



DARIO AMADEU DE MUNIZ OLIVEIRA

**PROTEÇÃO DO CAFEIEIRO CONTRA A MANCHA
AUREOLADA E ANÁLISES DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO
METABOLISMO FENÓLICO E LIGNINA**

LAVRAS-MG

2017

DARIO AMADEU DE MUNIZ OLIVEIRA

**PROTEÇÃO DO CAFEIRO CONTRA A MANCHA
AUREOLADA E ANÁLISES DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO
METABOLISMO FENÓLICO E LIGNINA**

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

Orientador

Ph.D. Mário Lúcio Vilela de Resende

LAVRAS-MG

2017

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

Oliveira, Dario Amadeu de Muniz.

Proteção do cafeeiro contra a mancha aureolada e análises de enzimas envolvidas no metabolismo fenólico e lignina : Controle da mancha aureolada do cafeeiro e análises enzimáticas / Dario Amadeu de Muniz Oliveira. - 2017.

38 p. : il.

Orientador(a): Mário Lúcio Vilela de Resende.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. *Pseudomonas syringae* pv *garcae*. 2. *Coffea arabica* L. 3. Controle alternativo. I. Resende, Mário Lúcio Vilela de. . II. Título.

DARIO AMADEU DE MUNIZ OLIVEIRA

**PROTEÇÃO DO CAFEIEIRO CONTRA A MANCHA
AUREOLADA E ANÁLISES DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO
METABOLISMO FENÓLICO E LIGNINA**

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

Aprovada em 28 de abril de 2017

Dr. Ricardo Magela de Souza

UFLA

Dr. Cesar Elias Botelho

EPAMIG

Orientador

Ph.D. Mário Lúcio Vilela de Resende

LAVRAS-MG

2017

*A meu pai, Sr. Lalau (Vigilato Jacinto de Oliveira), que hoje, no paraíso que sei que estás, a
deslumbrar por essa vitória em minha vida...*

Por tudo que me concedeu

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela saúde, paz, por todas as oportunidades, pelas graças concedidas e força para superar os desafios.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade concedida para realização do curso de mestrado.

Ao professor e orientador Mário Lúcio, pelos ensinamentos, amizade e confiança.

A todos os professores e funcionários do DFP, por todo conhecimento compartilhado e por todas as oportunidades concedidas.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, Moisés, Bruno, Manoel, Gustavo, Alexandre, Márcio, Marluce, Deila, José Diogo, Tharyn, Stefanny, Vitor, Lucas, Camila, Eliane, Joyce e, em especial, à pós-doutoranda Ana Cristina pela paciência e disposição para ensinar.

Aos membros de minha banca de defesa, o professor Dr. Ricardo Magela e o pesquisador Dr. César Botelho.

À querida Lisleny Maia, pelo amor, companheirismo e carinho.

À minha mãe, Belmira; ao meu irmão, Vibel e sua esposa Cinara; à minha irmã, Vanisa e seu marido Dinair; a minha filha Laís Caroline; e aos demais familiares, pela confiança e dedicação.

A todos que, de certa forma, contribuíram para que mais esta etapa de minha vida fosse cumprida, obrigado!

RESUMO

A mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, vem se destacando como uma das principais doenças emergentes do cafeeiro, ocasionando perdas expressivas tanto no campo, quanto em viveiros. O controle dessa doença é dificultado devido à ineficiência de produtos fitossanitários disponíveis no mercado. Em busca de desenvolver alternativas efetivas e sustentáveis no manejo da mancha aureolada do cafeeiro, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar formulações no controle desta doença em condições de campo, avaliar seu efeito no aumento da atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL) e peroxidase (POX), e no acúmulo de lignina em mudas de cafeeiro. O experimento foi conduzido nas safras 2014/15 e 2015/16, na Fazenda São José, no município de Três Pontas – MG, onde já estava implantada a lavoura com a variedade Icatu. Os tratamentos aplicados foram: Reforce[®] Mn (fosfito de manganês), Reforce[®] Cu (fosfito de cobre), Kasumin[®] (casugamicina), Greenforce CuCa (produto a base de subprodutos da lavoura e indústria cafeeira mais cálcio e cobre), Big Red[®](óxido cuproso), Yantra[®](fosfito de cobre), Fulland[®](fosfito de cobre), Fortaleza[®](fosfito de cobre mais subprodutos da lavoura de citrus), Bion[®](ASM) e a testemunha sem aplicação. Nas duas safras, foram realizadas avaliações da severidade da mancha aureolada e, também foi avaliado a produtividade. Os tratamentos que se destacaram no controle da doença em condições de campo foram selecionados e realizou-se a aplicação destes em mudas de cafeeiro. Foram realizadas coletas a 0, 1, 2, 3 e 7 dias após aplicação dos tratamentos. Na avaliação da severidade, nas duas safras avaliadas, observou-se que os tratamentos Big Red[®], Fulland[®], Greenforce CuCa, Yantra[®] e Reforce[®] Cu proporcionaram maior controle da doença diferindo estatisticamente dos demais tratamentos e não diferiram entre si. Estes tratamentos apresentaram controle que variou de 32,6% a 40,8% na safra 2014/15, e de 43,4% a 50,3%, na safra 2015/16. Os tratamentos Reforce[®] Mn, Kasumin[®], Fortaleza[®] e Bion[®], proporcionaram controle que variou de 22,9% a 30,1% na safra 2014/15, e de 33,7% a 40,1% na safra 2015/16, ainda assim significativo em relação à testemunha. Na análise de produtividade, os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si nas duas safras. Nas análises bioquímicas o produto Greenforce CuCa aumentou a atividade da enzima PAL um dia após aplicação, os produtos Big Red[®], Fulland[®], Greenforce CuCa, Yantra[®] e Reforce[®] Cu elevaram a atividade enzimática da POX e Big Red[®], Greenforce CuCa e Yantra[®] aumentaram também a concentração de lignina nas folhas.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L.; *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* ; Controle alternativo; Lignina.

ABSTRACT

The bacterial halo blight, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, has been excelling as a major emerging diseases of the coffee tree, causing significant losses both in the field and in nurseries. The control of this disease is hampered due to the inefficiency of pesticides used. Seeking to develop effective and sustainable alternatives in the handling of the the bacterial halo blight of coffee plant, the present study was conducted to assess the control of this disease formulations in field conditions. The objective also select the best treatments and assess your effect on the increased activity of the enzyme phenylalanine amôniaiase and peroxidase, and accumulation of lignin in coffee seedlings. The experiment was conducted in 2014/15 and 2015/16, yields at the farm São José, in the municipality of Três Pontas-MG, where was already deployed the crop with the variety Icatú. The treatments were applied: Reforce[®] Mn, Reforce[®] Cu, Kasumin[®], Greenforce CuCa, Big Red[®], Yantra[®], Fulland[®], Bion[®], and the control without application. In two seasons, were carried out assessments of the severity of the disease and was also rated and productivity. Outstanding treatments to control the disease in field conditions were selected and the application of these in coffee seedlings. The collections were held 0, 1, 2, 3 and 7 days after application of the treatments. In assessing the severity in the two crops evaluated, it was observed that the Big Red[®], Fulland[®], Greenforce CuCa, Yantra[®] and Reforce[®] Cu treatments provided greater control of the disease and the remaining statistically differing treatments and did not differ among themselves. These treatments showed average 39% control, 2014/15, and harvest of 47%, 2015/16 harvest. Already the treatments Reforce[®] Mn, Kasumin[®], and Bion[®], provided control around 25%, 2014/15 harvest, and 36% in 2015/16 crop, still significant in relation to the control. In the analysis of productivity, the treatments did not differ statistically between those two crops. Biochemical analyses the product Greenforce CuCa increased the enzyme activity PAL one day after application, Big Red[®], Fulland[®], Greenforce CuCa, Yantra[®], and Reforce[®] Cu products increased enzyme activity of POX, Big Red[®], Greenforce CuCa, and Yantra[®] treatments also increased the concentration of lignin in leaves.

Keywords: *Coffea arabica* L.; *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*; Alternative control; Lignin.

SUMARIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 8 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 9 |
| 2.1 Importância da cultura..... | 9 |
| 2.2 Mancha aureolada..... | 11 |
| 2.2.1 Agente etiológico da doença..... | 11 |
| 2.2.2 Colonização e sintomatologia..... | 12 |
| 2.2.3 Epidemiologia..... | 12 |
| 2.2.4 Controle..... | 13 |
| 2.3 Indução de resistência em plantas..... | 14 |
| 2.4 Mecanismos de defesa das plantas..... | 15 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 16 |
| 3.1 Eficiência de diferentes formulações químicas no controle da mancha aureolada do cafeeiro em campo..... | 16 |
| 3.2 Análises de enzimas envolvidas no metabolismo fenólico e lignina..... | 19 |
| 3.3 Análise de dados..... | 21 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 22 |
| 4.1 Eficiência de diferentes formulações químicas no controle da mancha aureolada do cafeeiro em campo..... | 22 |
| 4.2 Produtos alternativos na produtividade do cafeeiro em condições do campo..... | 26 |
| 4.3 Atividade das enzimas pal e pox e quantificação de lignina..... | 29 |
| 4.3.1 Quantificação de lignina..... | 31 |
| 5 CONCLUSÕES | 33 |
| 6 REFERÊNCIAS | 34 |

1 INTRODUÇÃO

A importância da cultura do cafeeiro para a economia brasileira é indiscutível, uma vez que o café é a principal “commodity” agrícola do mundo, ficando atrás apenas do petróleo, em exportações mundiais. A estimativa para a produção da safra cafeeira (espécies arábica e conilon) em 2017 indica que o país deverá colher entre 43,65 e 47,51 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado. O resultado representa redução de 15 a 7,5%, quando comparado com a produção de 51,37 milhões de sacas obtidas no ciclo anterior (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2017).

