Escala diagramática para avaliação da severidade de mancha de *Phoma* do cafeeiro (*Coffea arabica*). Simpósio de pesquisas dos cafés do Brasil, Londrina-PR, v4.

Salgado M., Pfenning L.H. 2000. Identificação e caracterização morfológica de espécies de *Phoma* no Brasil. Simpósio de pesquisas dos cafés do Brasil, Poços de Caldas-MG. 2:1490.

Salgado M., Pozza E.A., Lima L.M., Pereira R.T.G., Pfenning L.H. 2009. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha de *Phoma* do cafeeiro. *Tropical Plant Pathology*. 34:422-427.

Salgado S.M.L., Campos V.P. 2003. Eclosão e mortalidade de *Meloidogyne exigua* em extratos e em produtos naturais. *Fitopatologia Brasileira* 28:166-170.

Salgado S.M.L., Carneiro, R.M.D.G., Pinho, R.S.C. 2011. Aspectos técnicos dos nematoides parasitas do cafeeiro. *Boletim Técnico EPAMIG n°98 ISSN 0101-062X*.

Salgado S.M.L., Resende M.L.V., Campos V.P. 2007. Efeito de indutores de resistência sobre *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*. 31:1007-1013.

Sánchez G.R., Mercado E.C., Peña E.B., De La Cruz H.R., Pineda E.G. 2010. *Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, biológicas*. 12.

Schwan-Estrada K. R. F., Stangarlin J. R., Pascholati S. F. 2011. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). *Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular*. In: Stangarlin J. R.,

Kuhn O. J., Toledo M. V., Portz R. L., Schwan-Estrada K. R. F., Pascholati S. F. 2011. A defesa vegetal contra fitopatógenos. *Scientia Agraria Paranaensis*. 10:18-46.

Silva L.H.C.P., Campos J.R., Dutra M.R., Campos V.P. 2004: Aumento da resistência de tomate a *Meloidogyne incognita* com aplicações de Acibenzolar-S-Metil. *Nematologia brasileira*. 28(2):199-206.

Silva M.S., Silva R.P., Souza A.V.L., Xavier Y.P.M., Oliveira A.C., Coqueiro, D.S.O. 2016. Aplicação exógena de ácido salicílico em maracujazeiro-amarelo para o controle do vírus do endurecimento dos frutos. *Arquivos do Instituto Biológico*.83:1-7.

Silva R. V., Oliveira R. D. L., Nascimento K. J. T., Rodrigues, F. A. 2010. Biochemical responses of coffee resistance against *Meloidogyne exigua* mediated by silicone. *Plant Pathology*. 59:586–593.

Sperotto R.A. 2014. Protocolos e métodos de análises em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana. 1ª Edição. Editora Univates. 328pp.

Taiz L., Zeiger E., Moller I.A., Murphy A. 2017. Fisiologia e desenvolvimento vegetal – 6ª edição. 682pp.

Vale F.X.R., Zambolim L., Jesus W.C. 2000. Efeito da temperatura no período latente de *Hemileia vastatrix* Berk&Br, agente causal da ferrugem do cafeeiro. Simpósio de pesquisas dos cafés do Brasil. v.2 1490pp.

Vlot A.C., Dempsey D.A., Klessing D.F. 2009. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual review of phytopathology*. 47:177-206.

Zambolim L., Vale F.X.R., Zambolim E.M. 2005. Doenças do cafeeiro. In: Kimati H., Amorim L., Rezende J.A.M., Bergamin Filho A., Camargo L.E. (Ed.). 2005. Manual de Fitopatologia. vol. 2: Doenças das plantas cultivadas. 4.ed. São Paulo: Ceres. 165-180.

Zambolim L. 2016. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Tropical plant pathology*. 41:1-8.

Zambolim L., Vale F. X. R. do, Chaves G.M. 1995. Controle químico de doenças de plantas. Brasília: ABEAS. 307pp.