



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM CAFEIRO
CONTRA *Cercospora coffeicola* POR
ELICIADORES ABIÓTICOS E EXTRATOS
VEGETAIS**

DANIEL RUFINO AMARAL

2005

59412

050610

DANIEL RUFINO AMARAL

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM CAFEIEIRO CONTRA *Cercospora coffeicola* POR ELICIADORES ABIÓTICOS E EXTRATOS VEGETAIS

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

Orientador

Prof. Ph.D. Mário Lúcio Vilela de Resende

**LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL
2005**

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

Amaral, Daniel Rufino

Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora Coffeicola*
por eliciadores abióticos e extratos vegetais / Daniel Rufino Amaral. –
Lavras : UFLA, 2005.

96 p. : il.

Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Controle alternativo. 2. Café. 3. Cercosporiose. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD-633.7394

DANIEL RUFINO AMARAL

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM CAFEIRO CONTRA *Cercospora coffeicola* POR ELICIADORES ABIÓTICOS E EXTRATOS VEGETAIS

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

APROVADA em 18 de fevereiro de 2005

Prof. Dr. Eduardo Alves

DFP/UFLA

Prof. Dr. Rubens José Guimarães

DAG/UFLA



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

LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL
2005

A Deus,

que me faz crer que é possível alcançar meus objetivos.

Aos meus pais e irmãos,

que me amam, dão força e estão sempre do meu lado

me apoiando,

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade.

À CAPES, pela bolsa de estudos.

A FAPEMIG e EMBRAPA, pelo financiamento do projeto.

A Agrichem do Brasil, por ceder material para os trabalhos.

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

Ao professor Mário Sobral de Abreu, por aceitar o convite de co-orientar-me.

Aos professores Rubens José Guimarães e Eduardo Alves, por aceitarem o convite de participar da banca de avaliação e pelas dúvidas resolvidas.

Aos demais professores do Departamento de Fitopatologia, que contribuíram muito para minha formação acadêmica.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia Ana Maria, Ângela, Cleber, Edson, Heloísa, Maria de Lurdes, Renata, Ruti e Tarley, que sempre auxiliaram nas atividades durante o mestrado.

A Prof^ª. Antônia e o Prof. Eduardo, por terem cedido equipamentos para a realização de experimentos.

Aos amigos da república, Lucas e Washington, que sempre me apoiaram e incentivaram.

Aos colegas da chapa 2004 do NEFIT: Anderson, Elizandra, Fernando, Igor, Pedro e Ricardo, pela convivência e aprendizagem.

Aos colegas de turma do mestrado Elizandra, Igor, Juliana Campos, Júlio, Patrícia, Pedro e Sylvia, pelos momentos de estudos, alegrias, estresses e descontração.

Aos amigos Elizandra, Igor, Josimar, Pedro e Sylvia.

Ao Cristóvão, Paulo e Caju pelos momentos de diversão e boa música.

Aos colegas de laboratório, Carla Heloísa, Fábio Rossi, Fernanda Lopes, Galeno Vítor, João de Cássia, Moises e Sonia, pelo apoio.

Aos alunos Daniella, Fabrício, Jerônimo, Renata e Ricardo, por me ajudarem nos experimentos.

Aos colegas do Departamento Dejánia, José Mauro, Nilvanira Tebaldi, Juliana Franco, Anderson Almeida, Ênia, Val, Fátima, Carol, Helena, Nina, Amanda, Zuleide Chaves, Cristiano Lima, Alessandra Keiko, Flávio Henrique, Jadir, Frederico, Ellen, Deila Magda e Fernando Rocha, pelo companheirismo.

Ao Ricardo, Paloma, primos, tios e avós.

Aos meus sobrinhos e afilhados, por cada lindo sorriso de alegria.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
CAPITULO 1- Indução de resistência em cafeeiro por eliciadores abióticos e extratos vegetais.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Importância da cultura do café.....	4
2.2 Cercosporiose do cafeeiro.....	6
2.3 Indução de resistência.....	7
2.3.1 Mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa.....	9
2.3.1.1 Indução de peroxidases.....	9
2.3.1.2 Indução de polifenoloxidase.....	10
2.3.1.3 Clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e carotenóides.....	11
2.3.1.4 Indução de lignificação.....	11
2.4 Utilização de silício na indução de resistência.....	12
2.5 Extratos vegetais na Indução de resistência	13
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
CAPÍTULO 2- Indução de resistência em cafeeiro por eliciadores abióticos.....	25
RESUMO.....	26
ABSTRACT.....	27
1 INTRODUÇÃO.....	28
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1.Obtenção dos indutores abióticos.....	30
2.2.Obtenção do fungo <i>Cercospora coffeicola</i> e inoculação.....	30
2.3 Obtenção do cafeeiro para a indução de proteção contra <i>Cercospora coffeicola</i>	30
2.4 Experimentos com as doses de silicato de potássio.....	31
2.4.1 Experimento I: Avaliação da toxidez direta dos eliciadores abióticos a <i>Cercospora coffeicola</i>	31
2.4.2 Experimento II: Indução de resistência em cafeeiro contra <i>Cercospora coffeicola</i> por eliciadores abióticos.....	32
2.4.3 Experimento III: Caracterização dos mecanismos envolvidos na resposta de defesa do cafeeiro pelas melhores doses de silicato de potássio	33

2.5 Preparo de extratos foliares para avaliação de proteínas totais e enzimas.....	33
2.6 Determinação dos níveis de proteínas totais, peroxidases e polifenoloxidasas.....	33
2.7 Determinação de lignina.....	34
2.8 Preparo das amostras para observação em microscópio eletrônico de varredura (MEV).....	34
2.9 Avaliação da severidade da doença.....	35
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
3.1 Efeito das doses de silicato de potássio e cloreto de potássio no crescimento de <i>C. coffeicola</i>	36
3.2 Doses de silicato de potássio na severidade da doença.....	37
3.3 Atividade de enzimas.....	41
3.3.1 Peroxidasas.....	41
3.3.2 Polifenoloxidase.....	45
3.4 Determinação de pigmentos.....	48
3.5 Lignina.....	50
3.6 Efeito do silício no espessamento da cutícula de folhas de cafeeiro a <i>C. coffeicola</i>	52
4 CONCLUSÕES.....	54
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
CAPÍTULO 3- Indução de resistência em cafeeiro por extratos vegetais.....	58
RESUMO.....	59
ABSTRACT.....	60
1 INTRODUÇÃO.....	61
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.1 Obtenção dos extratos vegetais.....	64
2.2 Obtenção do fungo <i>C. coffeicola</i> e inoculação	64
2.3 Obtenção do cafeeiro para indução de proteção contra <i>C. coffeicola</i> ..	65
2.4 Experimentos com extratos vegetais.....	65
2.4.1 Experimento I: Avaliação da toxidez direta dos extratos vegetais a <i>C. coffeicola</i>	65
2.4.2 Experimento II: Indução de resistência em cafeeiro contra <i>C. coffeicola</i> por extratos vegetais.....	66
2.4.3 Experimento III: Caracterização dos mecanismos envolvidos na resposta de defesa do cafeeiro pelos melhores extratos vegetais.....	67
2.5 Avaliação da severidade da doença.....	68
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
3.1 Efeito dos extratos vegetais no crescimento de <i>C. coffeicola</i>	69

3.2 Efeito de extratos na severidade e número de lesões de <i>C. coffeicola</i>	71
3.3 Atividade de enzimas.....	76
3.3.1 Peroxidases.....	76
3.3.2 Polifenoloxidase.....	80
3.4 Determinação de pigmentos.....	84
3.5 Lignina.....	87
4 CONCLUSÕES.....	89
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

RESUMO GERAL

AMARAL, Daniel Rufino. **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais.** LAVRAS: UFLA, 2005. 96p. (Dissertação de Mestrado em Fitopatologia)*

O estudo desenvolvido no Departamento de Fitopatologia da UFLA, Lavras-MG, Brasil, teve como objetivos: 1) induzir proteção contra *Cercospora coffeicola* em cafeeiro com doses de silicato potássio e extratos vegetais; 2) caracterizar as reações bioquímicas do cafeeiro, desenvolvidas em função do estímulo de proteção, visando esclarecer parte da natureza das interações no patossistema *C. coffeicola* – cafeeiro. Testaram-se os seguintes eliciadores: silicato de potássio (doses 0,75; 1,5; 3,0 e 6,0 mL/L de água), extrato de casca de frutos de café (ECF), extrato de folhas de café infectadas com *Hemileia vastatrix* (EFID 100), extrato bruto aquoso de ramos de lobeira (*Solanum lycocarpum*) infectados com *Crinipellis pernicioso* (VLA) e extrato de folhas de eucalipto (*Corymbia citriodora*) (ECC). Nos experimentos com os eliciadores abióticos e bióticos, os produtos foram aplicados em cafeeiro *C. arabica* cv. Topázio e Acaia Cerrado respectivamente, sete dias antes da inoculação com *C. coffeicola*. Observou-se que entre os eliciadores abióticos, o melhor resultado foi encontrado com silicato de potássio 1,5 mL/L, com uma diminuição de 47% na doença quando comparado ao da testemunha inoculada. A diminuição da doença com a utilização de ASM (acibenzolar S-metil) foi de 43% em relação a mesma testemunha. Entre os extratos vegetais, os melhores resultados foram encontrados com os extratos EFID 100, VLA e ECF. Estes extratos proporcionaram uma diminuição na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de 37%, 32% e 40%, respectivamente, quando comparados com a testemunha inoculada. Plantas tratadas com ASM apresentaram 41% menor AACPD que a testemunha inoculada. Nos testes bioquímicos, pode-se observar que a pulverização de silicato de potássio (1,5 mL/L) proporcionou, em cafeeiro, um aumento na atividade de peroxidase, com pico aos 5 DAP (dias após a pulverização), sem inoculação. Inoculadas, as plantas apresentaram pico dessa enzima 10 DAP e 5 DAP. Para a polifenoloxidase, o pico de atividade ocorreu aos 15 DAP, sem inoculação. Quando se inoculou o patógeno, o pico de atividade ocorreu aos 10 DAP e 5 DAP. Também o maior acúmulo de lignina ocorreu em plantas tratadas com silicato de potássio 1,5 mL/L e inoculadas com

* Comitê Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende (Orientador), Mário Sobral de Abreu-UFLA.

o patógeno. Na dosagem de 1,5 mL/L, o silicato de potássio proporcionou um aumento na espessura da cutícula, provavelmente pela maior quantidade de cera na superfície inferior das folhas. Plantas tratadas com EFID 100 e ECF induziram maior atividade de peroxidases aos 20 dias, enquanto aquelas tratadas com VLA induziram aos 15 dias. Para polifenoloxidase, as plantas tratadas com EFID 100, VLA e ECF apresentaram pico de atividade aos 20 dias. EFID 100 e VLA proporcionaram maior acúmulo de lignina, após a inoculação de *C. coffeicola*.

GENERAL ABSTRACT

AMARAL, Daniel Rufino. **Induction of resistance in coffee plants against *Cercospora coffeicola* by abiotic elicitors and plant extracts.** LAVRAS: UFLA, 2005. 96p. (Dissertation for the Master Degree in Phytopathology)*

The study developed at the Department of Phytopathology-UFLA, Lavras-MG, Brazil, had as objectives: 1) to induce protection against *Cercospora coffeicola* in coffee plants with potassium silicate and plant extracts; 2) to characterize the biochemical reactions of coffee plants, developed as result of protection, seeking to clear part of the nature of the interactions in the patossystem *C. coffeicola* - coffee plants. The following elicitors were tested: potassium silicate (doses 0.75; 1.5; 3.0 and 6.0 mL/L of water), aqueous extracts from rusted coffee leaves (EFID 100), from witches' broom diseased branches of 'lobeira' (*Solanum lycocarpum*) (VLA), from husks of coffee berries (ECF) and from eucalyptus (*Corymbia citriodora*) leaves (ECC). In the experiments with the abiotic and biotic elicitors, the products were applied in coffee plants, *C. arabica* cv Topazio and Acaia Cerrado respectively, seven days before the inoculation with *C. coffeicola*. It was observed that, between the abiotic elicitors, the best result was found with potassium silicate (1.5 mL/L), with a decrease of 47% in the disease when compared to the inoculated control. The decrease of the disease with the use of ASM was of 43% when compared to the inoculated control. Among the plant extracts, the best results were found for EFID 100, VLA and ECF. These extracts provided a decrease in the area under the disease progress curve (AUDPC) of 37, 32 and 40% respectively, when compared to the inoculated control. Plants treated with ASM provided 41% reduction in AUDPC. In the biochemical tests, it was observed that potassium silicate at 1.5 ml/L provided an increase of the peroxidase activity, with a peak at 5 DAP (days after the pulverization), without inoculation. Inoculated plants presented peak of that enzyme 10 DAP and 5 DAP. For polyphenoloxidase, the peak of activity happened 15 DAP without inoculation. When the pathogen was inoculated, peaks happened at 10 DAP and 5 days after inoculation. Also, the highest lignin accumulation happened in treated plants with potassium silicate (1.5 mL/L) and inoculated with the pathogen. At the dose of 1.5 mL/L, the potassium silicate provided an increase in the thickness of the cuticle, probably because of the largest amount of wax in the inferior surface of the leaves. Treated plants with

* Guidance Committe:: Mário Lúcio Vilela de Resende (Major Professor), Mário Sobral de Abreu-UFLA.

EFID 100 and from ECF induced highest peroxidase activity up to 20 days, while those treated with VLA went to 15 days. For polyphenoloxidase, plants treated with those extracts presented activity peak with 20 days. The extracts EFID 100 and VLA provided highest accumulation of lignin, following inoculation.

CAPÍTULO 1

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM CAFEIRO CONTRA *Cercospora coffeicola* POR ELICIADORES ABIÓTICOS E EXTRATOS VEGETAIS

quando na ausência de medidas de controle dessa doença (Matiello, 1991; Zambolim et al., 1985).

2.2 Cercosporiose do cafeeiro

A cercosporiose, conhecida por “mancha de olho pardo” ou “olho de pomba”, causada por *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke, é uma das doenças mais antigas do cafeeiro, tanto na América do Sul, como América Central e encontra-se disseminada por todas as regiões produtoras. A doença manifesta-se por manchas circulares de coloração castanho-claro a escuro, com centro branco-acinzentado, quase sempre envolvido por um halo amarelo, dando à lesão um aspecto de olho. Por isso, os nomes vulgares "mancha de olho pardo" e "olho de pomba". No centro cinza das lesões, notam-se pontuações escuras que constituem as frutificações do fungo (esporodóquios). Podem ocorrer variações nos sintomas descritos pela ausência do halo amarelado e assim, a doença é denominada em algumas regiões como "cercospora negra".

Os frutos também podem ser infectados por *Cercospora* e, neles, as lesões são mais frequentes quando estão próximos da maturação. A infecção nos frutos inicia-se, mais ou menos, quatro meses após a floração, causando lesões deprimidas de coloração castanho claro, dispostas no sentido do pedúnculo-coroa do fruto. As manchas mais velhas são escuras e com aspecto ressecado, e a polpa correspondente ao local da lesão fica aderente ao pergaminho. Os frutos, quando atacados no estágio ainda verde e verde cana, amadurecem precocemente, iniciando por um avermelhamento a partir da lesão (Chalfoun, 1997; Zambolim et al., 1997).

Nas regiões altas do estado do Espírito Santo e em Minas Gerais, a partir de 1971, ocorreram ataques intensos da doença no campo, chegando a causar perdas de 30% na produção (Carvalho, 2001). Os prejuízos com a cercosporiose ganharam maior importância econômica com a implantação de lavouras nos

CAPÍTULO 1

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM CAFEIRO CONTRA *Cercospora coffeicola* POR ELICIADORES ABIÓTICOS E EXTRATOS VEGETAIS

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de café e o estado de Minas Gerais é o que mais contribui para esta condição, sendo seguido pelos estados do Espírito Santo e São Paulo. A cafeicultura representa uma fatia considerável do agronegócio brasileiro, tendo sido responsável, no ano safra de 2002/2003, pela exportação de 1.556.529 toneladas, o que corresponde a US\$ 1.201.261 (Agrianual, 2004).

As doenças foliares do cafeeiro causadas por *Hemileia vastatrix*, *Cercospora coffeicola*, *Colletotrichum* spp. e *Phoma costarricensis* são alguns dos principais problemas e fonte de perdas na produtividade. Os gastos com fungicidas para controlar doenças fúngicas numa lavoura de café adensado, do primeiro ao sexto ano, podem representar, aproximadamente, 36,86% dos gastos com insumos e materiais de consumo em geral (Agrianual, 1999).

A resistência a essas doenças é uma das alternativas mais viáveis para diminuir os prejuízos causados. Um grande número de programas objetivando o melhoramento do cafeeiro para resistência a doença é direcionado ao controle de *H. vastatrix*. Porém, fontes de resistência para controlar doenças causadas por alguns patógenos, como *Cercospora* e *Phoma*, ainda não foram bem identificadas. Alternativas, como a resistência induzida, através do uso de eliciadores ou sinalizadores para a ativação de genes de defesa, estão sendo estudadas em cafeeiro e precisam ser levadas em consideração. Trabalhos visando o controle dos patógenos *Cercospora*, *Phoma* e *Colletotrichum* foram relegados tanto pelos programas de melhoramento do cafeeiro, como pelas pesquisas com resistência induzida (Nojosa, 2003).

A indução de resistência em plantas é certamente promissora no controle de doenças devido aos bons resultados que vêm sendo obtidos, inclusive na

diminuição dos custos de produção. A busca de moléculas eliciadoras capazes de induzir resistência em plantas cultivadas, vem sendo realizada em plantas através da obtenção de extratos, ou produtos sintéticos, alguns dos quais à base de minerais, como o silício. A eficácia desses produtos no controle de fitopatógenos *in vitro* e *in vivo* tem sido observada em diversos trabalhos (Amadioha, 2000; Gonzaga et al., 2003; Karaman et al., 2003; Okemo et al., 2003; Pozza et al., 2004; Yin & Tsao, 1999).

Portanto, objetivou-se neste trabalho:

- 1) induzir proteção contra *Cercospora coffeicola* em cafeeiro com doses de silicato de potássio e extratos vegetais;
- 2) caracterizar as reações bioquímicas do cafeeiro, desenvolvidas em função do estímulo de proteção, visando esclarecer parte da natureza das interações no patossistema *C. coffeicola*–cafeeiro.

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da cultura do café

A produção de café, principalmente *C. arabica* L., é essencial para cerca de 50 países em desenvolvimento, incluindo o Brasil. A cafeicultura representa uma contribuição importante para o PIB desses países, porém, a distribuição das riquezas geradas pelo mercado do café entre os países produtores e importadores é muito desequilibrada. No ano agrícola de 2001/2002, o mercado do café gerou cerca de 70 bilhões de dólares, contudo, em função desses desequilíbrios, 92% foram retidos por países importadores e apenas 8% ficaram com os países produtores (Nojosa, 2003).

O café é uma das importantes fontes de divisas para o nosso país, que é o principal produtor e exportador mundial, fechando a safra de 2002/2003 com uma produção de 47,2 milhões de sacas (60 kg), correspondente a 39,92% da produção mundial. Minas Gerais destaca-se como o maior produtor nacional, com 25,1 milhões de sacas, e as regiões Sul e Oeste Mineiro contribuem com mais da metade desta produção, com 13,2 milhões de sacas numa área estimada em 629,7 mil hectares (Aguiar et al., 2003).

O Brasil, atualmente, é o segundo maior consumidor de café do mundo. O consumo que era de cerca de 6,4 milhões de sacas, passou para cerca de 13 milhões de sacas em 2002 (Embrapa Café, 2005).

O país obteve cerca de US\$ 1.212.511 em receitas de exportações com café no início do ano safra de 2001/2002 (Agrianual, 2003) e os principais destinos de exportação foram Alemanha, Estados Unidos, Itália e Japão. No final da década de 1990 e início da década de 2001, a cafeicultura nacional enfrentava problemas em função da qualidade do café produzido. Ocorreram perdas nas cotas de exportações de café do Brasil, enquanto aquelas de países como

Colômbia e outros da América Central foram elevadas, para atender à procura por cafés de melhor qualidade (Agriannual, 2003).

Este aspecto da procura pela qualidade no mercado internacional do café exigiu do Brasil uma modernização na produção, tanto pelo uso de melhores cultivares, como pelo controle fitossanitário do produto para exportação. Os cafés brasileiros têm se mostrado cada vez mais competitivos e o país está passando a fornecer grande parte do café consumido mundialmente. A produtividade média aumentou de cerca de 10 a 12 sacas para 16 a 18 sacas, com um dos custos de produção mais baixo do mundo para o café arábica (Conab, 2005).

A maior parte do café produzido mundialmente é proveniente de áreas cultivadas com *C. arabica*, o qual ocupa em torno de 70% das áreas cultivadas (Agriannual, 2003; Monaco, 1977). Atualmente, o café ocupa uma área cultivada com cerca de 11.168.000 hectares no mundo. O Brasil contribui com uma área de aproximadamente 3,5 milhões de hectares, sendo o país com maior área cultivada (FAO, 2003).

Além dos problemas de mercado, a produção nos países produtores tem como um dos principais obstáculos a ocorrência de uma série de doenças causadas por patógenos. Entre essas doenças, pode-se citar a ferrugem do café, causada por *Hemileia vastatrix* Berk & Br., a antracnose dos frutos (CBD) causada por *Colletotrichum kahawae*, a mancha aureolada causada por *Pseudomonas syringae* pv. *Garceae*, a cercosporiose causada por *Cercospora coffeicola* Berk & Cook e as manchas foliares causadas por *Phoma* spp. e *Ascochyta coffeae* (Barguil, 2004).

No Brasil, a ferrugem e a cercosporiose estão entre os principais causadores de perdas na produtividade. Estima-se que as perdas relacionadas apenas ao ataque por *C. coffeicola* sejam da ordem de 30% a 40% da produção

quando na ausência de medidas de controle dessa doença (Matiello, 1991; Zambolim et al., 1985).

