

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PEROXIDASES E TEOR DE LIGNINA EM MUDAS DE CAFÉ TRATADAS COM EXTRATOS VEGETAIS CONTRA *Cercospora coffeicola*

Daniel R. AMARAL¹, E-mail: danielrufino78@yahoo.com.br; Mário Lúcio V. RESENDE¹; Pedro Martins RIBEIRO JÚNIOR¹; Moises A. de PÁDUA¹; Rodrigo E. MAC LEOD¹; Jerônimo C. BOREL¹

¹Universidade Federal de Lavras/ Departamento de Fitopatologia.

Resumo:

Este trabalho visou estudar os mecanismos envolvidos na defesa de mudas de café tratadas com extratos de plantas contra *Cercospora coffeicola*. Para determinação dos mecanismos envolvidos, selecionaram-se os extratos que proporcionaram maior proteção de cafeeiro contra *C. coffeicola* em experimento previamente realizado, ou seja, extratos aquosos de folhas de café com ferrugem, de ramos de lobeira com vassoura de bruxa e de cascas de café. Observou-se que os extratos proporcionaram aumentos na atividade de peroxidases aos vinte dias após a pulverização, a exceção do extrato de vassoura de lobeira, o qual apresentou maior atividade aos 15 dias, semelhante ao indutor de resistência padrão acibenzolar S- metil (ASM). Quanto ao teor de lignina, observou-se maior acúmulo para o extrato de folhas de café infectadas com ferrugem.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, controle alternativo, respostas de defesa

DETERMINATION OF PEROXIDASE ACTIVITY AND LIGNIN CONTENT IN COFFEE SEEDLINGS TREATED WITH PLANT EXTRACTS AGAINST *Cercospora coffeicola*.

Abstract:

This work was aimed at studying mechanisms involved in the defense of coffee seedlings treated with plant extracts against *C. coffeicola*. For determination of the involved mechanisms, the extracts that induced higher protection of coffee seedlings against *C. coffeicola* were selected, i.e., the extracts from husks of coffee berries, coffee leaves with rust and branches of 'lobeira' (*Solanum lycocarpum*). It was observed that these extracts provided increases in peroxidase activity twenty days after spraying, except the extract from branches of 'lobeira', which presented higher activity at 15 days, likely the resistance inducer acibenzolar S-methyl (ASM). Regarding the lignin content, higher accumulation was observed for the extract from coffee leaves with rust.

Key words: *Coffea arabica*, alternative control, defense responses

Introdução

O uso indiscriminado de fungicidas tem causado danos ao meio ambiente, aos seres vivos e tem favorecido a seleção de raças resistentes de patógenos a estas substâncias químicas. Um dos enfoques da agricultura atual é o controle alternativo de doenças, o qual inclui diversas formas de controle, entre elas a indução de resistência em plantas (Bettiol, 1991).

A resistência induzida se caracteriza pela ativação dos mecanismos latentes de defesa da planta (Hammerschmidt & Dann, 1997) e pode ser obtida pelo tratamento com agentes bióticos, como microrganismos viáveis ou inativados (Stangarlin & Pascholati, 1994) ou abióticos, como, por exemplo, ácido salicílico (Hammerschmidt & Dann, 1997) e seu análogo acibenzolar S metil (ASM) (Friedrich *et al.*, 1996). A resposta das plantas pode ser, por exemplo, o acúmulo de fitoalexinas, lignina, peroxidases e de proteínas relacionadas à patogênese (Pascholati, 1998). Segundo Smith (1996), eliciadores são moléculas de origem bióticas ou abióticas capazes de estimular qualquer resposta de defesa nas plantas. Os eliciadores bióticos compreendem moléculas como oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos, ácidos graxos e podem estar presentes nas mais diversas formas de vida, como fungos, bactérias e extratos de plantas infectadas por patógenos ou não.