A produção pode ser severamente comprometida por pragas, nematoides e diferentes patógenos causadores de doenças, tais como bactérias e fungos, os quais podem também afetar a qualidade dos grãos e da bebida do café. Com relação às doenças bacterianas, quatro espécies de bactérias fitopatogênicas, incluindo dois patovares, estão descritas na cultura do cafeeiro: *Xylella fastidiosa*, causadora da atrofia dos ramos do café, *Burkholderia andropogonis*, agente causal da mancha escura bacteriana e duas espécies de *Pseudomonas*, que causam sintomas de manchas foliares: *P. syringae* patovares *garcae* e *tabaci*, e *P. cichorii*. A bactéria *P. syringae* pv. *garcae* é o agente causal da mancha aureolada, uma das principais doenças do cafeeiro.

A incidência da mancha aureolada ocorre principalmente em regiões montanhosas, de altitude elevada, onde fortes ventos atingem as plantas. Nessas regiões, o controle da mancha aureolada é dificultado devido ao pouco conhecimento sobre a dinâmica da doença, assim como pela ineficiência de produtos fitossanitários utilizados no controle dessa bacteriose em condições de campo (RODRIGUES et al., 2013).

A indução de resistência em plantas contra patógenos representa um método alternativo promissor no controle de doenças, por meio da ativação de mecanismos de defesa latentes na planta. A resistência induzida pode ser ativada por uma série de substâncias, evitando ou atrasando a entrada e/ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos, por meio de mecanismos de defesa próprios. Resende et al. (2004) e Cavalcanti et al. (2005) mencionam que a resistência induzida em plantas pode ocorrer por meio do tratamento com agentes bióticos (extratos vegetais, microrganismos ou parte desses) ou abióticos (substâncias químicas).

A utilização de fertilizantes foliares, como os fosfitos e fosfonatos, vem ganhando importância no controle de doenças de plantas, uma vez que podem, além de nutrir a planta,

atuar diretamente sobre o patógeno e também ativar a defesa natural das plantas contra uma série de patógenos (JACKSON et al., 2000; NOJOSA et al., 2009; DALIO et al., 2012). Outra opção que pode ser utilizada no manejo de doenças de plantas que vem despertando o interesse dos especialistas da área é o uso de formulações à base de extratos vegetais, possuidores de substâncias bioativas, capazes de atuar como indutores de resistência (TOYOTA, 2008).

Diante da necessidade de se intensificar a investigação e o desenvolvimento de alternativas efetivas e sustentáveis no manejo da mancha aureolada do cafeeiro, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar diferentes formulações no controle desta doença em condições de campo e, em seguida, selecionar os melhores tratamentos para elucidar seus efeitos na atividade das enzimas fenilalanina amônia-ase e peroxidase, e no acúmulo de lignina em mudas de cafeeiro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO CAFEEIRO

Conforme dados da Organização Internacional do Café (2017), existem cerca de 72 países produtores do grão no mundo. Essa multiplicidade de produtores deve-se à extensa faixa apta à produção do cafeeiro, graças à sua versatilidade. A região apta estende-se dos Trópicos de Câncer e de Capricórnio, ultrapassando ligeiramente os paralelos 24° em ambos os hemisférios. Essa variação das condições climáticas propicia a produção de blends de características peculiares, graças também a estilos diferenciados de tratamentos culturais. Os principais países produtores concentram-se na América do Sul (Brasil e Colômbia), América Central e Ásia (Vietnã).

O Brasil é o maior produtor mundial de café, e o segundo maior mercado consumidor. Quando se trata de café industrializado, o Brasil ainda está longe de alcançar a Itália e Alemanha, maiores exportadores do mundo. A Alemanha é também a maior compradora do café verde (em grãos) brasileiro. Este país importa o melhor café do mundo, agrega valor ao produto, torrando e moendo os grãos e vende para países da Europa, Ásia, África, América do Norte. A produção de café no Brasil é acometida por enfermidades que causam perdas significativas na sua produção, como a ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome), a

cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke), a mancha de phoma (*Phoma tarda* (Stewart) Boerema & Bollen), são as principais doenças fúngicas em cafezais brasileiros (ACUÑA et al., 1998; CARVALHO; CHALFOUN, 1998). As doenças bacterianas se distribuem em quatro espécies, dentre elas dois patovares, sendo: *Pseudomonas cichorii*, causadora do “crestamento bacteriano do cafeeiro”, detectada ocorrendo em viveiros e no campo no Estado de Minas Gerais (ROBBS et al., 1974) e em viveiro, no Estado de São Paulo (Almeida et al., 2012); *Burkholderia andropogonis* (sin. *P. andropogonis*), causadora da “mancha escura bacteriana” (RODRIGUES NETO et al., 1981), constatada em viveiro de mudas no Estado de Santa Catarina, *P. syringae* pv. *garcae* o agente etiológico da mancha aureolada, uma das principais doenças bacterianas do cafeeiro (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956), e sobre as quais poucas pesquisas foram realizadas (RODRIGUES et al., 2013), e *P. syringae* pv. *tabaci*, causadora da “mancha bacteriana”, detectada em viveiro, no Estado de São Paulo (RODRIGUES NETO et al., 2006; DESTÉFANO et al., 2010).

2.2 A MANCHA AUREOLADA

A mancha aureolada do cafeeiro, cujo agente causal é a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956), foi detectada pela primeira vez no Brasil em 1955, em folhas, ramos e frutos de cafezal localizado no município de Garça, no Estado de São Paulo (AMARAL et al., 1956). Nos anos de 1973 e 1975, foi observado um grande crescimento da doença em viveiro de mudas do Instituto Agrônomo, em Campinas (SP), e em lavouras do Estado do Paraná, em cafezais que se recuperavam da ocorrência de geadas (KIMURA et al., 1973; MOHAN, 1976). Porém, após sua descoberta, a doença ficou sem importância econômica por 17 anos, ocorrendo apenas em casos isolados.

Nos últimos anos, a mancha aureolada tornou-se um fator limitante para a cafeicultura em altitudes elevadas, com lavouras de clima mais frio e expostas ao vento, principalmente nas regiões produtoras dos Estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais, especialmente no Sul, Triângulo Mineiro, Alto do Parnaíba e Cerrado (SERA et al., 2002; SERA et al., 2004; PATRÍCIO et al., 2010; ZOCCOLI et al., 2011).

2.2.1 O AGENTE ETIOLÓGICO DA DOENÇA

O agente etiológico da mancha aureolada é uma bactéria Gram negativa, com células em forma de bastonetes retos ou levemente curvados, com medidas que variam de 0,5-1,0 x 1,5-4,0 µm, móveis por meio de um a sete flagelos polares. É pertencente ao filo Proteobacteria, classe Gamma Proteobacteria, ordem Pseudomonadales, família Pseudomonadaceae, gênero *Pseudomonas*, espécie *P. syringae*, patovar *garcae*. Os isolados produzem pouca quantidade de pigmento fluorescente em meio de cultura King B (KB) (KING et al., 1954) e, em meios de cultura, como Batata Dextrose Agar (BDA) e Nutriente Agar (NA), produzem pigmento marrom, denominado melanina, como citado por Barta e Willis (2005). A bactéria enquadra-se no grupo I das bactérias fluorescentes [LOPAT + - - - + (L= produção de Levan, O= atividade de oxidase, P= proctopectinase em discos de batata, A= utilização de arginina dihidrolase, T= hipersensibilidade em folhas de fumo)] (LELLIOTT et al., 1966). Utiliza L-ascorbato, meso-inositol, manitol, D-sorbitol, triacetina e D-xylose, porém não utiliza L-histidina, DLhomoserina, DL-lactato, α-lecitina, linolenato, L-malato, D(-) tartarato ou L(+) tartarato (BRADBURY, 1986). De acordo com Bradbury (1986), as hospedeiras naturais são

plantas de diversas espécies do gênero *Coffea*. São hospedeiras por inoculação artificial: *Citrus* sp., *Ligustrum lucidum*, *Solanum lycopersicum*, *Olea europea*, *Phaseolus vulgaris*, *Solanum paniculatum* var. *acutilobum*, *Solanum tuberosum* (BRADBURY, 1986) e *Avena sativa* (BARTA e WILLIS, 2005). Entretanto, não se tem registro de infecção natural nestas espécies de plantas.

2.2.2 COLONIZAÇÃO E SINTOMATOLOGIA

A penetração do patógeno nos tecidos da planta é feito na presença de lâmina de água, por ferimentos e/ou aberturas naturais. Esses ferimentos podem ser causados por insetos, atrito entre folhas e ramos da planta, maquinário agrícola e outras doenças (KIMATI et al., 2005).

Após a infecção, inicia-se à colonização dos espaços intra e intercelulares, pois os exsudados celulares são utilizados como fonte de nutrientes pela bactéria. Ao propagar-se nos tecidos, a bactéria migra das áreas colonizadas para áreas não colonizadas deixando para trás tecido necrosado, circundado por um halo amarelado, resultado da liberação de toxinas pela bactéria (KIMATI et al., 2005).