2.2 Cercosporiose do cafeeiro

A cercosporiose, conhecida por “mancha de olho pardo” ou “olho de pomba”, causada por *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke, é uma das doenças mais antigas do cafeeiro, tanto na América do Sul, como América Central e encontra-se disseminada por todas as regiões produtoras. A doença manifesta-se por manchas circulares de coloração castanho-claro a escuro, com centro branco-acinzentado, quase sempre envolvido por um halo amarelo, dando à lesão um aspecto de olho. Por isso, os nomes vulgares “mancha de olho pardo” e “olho de pomba”. No centro cinza das lesões, notam-se pontuações escuras que constituem as frutificações do fungo (esporodóquios). Podem ocorrer variações nos sintomas descritos pela ausência do halo amarelado e assim, a doença é denominada em algumas regiões como “cercospora negra”.

Os frutos também podem ser infectados por *Cercospora* e, neles, as lesões são mais frequentes quando estão próximos da maturação. A infecção nos frutos inicia-se, mais ou menos, quatro meses após a floração, causando lesões deprimidas de coloração castanho claro, dispostas no sentido do pedúnculo-coroa do fruto. As manchas mais velhas são escuras e com aspecto ressecado, e a polpa correspondente ao local da lesão fica aderente ao pergaminho. Os frutos, quando atacados no estágio ainda verde e verde cana, amadurecem precocemente, iniciando por um avermelhamento a partir da lesão (Chalfoun, 1997; Zambolim et al., 1997).

Nas regiões altas do estado do Espírito Santo e em Minas Gerais, a partir de 1971, ocorreram ataques intensos da doença no campo, chegando a causar perdas de 30% na produção (Carvalho, 2001). Os prejuízos com a cercosporiose ganharam maior importância econômica com a implantação de lavouras nos

cerrados ou em áreas de baixa fertilidade natural, pois há uma grande relação entre o ataque de cercospora e a nutrição mineral das plantas (Pozza et al., 2000; Talamini et al., 2001). O que faz esta doença ainda mais importante é o fato de se constituir um problema desde as mudas no viveiro até os plantios novos no campo (Chalfoun, 1997; Zambolim et al., 1997). Nos viveiros, a doença provoca desfolha, afetando o crescimento das mudas, tornando-as raquíticas e inadequadas para o plantio. Já em plantios novos é comum ocorrer em intensos ataques com desfolha acentuada, prejudicando o crescimento das mudas, principalmente em lavouras implantadas em terrenos de baixa fertilidade e ou com adubações desequilibradas. Além disso, podem ocorrer ataques severos da doença, causando queda de folhas e frutos após as primeiras produções. Em lavouras adultas, além da queda de folhas, a doença provoca a queda prematura e chochamento dos frutos atacados, podendo funcionar também como porta de entrada para outros fungos que interferem na qualidade do café. Isso implica na redução da produção, do rendimento, depreciação do tipo e qualidade da bebida do café (Chalfoun, 1997).

A cercosporiose desenvolve-se em condições de umidade relativa alta, temperatura amena e excesso de insolação ou alta luminosidade. Em lavouras adultas, além das condições climáticas já citadas, também solos argilosos, arenosos ou compactados, o sistema radicular deficiente e o pião torto são fatores que favorecem o desenvolvimento da doença (Chalfoun, 1997; Zambolim et al., 1997).

2.3 Indução de resistência

Em uma sociedade cada vez mais preocupada com o meio ambiente, a utilização de produtos ecologicamente corretos, de baixo custo e com bom nível de controle, representa um avanço na agricultura (Guzzo et al, 2001). Neste contexto, a indução de resistência (IR) em plantas contra fitopatógenos

representa um método alternativo no controle de doenças, o qual ativa os mecanismos de defesa latentes na planta.

A resistência induzida em plantas pode ocorrer através do tratamento com agentes bióticos (microrganismos viáveis ou inativados) ou abióticos (Resende et al., 2000). Esta IR pode ocorrer em condições de casa de vegetação e campo, além de poder exibir vantagens, como: efetividade contra vírus, bactérias, fungos e nematóides; estabilidade devido à ação de diferentes mecanismos de resistência; caráter sistêmico, persistente e natural da proteção; transmissão por enxertia e a presença do potencial genético para resistência em todas as plantas suscetíveis (Pascholati, 2002)

Como exemplo para IR utilizando agentes bióticos, a bactéria *Bacillus thuringiensis* é largamente utilizada no controle biológico de patógenos e insetos. No controle de patógenos com esta bactéria, merece destaque o trabalho de Guzzo & Martins (1996), que utilizaram *Bacillus thuringiensis* como indutor de proteção contra a ferrugem do cafeeiro causada por *Hemileia vastatrix*. Tal proteção desencadeou o aumento da atividade de β 1-3 glucanases e quitinases nas plantas induzidas pela bactéria.

Entre os agentes químicos abióticos, o ácido salicílico e seus análogos têm sido utilizados na indução de respostas de defesa contra patógenos em diversas espécies vegetais (Lawton et al., 1996). O ácido salicílico (AS) foi o primeiro composto derivado de plantas demonstrado como indutor de resistência e, posteriormente, o ácido 2,6 dicloroisonicotínico (INA), análogo de AS, foi o primeiro composto sintético indutor de resistência. Recentemente, a molécula acibenzolar-S-methyl (ASM) comportou-se como um potente ativador de resistência, possibilitando a proteção em condições de campo, contra um amplo espectro de patógenos em diversos cultivos (Gorlach et al., 1996). Em 2001, essa molécula foi registrada no Brasil, sob a marca comercial BION[®], como o

primeiro representante de uma nova classe de produtos para a proteção de cultivos, os ativadores de plantas (Castro, 2002).

Em culturas como trigo e milho, substâncias como o AS e o ASM são bem estudadas e apresentam resultados promissores (Görlach et al., 1996; Moraes, 1998; Stadnik, 1999).

Já em cafeeiro, a eficiência do ASM para o controle da ferrugem ficou demonstrada pela sua ação protetora em mudas, tendo este produto sido capaz de induzir proteção por 10 semanas (Martins et al., 1998). Esse efeito indutor do ASM contra ferrugem do cafeeiro foi confirmado por Nojosa (2003), tendo o tratamento com ASM proporcionado uma percentagem de controle de 56,82% em folhas destacadas e 52% em mudas de café. Nas plantas tratadas com ASM foi possível observar um aumento considerável nos teores de clorofila *a* e *b*, nos teores de lignina e na atividade de peroxidases (Nojosa, 2003).

2.3.1 Mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa

2.3.1.1 Indução de peroxidases

As peroxidases (PO) são glicoproteínas capazes de catalizar um grande número de reações. Entre as reações estão a redução de H_2O_2 a H_2O , a formação de lignina, regulação hormonal, diferenciação celular e respostas gerais de estresses, entre outros (Siegel, 1993).

As diversas reações catalisadas pelas peroxidases ocorrem em diferentes locais das células, dependendo da reação que catalisam. O aumento da atividade das peroxidases pode ocorrer devido a infecção por patógenos, por estresse ou eliciadores abióticos e bióticos. Em *C. arabica* cv. Catuaí, várias isoenzimas de peroxidase foram detectadas extracelularmente em suspensões celulares, relacionadas diretamente com o desenvolvimento das células cultivadas (Nojosa, 2003)

Marriott et al. (1978), citado por Soares et al. (2004), constataram que aumentos na atividade da peroxidase, associados com ferimentos em vegetais, podem indicar aumento na biossíntese de lignina, que atua como uma barreira à infecção microbiana. Birecka & Garraway (1978) também observaram aumentos na atividade da peroxidase em ferimentos ou tecidos infectados, perceptíveis 24 horas após o ferimento e continuado por muitos dias. Alguns trabalhos descrevem que o aumento na atividade da peroxidase é parte da fase geral de ativação do metabolismo, que sintetiza *de novo* esta enzima (Kanazawa et al., 1965). Esta reação ocorre rapidamente nas células infectadas, com estímulo do metabolismo das células vizinhas, organizando e estabelecendo um efetivo sistema de defesa pela planta em direção à área do ferimento ou lesão.

2.3.1.2 Indução de polifenoloxidasas

Segundo Wheatley (1982) citado por Campos (2004), a ação da polifenoloxidase processa-se por meio da hidroxilação de monofenóis para difenóis e oxidação destes difenóis para quinonas. As quinonas têm ação antimicrobiana e os polímeros podem atuar como taninos, formando complexos com proteínas que atuam como barreira física na penetração de patógenos (Mueller & Beckman, 1974). Cardoso & Garraway (1977) demonstraram que as substâncias provenientes de lesões de hipocótilos doentes de feijoeiros inibiam seletivamente isolados não-patogênicos. A importância da atividade da polifenoloxidase na resistência a doenças deve-se, provavelmente, à sua propriedade em oxidar compostos fenólicos para quinonas, os quais são muito mais tóxicos aos microrganismos do que o fenol original, e à sua ação protetora no local do ferimento.

Solorzano et al. (1996), estudando a indução sistêmica da peroxidase e da polifenoloxidase, pela aplicação de NaH_2PO_4 em tomateiro, concluíram

haver uma relação entre essas enzimas e a resistência, tendo a atividade dessas sido maior entre 10 e 15 dias, decaindo após 45 dias do tratamento.

2.3.1.3 Clorofila *a*, *b* e carotenóides

Entre os diversos tipos de pigmentos encontrados nos organismos, dois são de interesse especial para o processo fotossintético das plantas. Eles participam dos processos de absorção de energia luminosa para posterior transformação dessa energia em ATP e poder redutor, os quais serão usados na produção de fotoassimilados (Malkin & Niyogi, 2000). Os primeiros desses pigmentos são as clorofilas *a* e *b*, e o segundo, os carotenóides.

As doenças foliares afetam a fotossíntese da planta de várias formas. Entre essas formas podem ser citadas a interferência na fotoassimilação, causada pela perda de área fotossintética, devido à necrose dos tecidos (Misaghi, 1982). Contudo, alguns dos pigmentos fotossintéticos, como os carotenóides, podem funcionar como antioxidantes protegendo o processo fotossintético de radicais livres (Malkin & Niyogi, 2000; Bray et al., 2000). Diversos compostos antioxidantes podem atuar na defesa contra patógenos em várias culturas (Arnoldi et al., 1989; Elad, 1992; Prusky, 1988). Outros pigmentos do tipo flavonóides, como medicarpina e gliceolina de alfafa e soja, respectivamente, são fitoalexinas conhecidas envolvidas na defesa contra patógenos (Croteau et al., 2000; Taiz & Zeiger, 1998).

2.3.1.4 Indução de lignificação

A lignina é uma macromolécula fenólica, altamente complexa, sendo o segundo composto mais abundante nos tecidos vegetais. Sua estrutura ainda não é totalmente conhecida em função das dificuldades no processo de extração, mas acredita-se que seja originária da polimerização enzimática de monômeros de coniferil, sinapil e *p*-cumaril álcoois (Dence & Lin, 1992; Taiz & Zeiger, 1998).

A lignina geralmente é encontrada nos tecidos vegetais entre a parede celular e as células adjacentes. Estruturas lignificadas podem interromper o desenvolvimento fúngico em tecidos vegetais, atuando como barreira, resistindo à penetração ou desenvolvimento (Agrios, 1997; Hammerschmidt & Kúc, 1982; Misaghi, 1982; Nicholson & Wood, 2001; Pascholati & Leite, 1995; Ride, 1975).

2.4 Utilização de silício na indução de resistência

Fertilizantes contendo fósforo e silício estão entre os muitos produtos indutores de resistência citados na literatura (Nojosa, 2003). Alguns desses produtos na forma de silicatos e fosfitos estão ganhando importância, não somente pela alta eficiência na indução de proteção contra algumas doenças, mas talvez por serem alternativas que, além de conferir resistência também proporcionam benefícios nutricionais e incrementam a produção e qualidade dos produtos agrícolas (Nojosa, 2002).

O silício possivelmente está associado a vários processos fisiológicos das plantas, entre eles a indução de resistência em várias famílias de plantas, principalmente em gramíneas e cucurbitáceas. Um exemplo típico de estudo do silício na indução de resistência refere-se ao patossistema arroz-*Pyricularia grisea* (Seebold et al., 2000). Estes autores observaram que a aplicação de Si levava a formação de barreira física que impedia a penetração do patógeno. Já em pepino infectado por *Sphaerotheca fuliginea* e *Pythium ultimum*, a aplicação do silício ativou a resistência da planta comprovada pelo aumento na atividade de quitinases, além da maior produção de fitoalexinas flavonóides (Fawe et al., 1998). Plantas de pepino, cultivadas em solução nutritiva, apresentaram redução na intensidade de duas doenças, cujos agentes etiológicos são *Sphaerotheca fuliginea* e *Pythium ultimum* (Chérif et al., 1992; Menzies et al., 1991). No caso de *S. fuliginea*, o silicato de sódio (Na_2SiO_3), nas concentrações estudadas (0,5,

0,95, 1,4, 1,85, 2,3, 3,2 e 4,1 mM de Si), proporcionou menor número de colônias por folha, menor área das colônias por folhas e menor porcentagem de germinação dos conídios com o aumento das doses. O silicato de potássio reduziu a mortalidade, podridão de raiz e perdas na produção atribuída ao *P. ultimum*, porém não houve diferença entre as duas doses estudadas (1,7 e 3,4 mM Si).

O controle de doenças pela utilização de silício não se restringe à cultura do arroz e cucurbitáceas, mas outras, como aveia, roseira, videira e, mais recentemente, o café, têm-se beneficiado com a característica de indução de proteção proporcionada pelo silício (Pozza et al., 2004). De fato, a aplicação de silicato de cálcio e sódio em cafeeiro contra cercosporiose possibilitou observar uma diminuição na intensidade dessa doença demonstrada pela área abaixo da curva de progresso de plantas doentes (AACPPD) e área abaixo da curva de progresso do total de lesões (AACPLF) (Santos, 2002). Estudando o efeito de 1 g de CaSiO_3 por quilo de substrato em três cultivares de café (Catuaí, Mundo Novo e Icatú), Pozza et al. (2004) observaram redução de 63,2% na incidência e 43% na severidade na cultivar “Catuaí”, quando comparada à testemunha. As cultivares Catuaí e Mundo Novo apresentaram maior número médio de folhas doentes e lesões por planta quando comparada à Icatu, devido à maior resistência desta à cercosporiose. Os mesmos autores observaram que a cultivar Catuaí apresentava uma camada de cera espessa que cobria a região com estômatos e dificultava o processo de penetração do fungo.

2.5 Extratos vegetais na indução de resistência

Alguns trabalhos indicam a presença de substâncias bioativas em extratos vegetais e estes têm sido pesquisados como possíveis indutores de resistência (Abid et al., 1997; Costa et al., 2001; Dias et al., 2000; Khurma & Singii, 1997). Essas substâncias bioativas são, na maioria, compostos

secundários como é o caso dos alcalóides, fenólicos e terpenóides, dentre outros. Trabalhos têm indicado o potencial de extratos de plantas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando presença de algum composto eliciador.

Várias plantas têm sido empregadas em bioensaios na indução de resistência do pepino contra *Colletotrichum lagenarium* e no tratamento de sementes de trigo para o controle de *Bipolaris sorokiniana* (Schwan-Estrada, 2003). Extrato de *Piper longum* L. foi capaz de reduzir a severidade e a incidência dos fungos *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans*, *Puccinia recondita* e *Erysiphe graminis* (Lee et al., 2001). Os extratos de maçã e mamão (casca e semente) diminuíram a incidência de *Colletotrichum gloeosporioides* em pós-colheita de mamão (*Carica papaya*) (Banões et al., 2003). Resultados promissores têm sido encontrados também com o extrato de *Eucalyptus citriodora*, o qual reduziu o número e o tamanho das lesões de *Colletotrichum lagenarium* com a aplicação do extrato em plantas de pepino 72, 48 e 24 horas antes da inoculação do fungo (Bonaldo, 2001).

Na cafeicultura, a utilização de extratos vegetais em campo ainda é praticamente inexistente e a maioria dos trabalhos têm sido realizada *in vitro* ou em casa de vegetação. Segundo Schnepfleitner et al. (1996), a utilização de extratos de plantas medicinais, como a erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides*), alecrim-pimenta (*Lipia sidoides*) e erva cidreira (*L. alba*) em experimentos visando verificar a germinação de uredósporos de *H. vastatrix*, possibilitou observar que essa geminação não passou de 5%. Extratos aquosos de folhas de café infectadas com *H. vastatrix* foram eficazes no controle de *Phoma costarricensis*, outro importante patógeno do cafeeiro (Resende et al., 2004).

Como indutores bióticos tem-se também pesquisado filtrados de colônias e ou esporos fúngicos. Substâncias extraídas de esporos de *H. vastatrix* foram capazes de induzir proteção contra *H. vastatrix*, o que foi confirmado pelo aumento nos níveis de compostos fenólicos e na atividade das enzimas peroxidases e polifenoloxidasas (Maxemiuc–Naccache, 1983; Maxemiuc–Naccache & Dietrich, 1985; Guzzo et al., 1987). Maximiuc-Naccache et al. (1992) detectaram um aumento nas atividades de quitinases e β -1,3 glucanases, três dias após a inoculação de *H. vastatrix* em plantas resistentes, enquanto que, nas plantas suscetíveis esse aumento só foi verificado após 21 dias.

Novos produtos de menor impacto ao homem e ao meio ambiente necessitam de estudos como ativadores de defesa de plantas aos fitopatógenos. A aplicação de extratos e produtos naturais como ativadores de resistência na planta a fungos que atacam o cafeeiro futuramente poderá beneficiar principalmente, a agricultura orgânica, na qual é proibido o uso de produtos oriundos da indústria petroquímica. Sabe-se que os estudos de resistência induzida em cafeeiro contra ferrugem já apresentam resultados promissores, no entanto, a indução de proteção em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* é desconhecida (Nojosa, 2003).

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. 2000. p. 1250-1318.

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

DIAS, C. R.; SCHWAN, A. V.; EZEQUIEL, D. P.; SARMENTO, M. C.; FERRAZ, S. Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 203-210, 2000.

ELAD, Y. The use of antioxidants (free radical scavengers) to control grey mould (*Botrytis cinerea*) and white mould (*Sclerotinia sclerotiorum*) in various crops. **Plant Pathology**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 417-426, Aug. 1992.

FAO Statistics Data Base. 2003. Disponível em: <http://apps1.fao.org/copyright.htm>>. Acesso em: 2004.

FAWE, A. , ABOU, Z. M. , MENZIES, J. G.; BELANGER, R. R. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, n. 5, p. 396-401, May 1998.

FLEURIET, A. J. J.; DELOIRE, A. Aspects histochimiques et biochimiques de la cicatrisation des fruits de tomate blessés. **Phytopathologische Zeitschrift**, Jena, v. 107, n. 3, p. 259-268, 1982.

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**, Brasília, v. 28, p. 363, ago. 2003. Suplemento.

GÖRLACH, J.; VOLRATH, S.; KANAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K. H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance activates gene expression and disease reduction in wheat. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 4, p. 629-643, Apr. 1996.

Como indutores bióticos tem-se também pesquisado filtrados de colônias e ou esporos fúngicos. Substâncias extraídas de esporos de *H. vastatrix* foram capazes de induzir proteção contra *H. vastatrix*, o que foi confirmado pelo aumento nos níveis de compostos fenólicos e na atividade das enzimas peroxidases e polifenoloxidasas (Maxemiuc–Naccache, 1983; Maxemiuc–Naccache & Dietrich, 1985; Guzzo et al., 1987). Maximiuc-Naccache et al. (1992) detectaram um aumento nas atividades de quitinases e β -1,3 glucanases, três dias após a inoculação de *H. vastatrix* em plantas resistentes, enquanto que, nas plantas suscetíveis esse aumento só foi verificado após 21 dias.

Novos produtos de menor impacto ao homem e ao meio ambiente necessitam de estudos como ativadores de defesa de plantas aos fitopatógenos. A aplicação de extratos e produtos naturais como ativadores de resistência na planta a fungos que atacam o cafeeiro futuramente poderá beneficiar principalmente, a agricultura orgânica, na qual é proibido o uso de produtos oriundos da indústria petroquímica. Sabe-se que os estudos de resistência induzida em cafeeiro contra ferrugem já apresentam resultados promissores, no entanto, a indução de proteção em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* é desconhecida (Nojosa, 2003).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABID, M.; CHOUDHARY, M. I.; MAQBOOL, M. A.; RAHMAN, A. U. Preliminary screening of some plants for their nematocidal activity against *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Mediterranea*, Bari, v. 25, n. 2, p. 155-157, 1997.
- AGUIAR, E. L. de; CARVALHO, F. D. S. de; ABREU, D. F. de. **Informe Agropecuário do café**. Brasília: SPC/MAPA, 2003. v. 7, n. 6, 21 p.
- AGRIANUAL 1999: Anuário da Agricultura Brasileira. **FNP Consultoria e Comércio**. São Paulo, 1999.
- AGRIANUAL 2003: Anuário da Agricultura Brasileira. **FNP Consultoria e Comércio**. São Paulo, 2003.
- AGRIANUAL. 2004. Anuário da agricultura Brasileira. **FNP Consultoria e Comércio**. São Paulo, 2004. 496 p.
- AGRIOS, G. N. *Plant Pathology*. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1997.
- AMADIOHA, A. C. Controlling rice blast in vitro and in vivo with extracts of *Azadirachta indica*. *Crop Protection*, Oxford, v. 19, n. 5, p. 287-290, June 2000.
- ARNOLDI, A.; CARUGHI, M.; FARINA, G. MERLINI, L.; PARRINO, M. G. Synthetic analogues of phytoalexins. Synthesis and antifungal activity of potential free-radical scavengers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 37, n. 2, p. 508-512, Mar./Apr. 1989
- BANÕS, S. B.; LOPEZ, M. H.; MOLINA, E. B.; WILSON, C. L. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection*, Oxford, v. 22, n. 9, p. 1087-1092, Nov. 2003.
- BIRECKA, H.; GARRAWAY, M. O. Corn leaf isoperoxidase reaction to mechanical injury and infection with *Helminthosporium maydis*: effects of cycloheximide. *Plant Physiology*, Rockville, v. 61, n. 4, p. 561-566, Apr. 1978.