A eficiência de extratos vegetais no controle de fitopatógenos *in vitro* e *in vivo* tem sido observada em diversos trabalhos (Yin & Tsao, 1999; Amadioha, 2000; Gonzaga *et al.*, 2003; Karaman *et al.*, 2003; Okemo *et al.*, 2003). O extrato bruto aquoso (VLA) de vassoura de lobeira (*Solanum lycocarpum*), causada por *Crinipellis pernicioso*, aplicado em plantas de tomate e cacau promoveram a proteção dessas plantas contra os patógenos *Xantomonas vesicatoria* e *Verticillium dahliae*, respectivamente. Este extrato também induziu o acúmulo de várias substâncias, relacionadas à defesa da planta como as peroxidases (Cavalcanti *et al.*, 2004; Ribeiro Júnior *et al.*, 2004).

Este trabalho teve como objetivo determinar a atividade de peroxidases e o teor de lignina em mudas de cafeeiro, quando pulverizado com extratos produzidos a partir de matérias primas abundantes em Minas Gerais, tais como casca de frutos café, folhas de café infectadas e caídas ao solo (resíduos da cafeicultura), e ramos de lobeira infectados com *C. pernicioso*.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Departamento de Fitopatologia da UFLA, Lavras, MG. Utilizaram-se mudas da cultivar Acaiaí Cerrado.

Obtenção dos extratos vegetais

Folhas de café cv. Mundo Novo, naturalmente infectadas por *H. vastatrix* e caídas no solo, cascas de frutos de café coletadas após o beneficiamento dos grãos, folhas verdes de eucalipto (*Corymbia citriodora*) e ramos de lobeira (*Solanum lycocarpum*) com sintomas de vassoura-de-bruxa foram processados no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo do Departamento de Fitopatologia da UFLA. Para a obtenção dos extratos, 100 g do tecido vegetal moído foram ressuspensos em 1000 mL de água destilada e conduzidos à extração a quente (100 °C), em refluxo, seguida de filtração a vácuo. Para o extrato de folhas de café naturalmente infectadas por *H. vastatrix*, empregou-se também refluxo a 50 °C.

Experimento

O experimento, montado em DBC com três blocos e unidade experimental de oito plantas, foi realizado visando fornecer material foliar utilizado para se avaliar fatores bioquímicos envolvidos na defesa do cafeeiro. Avaliou-se a atividade de peroxidases e o teor de lignina para os melhores extratos obtidos no experimento em casa de vegetação.

Determinação da atividade de peroxidases

Para determinação da atividade de peroxidases, 0,2 g de tecido foliar foi macerado em nitrogênio líquido e extraído em tampão acetato. A determinação da atividade de peroxidases foi utilizada a metodologia descrita por Urbanek, Kuzniak-Gebarowska e Herka (1991). Como doador de elétrons foi utilizado o guaiacol e como receptor, o peróxido de hidrogênio. A reação, catalisada pela peroxidase, produziu o composto colorido 3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenolquinona. Uma alíquota de 0,025mL do extrato bruto foi adicionada a 0,5mL de guaiacol 0,02M e a 0,5mL de peróxido de hidrogênio 0,06M, em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,8, contendo 0,1 mM de EDTA, até o volume final de 2mL. A mistura foi incubada a 30 °C, por 10 minutos, e em seguida teve sua absorbância medida a 480nm. A variação de 1,0 unidade de absorbância por minuto foi assumida como sendo 1,0 unidade de atividade peroxidásica (1UA).

Determinação de lignina

O conteúdo de lignina foi determinado pelo ensaio com ácido tioglicólico (TGA) (Monties, 1989), em que 0,2 g de tecido foliar foram incubados quatro vezes sucessivamente com metanol por 48 horas; em seguida os tecidos foram secos por 48 horas a 60°C e homogeneizados em almofariz. Uma mistura de ácido tioglicólico e ácido clorídrico 2N (1: 10) foi adicionada à amostra de tecidos homogeneizados (5mL da mistura para 15 mg de tecidos) por 4 horas, a 100°C. Uma lavagem com água foi realizada em seguida e o ácido lignotiolglicólico foi extraído a partir do precipitado com 5 mL de hidróxido de sódio (NaOH 0,5N) por 18 horas. As amostras foram então centrifugadas a 8.000 g por 15 minutos, acidificadas com HCl concentrado e incubadas a 4°C por 4 horas. Em seguida uma nova centrifugação foi realizada e o precipitado, ressuspensão em NaOH 0,5N, e a absorbância dos derivados de TGA foi determinada a 280_{nm}.