Os sintomas observados causados pela bactéria são caracterizados por manchas de coloração pardo-escura com centro necrótico, envolvida por um halo amarelado (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956). Tecidos mais tenros como folhas, ramos e frutos novos, são mais propícios a penetração do patógeno, pois folhas velhas apresentam maior resistência à infecção (OLIVEIRA, 1988; OLIVEIRA; ROMEIRO, 1990; 1991).

Outros sintomas decorrentes da infecção por *P. syringae* pv. *garcae*, como seca de ramos e desfolha, podem também gerar confusão no diagnóstico, uma vez que *P. tarda* ou ainda distúrbios nutricionais ou climáticos podem causar sintomas semelhantes e em condições de campo pode haver ocorrência simultânea com a bactéria.

2.2.3 EPIDEMIOLOGIA

A bactéria causadora da mancha aureolada se espalha pelo cafezal nos períodos chuvosos com temperaturas amenas. Sua disseminação é favorecida pela ocorrência de

chuvas, principalmente com a formação de granizo que, além do molhamento foliar, causam ferimentos que funcionam como portas de entrada para a bactéria. Do mesmo modo, as faces das plantas não expostas ao sol permanecem durante períodos mais longos com as folhas molhadas, favorecendo o processo de infecção. Lavouras localizadas em altitudes elevadas tendem a apresentar maior incidência da doença devido à ação dos ventos. Enquanto a incidência de mancha aureolada tende a diminuir nos cafezais em períodos com menor ocorrência de chuvas, devido à diminuição de condições favoráveis para a dispersão, penetração e desenvolvimento da bactéria (RODRIGUES et al., 2013).

O inóculo bacteriano presente nas lesões é disseminado a longas distâncias por mudas infectadas e em curtas distâncias de folha para folha ou para plantas vizinhas através da água, e/ou carregadas pelo vento (CARVALHO; CHALFOUN, 1998). O patógeno sobrevive principalmente na face abaxial das folhas do cafeeiro como epífita, ou seja, na superfície das folhas sem causar doença, bem como, em restos de cultura presentes no solo, até que o próximo período chuvoso proporcione condições ideais para que as células bacterianas sobreviventes se constituam inóculo primário para novas infecções (ROBBS 1977, 1978; ZOCOLLI et al., 2011).

2.2.4 CONTROLE

O controle da mancha aureolada deve-se iniciar preventivamente ainda na fase de viveiro, com a escolha do local protegido de ventos frios e no campo com a utilização de quebra ventos em regiões com alta incidência de ventos (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997).

A opção com melhor custo/benefício ao produtor é o controle genético com a utilização de variedades resistentes. Foi identificadas fontes de resistência a *P. syringae* pv. *garcae* em cultivares de café arábica. A cultivar IPR 102 apresentou resistência completa e as cultivares IPR 103, IPR 104, IPR 108 e IPR 59 apresentaram resistência parcial. A IPR 102 também mostrou ser parcialmente resistente à ferrugem do café, além de ter alta produtividade, boa qualidade de bebida e tamanho de copa médio (ITO et al., 2008). Entretanto, a maioria dos cafezais implantados é de cultivares suscetíveis à bactéria, sendo necessária a realização do controle químico.

O controle químico é necessário com o aparecimento dos primeiros sintomas da doença. Porém, poucos são os produtos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para o controle da mancha aureolada do cafeeiro, sendo três cúpricos, tendo como ingrediente ativo o hidróxido de cobre, e um antibiótico, a casugamicina (SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS, 2017). Diante disso, é necessária a busca por medidas alternativas para o controle dessa bacteriose.

2.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS

A indução de resistência em plantas contra patógenos representa um método alternativo promissor no controle de doenças, pois irá ativar mecanismos de defesa latentes na planta. Essa resistência pode ser induzida por uma série de substâncias, evitando ou atrasando a entrada e/ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos. Resende et al. (2004) e Cavalcanti et al. (2005) mencionam que a resistência induzida em plantas pode ocorrer por meio do tratamento com agentes bióticos (extratos vegetais, microrganismos ou parte desses) ou abióticos (substâncias químicas).

Os indutores de resistência atuam como moléculas sinalizadoras de respostas de defesa, que ao serem reconhecidas pelas células vegetais, induzem a expressão de genes que codificam a síntese de compostos de resistência, impedindo ou dificultando o estabelecimento e/ou o desenvolvimento do patógeno (MÉTRAUX, 2001).

Uma opção que pode ser utilizada no manejo de doenças de plantas que vem despertando o interesse dos especialistas da área é o uso de formulações à base de extratos vegetais, capazes de atuar como indutores de resistência (TOYOTA, 2008). Formulações a base de subprodutos da lavoura e cadeia produtiva do café e do citros vêm mostrando resultados na indução de resistência de plantas contra patógenos (AMARAL, 2005; RESENDE et al., 2004; MONTEIRO, 2014). No campo, esses produtos podem ser utilizados no intuito de reduzir o impacto da aplicação de produtos convencionais, sendo compatíveis com as técnicas utilizadas na agricultura orgânica por se tratarem de tecnologias mais limpas, a partir de matéria-prima reciclável.

Outros produtos que vêm se destacando na indução de resistência em plantas são as formulações de fosfitos. Esses produtos podem atuar diretamente sobre o patógeno e ativar a defesa natural das plantas contra uma série de patógenos (JACKSON et al., 2000; NOJOSA et

al., 2009; DALIO et al., 2012). Os fosfitos originaram-se do fungicida etil-fosfonato (fosetyl-Al), o qual, comprovadamente, induz a síntese de fitoalexinas em citrus (AFEK; STZEJNBERG, 1989). Ao reagir com uma base, o ácido fosforoso origina o fosfito. Na reação com hidróxido de potássio (KOH), por exemplo, tem-se a formação do sal fosfito de potássio. Mais recentemente, os fosfitos têm sido formulados como sais de manganês, cobre ou zinco e recomendados para o controle de oomicetos e de fungos causadores de podridões do colo, raiz, troncos e frutos (RESENDE et al., 2008). Esses produtos apresentam alta solubilidade e são rapidamente absorvidos pelas raízes e folhas (GUEST; GRANT, 1991; JACKSON et al., 2000).

A principal característica do íon fosfito é a sua grande mobilidade, permitindo maior translocação e penetração pelos tecidos das plantas. Apresentam ação sistêmica na planta via floema e xilema, sendo que sua absorção pela planta é via floema através da associação com fotoassimilados, os quais são absorvidos rapidamente pelas folhas (GUEST & GRANT, 1991; MALUSA & TOSI, 2005).

2.4 MECANISMOS DE DEFESA DAS PLANTAS

Para se defender de uma vasta e ofensiva gama de patógenos, as plantas possuem barreiras químicas e mecânicas constitutivas, bem como um sistema de defesa induzível (MONTESANO; BRADER; PALVA, 2003). Este aumento na capacidade da planta de se defender é denominado como indução de resistência. A resistência resultante é proporcionada por um agente indutor que ativa os mecanismos de defesa na planta, os quais se encontram na forma latente na mesma (HAMMERSCHMIDT; KUC, 1982). Após esta interação entre ativador e planta, ocorrem mudanças enzimáticas e uma cascata de sinalização na membrana plasmática vegetal é iniciada, culminando na indução de redes interligadas de enzimas sinalizadoras que objetivam resistência à infecção do patógeno na planta (HARRISON; BALDWIN, 2004). Respostas de defesa têm sido associadas aos produtos da rota dos fenilpropanoides, rota que leva à formação de compostos fenólicos e de lignina (RAES et al., 2003). Metabólitos secundários como os compostos fenólicos são produzidos rapidamente e se acumulam após a infecção, estando assim, envolvidos na defesa da planta contra o ataque de patógenos. São exemplos de compostos fenólicos o ácido clorogênico, o catecol e os flavonoides (CAMPOS et al., 2004). A lignina pode desempenhar um papel importante na

resistência por meio de diferentes mecanismos, como por exemplo, no estabelecimento de barreiras mecânicas ao avanço e ao crescimento do patógeno; na modificação da parede celular, tornando-a mais resistente ao ataque por enzimas hidrolíticas secretadas pelos patógenos e no aumento da resistência das paredes à difusão de toxinas produzidas por patógenos e impedindo que nutrientes do tecido hospedeiro sejam utilizados pelo invasor (LATUNDE-DADA; LUCAS, 2001).

A biossíntese de compostos fenólicos e lignina envolve uma série de enzimas, dentre elas a fenilalanina amônialiase (PAL), que catalisa a conversão da fenilalanina em ácido transcinâmico, resultando em fitoalexinas, compostos fenólicos e lignina, que podem conferir maior resistência à parede celular das plantas aos patógenos (NAKAZAWA; NOZUE; YASUDA, 2001). Outra importante classe de enzimas nessa rota são as peroxidases (POX), que catalisam a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio, originando lignina (VAN LOON; STRIEN, 1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EFICIÊNCIA DE DIFERENTES FORMULAÇÕES QUÍMICAS NO CONTROLE DA MANCHA AUREOLADA DO CAFEIEIRO EM CAMPO

O experimento foi conduzido nas safras 2014/2015 e 2015/2016, em uma área de produção cafeeira comercial com a variedade Icatu, com idade de 9 anos, no espaçamento 3,6 X 0,8m., na Fazenda São José, no município de Três Pontas (MG), nas coordenadas: 21°21'15.26"S / 45°28'31.98"W, com altitude média de 1001m. Durante o período de condução da área experimental a lavoura recebeu reposição mineral pertinente ao sistema PAM nutri, da empresa Agrichem do Brasil. O delineamento experimental foi de blocos casualizados (DBC), com dez tratamentos e quatro repetições. Foram utilizadas dez plantas por parcela, das quais as seis centrais foram consideradas úteis para as avaliações.