BONALDO, S. M. **Fungitoxicidade, indução de fitoalexinas em sorgo e soja e indução de resistência em pepino a *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora* (eucalipto).** 2001. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá,

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. RESPONSES TO ABIOTIC STRESSES. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & Molecular Biology of plants.** 2000. p. 1158-1203.

CAMPOS, D. A.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; OSÓRIO, V. A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 637-643, jul. 2004.

CARDOSO, C. O. N.; GARRAWAY, M. O. Bioassay using phenolic compounds and phytoalexins produced in bean plants infected with *Fusarium solani* f. *phaseoli* (Burk.) Snyder & Hans. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 3, n. 2, p. 103-116, abr./jun. 1977.

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

CASTRO, R. M. de. Bion: a experiência brasileira. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 1., 2002, São Pedro. **Anais...** São Pedro: ESALQ, 2002. p. 12-13.

CHALFOUN, S. M. **Doenças do cafeeiro: importância, identificação e métodos de controle.** Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 93 p.

CHÉRIF, M.; BÉLANGER, R. R. Use of potassium silicate amendments in recirculating nutrient solutions to suppress *Pythium ultimum* on long english cucumber. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, n. 10, p. 1008-1011, Oct. 1992.

COSTA, M. J. N.; CAMPOS, V. P.; OLIVEIRA, D. F. Toxidade de Extratos Vegetais e de Esterco a *Meloidogyne incognita*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 22-23, abr./jun. 2001.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. 2000. p. 1250-1318.

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

DIAS, C. R.; SCHWAN, A. V.; EZEQUIEL, D. P.; SARMENTO, M. C.; FERRAZ, S. Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 203-210, 2000.

ELAD, Y. The use of antioxidants (free radical scavengers) to control grey mould (*Botritis cinerea*) and white mould (*Sclerotinia sclerotiorum*) in various crops. **Plant Pathology**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 417-426, Aug. 1992.

FAO Statistics Data Base. 2003. Disponível em: <http://apps1.fao.org/copyright.htm>>. Acesso em: 2004.

FAWE, A. , ABOU, Z. M. , MENZIES, J. G.; BELANGER, R. R. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, n. 5, p. 396-401, May 1998.

FLEURIET, A. J. J.; DELOIRE, A. Aspects histochimiques et biochimiques de la cicatrisation des fruits de tomate blessés. **Phytopathologische Zeitschrift**, Jena, v. 107, n. 3, p. 259-268, 1982.

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**, Brasília, v. 28, p. 363, ago. 2003. Suplemento.

GÖRLACH, J.; VOLRATH, S.; KANAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K. H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance activates gene expression and disease reduction in wheat. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 4, p. 629-643, Apr. 1996.

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

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F. Local and systemic resistance induction of β -1,3 glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 9/10, p. 449-454, Nov. 1996.

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

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

KANAZAWA, Y.; SHICHI, H.; URITANI, I. Biosynthesis of peroxidases in sliced or black rot-infected sweet potato roots. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 29, n. 9, p. 840-847, Sept. 1965.

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**, Clare, v. 85, n. 2/3, p. 231-235, Apr. 2003.

KHURMA, R.; SINGH, A. Nematicidal potential of seed extracts: *in vitro* effects on juvenile mortality and egg hatch of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. **Nematologia Mediterrânea**, Bari, v. 25, n. 1, p. 49-54, 1997.

KOMAROVA, E. P.; DAVIDOVICH, L. A. Involvement of phenolcarboxylic acids and phenol-oxidizing enzymes in rye defense necrotic response to leaf rust infection. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 44, n. 5, p. 749-755, Sept./Oct. 1997.

LAWTON, K. A.; FRIEDRICH, L.; HUNT, M.; WEYMANN, K.; DELANEY, T.; KESSMANN, H.; STAUB, T.; RYALS, J. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. **Plant Journal**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 71-82, July 1996.

LEE, S. E.; PARK, B. S.; KIM, M. K.; SIKCHOI, W.; KIM, H. T.; CHO, K. Y.; LEE, S. G.; LEE, H. S. Fungicidal activity of piperonaline a piperidine alkaloid derived from long pepper *Piper longum* L. against phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, Oxford, v. 20, n. 6, p. 523-528, July 2001.

MALKIN, R.; NIYOGI, K. Photosynthesis. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 568-628.

MARRIOTT, J.; BEEN, B. O.; PERKINS, C. The aethiology vascular streaking in cassava roots after harvest: association with water loss from wounds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 44, n. 1, p. 38-42, Jan. 1978.

MARTINS, E. M.; GUZZO, S. D.; CASTRO, R. M.; KYDA, K. Ação protetora do acibenzolar S-metil (Bion) em plantas de cafeeiro contra ferrugem. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEERAS, 24., 1998, Poços de Caldas, MG. **Anais...** Poços de Caldas, 1998. p. 177-178.

MATIELLO, J. B. **O café: do cultivo ao consumo**. São Paulo: Globo, 1991. cap. 24, p. 345-363. (Coleção do Agricultor – Grãos).

MAXEMIUC-NACCACHE, V. Alterações bioquímicas em folhas de *Coffea arabica* resistentes e suscetíveis à infecção por *Hemileia vastatrix* (ferrugem do cafeeiro). 1983. 145 p. Tese (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

MAXIMIUC-NACCACHE, V.; BRAGA, M. R.; DIETRICH, S. M. C. Chitinase and β -1, 3-glucanase changes in compatible and incompatible combinations between coffee leaf disks and coffee rust (*Hemileia vastatrix*). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 145-150, dez. 1992.

MAXEMIUC-NACCACHE, V.; DIETRICH, S. M. C. Changes in phenols and oxidative enzymes in resistant and susceptible *Coffea arabica* inoculated with *Hemileia vastatrix* (coffee rust). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 185-190, dez. 1985.

MENZIES, J. G.; EHRET, D. L.; GLASS, A. D. M.; HELMER, T.; KOCH, C. SEYWERD, F. Effects of soluble silicon on the parasitic fitness of

Sphaerotheca fuliginea on *Cucumis sativus*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 1, p. 84-88, Jan. 1991.

MISAGHI, I. J. **Physiology and biochemistry of plant-pathogen Interactions**. Tucson: University of Arizon, 1982.

MONACO, L. C. Consequences of the introduction of coffee leaf rust into Brazil. **Annals of the New York of Academic Science**, New York, v. 287, p. 57-71, Feb. 1977.

MORAES, M. G. Mecanismos de resistência adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 261-284, 1998.

MUELLER, W. C.; BECKMAN, C. H. Ultra structure of the phenol storing cells in roots of banana. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 4, n. 2, p. 187-190, 1974.

NICHOLSON, R. L.; WOOD, K. V. Phytoalexins and secondary products, where are they and how can we measure them? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, n. 2, p. 63-69, Aug. 2001.

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

NOJOSA, G. B. de A. Uso de silicatos e fosfitos na indução de resistência. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 1., 2002, São Pedro. **Anais...** São Pedro: ESALQ, 2002. p. 24-26.

OKEMO, P. O.; BARS, H. P.; VIVANCO, J. M. In vitro activities of *Maesa lanceolata* extracts against fungal plant pathogens. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 74, n. 3, p. 312-316, Apr. 2003.

PASCHOLATI, S. F. Resultados com resistência induzida no Brasil. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PATÓGENOS: aplicações no manejo integrado de fitodoeças, 1., 2002, Lavras. **Resumos...** Lavras: UFLA, 2002. p. 120.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de**

fitopatologia: princípios e conceitos. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 417-453.

POZZA, A. A.; ALVES, E.; POZZA, E. A.; CARVALHO, J. G. de; MONTANARI, M.; GUIMARÃES, P. T. G.; SANTOS, D. M. Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 185-188, mar./abr. 2004.

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

PRUSKY, D. The use of antioxidants to delay the onset of anthracnose and stem end decay in avocado fruits after harvest. **Plant Disease**, St. Paul, v. 72, n. 5, p. 381-384, May 1988.

RESENDE, M. L. V.; BARGUIL, B. M.; RESENDE, R. S.; BESERRA JÚNIOR, J. E. A.; SALGADO, S. M. L. Induction of resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. **The International Joint Workshop on PR-Proteins and Induced Resistance**. University of Fribourg, 2004. p. 79.

RIDE, J. P. Lignification in wounded wheat leaves in response to fungi and its possible role in resistance. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 5, n. 2, p. 125-128, 1975.

SANTOS, D. M. **Efeito do silício na intensidade da cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke) em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2002. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SCHNEPFLEITNER, C.; MAFFIA, L. A.; BARBOSA, L. C. A.; SANTOS, R. H. S. Germinação de uredosporos de *Hemileia vastatrix* e de *Uromyces appendiculatus* em presença de extratos de plantas medicinais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 407, 1996. Suplemento.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Potencial de extratos e óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência – plantas medicinais. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 124-125, jan./mar. 2003.

SEEBOLD, K. W. M.; DATNOFF, L. E.; CORREA, V. F. J.; KUCHARAK, T. A. & SNYDER, G. H. Effect of silicon rate and host resistance on blast, scald and yield of upland rice. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n. 8, p. 871-876, Aug. 2000.

SIEGEL, B. Z. Plant peroxidases – an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 12, n. 3, p. 303-312, Feb. 1993.

SOARES, R. M.; MARINGONI, A. C.; LIMA, G. P. P. Ineficiência de Acibenzolar-S-Methyl na Indução de Resistência de Feijoeiro Comum à Murcha-de-Curtobacterium. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 373-377, jul./ago. 2004.

SOLORZANO, E.; HERNANDEZ, S.; FERNANDEZ, E.; FERNANDEZ, A. Inducción sistémica de peroxidases y polifenoloxidasas frente a *Alternaria solani* en tomate por acción del Na PO₄. **Revista de Protección Vegetal**, La Habana, v. 11, n. 1, p. 29-32, 1996.

STADNIK, M. J. **Induction of resistance in wheat by a benzothiadiazole derivative against the powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*): practical aspects and mechanisms of action**. 1999. Thesis (PhD - University of Hohenheim, Stuttgart).

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1998.

TALAMINI, V.; SOUZA, P. E.; POZZA, E. A.; SILVA, A. M.; BUENO FILHO, J. S. S. Progresso da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro (*coffea arabica* l.) em diferentes lâminas de irrigação e diferentes parcelamentos de adubação. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 55-62, jan./mar. 2001.

WHEATLEY, C. **Studies on cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root post-harvest physiological deterioration**. 1982. 242 p. Thesis (Ph.D) - University of London, London.

YIN, Mei-chin; TSAO, Shih-ming. Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species. **Internacional Journal of Food Microbiology** Amsterdam, v. 49, n. 1/2, p. 49-56, Aug. 1999.

ZAMBOLIM, L.; MARTINS, M. C. Del P.; CHAVES, G. M. **Café. Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 131, p. 64-75, nov. 1985.

ZAMBOLIM, L.; RIBEIRO DO VALE, F. X.; PEREIRA, A. A.; CHAVES, G. M. **Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças**. In: RIBEIRO DO VALE, F. X.; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: UFV, 1997. v. 2, p. 83-179.

CAPÍTULO 2

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DO CAFEIRO CONTRA *Cercospora coffeicola* POR INDUTORES ABIÓTICOS

RESUMO

AMARAL, Daniel Rufino. Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos. In: **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora Coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais**. 2005. Cap. 2. p. 25-57. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

O principal método de controle da cercosporiose do cafeeiro, cujo agente etiológico é o fungo *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke, é o uso de fungicidas, no entanto, métodos alternativos, como a nutrição mineral, podem auxiliar no manejo da doença. Dentre os nutrientes minerais utilizados no manejo de doenças o silício destaca-se por reduzir a severidade de importantes doenças em várias culturas. Neste trabalho, silicato de potássio foi testado nas doses de 0,75, 1,5, 3,0 e 6,0 mL/L de água em mudas de cafeeiro. Quando se comparou as doses de silicato aos tratamentos adicionais, ASM (0,2 g/L) e testemunha absoluta, as doses de 0,75 e 1,5 mL/L não apresentaram diferença significativa, enquanto as demais doses foram significativas, com maiores valores de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). A dose de 1,5 mL/L de água propiciou menor AACPD final, com uma diminuição de 47% na doença quando comparado a testemunha inoculada. A diminuição na doença com a utilização de ASM foi de 43% quando comparada a testemunha inoculada. Nos testes bioquímicos, pode-se observar que a pulverização da dose de silício 1,5 mL/L proporcionou em cafeeiro um aumento na atividade de peroxidase, com pico aos 5 DAP (dias após a pulverização), sem inoculação. Inoculadas, as plantas apresentaram pico dessa enzima 10 DAP e 5 dias após a inoculação. Na atividade de polifenoloxidase, o pico de atividade ocorreu aos 15 DAP, sem inoculação. Quando se inoculou o patógeno o pico de atividade ocorreu aos 10 DAP e 5 dias após a inoculação. O maior acúmulo de lignina, ocorreu em plantas tratadas com silicato de potássio 1,5 mL/L e inoculadas com o patógeno. No dosagem de 1,5 mL/L o silicato de potássio proporcionou um aumento na espessura da cutícula, provavelmente pela maior quantidade de cera na superfície inferior das folhas.

* Comitê Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende (Orientador), Mário Sobral de Abreu-UFLA.

ABSTRACT

AMARAL, Daniel Rufino. Induction of resistance in coffee plants against *Cercospora coffeicola* by abiotics elicitors. In: **Induction resistance in coffee against *Cercospora Coffeicola* by abiotics elicitors and plant extracts**. 2005 Cap. 2. p. 24-57. Dissertation for the Master Degree in Phytopathology – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The principal method for the control of brown eye spot of coffee, whose etiologic agent is the fungus *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke, is the use of fungicides; however, alternative methods, as mineral nutrition can aid in the management of this disease. Among the nutrients, silicon stands for reducing the severity of important diseases in several crops. In this work, potassium silicate was tested at doses of 0.75, 1.5, 3.0 and 6.0 mL/L of water. When silicate doses were compared to the additional treatments ASM (0.2 g/L) and the absolute control, doses of 0.75 and 1.5 mL/L were not significantly different, while the other doses were significant, with higher values of area under the disease progress curve (AUDPC). The dose of 1.5 mL/L of water provided lower final AUDPC, with a decrease of 47% in the disease when compared to the inoculated control. The decrease of the disease with the use of ASM was of 43% when compared to the inoculated control. In the biochemical tests it can be observed that the pulverization of the dose of silicon 1,5 mL/L provide in coffee an increase in the peroxidase activity, with pick to 5 DAP (Days after the pulverization) without inoculation. Inoculated the plants they presented pick of that enzyme 10 DAP and 5 days after the inoculation. In the polyphenoloxidase activity the activity pick happened to 15 DAP without inoculation. When the pathogen the activity pick was inoculated it happened to 10 DAP and 5 days after the inoculation. The largest lignin accumulation happened in treated plants with potassium silicate 1,5 mL/L and inoculated with the pathogen. In the doses of 1,5 mL/L the potassium silicate provided an increase in he thickness of the cuticle, probably for the largest amount of wax in the inferior surface of the leaves.

* Guidance Committe: Mário Lúcio Vilela de Resende (Major Professor), Mário Sobral de Abreu-UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Desde que foi descoberto pelo homem, o café assumiu importante papel na economia e na vida dos povos que o cultivam, inclusive o Brasil que, devido às condições favoráveis à cultura, logo se tornou o maior produtor, papel desempenhado até os dias atuais. O país, além de maior produtor, é também o maior exportador. Entretanto, há uma série de fatores que podem levar à diminuição desta produção. Entre eles pode-se citar as doenças com destaque para cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk & Cooke), entre outras (Matiello & Almeida, 1997).

O principal método de controle dessa enfermidade é o uso de fungicidas, no entanto, métodos alternativos, como a nutrição mineral, podem auxiliar no manejo da doença. Dentre os nutrientes minerais utilizados no manejo de doenças, o silício destaca-se por reduzir a severidade de importantes doenças em várias culturas (Epstein, 1999).

O silício tem se mostrado um indutor de resistência em plantas a patógenos muito eficiente. Ele pode atuar na constituição de barreira física, com o acúmulo de lignina e cera, de maneira a impedir a penetração de fungos e afetar os sinais entre o hospedeiro e o patógeno, resultando na ativação mais rápida e extensiva dos mecanismos de defesa pré e pós-formados da planta, como também na indução de proteínas relacionadas a patogênese (PRs), peroxidases e polifenoloxidasas (Chérif et al., 1992; Chérif et al., 1994; Epstein, 1999).

Estudos foram realizados com plantas de café suplementadas com 1 g de silicato de cálcio incorporado a 1 kg de substrato, verificando redução de 43% no total de lesões por planta e de 63,2% nas folhas lesionadas pela

cercosporiose, em relação à testemunha (Pozza et al., 2004). Em plantas de pepinos, contra diversos patógenos, observou-se a produção de compostos fenólicos, quitinases, peroxidases e polifenoloxidasas em plantas suplementadas com 100 mg.kg^{-1} de silício na forma de silicato de potássio, em solução nutritiva (Chérif et al., 1994; Fawe et al., 1998).

De modo geral, este trabalho objetivou testar o silicato de potássio na indução de resistência contra a cercosporiose do cafeeiro e elucidar quais os possíveis mecanismos envolvidos nas respostas de defesa destas plantas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos indutores abióticos

Os indutores abióticos utilizados foram acibenzolar-S-methyl (Bion[®]), adquirido junto a Syngenta Proteção de Cultivos (São Paulo, SP) e silicato de potássio adquirido da Agrichem do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, SP.

2.2 Obtenção do fungo *Cercospora coffeicola* e inoculação

O patógeno foi obtido de folhas naturalmente infectadas coletadas em lavoura no campus da UFLA. As folhas foram lavadas superficialmente em água corrente e, em seguida, transferidas para câmara úmida por 12 horas. Os conídios formados foram retirados da superfície foliar com pincel de ponta macia. A concentração da suspensão de conídios para as inoculações foi ajustada em câmara de contagem de “Newbauer”, para 15.000 conídios/mL. A suspensão de conídios foi pulverizada sobre as folhas de mudas de cafeeiro e uma pequena alíquota da mesma retirada, em cada ocasião, para a realização do teste de germinação em lâmina escavada.

2.3 Obtenção do cafeeiro para indução de proteção contra *Cercospora coffeicola*

Mudas de cafeeiro cultivar Topázio, conhecidamente suscetível a *Cercospora coffeicola*, foram produzidas em substrato comercial Plantmax-café. As mudas foram suplementadas com aplicações de Iogen[®] (Fertilizantes Mitsui S. A., Poços de Caldas, MG) e uma adubação com 0,5g de fertilizante de liberação lenta (formulação 4-14-8 de NPK) para prevenir deficiências de nutrientes. As mudas foram transplantadas para vasos de 3 L, contendo substrato

2:1 (terra de subsolo: esterco bovino curtido) e mantidas em condições de casa de vegetação no Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.4 Experimentos com as doses de silicato de potássio

Foram realizados três experimentos com os produtos citados anteriormente para a verificação de seus efeitos no controle de *C. coffeicola*.

2.4.1 Experimento I: Avaliação da toxidez direta dos eliciadores abióticos a *Cercospora coffeicola*

O primeiro experimento foi conduzido para verificar o efeito das doses de silicato de potássio no crescimento micelial de *C. coffeicola*. O meio utilizado foi o batata-dextrose-ágar (BDA). Os produtos foram esterilizados sob luz ultravioleta violeta por 30 minutos e, em seguida, adicionados ao meio autoclavado nas dosagens de 0,75; 1,5; 3,0 e 6,0 mL de silicato de potássio/L de água. Os meios foram distribuídos em placas de petri e inoculados com disco de meio de cultura de 0,5 cm contendo micélio do fungo. Na testemunha, utilizou-se apenas BDA. As placas foram transferidas para a câmara de crescimento com temperatura de 23°C e fotoperíodo de 12 horas. O ensaio foi estabelecido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 8 repetições de uma placa cada. As avaliações foram realizadas de 5 em 5 dias após a inoculação. O índice de crescimento micelial (ICM) foi calculado e a análise estatística foi realizada utilizando o teste de Scott & Knott (1974) no programa SISVAR.

O índice de crescimento micelial (ICM) foi determinado pela adaptação da fórmula proposta por Maguire (1962):

$$ICM = \frac{C_1}{N_1} + \frac{C_2}{N_2} + \dots + \frac{C_n}{N_n}, \text{ sendo}$$

ICM = índice de crescimento micelial

C_1, C_2, C_n = crescimento micelial do fungo na primeira, segunda e última avaliação

N_1, N_2, N_n = número de dias após a inoculação

2.4.2 Experimento II: Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos

O segundo experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados (DBC), com onze tratamentos e três repetições com unidade experimental de seis plantas. As mudas foram mantidas em casa de vegetação à temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ até o final do experimento. Foram utilizados os seguintes tratamentos:

- 01) testemunha absoluta: plantas de café não inoculadas e não pulverizadas com indutores;
- 02) testemunha inoculada: plantas de café não pulverizadas com indutores e inoculadas com *C. coffeicola*;
- 03) testemunha ASM: plantas de café pulverizadas com 0,4 de ASM/L de água e inoculadas com *C. coffeicola*;
- 04) silicato de potássio 0,75: plantas de café pulverizadas com 0,75mL de silicato de potássio/L de água destilada e inoculadas com *C. coffeicola*;
- 05) silicato de potássio 1,50: plantas de café pulverizadas com 1,50mL de silicato de potássio/L de água destilada e inoculadas com *C. coffeicola*;
- 06) silicato de potássio 3,0: plantas de café pulverizadas com 3,0mL de silicato de potássio/L de água destilada e inoculadas com *C. coffeicola*;
- 07) silicato de potássio 6,0: plantas de café pulverizadas com 6,0mL de silicato de potássio/L de água destilada e inoculadas com *C. coffeicola*;
- 08) cloreto de potássio 0,33: plantas de café pulverizadas com 0,33g de cloreto de potássio/L de água destilada e inoculadas com *C. coffeicola*;

- 09) cloreto de potássio 0,66: plantas de café pulverizadas com 0,66g de cloreto de potássio/L de água destilada e inoculadas com *C. coffeicola*;
- 10) cloreto de potássio 1,32: plantas de café pulverizadas com 1,32g de cloreto de potássio/L de água destilada e inoculadas com *C. coffeicola*;
- 11) cloreto de potássio 2,64: plantas de café pulverizadas com 2,64g de cloreto de potássio/L de água destilada e inoculadas com *C. coffeicola*;

2.4.3 Experimento III: Caracterização dos mecanismos envolvidos na resposta de defesa do cafeeiro pelas melhores doses de silicato de potássio

Um novo experimento foi realizado com mudas, utilizando-se desta feita, apenas os tratamentos e dosagens dos experimentos com eliciadores abióticos, que propiciaram os mais altos níveis de proteção contra *C. coffeicola* nos experimentos 1 e 2. Este experimento montado em DBC, com 3 blocos e unidade experimental de 8 plantas, foi realizado visando fornecer material foliar utilizado para avaliar fatores bioquímicos envolvidos na resistência, conforme detalhados nos próximos itens.