Resultados e Discussão

Determinação da atividade de peroxidases

A atividade de peroxidases da testemunha absoluta foi menor que a atividade em todos os outros tratamentos (Figuras 1 – A, B, C e D). A atividade de peroxidases em plantas tratadas com ASM foi maior na terceira coleta, aos 15 dias (Figura 1 A). Em plantas de tomate tratadas com ASM, sem inoculação ou inoculadas, o pico de produção dessa enzima ocorreu aos nove dias (Ribeiro Júnior et al., 2004). No patossistema tomate X *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* o pico de produção de peroxidases foi aos 14 dias (Soylu et al., 2003).

Plantas tratadas com EFID sem inoculação tiveram pico de produção de peroxidases no 15º dia após a aplicação do extrato. Quando o mesmo extrato foi aplicado em mudas de cafeeiro e posteriormente estas foram inoculadas, a maior produção dessa enzima ocorreu na última coleta, aos 20 dias (Figura 1 B). O resultado foi semelhante a aquele encontrado para plantas tratadas com ASM e inoculadas com *C. coffeicola*. A atividade de peroxidases em plantas de café tratadas com extrato de casca de café foi maior em plantas onde não se realizou a inoculação do patógeno, do que em plantas tratadas com este extrato e inoculadas com o patógeno. A maior atividade dessa enzima também ocorreu aos 20 dias, na última coleta do experimento, semelhante ao que ocorreu com plantas tratadas com ASM (Figura 1 D). Mazzafera et al. (1989) também encontraram que em cultivares de Catuaí e Mundo Novo infectados com *Meloidogyne incognita* a atividade de peroxidase foi maior que em tecidos não infectados. Pereira (2006) observou pico de atividade dessa enzima em plantas tratadas com extrato de casca de café (150 g.L⁻¹) aos 11 dias, com ou sem a inoculação de *C. coffeicola*.

Plantas de café tratadas com VLA tiveram pico de produção de peroxidases aos 15 dias. No caso deste extrato, tanto as plantas sem inoculação como as inoculadas tiveram uma maior atividade dessa enzima na mesma época (Figura 1

C). Isso também foi observado no patossistema tomate X *X. vesicatoria*, sendo que o pico de produção dessa enzima ocorreu aos nove dias (Ribeiro Júnior et al., 2004).