Os tratamentos utilizados nesse experimento, composição e empresa fabricante dos químicos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 Composição dos produtos químicos utilizados no controle da mancha aureolada do cafeeiro em experimento de campo.

| Produto | Composição | Empresa |
|-------------------------|---|---------------------------------------|
| Reforce [®] Mn | Fosfito de manganês (P ₂ O ₅ e Mn) | Agrichem do Brasil S.A. |
| Reforce [®] Cu | Fosfito de cobre (P ₂ O ₅ e Cu) | Agrichem do Brasil S.A. |
| Kasumin [®] | Casugamicina | Mitsui&Co S.A. |
| Greenforce CuCa | Formulação à base de subprodutos da indústria de café | Agrofitness Tecnologia Agrícola Ltda* |
| Big Red [®] | Óxido cuproso | Agrichem do Brasil S.A. |
| Fulland [®] | Fosfonato de potássio com cobre | Satis Agrícola Ltda. |
| Yantra [®] | Fosfito de potássio | Agrichem do Brasil S.A. |
| Fortaleza [®] | Fosfito de potássio (P ₂ O ₅ e K ₂ O) + Formulação à base de subproduto da indústria de citros | Agrichem do Brasil S.A. |
| Bion [®] | Acibenzolar-S-metil | Syngenta Proteção de cultivos Ltda. |

*Empresa incubada na Universidade Federal de Lavras

Nas duas safras foram realizadas quatro aplicações dos tratamentos, sendo que a primeira foi aplicada preventivamente em novembro e as demais em intervalos de 60 dias, conforme descrito na Tabela 2. Os produtos foram pulverizados nas plantas utilizando pulverizador costal motorizado de três bicos cone cheio, da marca Yamaho[®], com volume de calda de 400 L ha⁻¹.

Tabela 2 Tratamentos, doses e épocas de aplicação dos produtos.

| Tratamento | Dose | Época de aplicação* |
|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Testemunha | Sem aplicação | --- |
| Reforce [®] Mn | 1,2 L.ha ⁻¹ | Novembro/Janeiro/Março/Maio |
| Reforce [®] Cu | 1,2 L.ha ⁻¹ | Novembro/Janeiro/Março/Maio |
| Kasumin [®] | 1,2 L.ha ⁻¹ | Novembro/Janeiro/Março/Maio |
| Greenforce CuCa | 1,6 L.ha ⁻¹ | Novembro/Janeiro/Março/Maio |
| Big Red [®] | 1,2 L.ha ⁻¹ | Novembro/Janeiro/Março/Maio |
| Fulland [®] | 1,2 L.ha ⁻¹ | Novembro/Janeiro/Março/Maio |
| Yantra [®] | 1,2 L.ha ⁻¹ | Novembro/Janeiro/Março/Maio |
| Fortaleza [®] | 1,2 L.ha ⁻¹ | Novembro/Janeiro/Março/Maio |
| Bion [®] | 0,08 Kg.ha ⁻¹ | Novembro/Janeiro/Março/Maio |

*Safras 2014/15 e 2015/16

Nas safras 2014/2015 e 2015/2016 foram realizadas avaliações da severidade da mancha aureolada e produtividade. Foram feitas avaliações quinzenais a partir da primeira aplicação de produtos da severidade da doença. As avaliações foram realizadas em oito ramos plagiotrópicos por planta, sendo quatro ramos de cada lado da linha de plantio, no terço médio das plantas. Em cada ramo foi avaliado o primeiro par de folhas totalmente expandido, quantificando-se a severidade da mancha aureolada do cafeeiro de acordo com escala diagramática proposta por Belan et al. (2014). Os índices médios de severidade observados em cada safra foram transformados em área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), determinada pela equação proposta por Shaner e Finney (1977).

A colheita foi realizada por meio de derrigadora lateral costal, nos meses de julho de 2015 e agosto de 2016. A produção foi determinada a partir da massa dos frutos colhidos nas plantas. Posteriormente, procedeu-se à conversão para a produtividade (sacas de 60 kg de café beneficiado ha⁻¹), utilizando-se a seguinte fórmula: Produtividade = [(kg/planta x 0,2) x número de plantas/ha]/60 kg), em que se considera que 10 kg de café cereja equivalem a 2 kg de café beneficiado, ou seja, um rendimento em peso de 20% (CARVALHO et al., 2006).

3.2 ANÁLISES DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO FENÓLICO E LIGNINA

As análises bioquímicas foram conduzidas no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. Para a análise bioquímica, os tratamentos que se destacaram no controle da doença em condições de campo foram selecionados e realizou-se a aplicação destes em mudas de cafeeiro que estavam em casa-de-vegetação do referido laboratório.

Os tratamentos selecionados foram: Greenforce CuCa, Big Red[®], Yantra[®], Fulland[®] e testemunha, baseados nos tratamentos de campo. As mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo 376/4 com 4 pares de folha, foram pulverizadas com os produtos na metade da dose utilizada em campo, a fim de evitar fitotoxidez nas mesmas. A testemunha foi pulverizada com água. Amostras foliares foram coletadas ao zero, um, dois, três e sete dias após aplicação dos tratamentos para a realização da análise da atividade das enzimas PAL e POX e aos 7 dias após aplicação para a análise do acúmulo de lignina.. O material vegetal foi revestido individualmente com papel alumínio, rapidamente congelado em nitrogênio líquido e

armazenado em ultrafreezer a -80 °C. As amostras foram utilizadas na avaliação da atividade das enzimas fenilalanina amônia-ase e peroxidase e na quantificação de lignina.

O delineamento experimental foi de blocos casualizados (DBC), com cinco tratamentos, três repetições e parcela experimental composta por três plantas, por tempo de coleta.

Para a determinação da PAL, amostras de tecido foliar foram maceradas com N₂ líquido em almofariz, com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/p), até a obtenção de um pó fino. Para cada grama de pó macerado, adicionaram-se 3 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5, acrescido de 1 mM de PMSF e 1% de PVP. A solução foi centrifugada a 13.000 g, por 25 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi usado como fonte enzimática. A atividade da PAL foi determinada conforme metodologia descrita por Zucker (1965). Adicionaram-se 5 µL do extrato enzimático, ajustado para 200 µL de solução, contendo Tris-HCl 100mMpH 8,8 e L-fenilalanina 50 mM. Após incubação a 37°C, por 20 minutos, a absorbância foi medida a 280nm. O coeficiente de extinção molar de 5000mM⁻¹ cm⁻¹ foi usado para calcular a atividade da PAL.

Para a obtenção do extrato utilizado na determinação da atividade da enzima POX, o tecido foliar foi macerado conforme efetuado para a PAL. O pó obtido foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 100 mM Ph 7,8, EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. Os homogeneizados foram centrifugados a 13.000 g, por 25 minutos, a 4°C, e os sobrenadantes foram utilizados para a análise enzimática (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

A atividade da POX foi determinada pela oxidação do guaiacol, de acordo com a metodologia de Urbanek, Kuzniakgebarowska e Herka (1991). Adicionou-se 40 µL do extrato enzimático, ajustado para 200 µL de solução, contendo fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, guaiacol 7,5 mM e peróxido de hidrogênio 18,75 mM. Após incubação a 30°C, por 10 minutos, a absorbância foi medida a 480nm. O coeficiente de extinção molar de 1,235 mM⁻¹ cm⁻¹ foi usado para calcular a atividade da POX (CHANCE; MAEHLEY, 1955).

Para a análise de teores de lignina, os tecidos foliares coletados foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino, como na determinação das enzimas. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 48 horas. Uma alíquota de 30 mg do material liofilizado foi transferida para microtubo de 2 mL, homogeneizada com 1,5 mL de metanol 80% e mantida sob agitação por 15 horas, em agitador rotativo, protegido da luz, à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada, a 12.000 g, por 5 minutos. O sobrenadante (extrato metanólico) foi descartado e foi adicionado

ao resíduo sólido 1,5 mL de metanol 80%, homogeneizado e centrifugado, a 12.000 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco a 65°C por 15 horas. Foi acrescentado 1,5 mL de solução de ácido tioglicólico:HCl 2M (1:10). Em seguida, os microtubos foram agitados suavemente para hidratar o resíduo e colocados em banho-maria a 100°C por 4 horas. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 12.000 g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,5 mL de água ultrapura e novamente centrifugado a 12.000 g, por 10 minutos, a 4°C. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 1,5 mL de NaOH 0,5 M e mantido em agitador rotativo por 15 horas à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 12.000 g, por 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo, ao qual foram adicionados 200 µL de HCl concentrado. A suspensão obtida foi mantida em câmara fria a 4 °C, por 4 horas, para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 12.000 g, por 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em 2,0 mL de NaOH 0,5 M. Uma alíquota de 100 µL da suspensão foi transferida para microplacas, onde se completou o volume para 200 µL de NaOH 0,5 M. A absorbância desta solução foi determinada em espectrofotômetro de Elisa, a 280 nm e os valores calculados com base na curva de lignina e expressos em µg de lignina solúvel por miligrama de massa seca.