2.5 Preparo de extratos foliares para avaliação de proteínas totais e enzimas

A partir dos tecidos foliares coletados, procedeu-se a maceração dos mesmos em tampão acetato de sódio, na proporção 1:3 (gramas de tecido foliar para mL de tampão). Estes extratos foram utilizados para a determinação de proteínas totais, pelo método de Bradford (1976), quantificação da atividade das enzimas peroxidases e polifenoloxidasas e de lignina.

2.6 Determinação dos níveis de proteínas totais, peroxidases e polifenoloxidasas

Os níveis de proteína total dos extratos foram determinados por meio do método de Bradford (1976), utilizando soluções de albumina sérica bovina (BSA) para fazer a calibração da curva padrão do reagente de Bradford.

A determinação da atividade de peroxidases e polifenoloxidasas foi realizada de acordo com a metodologia de Kar & Mishra (1976), utilizando-se guaicol como substrato para enzimas peroxidases na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e na ausência de H_2O_2 , utilizando, como substrato, pirocatecol para a determinação da atividade das enzimas polifenoloxidasas.

2.7 Determinação de lignina

Para o conteúdo de lignina utilizou-se metodologia descrita por Stadnik (1999), por meio do ensaio com ácido tioglicólico (Monties, 1989), em que 0,2 g dos tecidos foliares foram macerados em almofariz e incubados por 24 horas em solução de acetona 85%; em seguida, os tecidos foram secos à temperatura ambiente. Uma mistura de ácido tioglicólico e ácido clorídrico 2N (1: 10, v/v) foi adicionada a amostra de tecidos homogeneizados (5mL da mistura para 15 mg de tecidos) por 4 horas, a 100°C. Realizou-se uma lavagem com água em seguida e extraiu-se o ácido lignotioglicolítico a partir do precipitado com 5 mL de hidróxido de sódio (NaOH 0,5N) por 18 horas. As amostras foram então centrifugadas, acidificadas com HCl concentrado e incubadas a 4°C por 4 horas. Em seguida, procedeu-se nova centrifugação e o precipitado foi re-suspensão em NaOH 0,5N e a absorbância dessa solução determinada a 280_{nm}.

2.8 Preparo das amostras para observação em microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Depois da coleta de folhas, fragmentos com 0,5 cm X 0,5 cm delas foram imersos em solução fixativa, pH 7,2 e armazenados em geladeira. Em seguida, as amostras foram lavadas com tampão cacodilato (0,05mM) por três

vezes, durante 10 minutos. As secções obtidas foram transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio 1% em água por duas horas e, subseqüentemente, desidratadas em uma série de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100% por três vezes) e depois levadas para o aparelho de ponto crítico.

Com a ajuda de uma fita de carbono, os espécimes foram colocados sobre “*stubs*” revestidos por uma película de papel alumínio, cobertos com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO Evo 40. Foram geradas e registradas digitalmente, em aumentos variáveis, diversas imagens para cada amostra e as imagens geradas foram gravadas e abertas no software Photopaint, do pacote Corel Draw 9, para preparação das pranchas com eletromicrografias.

2.9 Avaliação da severidade da doença

As avaliações de severidade da doença foram realizadas quinzenalmente, num total de seis avaliações, seguindo escala proposta por Oliveira et al (2001). Calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença para cada tratamento, seguindo a seguinte fórmula:

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} [(X_i + X_{i+1}) / 2] (t_{i+1} - t_i)$$

em que: X é a intensidade da doença, t o tempo e n o número de avaliações no tempo (Campbell & Madden, 1990)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito das doses de silicato e cloreto de potássio no crescimento de *C. coffeicola*.

O crescimento do fungo foi inversamente proporcional ao aumento das doses dos produtos. Com o aumento das doses de silicato de potássio e cloreto de potássio, observou-se um menor crescimento micelial. (Figura 1).

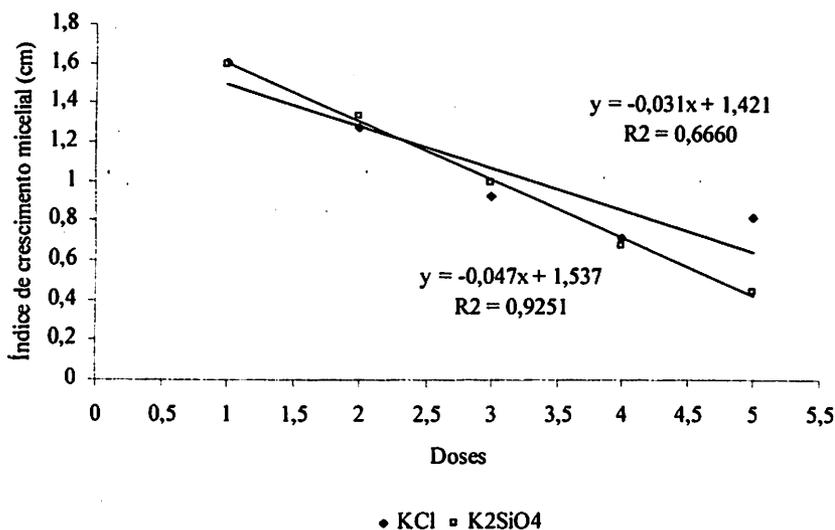


FIGURA 1 Efeito *in vitro* de doses de silicato e cloreto de potássio, medido pelo índice de crescimento micelial (ICM) do fungo. Doses: 0; 0,75; 1,5; 3 e 6 mL/L de silicato de potássio e 0; 0,36; 0,72; 1,44 e 2,88 g/L de cloreto de potássio.

O desenvolvimento do fungo foi afetado diretamente quando utilizaram-se silicato e cloreto de potássio, caracterizando um efeito fungitóxico (Figura 1). Os fungos *Hemileia vastatrix* e *Phoma* sp. também foram afetados diretamente em testes de germinação de esporos e crescimento micelial, quando em contato com indutores de resistência (Nojosa, 2003).

Geralmente, produtos indutores de resistência não atuam sobre o patógeno, contudo, em alguns casos os indutores podem atuar induzindo resistência e afetar o patógeno diretamente, dependendo das dosagens utilizadas (Nojosa, 2003). Jackson et al. (2000) observaram que o fosfito, em doses inferiores a 2 mM, atua como indutor de resistência, e em doses superiores a essa, apresenta toxidez direta sobre o patógeno.

De acordo com Kataria et al. (1997) indutores de resistência conhecidos como os ácidos salicílico, nitrosalicílico e ASM inibiram o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, em diferentes doses.

3.2 Doses de silicato de potássio na severidade da doença

A área abaixo da curva de progresso da doença para cercosporiose (AACPD) apresentou diferença significativa, para as doses de silicato de potássio utilizadas. Observou-se que houve um decréscimo até a dose de 2,27 mL/L, dose ótima observada como ponto mínimo, seguida de um aumento na AACPD nas doses maiores (Figura 2).

O decréscimo observado foi da ordem de 47% da dose 1,5 mL/L para a dose zero. Moraes (2004) observou menor incidência de antracnose no feijoeiro com aplicação via solo de silicato de cálcio. A menor incidência foi observada para a maior dose de silicato de cálcio. Utilizando sulfato de cobre via foliar, a mesma autora observou que a menor severidade foi observada para maior dose de sulfato de cobre.

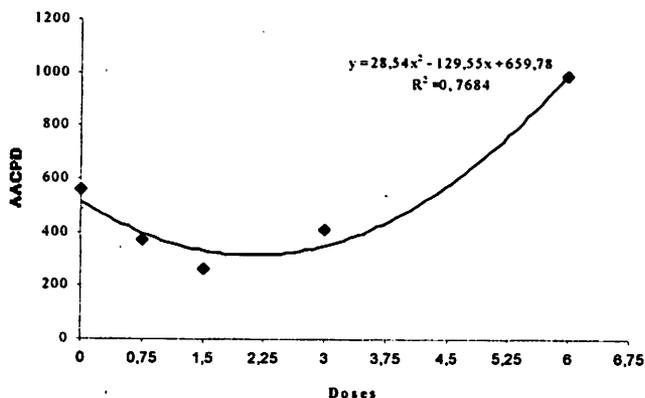


FIGURA 3 Área abaixo da curva de progresso da doença, em função das doses de silicato de potássio aplicado via foliar.

Não houve diferença entre as doses de potássio na forma de cloreto, utilizadas nas mesmas proporções para aquelas utilizadas nas doses de silicato de potássio. Entre os tratamentos adicionais, pode-se observar que todas as doses de potássio diferiram significativamente, apresentando AACPD maiores que os tratamentos com ASM e a testemunha absoluta. Em relação às doses de silicato, observou-se que não houve significância para as doses de 0,75 e 1,5 mL/L de água para os adicionais, ASM e testemunha absoluta. Somente as maiores doses 3,0 e 6,0 mL/L foram significativamente maiores quando comparadas aos adicionais.

Plantas de pepino, cultivadas em solução nutritiva, apresentaram redução na intensidade de duas doenças, cujos agentes etiológicos foram *Sphaerotheca fuliginea* e *Pythium ultimum* (Chérif et al., 1992; Menzies et al., 1991). No caso de *S. fuliginea*, o silicato de sódio (Na_2SiO_3), nas concentrações estudadas (0,5, 0,95, 1,4, 1,85, 2,3, 3,2 e 4,1 mM de Si), proporcionou menor número de colônias por folha, menor área das colônias por folhas e menor

porcentagem de germinação dos conídios com o aumento das doses. O silicato de potássio reduziu a mortalidade, podridão de raiz e perdas na produção atribuída ao *P. ultimum*, porém, não houve diferença entre as duas doses estudadas (1,7 e 3,4 mM Si).

O aumento observado na AACPD com o aumento das doses de silicato de potássio deve-se, provavelmente, ao fato do produto utilizado conter em sua constituição, uma percentagem de potássio. De acordo com Malavolta (1980) altas concentrações de K interferem na absorção de cálcio e magnésio. Pozza et al. (2001) observaram aumento da cercosporiose do cafeeiro com o aumento das doses de adubação com potássio, desbalanceando outros nutrientes como o cálcio.

O progresso da cercosporiose no tempo teve influência para a aplicação de silicato de potássio (Figura 3).

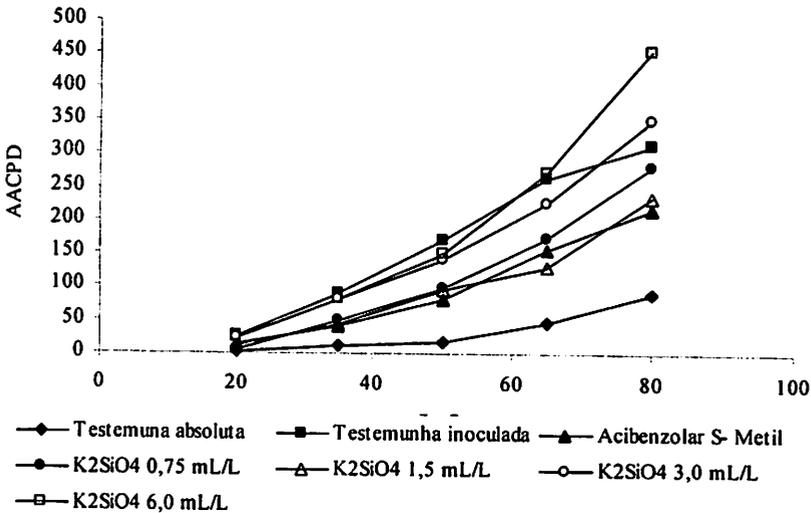


FIGURA 3 Progresso da cercosporiose de 20 a 80 dias após a pulverização (DAP) dos eliciadores abióticos.

Pôde-se observar, aos 35 dias após a pulverização dos tratamentos, que em plantas tratadas com Si na dose de 1,5 mL/L, a diminuição da AACPD foi de 53% em relação a testemunha inoculada. Plantas que não foram inoculadas e não tratadas (testemunha absoluta) e as plantas tratadas com ASM apresentaram uma diminuição de doença em 89% e 56%, comparadas com a testemunha inoculada, respectivamente (Figura 3).

Aos 50 dias, a diminuição na percentagem da doença em plantas pulverizadas com Si 1,5 mL/L de água comparadas com testemunha inoculada foi de 45%. Observou-se uma tendência na diminuição da percentagem de doença para este tratamento, culminando, aos 80 dias, com uma diminuição na percentagem de doença de 25% (Tabela 1).

TABELA 1. Efeito de doses de silicato de potássio (K_2SiO_4) na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da cercosporiose do cafeeiro.

Tratamentos/DAP*	20 dias ¹	35 dias	50 dias	65 dias	80 dias
Testemunha absoluta	4,05 ^a	10,45 ^a	17,85 ^a	45,98 ^a	88,22 ^a
Testemunha inoculada	25,44 ^b	90,25 ^c	170,24 ^c	263,66 ^d	310,72 ^c
ASM	14,33 ^a	40,55 ^b	80,03 ^b	156,72 ^b	215,94 ^b
K_2SiO_4 – 0,75 mL/L	6,11 ^a	49,55 ^b	99,33 ^b	174,55 ^b	279,89 ^c
K_2SiO_4 – 1,5 mL/L	11,83 ^a	42,16 ^b	94,05 ^b	130,69 ^b	233,33 ^b
K_2SiO_4 – 3,0 mL/L	23,05 ^b	80,68 ^c	140,47 ^c	225 ^c	349,22 ^c
K_2SiO_4 – 6,0 mL/L	22,58 ^b	79,85 ^c	150,83 ^c	270,54 ^c	455 ^d

¹ Letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$)

*dias após a pulverização

Vários trabalhos relatam a eficiência de silicatos em reduzir doenças, contudo, esses efeitos são mais estudados em plantas acumuladoras de silício, como gramíneas e em plantas intermediárias no acúmulo de silício, como as curcubitáceas (Epstein, 1999; Fawe et al., 1998; Ma et al., 2001). No cafeeiro, Santos (2002) adicionou silicato de cálcio e sódio ao substrato para controlar

Cercospora coffeicola e observou uma diminuição na porcentagem de doença de aproximadamente 24% e 60%, respectivamente.

3.3 Atividade de enzimas

3.3.1 Peroxidases

A atividade de peroxidases da testemunha absoluta foi menor que a atividade em todos os outros tratamentos (Figuras 4, 5 e 6). As plantas em que foram aplicados os indutores e inoculadas com *C. coffeicola* apresentaram atividade de peroxidase maior que aquelas nas quais foram aplicados somente os indutores, com exceção dos tratamentos com silício, que apresentaram atividade maior quando foram aplicados isoladamente (Figuras 4, 5 e 6). Plantas tratadas com ASM e inoculadas apresentaram maior atividade que aquelas plantas que foram tratadas com indutor e não foram inoculadas (Figura 4). Plantas tratadas com silicato de potássio na dose 1,5 mL/L apresentaram maior atividade aos 5 dias, na primeira coleta (Figura 5). Quando a dose utilizada foi 0,75 mL/L, o pico de atividade da enzima ocorreu aos 15 dias, na 3ª coleta (Figura 6). Em *C. arabica* cv. Catuaí, várias isoenzimas de peroxidase foram detectadas extracelularmente em suspensões celulares relacionadas diretamente com o desenvolvimento das células cultivadas (Queiroz-Figueroa & Loyola-Vargas, 2001).

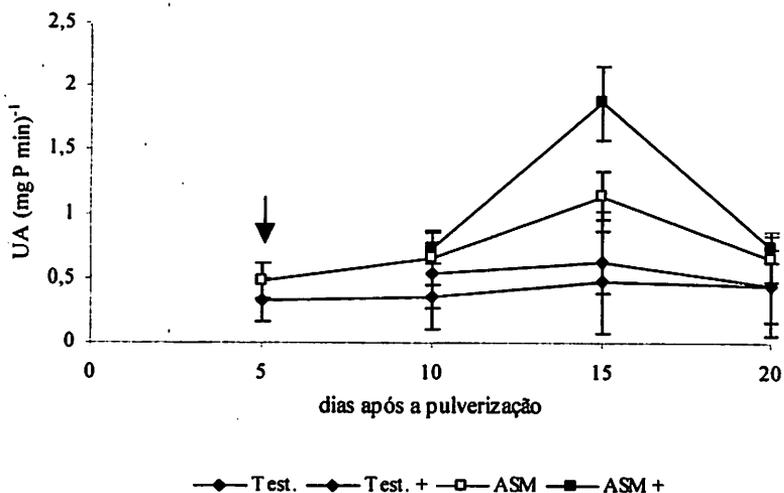


FIGURA 4 Efeito de ASM sobre a atividade de peroxidases (UA - unidade de atividade da enzima/mg de proteína) em folhas de café. Tratamentos: Test – testemunha; Test+ - testemunha inoculada com *C. coffeicola*; ASM – Acibenzolar –S-metil; ASM+ - Acibenzolar – S-metil inoculada com *C. coffeicola*. A seta indica o momento da inoculação. Barras representam a média \pm desvio padrão.

Segundo Nojosa (2003), a atividade de peroxidase em tecidos infectados e tecidos intermediários foi cerca de 11,6 e 5,8 vezes superior àquela encontrada em tecidos saudáveis, respectivamente. Neste mesmo estudo foi constatado que plantas tratadas com os produtos ASM, AS e fosfito de potássio, isoladamente e inoculadas com *H. vastatrix*, apresentaram atividade superior às testemunhas absoluta e inoculada.

A atividade de peroxidases em plantas tratadas com ASM foi maior na terceira coleta, aos 15 dias (Figura 4). Em alguns patossistemas, esse pico de atividade ocorre antes.



Em plantas de tomate tratadas com ASM sem inoculação e inoculadas o pico de produção dessa enzima ocorreu aos 9 dias (Ribeiro Júnior et al., 2004). No patossistema tomate X *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, o pico de atividade de peroxidases foi aos 14 dias (Soylu et al., 2003). Os tratamentos com ASM isoladamente e inoculado foram superiores aos observados na testemunha absoluta e inoculada (Figura 4).

Plantas tratadas com silicato de potássio na dose 1,5 mL/L, provavelmente tiveram pico de atividade de peroxidases antes do 5º dia ou no próprio 5º dia. Isto pode ser explicado pelo fato de, logo na primeira coleta, ter-se observado a maior atividade da enzima (Figura 5). Em plantas de pepino mantidas em solução nutritiva com silicato de potássio 1,7 mM (100 ppm) e inoculadas com *Pythium* spp., observou-se que a atividade dessa enzima aumenta a partir de 2 dias de inoculação e tem sua máxima atividade aos 4 dias (Chérif et al., 1994).

O máximo de atividade da peroxidase observado neste experimento foi 5 dias após a pulverização do indutor, sem a inoculação. Quando foram inoculadas, as plantas tiveram a primeira coleta 5 dias após a inoculação e 10 dias após a pulverização do indutor. Nessa coleta observou-se a maior atividade da enzima (Figura 5).

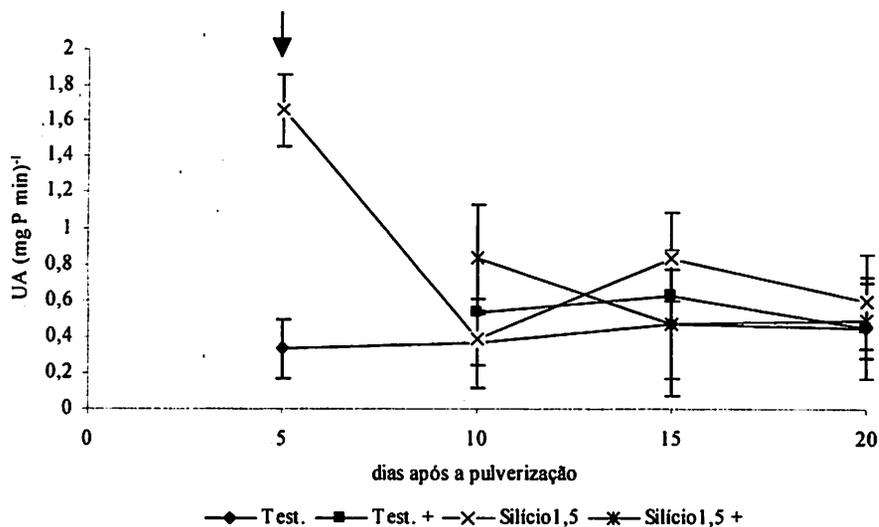


FIGURA 5 Efeito de Si sobre a atividade de peroxidases (UA - unidade de atividade da enzima/ mg de proteína) em folhas de cafeeiro. Tratamentos: Test - testemunha; Test+ - testemunha inoculada com *C. coffeicola*; silício 1,5 - silicato de potássio 1,5 mL/L; silício 1,5 - silicato de potássio 1,5 mL/L inoculada com *C. coffeicola*. A seta indica o momento da inoculação. Barras representam a média \pm desvio padrão.