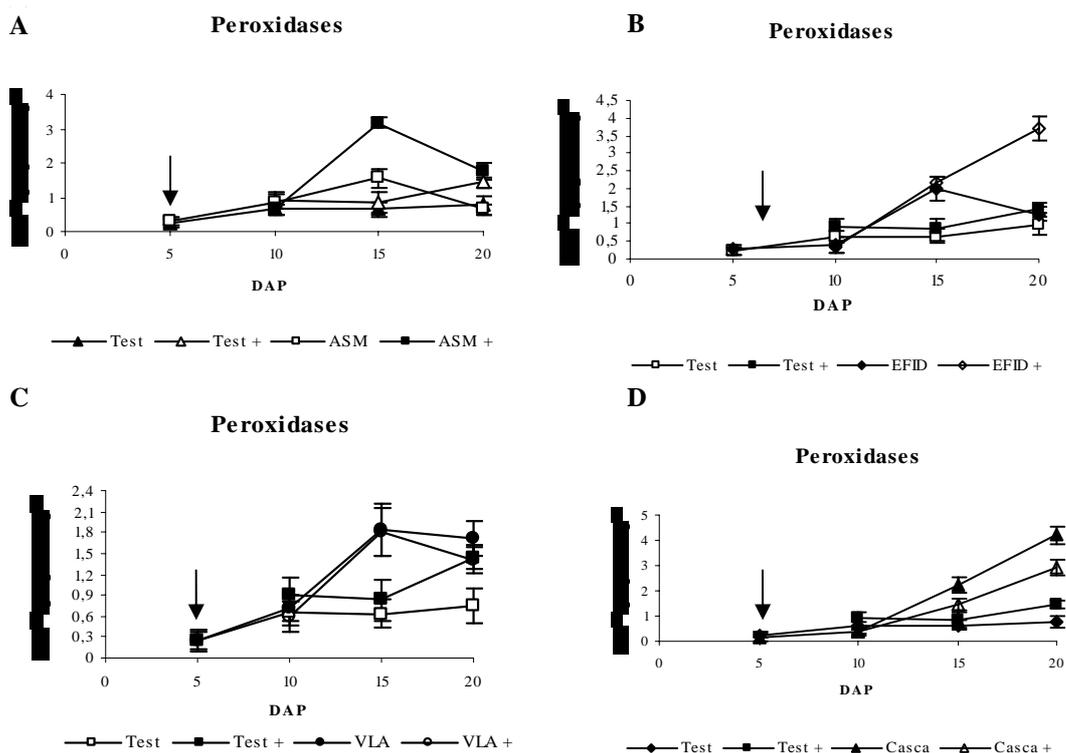


Figura 1 Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD)(A) e número de lesões (AACPNL)(B). *Tratamentos com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott a 5%. ASM – acibenzolar S-metil; EFID 50 – extrato de folha de café infectadas com ferrugem com tratamento térmico à 50°C; EFID 100 - extrato de folha de café infectadas com ferrugem com tratamento térmico à 100°C; VLA – extrato bruto aquoso de lobeira (*Solanum lycocarpum*) infectado com *C. perniciosa*. Barras representam a média \pm desvio padrão.

Determinação de lignina

Os teores de lignina da testemunha absoluta, da testemunha inoculada e do tratamento com casca de café foram menores que nos demais tratamentos e não apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 2). O tratamento com extrato de folhas de café (EFID) sem inoculação induziu maior acúmulo de lignina, diferindo-se estatisticamente de todos os outros tratamentos.

O tratamento de plantas de café com ASM, VLA seguido por inoculação e casca de café também seguido por inoculação induziram menor acúmulo de lignina que o tratamento com EFID e maior acúmulo que os tratamentos ASM + inoculação, EFID + inoculação e VLA.

Alves *et al.* (2006) não observou diferenças entre os teores de lignina em cafeeiros inoculados e não inoculados, tratados com ASM ou extrato de casca de café.

Plantas de tomate tratadas com VLA apresentaram tecido mais lignificado, com ou sem inoculação com *X. vesicatoria* (Ribeiro Júnior *et al.* 2004). No patossistema cacau X *Verticillium dahliae*, também se observou aumento no acúmulo de lignina (Cavalcanti *et al.*, 2004).