3.3 ANÁLISE DOS DADOS

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Sisvar versão 5.1 (FERREIRA, 2008). Quando significativas pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EFICIÊNCIA DE DIFERENTES FORMULAÇÕES QUÍMICAS NO CONTROLE DA MANCHA AUREOLADA DO CAFEIEIRO EM CAMPO

Na avaliação da severidade da mancha aureolada na safra 2014/15, observou-se que os tratamentos Big Red[®], Fulland[®], Reforce[®] Cu, Greenforce CuCa e Yantra[®], apresentaram melhores resultados, deferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Estes tratamentos apresentaram controle que variou de 32,6% a 40,8%. Já os tratamentos Reforce[®] Mn, Kasumin[®], Bion[®] e Fortaleza[®] proporcionaram controle intermediário que variou de 22,9% a 30,1%, ainda assim significativo em relação a testemunha (Figura 1).

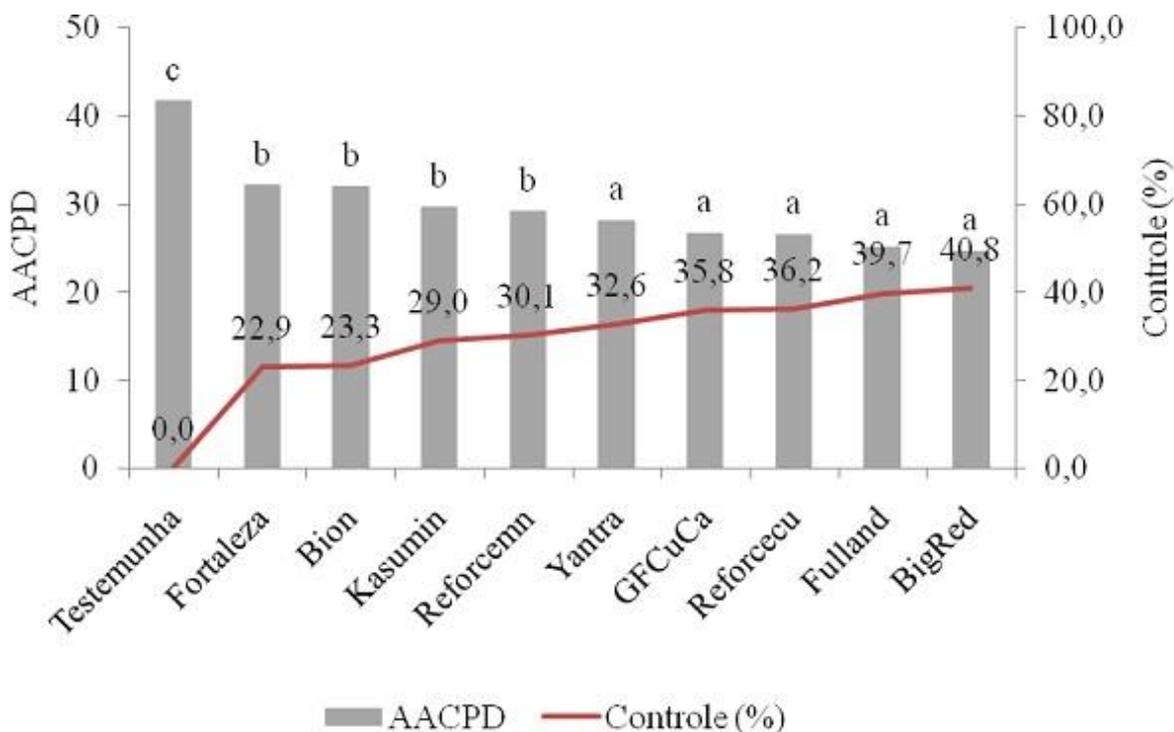


Figura 1 Área abaixo da curva de progresso da severidade da mancha aureolada do cafeeiro (AACPSD) e porcentagem de controle da doença na safra 2014/15, em condições de campo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% ($P \leq 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

Na avaliação da área abaixo da curva de progresso da severidade da mancha aureolada na safra 2015/16, observou-se comportamento semelhante dos tratamentos na safra anterior. Os tratamentos Big Red[®], Fulland[®], Greenforce CuCa, Yantra[®] e Reforce[®] Cu proporcionaram maior controle da doença, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos e não diferiram entre si. Estes tratamentos apresentaram um controle que variou de 43,4% a 50,3%. Já os tratamentos Reforce[®] Mn, Kasumin[®], Fortaleza[®] e Bion[®] proporcionaram um controle intermediário que variou de 33,7% a 40,1%, ainda assim significativo em relação a testemunha (Figura 2). Os produtos mais eficientes no primeiro ano, também foram os mais eficientes no segundo ano experimental.

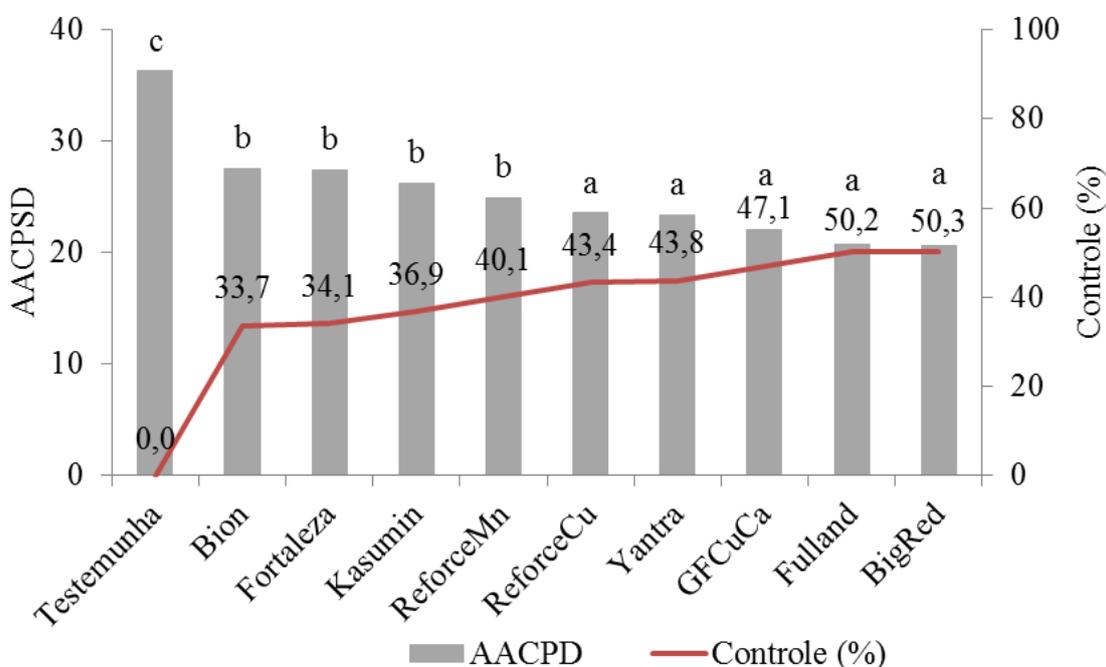


Figura 2 Área abaixo da curva de progresso da severidade da mancha aureolada do cafeeiro (AACPSD) e porcentagem de controle da doença na safra 2015/16, em condições de campo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% ($P \leq 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

A utilização de produtos alternativos, como os fosfitos Fulland[®], Yantra[®] e Reforce[®] Cu, Formulação à base de subprodutos da indústria de café (Greenforce CuCa) e óxido cuproso (Big Red[®]) no controle da mancha aureolada se mostra um método promissor para o controle de emergente da mancha aureolada do cafeeiro. Compostos cúpricos vêm sendo utilizados no controle de doenças bacterianas em razão de sua relativa eficácia, de baixo custo e baixo efeito tóxico em mamíferos, o que os torna econômica e ecologicamente adequados (CHA; COOKSEY, 1991). O uso de produtos a base de fosfitos têm proporcionado resultados expressivos no controle de doenças de plantas (NOJOSA; RESENDE; RIBEIRO JUNIOR 2008). A aplicação conferiu alto nível de proteção em crucíferas, de maneira dependente da dose utilizada. A proteção restringiu-se apenas aos tecidos tratados sem resposta sistêmica, embora os autores sugiram a atuação sinérgica dos modos de ação direto sobre o patógeno e indireto, com ativação das defesas dessas hortaliças (BECOT et al.; 2000).

O uso de fosfitos contra outras doenças do cafeeiro já vem sendo utilizado. Ribeiro Júnior (2008), realizando pulverizações de fosfitos de potássio, manganês e zinco em cafeeiros adultos por dois anos consecutivos, observou reduções de 30% e 25% em ano de alta produção, respectivamente para ferrugem e cercosporiose e reduções de 53% e 32% em ano de baixa, na severidade da ferrugem e cercosporiose, respectivamente. Em trabalho estudando aplicação de produtos contendo fosfitos em mudas de cafeeiro, observou-se controle eficaz de *Phoma costarricensis*, reduzindo a severidade da mancha de Phoma, sem diferir em relação aos fungicidas tebuconazole e fosetyl-Al (NOJOSA et al., 2009). Formulações a base de extrato da lavoura cafeeira também foi alvo de estudo para manejo de doenças fúngicas do cafeeiro. Santos et al. (2007) observaram em testes de campo, que o tratamento com formulações a base de extrato de folhas de café reduziu a área abaixo da curva de progresso da mancha-de-Phoma em 61%, comparada à testemunha.