As plantas pulverizadas com silicato de potássio na dose 0,75 mL/L tiveram comportamento similar como aquelas tratadas com 1,5 mL/L de Si e sem inoculação, quando observou-se a maior atividade da enzima na primeira coleta. No entanto, quando o mesmo tratamento foi seguido da inoculação do patógeno, a maior atividade da enzima somente foi observada na última coleta, aos 20 dias (Figura 6).

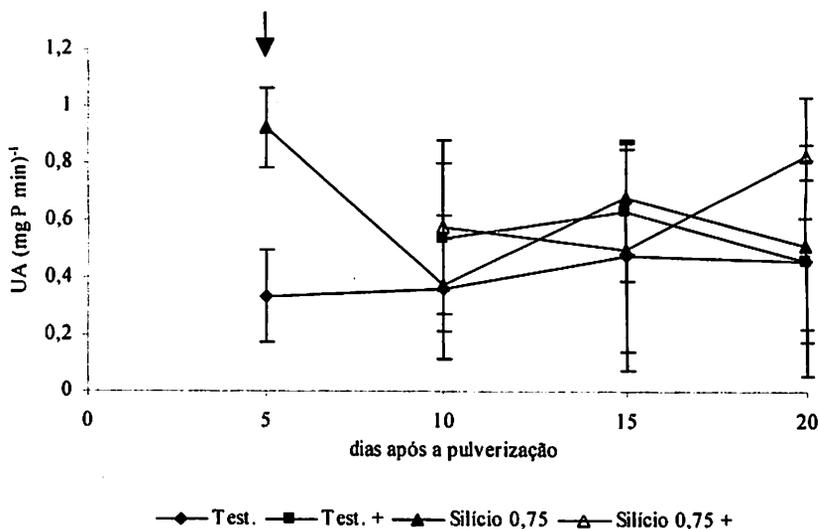


FIGURA 6 Efeito de Si sobre a atividade de peroxidases (UA - unidade de atividade da enzima/ mg de proteína) em folhas de cafeeiro. Tratamentos: Test – testemunha; Test+ - testemunha inoculada com *C. coffeicola*; silício 0,75 – silicato de potássio 0,75 mL/L; silício 0,75 – silicato de sódio 0,75 mL/L inoculada com *C. coffeicola*. A seta indica o momento da inoculação. Barras representam a média \pm desvio padrão.

3.3.1 Polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase em plantas tratadas com ASM foi maior aos 10 dias da pulverização do indutor e 5 dias após a inoculação. Em seguida, nas outras coletas, a atividade dessa enzima caiu. A atividade da polifenoloxidase em plantas que somente foram inoculadas ocorreu mais tardiamente, aos 15 dias. As plantas que somente foram tratadas com o indutor tiveram pico de produção da enzima aos 15 dias (Figura 7).

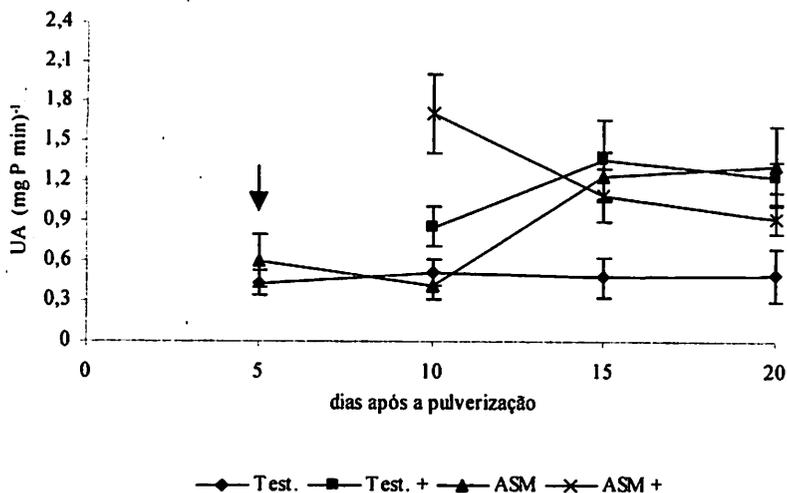


FIGURA 7 Efeito de ASM sobre a atividade de polifenoloxidasas (UA - unidade de atividade da enzima/mg de proteína) em folhas de cafeeiro. Tratamentos: Test - testemunha; Test+ - testemunha inoculada com *C. coffeicola*; ASM - acibenzolar -S-metil; ASM+ - acibenzolar -S-metil inoculada com *C. coffeicola*. A seta indica o momento da inoculação. Barras representam a média \pm desvio padrão.

As plantas tratadas com o indutor silicato de potássio 1,5 mL/L e inoculadas com o patógeno tiveram maior atividade 10 dias após a pulverização do indutor e 5 dias após a inoculação do patógeno. Chérif et al. (1992) observaram um rápido início de atividade dessa enzima, logo aos 2 dias. O pico de atividade foi observado aos 4 dias (Figura 8).

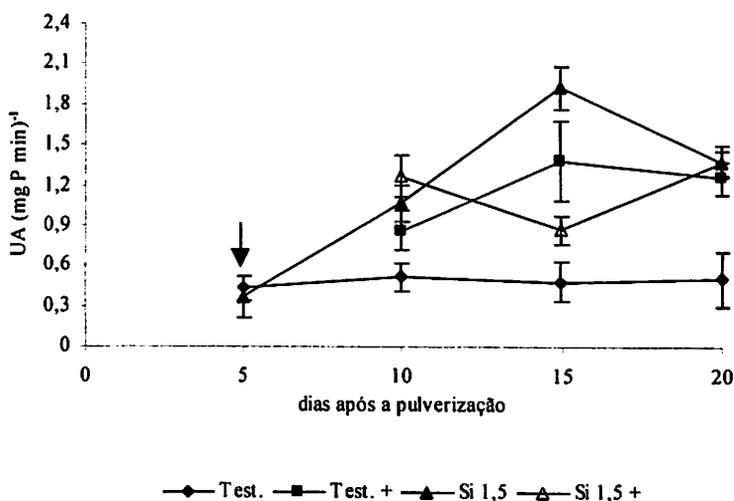


FIGURA 8 Efeito de Si sobre a atividade de polifenoloxidases (UA - unidade de atividade da enzima/ mg de proteína) em folhas de cafeeiro. Tratamentos: Test - testemunha; Test+ - testemunha inoculada com *C. coffeicola*; silício 1,5 - silicato de potássio 1,5 mL/L; silício 1,5 - silicato de potássio 1,5 mL/L inoculada com *C. coffeicola*. A seta indica o momento da inoculação. Barras representam a média \pm desvio padrão.

Plantas pulverizadas com silicato de potássio 0,75 mL/L tiveram maior atividade da enzima aos 10 dias sem inoculação e 20 dias com a inoculação. No entanto, pode ser observado que estas atividades foram inferiores àquela observada pelas plantas que foram somente inoculada pelo patógeno (Figura 9).

Em plantas de pepino em solução nutritiva contendo 100 ppm de Si e inoculadas, observou-se que o máximo de atividade dessa enzima ocorreu aos 6 dias após a inoculação de *Pythium* spp (Chérif et al., 1992).

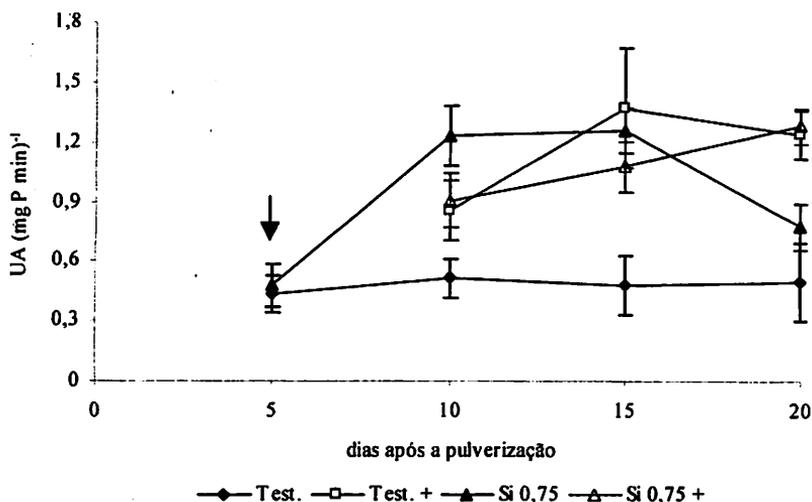


FIGURA 9 Efeito de Si sobre a atividade de polifenoloxidasas (UA - unidade de atividade da enzima/ mg de proteína) em folhas de cafeeiro. Tratamentos: Test - testemunha; Test+ - testemunha inoculada com *C. coffeicola*; silício 0,75 - silicato de potássio 0,75 mL/L; silício 0,75 - silicato de potássio 0,75 mL/L inoculada com *C. coffeicola*. A seta indica o momento da inoculação. Barras representam a média \pm desvio padrão.

3.4 Determinação de pigmentos

A quantidade de clorofila a, b e carotenóides para os tratamentos é apresentada nas Figuras 10 (A), 10 (B) e 10 (C), respectivamente.

A quantidade de clorofila a dos tratamentos que foram induzidos não apresentaram diferenças entre si e o tratamento que apresentou maior quantidade desse pigmento foi silicato de potássio 0,75 mL/L inoculado com o patógeno (Figura 12 A) (Scott & Knott, a 5%).

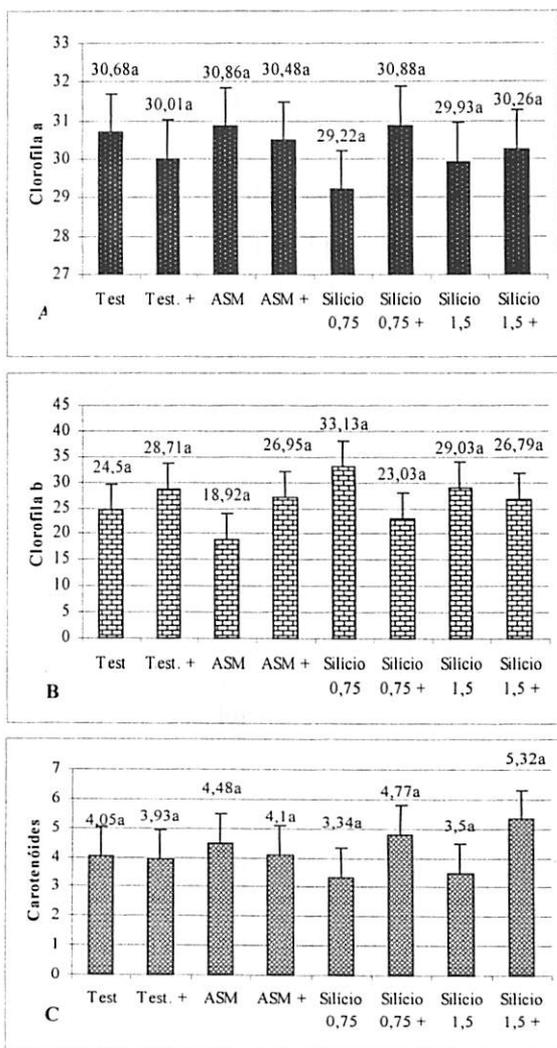


FIGURA 10 Quantidade de clorofila *a* (A), *b* (B) e carotenóides (C) em mudas de cafeeiro. Tratamentos: testemunha absoluta; testemunha inoculada com *C. coffeicola*; ASM – acibenzolar –S-metil; ASM+ - acibenzolar –S-metil inoculado com *C. coffeicola*; silício 1,5 – silicato de potássio 1,5 mL/L; silício 1,5 – silicato de potássio 1,5 mL/L inoculado com *C. coffeicola*; silício 0,75 – silicato de potássio 0,75 mL/L; Silício 0,75 – silicato de potássio 0,75 mL/L inoculado com *C. coffeicola*. Barras representam a média \pm desvio padrão.

As quantidades de clorofila *b* dos tratamentos também não tiveram diferença entre si. Novamente, aquele que apresentou maior valor desse pigmento foi o tratamento com silicato de potássio, neste caso sem a inoculação do patógeno (Figura 10 B).

As quantidades de carotenóides foi maior nos tratamento com silicato de potássio 0,75 e 1,5 mL/L, ambos inoculados com o patógeno. No entanto, novamente não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos (Figura 10 C).

Plantas de café pulverizadas com ASM e inoculadas com *Hemileia vastatrix* e fosfito sem inoculação apresentaram uma maior quantidade de clorofila *b* e carotenóides quando comparadas com a testemunha absoluta e a testemunha inoculada (Nojosa, 2003).

3.5 Lignina

O teor de lignina dos tratamentos com silicato de potássio 1,5 mL/L isoladamente e inoculado sobressaiu-se em relação aos demais, apresentando maior acúmulo dessa macromolécula. Os tratamentos silicato de potássio 0,75 mL/L e ASM, ambos inoculados com o patógeno, apresentaram um maior acúmulo de lignina que as testemunhas absoluta e inoculada (Figura 11).

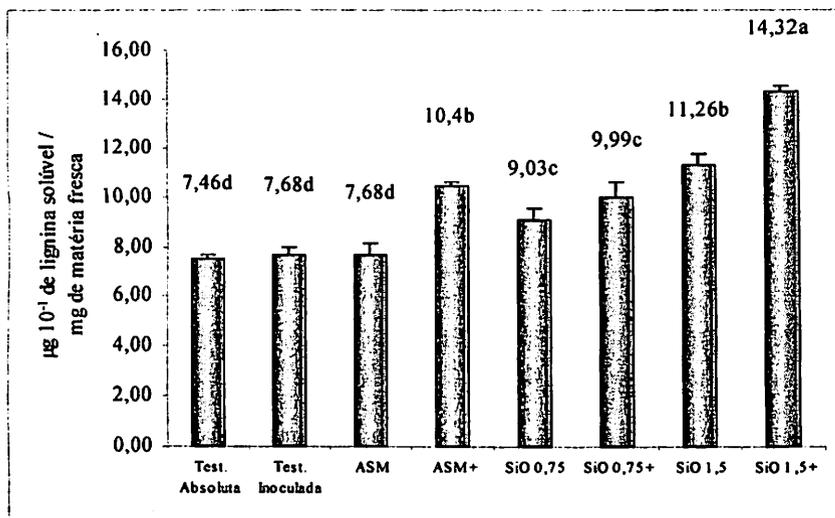


FIGURA 11. Acúmulo de lignina em mudas de cafeeiro 20 dias após pulverização dos tratamentos. Tratamentos: testemunha absoluta; testemunha inoculada com *C. coffeicola*; ASM – acibenzolar –S-metil; ASM+ - acibenzolar –S-metil inoculado com *C. coffeicola*; silício 1,5 – silicato de potássio 1,5 mL/L; silício 1,5 – silicato de potássio 1,5 mL/L inoculado com *C. coffeicola*; silício 0,75 – silicato de potássio 0,75 mL/L; silício 0,75 – silicato de potássio 0,75 mL/L inoculado com *C. coffeicola*. Barras representam a média ± desvio padrão.

No patossistema café-*H. vastatrix*, as plantas tratadas com os indutores, ASM, AS e fosfito e inoculados com *H. vastatrix*, com exceção do tratamento silicato+, apresentaram uma quantidade de lignina maior que os tratamentos que não foram inoculados com o fungo, não diferindo entre si. No entanto, o maior acúmulo de lignina foi observado em plantas inoculadas que não foram tratadas com indutores (Nojosa, 2003).

Em culturas como o trigo o ASM também não foi capaz de induzir acúmulo de lignina, porém, a aplicação de baixa concentração de nitrogênio

(30mg de N/Kg de solo) favoreceu o acúmulo de lignina nessa cultura (Stadnik, 1999).

3.6 Efeito do silício no espessamento da cutícula de folhas de cafeeiro a *C. coffeicola*

Por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), pode-se observar que uma cutícula mais espessa foi formada na superfície inferior das folhas tratadas com Si 1,5 mL/L do que em plantas tratadas com Si 0,75 mL/L e plantas não tratadas (Figura 14). Isso, provavelmente, ocorre pelo acúmulo de cera na superfície dessas folhas. Tal camada não foi mensurada, no entanto, os estômatos em plantas não tratadas foram mais visíveis do que em plantas tratadas com Si 1,5 mL/L (Figura 12 A, B e C).

Pozza et al. (2004) observaram em três variedades diferentes de cafeeiro tratadas com silicato de cálcio, um aumento no espessamento da cutícula dessas plantas, devido ao acúmulo de cera, principalmente na cultivar Catuaí. As outras duas variedades, Icatu e Mundo Novo, também apresentaram aumento de cera, mas estes foram inferiores àquele apresentado na primeira variedade.

A camada de cera formada pode ter tornado a superfície hidrofóbica, impedindo a formação do filme de água, importante para os processos vitais da patogênese como a germinação e a penetração, além de permitir o acúmulo de substâncias antifúngicas na cutícula (Pascholati & Leite, 1985; Pozza et al., 2004).

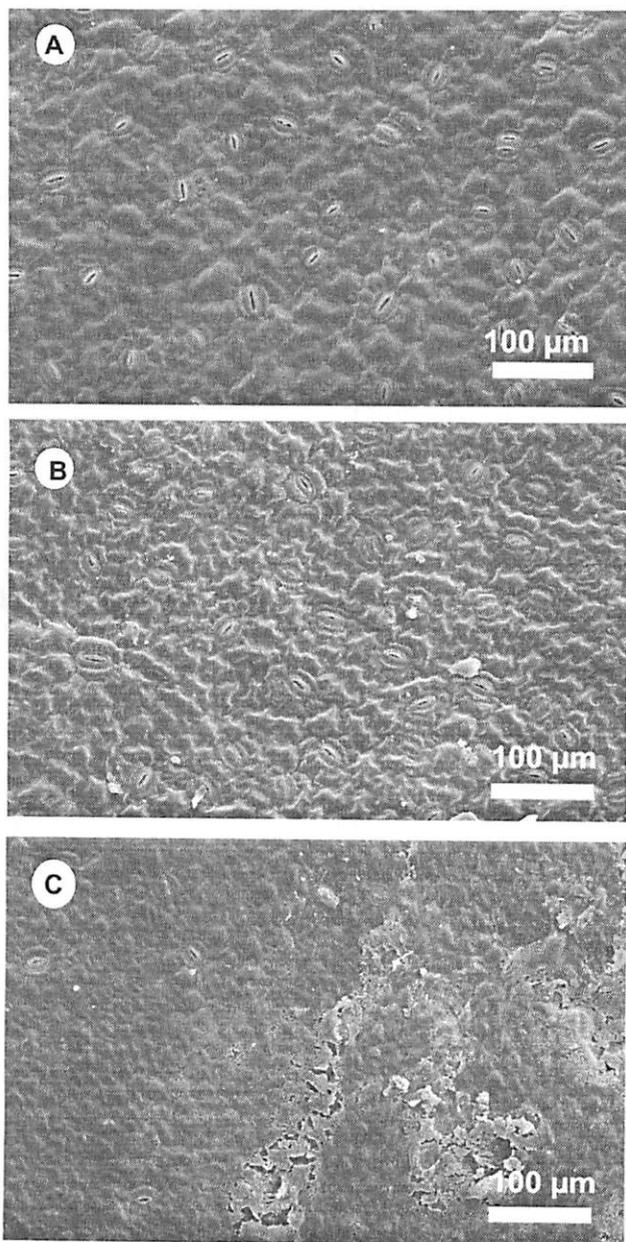


FIGURA 12 Superfície inferior de folhas de plantas de cafeeiro. A) testemunha; B) silicato de potássio 0,75 mL/L; C) silicato de potássio 1,5 mL/L.

4 CONCLUSÕES

O silicato de potássio e o cloreto de potássio exercem efeito direto ao patógeno com o aumento de suas doses.

O silicato de potássio, na dose 1,5 mL/L de água, confere proteção a mudas de cafeeiro diminuindo a severidade da doença.

Mudas de café tratadas com Si induzem a atividade de peroxidases entre 1 e 5 dias.

Mudas de café tratadas com Si induzem a atividade de polifenoloxidasas mais tardiamente, entre 10 e 15 dias após o tratamento.

O maior acúmulo de lignina ocorre na dose de 1,5 mL/L de água, em plantas de café inoculadas.

Ocorre um aumento na quantidade de cera em folhas tratadas com Si na dose de 1,5 mL/L de água.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. 1990. 532 p.

CHÉRIF, M.; ASSELIN, A.; BÉLANGER, R. R. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, n. 3, p. 236-242, Mar. 1994.

CHÉRIF, M.; BÉLANGER, R. R. Use of potassium silicate amendment in recirculating nutrient solutions to suppress *Pythium ultimum* on long english cucumber. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, n. 10, p. 1008-1011, Oct. 1992.

EPSTEIN, E. Silicon. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo alto, v. 50, p. 641-664, 1999.

FAWE, A.; MENZIES, J. G.; CHERIF, M.; BÉLANGER, R. R. Silicon and disease resistance in dicotyledons. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDÖRFER, G. H. (Ed.) **Silicon in agriculture**. Elsevier Science, 2001. p. 159-169.

KAR, M. E.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, Rockville, v. 57, n. 6, p. 315-319, dec. 1976.

KATARÍA, H. R.; WILMSMEIER, B.; BUCHENAUER, H. Efficacy of resistance inducers, free-radical scavengers and an antagonist strain of *Pseudomonas fluorescens* for control of *Rhizoctonia solani* AG-4 in bean and cucumber. **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, n. 6, p. 897-909, De c. 1997.

MA, J. F.; MIYAKE, Y.; TAKAHASHI, E. Silicon as a beneficial element for crop plants. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDÖRFER, G. H. (Ed.) **Silicon in agriculture**. Elsevier Science, 2001. p. 17-39.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and avaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar./Apr. 1962.

MALAVOLTA, E. **Elementos da nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 251 p.

MATIELLO J. B.; ALMEIDA S. R. Controle associado de doenças do cafeeiro. **Correio Agrícola**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 25-27, 1997.