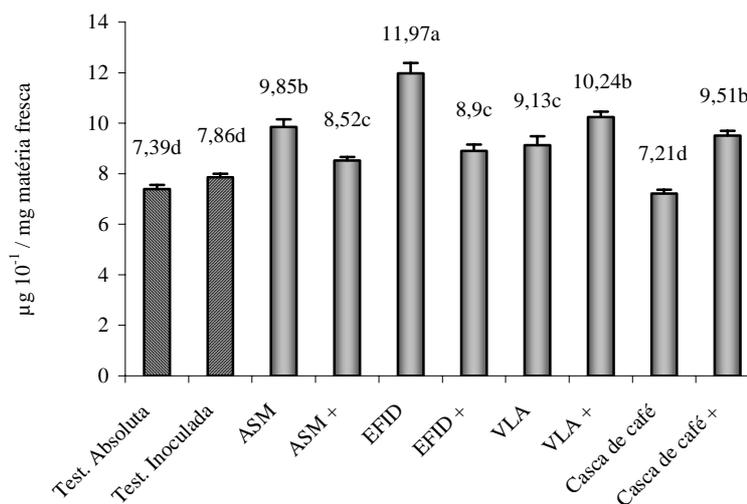


Figura 2 Determinação de lignina 20 dias após a pulverização dos tratamentos. Test – testemunha; Test+ - testemunha inoculada; ASM - acibenzolar S metil; ASM+ - acibenzolar S metil + inoculação; EFID - extrato de folhas de café infectadas com ferrugem; EFID+ - extrato de folhas de café infectadas com ferrugem + inoculação; Casca de café - extrato de casca de frutos de café; Casca de café+ - extrato de casca de frutos de café + inoculação; VLA - extrato bruto aquoso (VLA) de vassoura de lobeira (*Solanum lycocarpum*); VLA+ - extrato bruto aquoso (VLA) de vassoura de lobeira + inoculação. Tratamentos com as mesmas letras não diferem pelo teste de Scott & Knott a 5%. Barras representam a média \pm desvio padrão.

Conclusões

Os extratos vegetais exercem efeito sobre a atividade de peroxidases e o teor de lignina, proporcionando aumento de ambos.

Referências Bibliográficas

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

AMADIOHA, A. C. Controlling rice blast in vitro and in vivo with extracts of *Azadirachta indica*. **Crop Protection** 19: 287-290. 2000.

BETTIOL, W. (Ed.). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPDA. 1991.

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

FRIEDRICH, L., LAWTON, K., RUESS, W., MASNER, P., SPECKER, N. RELLA, M. G., MEIER, B., DINCHER, S., GHINI, R. & KIMATI, H. **Resistência de Fungos a Fungicidas**. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2000.

GONZAGA, F.; LEONETTI, D. B.; DRINGRA, O. D. & STADNIK, M. J. Efeito de extratos naturais de plantas no controle de oídio do feijoeiro e de bactérias fitopatogênicas. **Fitopatologia Brasileira** 28: 363. 2003. Suplemento.

HAMMERSCHMIDT, H. & DANN, E.K. **Induced resistance to disease**. In: Rechcigl, N.A. & Rechcigl, J.E. (Eds.). *Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control*. Boca Raton: CRC – Lewis Publishers, 1997. Cap.8:177-199.

KARAMAN, I.; SAHIN, F.; GULLUCE, M.; OGUTÇU, H.; SENGUL, M. & ADIGUZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology** 85: 231-235. 2003.

- MAZZAFERA, P.; GONÇALVES, W.; FERNANDES, J.A.R. Fenóis, peroxidases e polifenoxidase na resistência do cafeeiro a *Meloidogyne incognita*. **Bragantia** 48: 131-142. 1989.
- MONTIES, B. Lignins. In: Dey, P.M. and Harborne, J.B. (Eds.) **Methods in Plant Biochemistry**, v. 1. Academic Press, New York, pp. 113-158. 1989.
- OKEMO, P. O.; BARS, H. P.; VIVANCO, J. M. In vitro activities of *Maesa lanceolata* extracts against fungal plant pathogens. **Fitoterapia** 74: 312-316. 2003.
- PASCHOLATI, S.F. 1998. Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos. Tese de Livre Docência). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".
- PEREIRA, R. B. Extrato de casca de café e óleo de tomilho no controle de *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke em cafeeiro. 2006. 79 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- RIBEIRO-JÚNIOR, P. M.; PEREIRA, R. B.; CAVALCANTI, F. R.; ZACCARONI, A. B.; RESENDE, M. L. V. Lignificação induzida por extratos naturais e produtos comerciais em tomateiro infectado por *Xantomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 261, ago. 2004. Suplemento.
- SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist** 132:1-45. 1996.
- SOYLU, S.; BAYSAL, O.; SOYLU, E. M. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-Smethyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. **Plant Science** 165, pp. 1069-1075. 2003.
- STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (rubisco), clorofilase, β -1,3-glucanase e quitinase e conteúdo de clorofila em cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) infectados com *Uromyces appendiculatus*. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 34-42, jan./mar. 2000.
- URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologia Plantarum**, Varsóvia, v. 13, n1, p. 43 – 50, 1991.
- YIN, Mei-chin & TSAO, Shih-ming. Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species. **Internacional Journal of Food Microbiology** 49: 49-56. 1999.