O controle proporcionado pelos fosfitos ocorreu, provavelmente, pela indução de resistência proporcionada por esses produtos e por meio do efeito direto nos patógenos, conforme relatado na literatura (DALIO et al., 2012). Recentemente, Eshraghi et al. (2011) relataram que os fitormônios ácido salicílico e ácido jasmônico/etileno estão envolvidos nos mecanismos de defesa induzidos por fosfito na ausência de um patógeno, sugerindo que este indutor permite o recrutamento de moléculas que participam de diferentes rotas de resposta de defesa. Em cafeeiros, também foi observado que os fosfitos ativaram proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) e proporcionaram aumento nos teores de compostos fenólicos (RIBEIRO JÚNIOR, 2008; TOYOTA, 2008). As PRPs são proteínas de plantas que se acumulam rapidamente nos tecidos vegetais após o contato com patógenos ou em resposta ao tratamento com determinados compostos químicos ou a outros tipos de estresse (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998).

4.2 PRODUTOS ALTERNATIVOS NA PRODUTIVIDADE DO CAFEIEIRO EM CONDIÇÕES DO CAMPO

Na análise de produtividade da safra 2014/15, os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si, porém o tratamento Yantra[®] superou os demais tratamentos com uma produtividade de 51 sacas ha⁻¹. O tratamento Greenforce CuCa apresentou a segunda melhor produtividade de 48,9 sacas ha⁻¹ e os demais tratamentos seguem uma sequência decrescente de produtividade: Reforce[®] Mn, Reforce[®] Cu, Kasumin[®], Bion[®], Fortaleza[®], Big Red[®], Fulland[®] e testemunha (Figura 4).

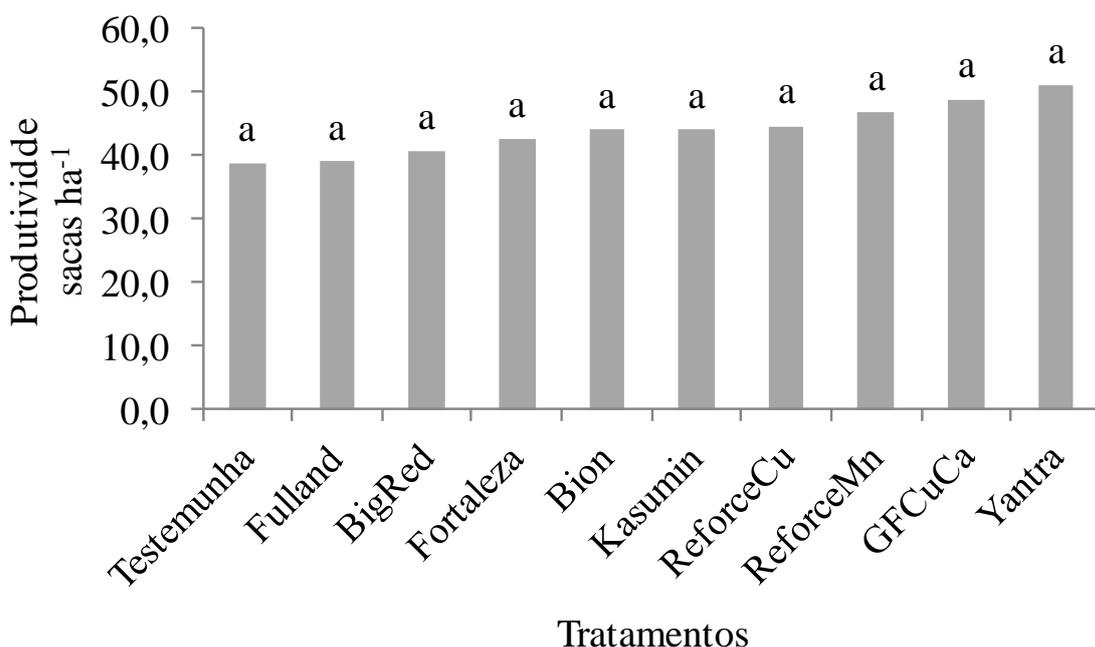


Figura 4 Produtividade (sacas de 60Kg/ha) do cafeeiro na safra 2014/15, em condições de campo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% ($P \leq 0,05$) pelo teste de Scott-Knott

A produtividade dos tratamentos também não diferiram estatisticamente entre si na safra 2015/16, porém o tratamento Greenforce CuCa superou os demais tratamentos com uma produtividade de 35 sacas ha^{-1} e o tratamento Big Red[®] apresentou a segunda melhor produtividade, com 33 sacas ha^{-1} . Os demais tratamentos seguem uma sequência decrescente de produtividade: Fortaleza[®], Yantra[®], Reforce[®] Mn, Fulland[®], Kasumin[®] e Testemunha, sendo que os tratamentos Bion[®] e Reforce[®] Cu apresentaram suas produtividades inferiores a da Testemunha.(Figura 5).

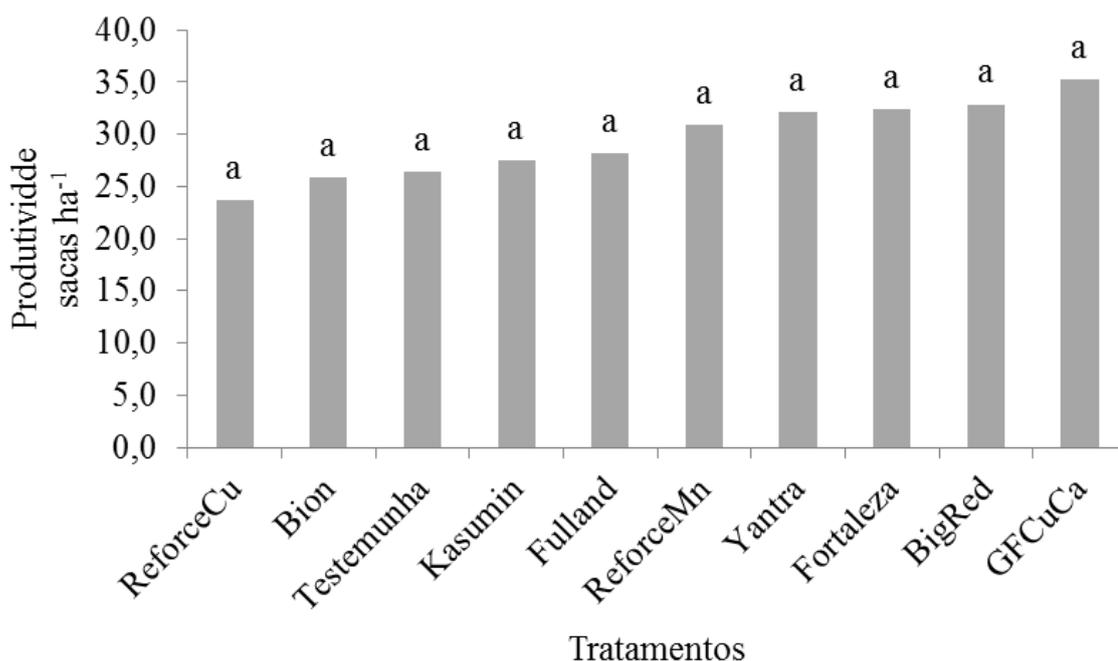


Figura 5 Produtividade (sacas de 60Kg/ha) do café na safra 2015/16, em condições de campo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% ($P \leq 0,05$) pelo teste de Scott-Knott

A diferença na produtividade entre as safras 2014/15 e 2015/16 pode ser explicada pela bienalidade negativa da lavoura *in loco* no ano 2016 e pelo fato de a safra 2015 ter apresentado uma produtividade superior em quase 15 sacas. No geral, a produtividade de arábica deve ser baixa no ano que é de bienalidade negativa na maior parte dos estados produtores o que, conseqüentemente, resulta numa produtividade média menor do que o ano anterior de bienalidade positiva (CONAB, 2017).

Vários fatores contribuem também para reduzir a produtividade da lavoura cafeeira e entre esses as doenças ocupam lugar de destaque. A ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome), a cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke), a mancha de phoma (*Phoma tarda* (Stewart) Boerema & Bollen,) são as principais doenças fúngicas em cafezais brasileiros (ACUÑA et al., 1998; CARVALHO; CHALFOUN, 1998), além daquelas de etiologia bacteriana e virótica, que contribuem expressivamente na queda a produtividade (POZZA et al., 2010).

4.3 ATIVIDADE DAS ENZIMAS PAL E POX E QUANTIFICAÇÃO DE LIGNINA

Para a atividade da PAL no primeiro dia após aplicação, plantas pulverizadas com Greenforce CuCa, apresentaram maior atividade desta enzima, diferindo de plantas pulverizadas com os demais produtos e com água. Nos demais dias de coleta, não foi observado diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (Figura 6).