MENZIES, J. G.; EHRET, D. L.; GLASS, A. D. M.; HELMER, T.; KOCH, C. SEYWERD, F. Effects of soluble silicon on the parasitic fitness of *Sphaerotheca fuliginea* on *Cucumis sativus*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 1, p. 84-88, Jan. 1991.

MONTIES, B. Lignins. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Ed.) **Methods in plant biochemistry**. New York: Academic Press, 1989. p. 113-158.

MORAES, S. R. G. **Fontes e doses de silício na intensidade da antracnose do feijoeiro**. 100 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

NOJOSA, G. B. A. **Efeito de indutores na resistência de *Coffea arabica* L. à *Hemileia vastatrix* BERK & BR. e *Phoma costarricensis* ECHANDI**. 2003. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OLIVEIRA, C. A.; POZZA, E. A.; OLINEIRA, V. B.; SANTOS, R. C.; CHAVES, Z. M. Escala diagramática para avaliação da severidade de cercosporiose em folhas de cafeeiro. In. **SIMPÓSIO DOS CAFÉS DO BRASIL**, 2., 2001, Vitória. **Resumos...** Vitória: Embrapa café, 2001. p. 80.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. & AMORIM, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 417-53.

POZZA, A. A. A.; GUIMARÃES, P. T. G.; POZZA, E. A.; ROMANIELLO, M. M.; CARVALHO, J. G. Efeito do substrato e adubações de mudas de cafeeiro em tubetes na produção e na intensidade de cercosporiose. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 4, p. 370-374, out./dez. 2001.

POZZA, A. A.; ALVES, E.; POZZA, E. A.; CARVALHO, J. G. de; MONTANARI, M.; GUIMARÃES, P. T. G.; SANTOS, D. M. Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de café. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 185-188, mar./abr. 2004.

QUEIROZ-FIGUEROA, F. R.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Characterization of extracellular peroxidases released by coffee suspension cell cultures. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 19., 2001, Paris. **Proceedings...** Paris, France: ASIC, 2001.

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.

SANTOS, D. M. Efeito do silício na intensidade da cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke) em mudas de café (*Coffea arabica* L.). 2002. 43 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SOYLU, S.; BAYSAL, O.; SOYLU, E. M. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. **Plant Science**, Clare, v. 165, n. 5, p. 1069-1075, Nov. 2003.

STADNIK, M. J. Induction of resistance in wheat by a benzothiadiazole-derivative against the powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*): practical aspects and mechanisms of action. 1999. Ph. D. Thesis (PhD) - University of Hohenheim, Stuttgart. Germany.

CAPÍTULO 3

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DO CAFEIRO CONTRA *Cercospora coffeicola* POR EXTRATOS VEGETAIS

AMARAL, Daniel Rufino. **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por extratos vegetais.** In: **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora Coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais.** 2005. Cap. 3. p. 58-96. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

O uso indiscriminado de fungicidas tem causado danos ao meio ambiente e tem favorecido a seleção de raças resistentes de patógenos. A resistência induzida se caracteriza pela ativação dos mecanismos latentes de defesa de uma planta e pode ser obtida pelo tratamento com eliciadores abióticos ou bióticos. Este trabalho visou a proteção de cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* utilizando extratos vegetais. Pode-se observar que os extratos aquosos provenientes de folha de café infectada com ferrugem, de ramos de lobeira (*Solanum lycocarpum*) com vassoura-de-bruxa e de casca de frutos de café proporcionaram a maior proteção de plantas de cafeeiro, comparados com acibenzolar S-metil, um indutor de resistência convencional. Estes extratos proporcionaram uma diminuição na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de 37, 32 e 40 % respectivamente, quando comparado com a testemunha inoculada. Plantas tratadas com ASM apresentaram 41% menor AACPD que a testemunha inoculada. Plantas tratadas com EFID e extrato de casca de café induziram maior atividade de peroxidases aos 20 dias, enquanto aquelas tratadas com VLA aos 15 dias. Para polifenoloxidasas as plantas tratadas com os extratos apresentaram pico de atividade aos 20 dias. Os extratos de folha de café infectada com ferrugem e de vassoura-de-bruxa de lobeira proporcionaram um maior acúmulo de lignina.

* Comitê Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende (Orientador), Mário Sobral de Abreu-UFLA.

ABSTRACT

AMARAL, Daniel Rufino. **Induction of resistance in coffee plants against *Cercospora coffeicola* by plant extracts.** In: **Induction of resistance in coffee plants against *Cercospora coffeicola* by abiotics and plant extracts.** 2005. Cap. 3. p. 58-96. Dissertation for the Master Degree in Phytopathology – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

The indiscriminate use of fungicides has caused damages to the environment and has favored the selection of resistant strains of pathogens. The induced resistance is characterized by the activation of latent defense mechanisms of a plant and can be obtained by the treatment with abiotic or biotic elicitors. This work was aimed at protecting coffee seedlings against *Cercospora coffeicola* using plant extracts. It was observed that the aqueous extracts from rusted coffee leaves, from witches' broom diseased branches of 'lobeira' (*Solanum lycocarpum*) and from husks of coffee berries provided the best protection of coffee plants, compared to acibenzolar S-methyl (ASM), a standard inducer of resistance. These extracts provided a decrease in the area under the disease progress curve (AUDPC) of 37, 32 and 40% respectively, when compared to the inoculated control. Treated plants with ASM provided 41% reduction in AUDPC. Treated plants with EFID and extract of peel of coffee induced larger peroxidases activity to the 20 days, while those treated with VLA they went to the 15 days. For polyphenoloxidase the treated plants with the extracts presented activity pick to the 20 days. The extracts from rusted coffee leaves and witches' broom diseased branches of 'lobeira' provided the highest accumulation of lignin.

* Guidance Committe: Mário Lúcio Vilela de Resende (Major Professor), Mário Sobral de Abreu-UFLA.

1 INTRODUÇÃO

A agricultura atual tem aumentado cada vez mais sua potencialidade de produção, às custas de aumento na aplicação de produtos químicos para o controle de pragas e doenças de plantas. 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. Termos como “agricultura sustentável” ou agricultura alternativa”presumem expressão política (Zadoks, 1992), estimulando a busca por novas medidas de proteção das plantas contra as doenças. Um dos enfoques da agricultura alternativa 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 resistência de uma planta (Hammerschmidt & Dann, 1997), que 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). 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 e ácidos graxos e podem estar presentes nas mais diversas formas de vida, como fungos, bactérias e extratos de plantas infectadas por patógenos ou não. Os eliciadores abióticos são representados por metais pesados (HgCl₂) e luz ultravioleta, entre outros (Pascholati & Leite, 1995). A

variada natureza química dos eliciadores demonstra que não há uma característica estrutural única que determine a atividade eliciadora (Bonaldo et al., 2004).

A eficiência de extratos vegetais no controle de fitopatógenos *in vitro* e *in vivo* tem sido observada em diversos trabalhos (Amadioha, 2000; Gonzaga et al., 2003; Karaman et al., 2003; Okemo et al., 2003; Yin & Tsao, 1999). O extrato metanólico de “casca de café”, quando aplicado em cacauero, na diluição em água de 1:1, reduziu para 21% a incidência de vassoura-de-bruxa, contra 61% na testemunha (Lopes et al., 2003). Extratos aquosos de folhas de café infectadas com *H. vastatrix* foram eficazes no controle de *Phoma costarricensis*, em experimentos com folhas destacadas, em que a aplicação preventiva do extrato promoveu proteção contra o supracitado patógeno, com 28% na diminuição na porcentagem da doença quando comparado com a testemunha inoculada (Barguil, 2004). O extrato bruto aquoso (VLA) de vassoura-de-bruxa-de-lobeira (*Solanum lycocarpum*), causada por *C. pernicioso*, aplicado em plantas de tomate e cacau promovem a proteção dessas plantas contra os patógenos *Xantomonas vesicatoria* e *Verticillium dahliae*, com 33% e 40% na diminuição da porcentagem da doença quando comparado com as testemunhas inoculadas, respectivamente. Este extrato também induziu o acúmulo de várias substâncias, relacionadas a defesa da planta como as peroxidases (Cavalcanti et al., 2004; Ribeiro Júnior et al., 2004).

A casca de frutos café, as folhas de café infectadas com *Hemileia vastatrix* caídas ao solo, são resíduos da cafeicultura e materiais vegetais facilmente disponíveis para os cafeicultores e as plantas de lobeira facilmente encontradas na região de cerrado. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de extratos aquosos de folha e de casca de café, ramos de lobeira infectados com *C. pernicioso* e extrato de folhas de eucalipto na indução

de resistência e verificar que os mecanismos estão envolvidos na resposta de defesa do cafeeiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos extratos vegetais

Para a obtenção dos extratos vegetais foram empregadas folhas de café naturalmente infectadas por *H. vastatrix* (EFID), casca de frutos de café (ECF), folhas de eucalipto (*Corymbia citriodora*) (ECC) e extrato bruto aquoso (VLA) de vassoura de lobeira (*Solanum lycocarpum*) causada por *C. pernicioso*. Esses órgãos/tecidos vegetais foram processadas no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, para dar origem a extratos. Para isso, 80 g do órgão/tecido vegetal moído foram ressuspensos em 400 mL de água destilada e conduzidos à extração a quente, em refluxo, seguida de filtragem a vácuo, no caso do extrato de lobeira. Para os demais extratos, 10 g do órgão/tecido vegetal moído foram ressuspensos em 100 mL de água destilada e conduzidos à extração a quente, em refluxo, seguida de filtragem a vácuo.

2.2 Obtenção do fungo *Cercospora coffeicola* e inoculação

O patógeno foi obtido de folhas naturalmente infectadas coletadas em lavoura no campus da UFLA. As folhas foram lavadas superficialmente em água corrente, e em seguida, transferidas para câmara úmida por 3 dias. Os conídios formados foram retirados da superfície foliar com pincel de ponta macia. A concentração da suspensão de conídios para as inoculações foi ajustada em câmara de contagem de Newbauer, para 15.000 conídios/mL. A suspensão de conídios foi pulverizada sobre as folhas de mudas de cafeeiro e uma pequena alíquota da mesma retirada, em cada ocasião, para a realização do teste de germinação em lâmina escavada.

2.3 Obtenção do cafeeiro para indução de proteção contra *Cercospora coffeicola*

Mudas de cafeeiro cultivar Acaia Cerrado foram produzidas, em substrato comercial Plantmax-café. As mudas foram suplementadas com aplicações de Iogen[®] (Fertilizantes Mitsui S. A., Poços de Caldas, MG) e uma adubação com 0,5g de fertilizante de liberação lenta (formulação 4-14-8 de NPK) para prevenir deficiências de nutrientes. As mudas foram mantidas em condições de casa de vegetação na UFLA.

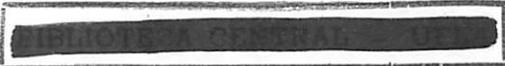
2.4 Experimentos com extratos vegetais

Foram realizados 3 experimentos com os extratos citados anteriormente para verificação de seus efeitos no controle de *C. coffeicola*.

2.4.1 Experimento I: Avaliação da toxidez direta dos extratos vegetais a *Cercospora coffeicola*

O primeiro experimento foi conduzido para verificar o efeito dos extratos vegetais no crescimento micelial de *C. coffeicola*. O meio utilizado foi o batata-dextrose-ágar (BDA). Os extratos foram adicionados ao meio e autoclavados. Os meios foram distribuídos em placas de petri e inoculados com disco de meio de cultura de 0,5 cm contendo micélio do fungo. Na testemunha, utilizou-se apenas BDA. As placas foram transferidas para a câmara de crescimento com temperatura de 23°C. O ensaio foi estabelecido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 10 repetições, de uma placa cada. As avaliações foram realizadas de 5 em 5 dias após a inoculação. O índice de crescimento micelial (ICM) foi calculado e a análise estatística foi realizada utilizando o teste de Scott & Knott (1974) no programa SISVAR.

O índice de crescimento micelial (ICM) foi determinado pela adaptação da fórmula proposta por Maguire (1962):


$$\text{ICM} = \frac{C_1}{N_1} + \frac{C_2}{N_2} + \dots + \frac{C_n}{N_n}, \text{ sendo:}$$

ICM = índice de crescimento micelial

C_1, C_2, C_n = crescimento micelial do fungo na primeira, segunda e última avaliação

N_1, N_2, N_n = número de dias após a inoculação

2.4.2 Experimento II: Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por extratos vegetais

O segundo experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados (DBC), com 8 tratamentos e três repetições com 12 plantas cada. As mudas foram mantidas em casa de vegetação à temperatura de 25°C até o final do experimento. As mudas de 1 ano e meio foram pulverizadas com os seguintes tratamentos:

- 1) testemunha absoluta: plantas de café não inoculadas e não pulverizadas com indutores;
- 2) testemunha inoculada: plantas de café não pulverizadas com indutores e inoculadas com *C. coffeicola*;
- 3) testemunha ASM: plantas de café pulverizadas com ASM 0,4 de ASM/L de água e inoculadas com *C. coffeicola*;
- 4) extrato de casca de frutos de café (ECF);
- 5) extrato de folha de café com ferrugem (EFID) (50)*;
- 6) extrato de folha de café com ferrugem (EFID) (100)**;
- 7) extrato de folha de eucalipto (*Corymbia citriodora*) (ECC);
- 8) extrato de lobeira (*Solanum lycocarpum*) infectada com *Crinipellis pernicioso* (VLA);

*Tratamento em refluxo à 50°C

**Tratamento em refluxo à 100°C

2.4.3 Experimento III: Caracterização dos mecanismos envolvidos na resposta de defesa do cafeeiro pelos melhores extratos vegetais

Um outro experimento realizado com mudas, utilizando-se desta feita, apenas os tratamentos dos experimentos com eliciadores bióticos, que propiciaram os mais altos níveis de proteção contra *C. coffeicola* nos experimentos 1 e 2. Este experimento montado em DBC, com 3 blocos e unidade experimental de 8 plantas, foi realizado visando fornecer material foliar utilizado para avaliar fatores bioquímicos envolvidos na resistência, conforme detalhados nos próximos itens.

2.4.3.1. Preparo de extratos foliares para avaliação de proteínas totais e enzimas

A partir dos tecidos foliares coletados, procedeu-se a maceração dos mesmos em tampão acetato de sódio na proporção 1:3 (gramas de tecido foliar para mL de tampão). Estes extratos foram utilizados para a determinação de proteínas totais, pelo método de Bradford (1976), quantificação da atividade das enzimas peroxidases e polifenoloxidasas e de lignina.

2.4.3.2. Determinação dos níveis de proteínas totais, peroxidases e polifenoloxidasas

Os níveis de proteína total dos extratos foram determinados pelo método de Bradford (1976), utilizando soluções de albumina sérica bovina (BSA) para fazer a calibração da curva padrão do reagente de Bradford.

A determinação da atividade de peroxidases e polifenoloxidasas foi realizada de acordo com a metodologia de Kar & Mishra (1976), utilizando-se guaicol como substrato para enzimas peroxidases na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e na ausência de H_2O_2 , utilizando, como substrato, pirocatecol para determinação da atividade das enzimas polifenoloxidasas.

2.4.3.3 Determinação de lignina

Para o conteúdo de lignina utilizou-se metodologia descrita por Stadnik (1999), por meio do ensaio com ácido tioglicólico (Monties, 1989), em que 0,2 g dos tecidos foliares foram macerados em almofariz e incubados por 24 horas em solução de acetona 85%; em seguida os tecidos foram secos a temperatura ambiente. Uma mistura de ácido tioglicólico e ácido clorídrico 2N (1: 10, v/v), foi adicionada a amostra de tecidos homogeneizados (5mL da mistura para 15 mg de tecidos) por 4 horas a 100°C. Realizou-se uma lavagem com água em seguida, e extraiu-se o ácido lignotioglicolítico a partir do precipitado com 5 mL de hidróxido de sódio (NaOH 0,5N) por 18 horas. As amostras foram então centrifugadas, acidificadas com HCl concentrado e incubadas a 4°C por 4 horas. Em seguida procedeu-se nova centrifugação, e o precipitado foi re-suspenso em NaOH 0,5N e a absorvância dessa solução determinada a 280_{nm}.

2.5 Avaliação da severidade da doença

As avaliações de severidade e número de lesões da doença foram realizadas quinzenalmente, num total de seis avaliações, seguindo escala proposta por Oliveira et al. (2001).

Calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença para cada tratamento, seguindo a seguinte fórmula:

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} [(X_i + X_{i+1}) / 2] (t_{i+1} - t_i)$$

em que: X é a intensidade da doença, t o tempo e n o número de avaliações no tempo (Campbell & Madden, 1990).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito dos extratos vegetais no crescimento micelial de *C. coffeicola*.

Os extratos aquosos de folha (EFID) e de “casca de frutos de café” (ECF), de folhas de eucalipto (*C. citriodora*) (ECC) e o de vassoura de lobeira (VLA) não exerceram efeito inibitório no crescimento micelial de *C. coffeicola*. Todos os tratamentos apresentaram crescimento superior àquele apresentado pela testemunha, conforme observado na Figura 1 ($p \leq 0,05$).

Os tratamentos com extratos *in vitro* foram iguais entre si e com a testemunha (Figura 1). Extratos a partir de resíduos das plantas de café, casca de frutos e folhas infectadas com ferrugem caídas ao chão, acrescidos ao meio de cultura inoculados com fungo, não apresentaram toxidez direta ao patógeno. Barguil (2004) encontrou resultado semelhante a esse quando utilizou extratos aquosos de casca de frutos de café e folhas de café infectadas com ferrugem, em diferentes concentrações contra *Phoma costarricensis*. A autora observou que os extratos, além de não serem tóxicos ao fungo, também promoveram o crescimento do fungo superior ou da testemunha. Já quando utilizou extratos etéricos e ou metanólicos, a mesma observou que os extratos etéricos de folha na diluição 1:3 e o metanólico de casca e de folha nas diluições 1:6, promoveram redução do crescimento micelial ($P \leq 0,05$).

O extrato de eucalipto também não apresentou toxidez direta ao fungo, que apresentou crescimento em meio de cultura com extrato da planta superior ao da testemunha (Figura 1) Stangarlin et al. (1999), quando estudaram o efeito do extrato bruto de *C. citriodora*, não autoclavado, na germinação de esporos de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wilson, observaram que ocorreu estímulo da germinação de esporos e redução de 14% a 34% na formação de apressórios em concentrações do extrato acima de 10%. Bonaldo et al. (2004) observaram que

extrato de *C. citriodora* autoclavado a partir de 5%, inibiu a germinação de esporos. Quando o extrato não foi autoclavado, a inibição da germinação começou a partir de 10%, com 50% de inibição.

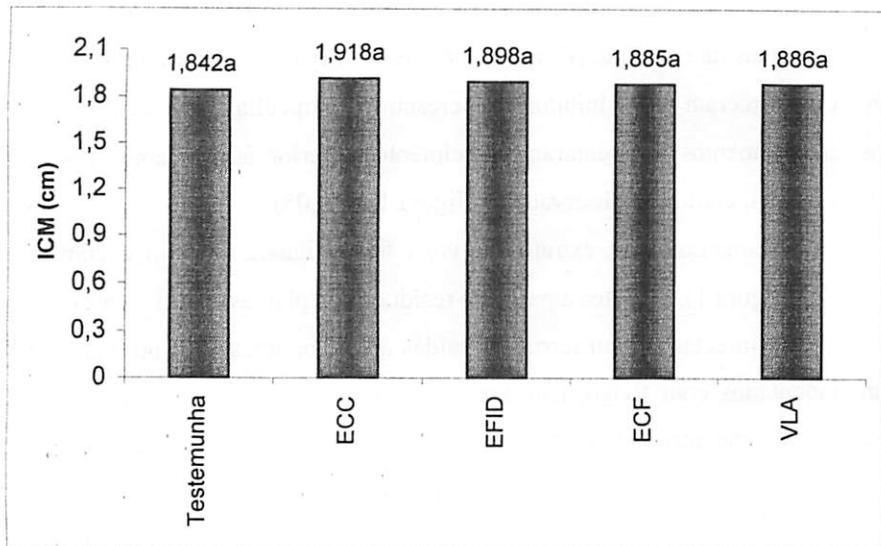


FIGURA 1 Índice de crescimento micelial (ICM) de *C. coffeicola*, em meio batata-dextrose-ágar acrescido de extratos. *Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott (1974) a 5%.

3.2 Efeito de extratos na severidade e número de lesões de *C. coffeicola*

As áreas abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) dos tratamentos em que se utilizaram-se os extratos de folhas de café infectadas com ferrugem, refluxo a 100°C (EFID 100), extrato bruto aquoso (VLA) de vassoura de lobeira (*Solanum lycocarpum*) e extrato de casca de frutos de café foram menores que aquela apresentada pela testemunha inoculada e semelhante estatisticamente as testemunhas absolutas e àquelas tratadas com ASM ao nível

de 5 % de probabilidade (Figura 2). O extrato de folhas de café infectadas com ferrugem, refluxo a 50°C (EFID 50), apresentou AACPD semelhante estatisticamente a testemunha inoculada a 5% de probabilidade (Figura 2). Já extrato de eucalipto (*C. citriodora*) apresentou AACPD diferente da testemunha inoculada e dos demais tratamentos, a 5% de probabilidade (Figura 2).

Nenhum dos extratos apresentou efeito direto de toxidez ao fungo, nas dosagens utilizadas, conforme foi observado nos testes de crescimento micelial. Resultado semelhante foi encontrado por Resende et al. (2004), que observaram que alguns extratos não exerciam efeito tóxico ao patógeno, mais conferiram proteção contra a doença. O extrato de EFID 100 apresentou uma diminuição de 37% na doença, quando comparado à testemunha inoculada. Esporos de *H. vastatrix* inativados por autoclavagem e preparados na forma de extratos aplicados 7 dias antes da inoculação do patógeno foram capazes de induzir proteção contra *H. vastatrix* (Guzzo et al., 1987; Maxemiuc–Naccache, 1983; Maxemiuc–Naccache & Dietrich, 1985).