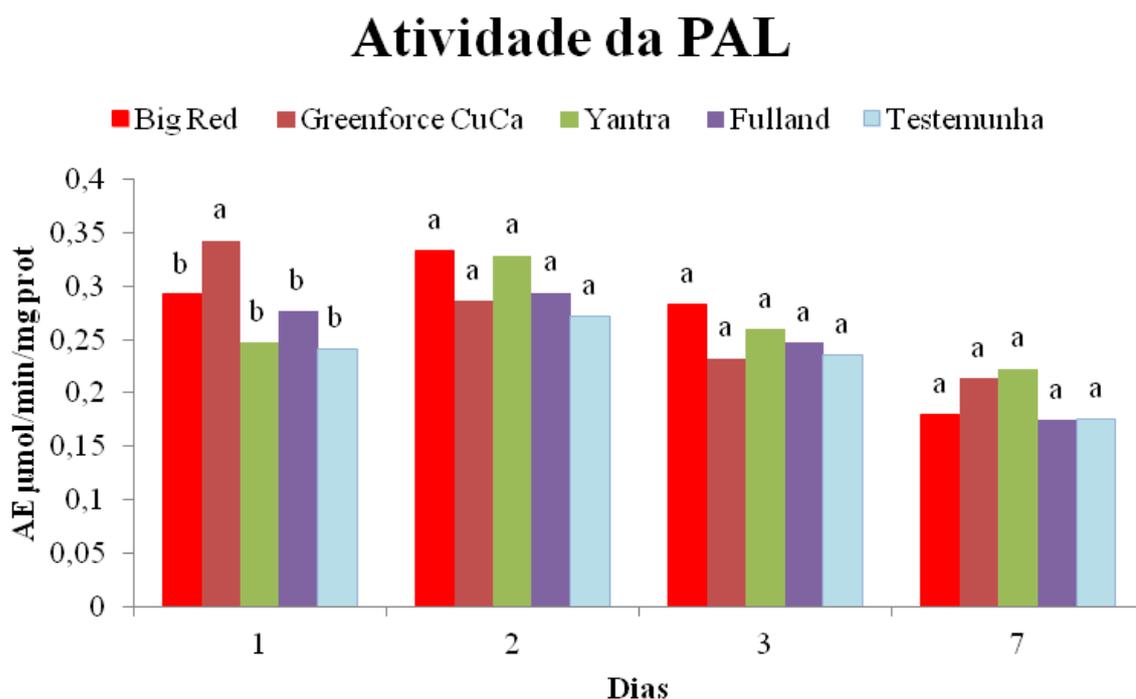


Figura 6 Atividade da enzima fenilalanina amônialiase (PAL) ao longo dos dias após aplicação dos produtos em mudas de cafeeiro. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% ($P \leq 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

Na análise da atividade da POX, observou-se que plantas pulverizadas com os tratamentos BigRed[®], Fulland[®], Yantra[®] e Greenforce CuCa apresentaram maior atividade enzimática diferindo estatisticamente de plantas pulverizadas com água no primeiro dia após aplicação. Os tratamentos Greenforce CuCa e Yantra[®] proporcionaram maior atividade da enzima, diferindo dos produtos BigRed[®] e Fulland[®], que diferiram da atividade da POX na testemunha no segundo dia após aplicação. No terceiro dia após aplicação os tratamentos Greenforce CuCa e BigRed[®] superaram os demais tratamentos, diferindo dos mesmo. No sétimo e último dia de avaliação, os tratamentos BigRed[®], Greenforce CuCa e Yantra[®] proporcionaram em mudas de cafeeiro maior atividade da enzima POX, diferindo dos demais tratamentos (Figuras 7).

Atividade da POX

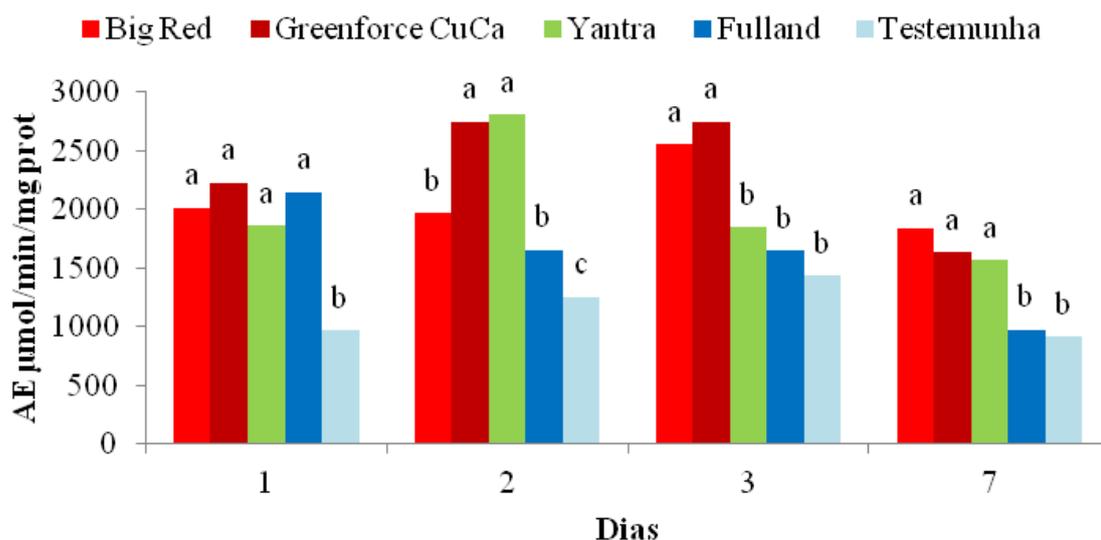


Figura 7 Atividade da enzima peroxidase (POX) ao longo dos dias após aplicação dos produtos em mudas de cafeeiro. . Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% ($P \leq 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

4.3.1 QUANTIFICAÇÃO DE LIGNINA

Na análise da lignina, observou-se que plantas pulverizadas com os tratamentos BigRed[®]; Greenforce CuCa e Yantra[®] apresentaram maiores teores de lignina, diferindo estatisticamente de plantas pulverizadas os tratamentos Fulland[®] e Testemunha (Tabela 3).

Tabela 3 Teores de lignina (μg lignina/mg massa seca) em mudas de cafeeiro coletadas sete dias após a aplicação dos tratamentos.

| Tratamentos | Lignina (μg lignina/mg massa seca) |
|----------------------|---|
| Greenforce CuCa | 25,7a |
| Big Red [®] | 20,4a |
| Yantra [®] | 22,6a |
| Fulland [®] | 14,9b |
| Testemunha | 11,7b |
| CV | 14,3 |

No presente trabalho, mudas de cafeeiro pulverizadas com Greenforce CuCa, Big Red[®], Fulland[®] e Yantra[®] apresentaram maior atividade da PAL e da POX. Este fato, provavelmente, possibilitou uma maior intensidade de defesa de mudas de cafeeiro contra a mancha aureolada. A fenilalanina amônia-liase é uma enzima chave no metabolismo dos fenilpropanoides, que resultará em compostos como fitoalexinas, compostos fenólicos e lignina, conferindo maior resistência à parede celular das plantas (RAES et al., 2003). Observou-se que com a aplicação do tratamento Greenforce CuCa, proporcionou um aumento significativo na atividade da enzima PAL, um dia após sua aplicação, podendo desencadear uma série de respostas de defesa na planta. Na literatura existem trabalhos que relatam o uso de formulações à base de extratos vegetais no controle de doenças em cafeeiro por meio da indução de resistência da planta (SANTOS et al., 2007).

Segundo COSTA (2016), em respostas bioquímicas de defesa do feijoeiro, as enzimas superóxido dismutase, POX, quitinase e β -1,3-glucanase tiveram aumento das atividades após a aplicação dos produtos fosfitos, assim como compostos fenólicos solúveis e lignina. Em casa de vegetação TOYOTA (2008) observou que fosfito de cobre proporcionou aumento na atividade da peroxidase, quitinase e no teor de fenóis solúveis totais.

Produtos como o Greenforce CuCa possuem eliciadores que, possivelmente, disparam respostas de defesa nas plantas. Além desses eliciadores, os nutrientes cobre e cálcio, também presentes nessa formulação, possibilitam uma melhor nutrição da planta e, possivelmente, o aumento de sua resistência contra patógenos (MONTEIRO, 2014). O cobre apresenta importância no sistema redox da planta, ativando várias enzimas que estão envolvidas na detoxificação de radicais superóxido e, também, no metabolismo de fenóis e lignina (MARSCHNER, 2012).

Houve incremento na lignificação das plantas tratadas com Greenforce CuCa, BigRed[®] e Yantra[®] no sétimo dia após a pulverização em relação aos tratamentos Fulland[®] e Testemunha. Este incremento está diretamente associado a alta atividade da enzima POX, neste mesmo intervalo de tempo após aplicação destes tratamentos.

As peroxidases são parte de um seletivo grupo de proteínas relacionadas à indução de mecanismos de defesa das plantas, as chamadas PR-proteínas e também estão envolvidas no metabolismo de compostos que atuam como barreira contra patógenos, como lignina e suberina, responsáveis por reforçar a parede celular (Avila et al., 2011). Dessa forma, exercem papel importante na proteção da planta contra os danos celulares causados por estresses bióticos ou abióticos.

RIBEIRO JUNIOR (2008), constatou que aos 7 dias após aplicação, plantas tratadas com fosfitos obtiveram um aumento na atividade da POX em relação a testemunha.

O controle da mancha aureolada em campo se mostrou promissor com o uso dos produtos Greenforce CuCa, BigRed[®] e Yantra[®]. Além disso, estes produtos apresentaram efeito de indutores de resistência, induzindo a aumento da atividade das enzimas PAL e POX e proporcionando maior acúmulo de lignina em plantas de café. Assim, estes produtos são alternativas viáveis para o controle da dessa bacteriose em café.

5. CONCLUSÕES

1. Na avaliação da AACPSD, nas duas safras avaliadas, observou-se que os tratamentos Big Red[®], Fulland[®], Greenforce CuCa, Yantra[®] e Reforce[®] Cu proporcionaram maior controle da doença.
2. Os produtos não diferiram na produtividade.
3. O produto Greenforce CuCa aumentou a atividade da enzima PAL um dia após aplicação.
4. Os produtos Big Red[®], Fulland[®], Greenforce CuCa e Yantra[®] aumentaram a atividade enzimática da POX.
5. Os produtos Greenforce CuCa, BigRed[®] e Yantra[®] aumentaram a concentração de lignina nos tecidos vegetais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA, R. S. et al. Estudo epidemiológico da ferrugem-do-cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) utilizando a análise de trilha. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 425-430, 1998.

AFEK, U.; STZEJNBERG, A. Effects of fosetyl-Al and phosphorous acid on scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus to *Phytophthora citrophthora*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, n. 7, p. 736-739, July 1989.

AMARAL, J.F.; TEIXEIRA, C.; PINHEIRO, E.D. A bacterium causing halo blight of coffee. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 23, p. 151-155, 1956.

BARTA, T. M.; WILLIS, D. K. Biological and molecular evidence that *Pseudomonas syringae* pathovars coronafaciens, striafaciens and garcae are likely the same pathovar. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, p. 492-499, 2005.

BELAN, L. L., POZZA, E. A., FREITAS, M. L. D. O., DE SOUZA, R. M., DE JESUS JUNIOR, W. C. AND OLIVEIRA, J. M. Diagrammatic Scale for Assessment of Bacterial Blight in Coffee Leaves. **Journal of Phytopathology**, 162: 801–810, 2014. doi: 10.1111/jph.12272.

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998.

BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Farhan House: C.A.B. International, 1986. 332 p.

BOATRIGT, J. et al. Understanding in vivo benzenoid metabolism in petunia petal tissue. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 135, n. 4, p. 1993-2011, Aug. 2004.

CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas contra patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 263 p.

CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. Manejo integrado das principais doenças do cafeeiro. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 19, n. 193, p. 27-35, 1998.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, New York, v. 2, p. 764-775, 1955.

DALIO, R. J. D. et al. O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 206-243, 2012.

DESTÉFANO, S. A. L. et al. Bacterial leaf spot of coffee caused by *Pseudomonas syringae* pv. tabaci in Brazil. **Plant Pathology**, v. 59, n. 6, p. 1162-1163, Dec. 2010.

GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 414-420, Aug. 2006.

GUEST, D.; GRANT, B. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 159-187, May 1991.

GODOY, C.V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C.L. Doenças do cafeeiro. In **Manual de Fitopatologia, Doenças das plantas cultivadas**. v. 2, 3ª ed, p. 184–200. 1997. Eds H. KIMATI, L.AMORIM, A. F. BERGAMIN, L. E. A.; CAMARGO; J. A. M. REZENDE. SP, Brasil: Editora Agronômica Ceres.

HAMMERSCHMIDT, D.; KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 20, n. 1, p. 61-71, Jan. 1982.

HARRISON, M. J.; BALDWIN, I. T. Biotic interactions: ploy and conter-ploy in the biotic interactions of plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, n. 4, p. 353-355, Aug. 2004.

JACKSON, T. J. et al. Action of the fungicide phosphate on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 49, n. 1, p. 147-154, Jan. 2000.

KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia; doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 663 p.

KIMURA, O.; ROBBS, C.F.; FERRARI, J.A.R. Algumas observações relacionadas com as bacterioses do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 4, 1976, Caxambu. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1976, p.104.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 44, n. 1, p. 301-307, 1954.

LELLIOT, R.A.; BILLING, E.; HAYWARD, A.C. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonads. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.29, n.3, p.470-589, 1966.

MARSCHNER, H. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3rd ed. London: Academic, 2012. 651 p.

MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 13-18, Nov. 2001.

MÉTRAUX, J. P. Induced defenses in plants. In: RODRIGUES, F. A.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa, MG: UFV, 2007. p. 7-24.

MOHAN, S.K. Investigações sobre *Pseudomonas garcae* Amaral et al. em cafeeiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 4, 1976, Caxambu. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1976, p.56.

MONTEIRO, Ana Cristina Andrade. Indutores de resistência no manejo da ferrugem e cercosporiose do cafeeiro (*Coffea arabica*) : **análises bioquímicas e moleculares** / Ana

Cristina Andrade Monteiro. – Lavras : UFLA, 2014. 132 p. : il.

MONTESANO, M.; BRADER, G.; PALVA, E. T. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. **Molecular Plant Pathology, London**, v. 4, n. 1, p. 73-79, Jan. 2003.

NAKAZAWA, A.; NOZUE, M.; YASUDA, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 114, n. 2, p. 323-328, Apr. 2001.

NOJOSA, G. B. A. et al. Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha-de-Phoma. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 1, p. 60-62, jan./fev. 2009.

NOJOSA, G. B. A.; RESENDE, M. L. V.; RESENDE, A. V. Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. v. 1, p. 139-153.

OLIVEIRA, J. R. **Idade da folha e suscetibilidade do cafeeiro a *Pseudomonas cichorii* e a *Pseudomonas syringae* pv *garcae***. 1988. 79 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1988.

OLIVEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S. Compostos fenólicos, idade da folha e resistência do cafeeiro à *Pseudomonas cichorii* e *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. **Revista Ceres**, Lavras, v. 38, n. 220, p. 445-452, 1991.

OLIVEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S. Reação de folhas novas e velhas de cafeeiro a infecção por *Pseudomonas cichorii* e *P. syringae* pv. *garcae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 1, p. 355-356. 1990.

OLIVEIRA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Papilla formation and peroxidase activity in *Mimosa scabrella* hypocotyls inoculated with the nonpathogen *Colletotrichum graminicola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 195-197, jun. 1997.

PATRÍCIO, F.R.A.; ALMEIDA, I.M.G.; BARROS, B.C.; SANTOS, A.S. Effect of fungicides, antibiotics, and acibenzolar-S-methyl over cercosporiosis and bacterial halo blight in coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.147, 2002. (Suplemento).

PATRÍCIO, F. R. A. et al. Controle químico da mancha aureolada em uma região montanhosa. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. S119, 2010. (Suplement).

Pozza, E. A.; Carvalho, V. L. & Chalfoun, S. M. (2010). Sintomas de injúrias causadas por doenças do cafeeiro. In: Semiologia do cafeeiro, Guimarães, R. J., Mendes, A. N. G. & Baliza, D. P. (01) pp. 67-106. Lavras, MG: Editora UFLA

RAES, J. et al. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 133, n. 3, p. 1051-1071, 2003.

RESENDE, M. L. V. et al. Induction of resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. In: **THE INTERNATIONAL JOINT WORKSHOP ON PR-PROTEINS AND INDUCED**

RESISTANCE, 1., 2004, Helsingor. Proceedings... Helsingor: Danish, 2004. p. 79.

RIBEIRO JÚNIOR, P. M. **Fosfitos na proteção e na indução de resistência do cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* e *Cercospora coffeicola***. 2008. 107 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

ROBBS, C. F. et al. cichorii (Swingle) Stapp. “Crestamento bacteriano das folhas” .enfermidade do cafeeiro (*Coffea arábica* L.) incitada por *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Itaquai, v. 4, n. 2, p. 1-5, 1974.

ROBBS, C. F. Epiphytic survival of *Pseudomonas garcae* on coffee. In: **INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA**, 4., 1978, Angers. Proceedings... Angers: INRA, 1978. p. 747-748.

RODRIGUES, L. M. R. et al. Mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Campinas: **Instituto Agrônômico**, 2013. 24 p.

RODRIGUES NETO, J. et al. Mancha bacteriana do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 32, p. 85, 2006. (Suplement).

SANTOS, F. S. et al. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 59-63, jan./fev. 2007.

SERA, T.; ALTEIA, M. Z.; PETEK, M. R. Melhoramento do cafeeiro: variedades melhoradas no Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR). In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 217-251.

SERA, G. H. et al. Associação de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* com algumas características agrônômicas em cafeeiros F2 segregantes para o gene *erecta*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 974-977, 2004.

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

TOYOTA, M. **Extratos vegetais e produtos comerciais no manejo da ferrugem e nos mecanismos de defesa do cafeeiro à cercosporiose**. 2008. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

YOUNG, LM.; DYE, D.W.; BRADBURY, I.F.; PANAGOPOULOS, C.G.; ROBBS, C.F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 21, p.153-177, 1978.

VAN LOON, L. C. van; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 453-483, Oct. 1998.

VAN LOON, L. C. van; STRIEN, E. A. van. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular**

Plant Pathology, London, v. 55, n. 2, p. 85-97, Aug. 1999.

ZOCCOLI, D.M.; TAKATSU, A.; UESUGI, C.H. Ocorrência de mancha aureolada em cafeeiros na Região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 4, p.843-849, 2011.