Resende et al. (2004) observaram uma diminuição na AACPD em plantas tratadas 7 dias antes da inoculação com extrato aquoso de folha de café infectada com *H. vastatrix*. Segundo Guzzo et al. (1987), a parede do fungo é composta pela combinação de β -glucanas e quitinas, que seriam responsáveis pela resposta de defesa de plantas ao patógeno. No caso do extrato EFID 100, o princípio de atividade pode ser o mesmo, visto que, em teste para isolar seu efeito, utilizou-se extrato de folhas de café sadio e o extrato de EFID 100. O extrato EFID apresentou AACPD menor que a testemunha inoculada enquanto o extrato de folhas de café sadio apresentou AACPD semelhante ao da testemunha inoculada (Amaral et al., dados não publicados). Provavelmente, o efeito conferido pelo extrato EFID 50 não foi semelhante ao do EFID 100 por causa da temperatura utilizada na preparação do extrato. A temperatura de 50°C talvez

não seja suficiente para inativar o esporo de *H. vastatrix* e, conseqüentemente, conferir proteção às plantas de cafeeiro.

O extrato de VLA apresentou uma diminuição na severidade da doença de 32% quando comparado ao da testemunha inoculada. Aguilár et al. (2004), utilizando o mesmo extrato, observaram queda na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) no patossistema cacaueiro e *Verticillium dahliae* com relação à testemunha inoculada.

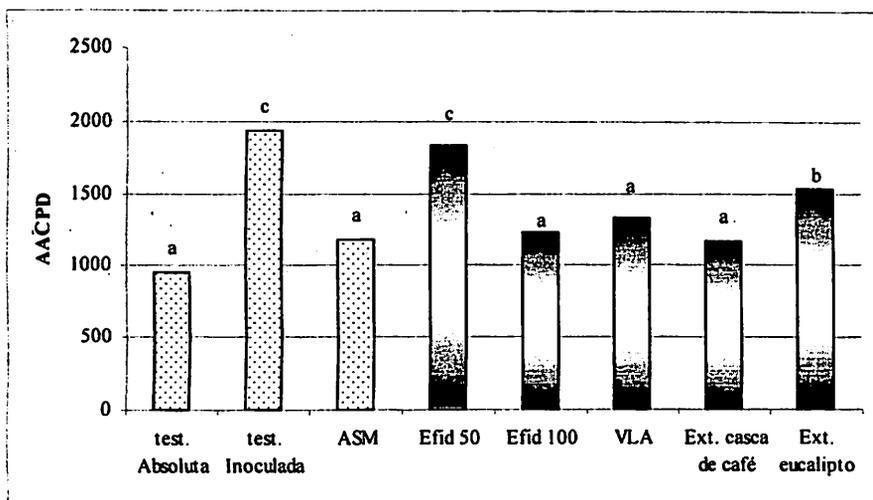


FIGURA 3 Área abaixo da curva de progresso da severidade da doença. *Letras diferentes diferem pelo teste de Scott & Knott a 5%. ASM – acibenzolar S-metil; EFID 50 – extrato de folha de café infectadas com ferrugem com tratamento térmico à 50°C; EFID 100 - extrato de folha de café infectadas com ferrugem com tratamento térmico à 100°C; VLA – extrato bruto aquoso de lobeira (*Solanum lycocarpum*) infectado com *C. pernicioso*.

O extrato de casca de frutos de café também não apresentou atividade tóxica ao fungo, como observou-se no teste de crescimento micelial. Entretanto, este extrato foi o que proporcionou a maior diminuição na severidade da doença. Esta diminuição foi de 40% quando comparado à testemunha inoculada. Quando comparado ao produto comercial Bion®, a diferença é mínima, já que a diminuição na severidade da doença foi de 39%.

O extrato de eucalipto apresentou uma diminuição na severidade da doença da ordem de 21% em comparação à testemunha inoculada (Figura 2). Bonaldo et al. (2004) observaram que extrato de eucalipto (*C. citriodora*) (20%) conferiu proteção local e sistêmica à planta de pepino quando pulverizado 48 horas antes da inoculação, com o patógeno *Colletotrichum lagenarium*.

O número de lesões também foi avaliado neste experimento. O resultado foi semelhante àquele apresentado para a severidade. Os extratos EFID 100, VLA e casca de frutos de café foram semelhantes entre si e diferentes da testemunha inoculada, a 5% de probabilidade (Figura 3). Barguil (2004) já havia observado que os extratos EFID e casca de frutos de café também influenciavam o tamanho das lesões observadas em folhas destacadas de café inoculadas com *P. costarricensis*. A autora observou que estes extratos apresentavam Áreas abaixo da curva de progresso do número de lesões (AACPNL) inferior àquela apresentada pela testemunha inoculada.

O extrato de EFID 50 não influenciou na AACPD, mas, no resultado para AACPNL, pôde-se observar que este extrato diferiu da testemunha inoculada. Isso pode ser devido a um tamanho maior das lesões apresentadas para as plantas tratadas com tal extrato. Em experimento com tomate e *Xantomonas campestris* pv. *vesicatoria*, Cavalcanti et al. (2004) e Ribeiro-Júnior et al. (2004), observaram que plantas tratadas com extrato de vassoura-de-lobeira (*Solanum lycocarpun* infectado com *C. perniciosa*) apresentaram menor valor de AACPL (área abaixo da curva de progresso da lesão causada por *X.*

campestris pv. *vesicatoria*), inferior apenas ao acibenzolar-S-metil (ASM) e Ecolife® e superior às frações parciais de extração de quitosana, provenientes de quitina de carapaça de carangueijo e de micélio de *C. pernicioso* (Pereira et al., 2004). O extrato de eucalipto (*C. citriodora*) apresentou resultado similar àquele apresentado para severidade.

As plantas tratadas com este extrato apresentaram AACPNL inferior à testemunha inoculada e superior às plantas tratadas com os extratos EFID 100, VLA e casca de frutos de café.

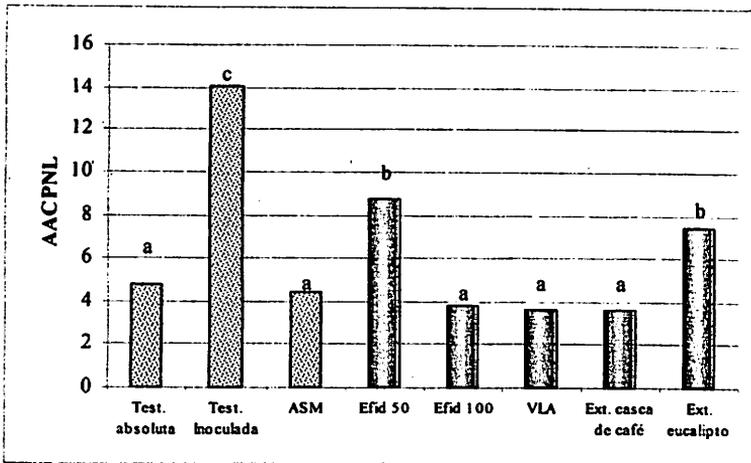


FIGURA 3 Área abaixo da curva de progresso do número de lesões. *Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5%. ASM – acibenzolar-S-metil; EFID 50 – extrato de folha de café infectadas com ferrugem com tratamento térmico à 50°C; EFID 100 - extrato de folha de café infectadas com ferrugem com tratamento térmico à 100°C; VLA – extrato bruto aquoso de lobeira (*Solanum lycocarpum*) infectado com *C. pernicioso*.

Com a avaliação do progresso da doença no tempo em plantas tratadas com os extratos, observou-se que, aos 35 dias após a pulverização dos

tratamentos, plantas pulverizadas com o extrato de casca de frutos de café apresentavam uma redução na AACPD de 48%, enquanto as plantas tratadas com ASM e a testemunha absoluta apresentavam AACPD de 56% e 70% de diminuição na AACPD em comparação à testemunha inoculada, respectivamente (Figura 4).

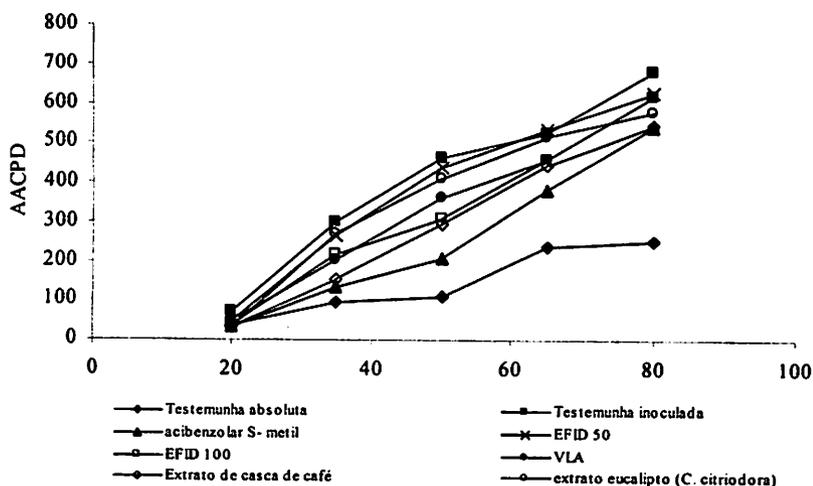


FIGURA 4 Progresso da cercosporiose de 20 a 80 dias após a pulverização (DAP) dos eliciadores bióticos. EFID 50 – extrato de folha de café infectadas com ferrugem com tratamento térmico à 50°C; EFID 100 - extrato de folha de café infectadas com ferrugem com tratamento térmico à 100°C; VLA – extrato bruto aquoso de lobeira (*Solanum lycocarpum*) infectado com *C. pernicioso*.

Aos 50 dias, a redução da AACPD foi de 37%, menor que aquela observada aos 35 dias para as plantas tratadas com o extrato de casca de café. Para as plantas tratadas com ASM e a testemunha absoluta, observaram-se diminuições na AACPD de 55% e 77%, respectivamente (Tabela 1).

TABELA 1. Efeito de extratos vegetais na Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da cercosporiose do cafeeiro.

Tratamentos/DAP*	20 dias	35 dias	50 dias	65 dias	80 dias
Testemunha absoluta	38,41 ^a	97,34 ^a	110,19 ^a	235,03 ^a	248,33 ^a
Testemunha inoculada	72,31 ^b	298,22 ^c	463,48 ^c	524,75 ^c	679,33 ^b
ASM	34,09 ^a	136,25 ^a	208,91 ^b	381,41 ^b	541 ^b
EFID 50**	46,4 ^a	264,34 ^c	440,62 ^c	533,36 ^c	624,66 ^b
EFID 100**	39,98 ^a	216,09 ^b	308,09 ^b	456,11 ^c	618,66 ^b
ext. de casca de café	46,08 ^a	156,53 ^a	293,39 ^b	456,16 ^c	545,66 ^b
VLA**	33,25 ^a	203,19 ^b	359,58 ^c	442,53 ^c	546,66 ^b
ext. de eucalipto	35,35 ^a	268,53 ^c	407,75 ^c	513,36 ^c	580,66 ^b

¹ Letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,005$)

*dias após a pulverização

** EFID 50 – extrato de folha de café com ferrugem, com tratamento térmico a 50°C; EFID 100 – extrato de folha de café com ferrugem, com tratamento térmico a 100°C; VLA – extrato de lobeira (*Solanum lycocarpum*) infectada com *Crinipellis perniciososa*.

3.3 Atividade de enzimas

3.3.1 Peroxidases

A atividade de peroxidase da testemunha absoluta foi menor que a atividade em todos os outros tratamentos (Figuras 5, 6, 7 e 8). Os tratamentos em que foram aplicados os indutores e inoculados com *C. coffeicola* apresentaram atividade de peroxidase maior que aqueles onde foram aplicados somente os indutores, com exceção dos tratamentos casca e casca +, que apresentaram resultado inverso, o tratamento sem inoculação apresentou pico de peroxidase maior que os inoculados (Figura 7).

A atividade de peroxidases em plantas tratadas com ASM foi maior na terceira coleta, aos 15 dias (Figura 5). Este resultado foi semelhante àquele obtido neste mesmo estudo, em que observaram-se plantas da cultivar Topázio pulverizadas com ASM com atividade de peroxidase também aos 15 dias. Em

alguns patossistemas, esse pico de produção ocorre antes. Em plantas de tomate tratadas com ASM sem inoculação e inoculadas, o pico de produção dessa enzima ocorreu aos 9 dias (Ribeiro Júnior et al., 2004). No patossistema tomate-*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* o pico de produção de peroxidases foi aos 14 dias (Soylu et al., 2003). O maior valor foi encontrado em plantas tratadas com ASM e inoculadas com o patógeno (Figura 5).

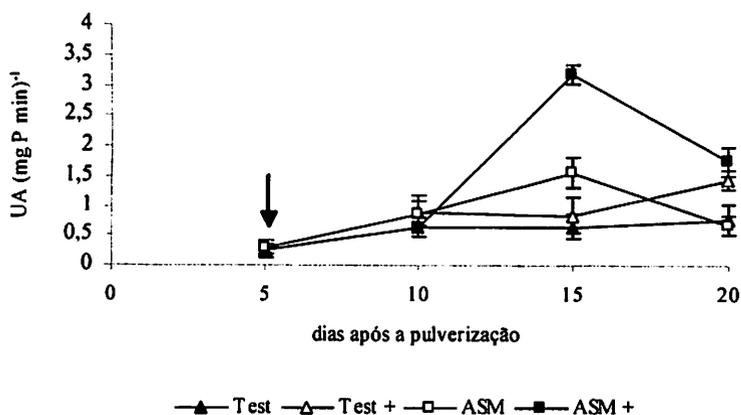


FIGURA 5 Efeito de ASM sobre a atividade de peroxidases (UA - unidade de atividade da enzima/mg de proteína) em folhas de café. Tratamentos: Test – testemunha; Test+ - testemunha inoculada com *C. coffeicola*; ASM – acibenzolar –S-metil; ASM+ - acibenzolar –S-metil inoculado com *C. coffeicola*. A seta indica o momento da inoculação. Barras representam a média \pm desvio padrão.

Como pode ser observado, mesmo com cultivares diferentes, “Acaiá Cerrado” e “Topázio”, os níveis de peroxidases foram similares. Outro fato a ser observado é o aumento na atividade dessa enzima quando se tem apenas a infecção com o patógeno (Figura 5). Vários autores já demonstraram o aumento da atividade de peroxidases ou de isoenzimas nos processos de infecção ou

indução de resistência contra patógenos (Flood et al., 1989; Resende et al., 2002; Xue et al., 1998).

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 6). O resultado foi semelhante ao encontrado para plantas tratadas com ASM e inoculadas com *C. coffeicola* (Figura 6).

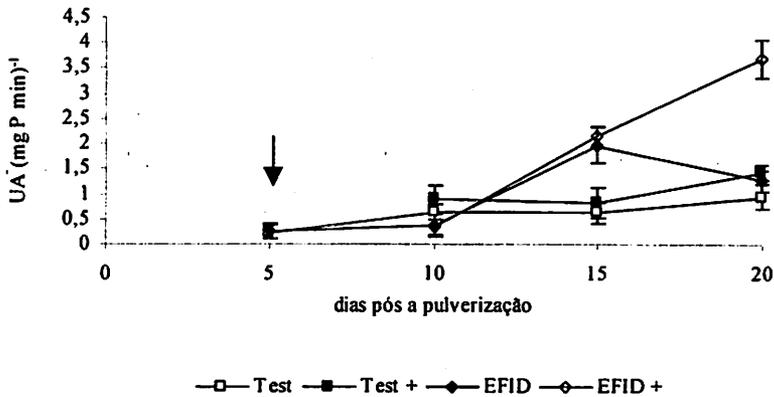


FIGURA 6 Efeito de EFID sobre a atividade de peroxidases (UA - unidade de atividade da enzima/mg de proteína) em folhas de cafeeiro. Tratamentos: Test - testemunha; Test+ - testemunha inoculada com *C. coffeicola*; EFID - extratos de folhas de café infectadas com ferrugem; EFID+ - extratos de folhas de café infectadas com ferrugem inoculado com *C. coffeicola*. A seta indica o momento da inoculação. Barras representam a média \pm desvio padrão.

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 concentração dessa enzima também ocorreu aos 20 dias, na última coleta do experimento (Figura 7), semelhante ao que ocorreu com plantas tratadas com ASM (Figura 5). Mazzafera et al. (1989) também concluíram que, em cultivares de “Catuaí” e “Mundo Novo” infectadas com *Meloidogyne incognita*, a atividade de peroxidase foi maior que em tecidos não infectados.

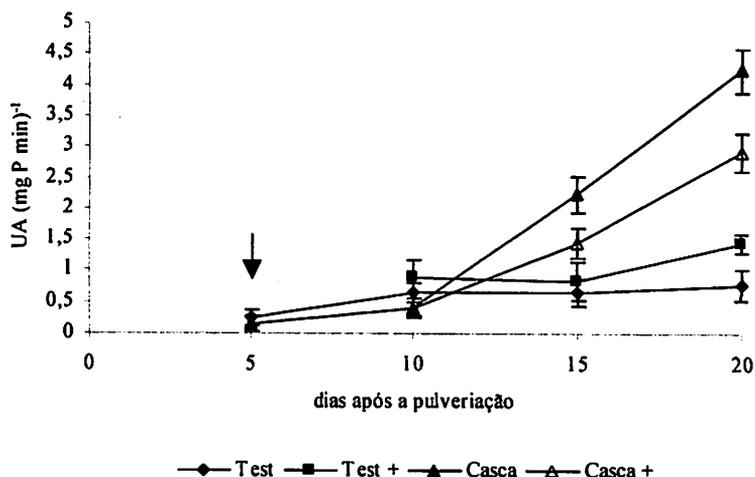


FIGURA 7 Efeito de extrato de casca de café sobre a atividade de peroxidases (UA - unidade de atividade da enzima/ mg de proteína) em folhas de cafeeiro. Tratamentos: Test - testemunha; Test+ - testemunha inoculada com *C. coffeicola*; Casca - extratos de casca de frutos de café infectadas; Casca+ - extratos de casca de frutos de café inoculada com *C. coffeicola*. A seta indica o momento da inoculação. Barras representam a média ± desvio padrão.

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,

e quantidades muito próximas uma da outra (Figura 8). Isso também foi observado no patossistema tomate-*X.campestris* pv. *vesicatoria*, sendo que para este patossistema o pico de atividade dessa enzima foi aos 9 dias (Ribeiro Júnior et al., 2004).

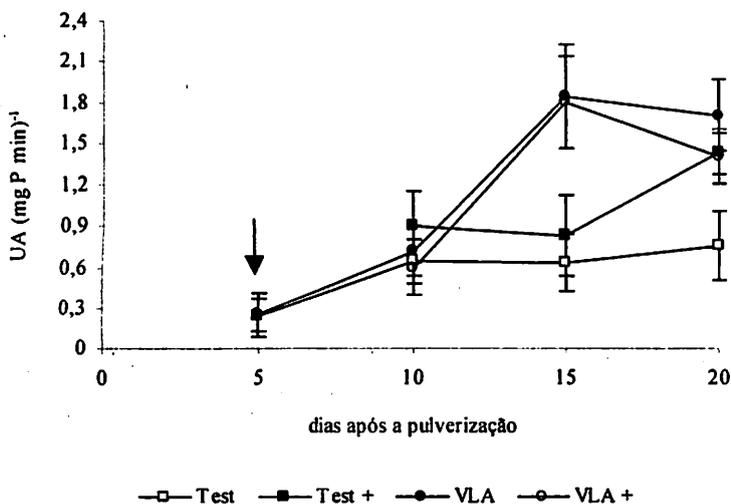


FIGURA 8 Efeito de VLA sobre a atividade de peroxidases (UA - unidade de atividade da enzima/mg de proteína) em folhas de café. Tratamentos: Test - testemunha; Test+ - testemunha inoculada com *C. coffeicola*; VLA - extrato bruto aquoso (VLA) de vassoura-de-lobeira (*Solanum lycocarpum*); VLA+ - extrato bruto aquoso (VLA) de vassoura-de-lobeira (*Solanum lycocarpum*) inoculada com *C. coffeicola*. A seta indica o momento da inoculação. Barras representam a média \pm desvio padrão.

3.3.2 Atividade de polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase foi determinada em plantas de café também utilizando os melhores extratos quando se avaliou a severidade da

doença. Foi observado, para a atividade de polifenoloxidasas, que a testemunha absoluta apresentou menor atividade quando comparada com todos os outros tratamentos (Figuras 9, 10, 11 e 12).

Plantas de café tratadas com ASM e depois inoculadas com *C. coffeicola* tiveram maior acúmulo de polifenoloxidase aos 20 dias, na última coleta do experimento, semelhante ao que ocorreu com a outra enzima oxidativa, peroxidase que, em plantas tratadas com ASM, também tiveram maior atividade na última coleta (Figura 9).

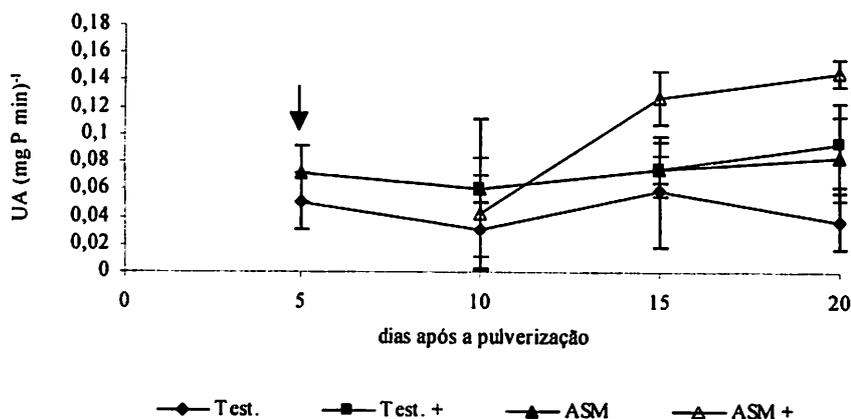


FIGURA 9 Efeito de ASM sobre a atividade de polifenoloxidasas (UA - unidade de atividade da enzima/ mg de proteína) em folhas de café. Tratamentos: Test - testemunha; Test+ - testemunha inoculada com *C. coffeicola*; ASM - acibenzolar -S-metil; ASM+ - acibenzolar -S-metil inoculada com *C. coffeicola*. A seta indica o momento da inoculação. Barras representam a média \pm desvio padrão.

Quando as plantas foram tratadas com ASM e não foram inoculadas, a concentração da enzima foi menor, assim como a planta que não recebeu tratamento algum e somente foi inoculada com o patógeno (Figura 9).

O extrato de casca de frutos de café utilizado em plantas de cafeeiro induziram a atividade de polifenoloxidase. A maior atividade da enzima ocorreu aos 15 dias, na terceira coleta pela utilização desse extrato em plantas inoculadas. As plantas tratadas com o extrato de casca de frutos de café não inoculadas com o patógeno apresentaram pico da enzima aos 20 dias, inferior a aqueles apresentados pelas plantas tratadas com o extrato e inoculadas (Figura 10).

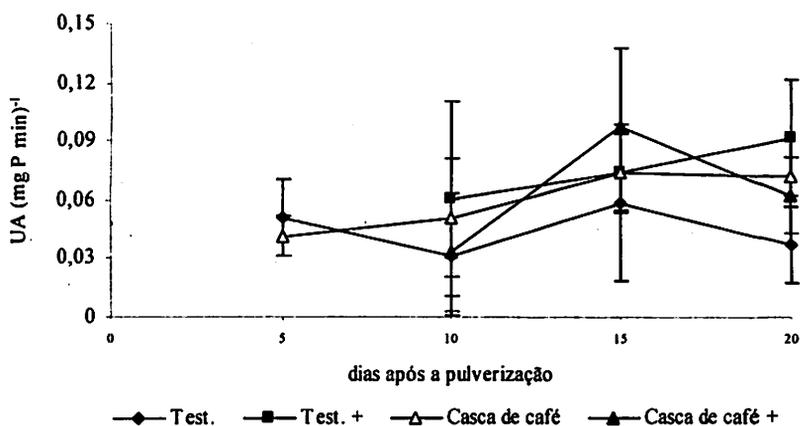


FIGURA 10 Efeito do extrato de casca de café sobre a atividade de polifenoloxidases (UA - unidade de atividade da enzima/ mg de proteína) em folhas de cafeeiro. Tratamentos: Test - testemunha; Test+ - testemunha inoculada com *C. coffeicola*; Casca - extratos de casca de frutos de café; Casca+ - extratos de casca de frutos de café inoculado com *C. coffeicola*. A seta indica o momento da inoculação. Barras representam a média \pm desvio padrão.

O efeito do tratamento EFID em plantas de café, foi similar ao efeito do extrato de cascas de café. As plantas de café tratadas com este extrato sem a inoculação do patógeno, apresentaram uma maior atividade de polifenoloxidase

na última coleta, 20 dias após o tratamento. O pico de atividade da enzima com a utilização do extrato anteriormente a inoculação do patógeno, ocorreu aos 15 dias (Figura 11).

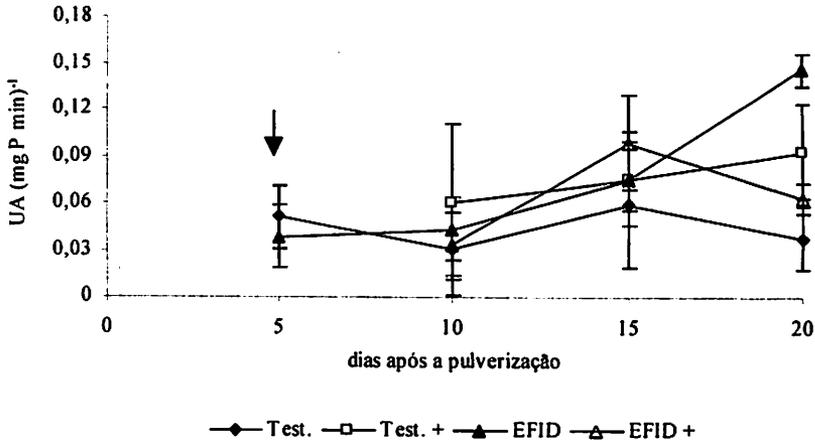


FIGURA 12 Efeito de EFID sobre a atividade de polifenoloxidasas (UA - unidade de atividade da enzima/ mg de proteína) em folhas de café. Tratamentos: Test - testemunha; Test+ - testemunha inoculada com *C. coffeicola*; EFID - extratos de folhas de café infectadas com ferrugem; EFID+ - extratos de folhas de café infectadas com ferrugem inoculado com *C. coffeicola*. A seta indica o momento da inoculação. Barras representam a média \pm desvio padrão.

O efeito do extrato VLA na atividade de polifenoloxidase foi maior quando o extrato foi utilizado em plantas com inoculação do patógeno. As plantas tratadas com esse extrato tiveram maior concentração de polifenoloxidasas na última coleta, aos 20 dias. (Figura 12).

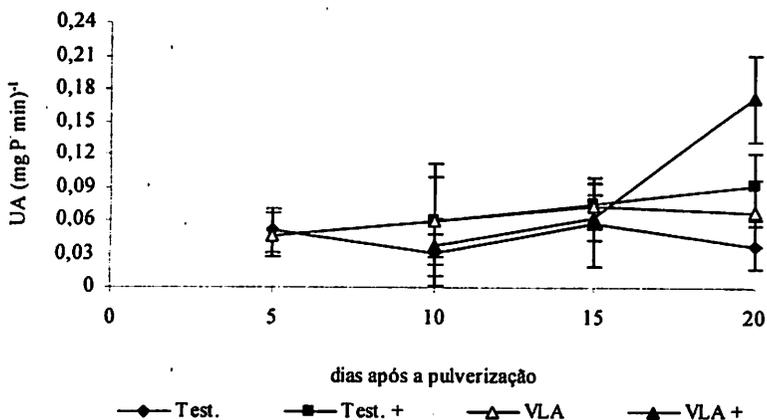


FIGURA 12 Efeito de VLA sobre a atividade de polifenoloxidases (UA - unidade de atividade da enzima/ mg de proteína) em folhas de cafeeiro. Tratamentos: Test - testemunha; Test+ - testemunha inoculada com *C. coffeicola*; VLA - extrato bruto aquoso (VLA) de vassoura de lobeira (*Solanum lycocarpum*); VLA+ - extrato bruto aquoso (VLA) de vassoura de lobeira (*Solanum lycocarpum*) inoculado com *C. coffeicola*. A seta indica o momento da inoculação. Barras representam a média \pm desvio padrão.

A atividade de enzimas oxidativas, como a polifenoloxidase, têm sido bastante estudada em plantas como parte dos mecanismos de defesas induzidas, ou em condições de estresse (Sánchez et al., 2000; Siegel, 1993). Contudo, a participação destas enzimas na resistência constitutiva, antes de ocorrer algum tipo de estresse, tem sido pouco estudada.

3.4 Determinação de pigmentos

A quantidade de clorofila a, b e carotenóides para os tratamentos é apresentada nas Figuras 13 (A, B e C), respectivamente. A quantidade de clorofila a dos tratamentos que foram induzidos apresentaram diferenças entre si e foram maiores que a testemunha absoluta e inoculada (Figura 13A). A

testemunha absoluta não diferiu significativamente da testemunha inoculada e os tratamentos que mais aumentaram o teor de clorofila *a* foram ASM, EFID, EFID+, VLA, casca de café e casca de café +.

Quanto ao teor de clorofila *b* (Figura 13B), os tratamentos utilizados não diferiram entre si, assim como a quantidade de carotenóides produzida pelas plantas de café (Figura 13C) (Scott & Knott, a 5%).

Os pigmentos como as clorofilas e carotenóides são importantes porque participam dos processos de absorção, conversão da energia luminosa em ATP e poder redutor que podem ser usados no metabolismo de carboidratos e outros processos energéticos das células (Malkin & Niyogi, 2000; Misaghi, 1982). As doenças causadas por patógenos geralmente diminuem a fotossíntese causando clorose e necrose, interferindo dessa forma na área fotossintética e na quantidade de pigmentos (Agrios, 1997; Ayres, 1991; Misaghi, 1982).

As avaliações foram realizadas no final do experimento quando as folhas já apresentavam os sintomas da doença. Porém, como na metodologia utilizada para as determinações se fazia uma retirada de 0,2g de tecidos das folhas, independente de estarem cloróticas ou necróticas, podem ter ocorrido diferenças não detectadas, ou que seriam detectadas apenas fazendo-se uma separação das áreas saudáveis, cloróticas e necróticas de um mesmo tratamento. Talvez, por isso, não tenham sido detectadas diferenças nas quantidades de clorofila *b* e carotenóides entre os tratamentos.

O tratamento de plantas de café com ASM, VLA inoculado e casca de café inoculado foram inferiores ao tratamento com EFID e superiores aos tratamentos ASM inoculada, EFID inoculada e VLA (Figura 14).

Plantas de tomate tratadas com VLA apresentaram tecido mais lignificado, com seu efeito isolado ou com a inoculação com *X. vesicatoria* (Ribeiro Júnior et al., 2004). No patossistema cacau-*Verticillium dahliae*, também se observou esse aumento no acúmulo de lignina (Cavalcanti et al., 2004). O extrato VLA tem se mostrado eficaz nas respostas de defesa de plantas contra fitopatógenos. Isso foi demonstrado em vários patossistemas, nos quais esse extrato sempre esteve entre os melhores tratamentos, como também verificado neste estudo para o patossistema café-*C. coffeicola*. O extrato de cascas de frutos de café é bastante promissor, devido aos resultados encontrados neste estudo e por tratar-se de um resíduo da própria cultura, o que facilita sua obtenção e conseqüente utilização.

Até o momento, nas pesquisas com cafeeiro tem se associado a reação de hipersensibilidade com o acúmulo de calose, deposição de compostos fenólicos e lignificação da parede celular da planta (Martins et al., 1985, Martins & Moraes, 1996, Rijo et al., 1991 e Silva et al., 2002). Então, possivelmente, a lignificação ocorre para tentar impedir a penetração ou mesmo a colonização dos tecidos pelo patógeno, mesmo em cafeeiro suscetível, como é o caso da cultivar Acaiá Cerrado e como vem sendo comprovado em cafeeiro resistente (Nojosa, 2003).

3.5 Determinação de lignina

O teor de lignina da testemunha absoluta, inoculada e o tratamento com casca de café foram menores que nos demais tratamentos e não apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 14). O tratamento com EFID foi o que induziu maior quantidade de lignina, diferindo estatisticamente de todos os outros tratamentos.

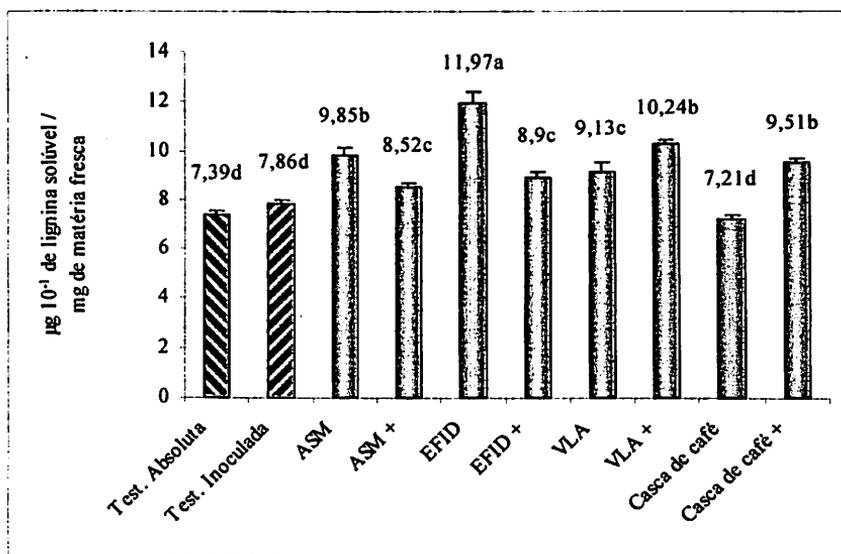


FIGURA 14 Determinação de lignina 20 dias após a pulverização dos tratamentos. ASM - acibenzolar S-metil; ASM - acibenzolar S-metil inoculada; EFID - extratos de folhas de café infectadas com ferrugem; EFID+ - extratos de folhas de café infectadas com ferrugem e inoculado; Casca de café - extratos de casca de frutos de café; Casca de café+ - extratos de casca de frutos de café inoculado; VLA - extrato bruto aquoso (VLA) de vassoura de lobeira (*Solanum lycocarpum*); VLA+ - extrato bruto aquoso (VLA) de vassoura de lobeira (*Solanum lycocarpum*) inoculado. Tratamentos com as mesmas letras não diferem pelo teste de Scott & Knott a 5%. Barras representam a média \pm desvio padrão.

O tratamento de plantas de café com ASM, VLA inoculado e casca de café inoculado foram inferiores ao tratamento com EFID e superiores aos tratamentos ASM inoculada, EFID inoculada e VLA (Figura 14).

Plantas de tomate tratadas com VLA apresentaram tecido mais lignificado, com seu efeito isolado ou com a inoculação com *X. vesicatoria* (Ribeiro Júnior et al., 2004). No patossistema cacau-*Verticillium dahliae*, também se observou esse aumento no acúmulo de lignina (Cavalcanti et al., 2004). O extrato VLA tem se mostrado eficaz nas respostas de defesa de plantas contra fitopatógenos. Isso foi demonstrado em vários patossistemas, nos quais esse extrato sempre esteve entre os melhores tratamentos, como também verificado neste estudo para o patossistema café-*C. coffeicola*. O extrato de cascas de frutos de café é bastante promissor, devido aos resultados encontrados neste estudo e por tratar-se de um resíduo da própria cultura, o que facilita sua obtenção e conseqüente utilização.

Até o momento, nas pesquisas com cafeeiro tem se associado a reação de hipersensibilidade com o acúmulo de calose, deposição de compostos fenólicos e lignificação da parede celular da planta (Martins et al., 1985, Martins & Moraes, 1996, Rijo et al., 1991 e Silva et al., 2002). Então, possivelmente, a lignificação ocorre para tentar impedir a penetração ou mesmo a colonização dos tecidos pelo patógeno, mesmo em cafeeiro suscetível, como é o caso da cultivar Acajá Cerrado e como vem sendo comprovado em cafeeiro resistente (Nojosa, 2003).

4 CONCLUSÕES

Os extratos de plantas utilizados não exercem efeito direto no patógeno.

Os extratos folhas de café infectadas com ferrugem, casca de frutos de café e extrato bruto de vassoura-de-lobeira conferem proteção a mudas de cafeeiro diminuindo os níveis de doença com base na Área abaixo da curva do progresso da doença e número de lesões.

Plantas tratadas com extratos folhas de café infectadas com ferrugem e casca de café induzem maior atividade de peroxidases aos 20 dias, enquanto aquelas tratadas com extrato bruto de vassoura de lobeira foi aos 15 dias.

Plantas tratadas com folhas de café infectadas com ferrugem, casca de frutos de café e extrato bruto de vassoura-de-lobeira induzem maior atividade de polifenoloxidasas aos 20 dias.

Plantas tratadas com folhas de café infectadas com ferrugem, casca de frutos de café e extrato bruto de vassoura de lobeira contribuem para aumento do pigmento, clorofila *a*.

O maior acúmulo de lignina ocorre para plantas tratadas com folhas de café infectadas com ferrugem e extrato bruto de vassoura de lobeira inoculado.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É evidente que numa sociedade cada vez mais preocupada com o meio ambiente, a utilização de produtos ecologicamente corretos, de baixo custo e com bom nível de controle, representa um avanço na agricultura. Dentro desse contexto, a indução de resistência em plantas contra fitopatógenos representa um método alternativo no controle de doenças, que pode ser obtido por nutrientes à base de silício e por resíduos da própria atividade agrícola.

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pôde-se observar o potencial do silício e dos extratos vegetais na redução de doenças. A utilização de silício na forma de silicato de potássio diminuiu em 47% a cercosporiose do cafeeiro, causada pelo fungo *Cercospora coffeicola*, em casa de vegetação, enquanto a utilização extratos a base de resíduos da própria lavoura cafeeira, como a casca de frutos de café e as folhas da planta que caem ao chão infectadas por *Hemileia vastatrix* e também ramos de lobeira (*Solanum lycocarpum*) infectados com *Crinipellis pernicioso*, diminuíram em 40%, 37% e 32%, respectivamente, a mesma doença. Os produtos também induziram a atividade das enzimas peroxidases e polifenoloxidasas e o acúmulo de lignina.

No entanto, faz-se necessária a realização de novos experimentos em casa-de-vegetação para verificar a melhor época de aplicação do silicato de potássio. Para os extratos é preciso verificar a melhor dose, bem como a melhor época de aplicação. Por fim, testes no campo são necessários para que se possa realmente afirmar que tais produtos são uma alternativa que se pode ser incorporada ao manejo da cercosporiose.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1997.

AGUILAR, M. A. G.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; PEREIRA, R. B.; CAVALCANTI, F. R.; SONEGHETI, S.; RESENDE, M. L. V. Extratos naturais na proteção de mudas de cacaueteiro contra *Verticillium dahliae* Kleb. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 263, ago. 2004. Suplemento.

AMADIOHA, A. C. Controlling rice blast in vitro and in vivo with extracts of *Azadirachta indica*. **Crop Protection**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 287-290, June 2000.

AYRES, P. G. Growth responses induced by pathogens and other stresses In: MOONEY, H. A.; WINNER, W. E.; PELL, E. J. (Ed.) **Response of plants to multiple stresses**. New York: Academic Press, 1991. p. 227-248.

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

BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991.

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TESSMANN, D. J.; SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, Atividade Elicitora de Fitoalexinas e Proteção de Pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo Extrato Aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n.2, p. 128-134, mar./abr. 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-254. 1976.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. 1990. 532 p.

CAVALCANTI, F. R.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; PEREIRA, R. B.; ZACARONI, A. B.; VILLAS BOAS, C. H.; RESENDE, M. L. 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.

FLOOT, B. E.; MOERSCHBACHER, B. M.; REISENER, H. J. Peroxidase isoenzymes patterns of resistant and susceptible wheat leaves following stem rust infection. **New Phytologist**, Cambridge, v. 111, n. 3, p. 413-421, Mar. 1989.

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**, Brasília, v. 28, p. 363, ago. 2003. Suplemento.

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

HAMMERSCHMIDT, H.; DANN, E. K. **Induced resistance to disease**. In: RECHCIGL, N. A.; RECHCIGL, J. E. (Ed.). **Environmentally safe approaches to crop disease control**. Boca Raton: CRC – Lewis Publishers, 1997. Cap. 8, p. 177-199.

KAR, M. E.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, Rockville, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.

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**, Clare, v. 85, n. 2/3, p. 231-235, Apr. 2003.

LOPES, F. C. A.; CORRÊA, L. G. G.; VILAS-BÔAS, C. H.; RESENDE, M. L. V. Uso do extrato de casca de café para o controle da vassoura-de-bruxa em mudas de cacau. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 353, ago. 2003. Suplemento.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and avaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar./Apr. 1962.

- MALKIN, R.; NIYOGI, K. Photosynthesis. In: BUCHANAN, B; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed). **Biochemistry & molecular biology of plants**. American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 568-628..
- MARTINS, E. M. De MARIA, A.; MORAES, W. B. C. Histological studies of compatible interaction of coffee leaves and *Hemileia vastatrix*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, n. 3, p. 627-636, out. 1985
- MARTINS, E. M. F.; MORAES, W. B. C. Development of *Hemileia vastatrix* in coffee plants with genetic and induced resistance. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 11/12, p. 519-526, Dec. 1996.
- MAXEMIUC-NACCACHE, V. **Alterações bioquímicas em folhas de *Coffea arabica* resistentes e suscetíveis à infecção por *Hemileia vastatrix* (ferrugem do cafeeiro)**. 1983. Tese (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo.
- MAXEMIUC-NACCACHE, V.; DIETRICH, S. M. C. Changes in phenols and oxidative enzymes in resistant and susceptible *Coffea arabica* inoculated with *Hemileia vastatrix* (coffee rust). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 185-190, Dez. 1985.
- MAZZAFERA, P.; GONÇALVES, W.; FERNANDES, J. A. R. Fenóis, peroxidases e polifenoloxidase na resistência do cafeeiro a *Meloidogyne incognita*. **Bragantia**, Campinas, v. 48, n. 2, p. 131-142, 1989.
- MISAGHI, I. J. **Physiology and biochemistry of plant-pathogen interactions**. Tucson: University of Arizon, 1982.
- MONTIES, B. **Lignins**. In: DEY, P. M. AND HARBORNE, J. B. (Ed.) **Methods in plant biochemistry**. New York: Academic Press, 1989. p. 113-158.
- NOJOSA, G. B. A. **Efeito de indutores na resistência de *Coffea arabica* L. à *Hemileia vastatrix* BERK & BR. e *Phoma costarricensis* ECHANDI**. 2003. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- OKEMO, P. O.; BARS, H. P.; VIVANCO, J. M. In vitro activities of *Maesa lanceolata* extracts against fungal plant pathogens. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 74, n. 3, p. 312-316, Apr. 2003.

OLIVEIRA, C. A.; POZZA, E. A.; OLIVEIRA, V. B.; SANTOS, R. C.; CHAVES, Z. M. Escala diagramática para avaliação da severidade de cercosporiose em folhas de cafeeiro. In. SIMPÓSIO DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. Resumos... Vitória: Embrapa café, 2001. p. 80.

PASCHOLATI, S. F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos.** 1998. Tese de Livre Docência) - Piracicaba. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 417-53.

PEREIRA, R. B.; ZACCARONI; RIBEIRO-JUNIOR, P. M.; CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. Produtos comerciais e extratos naturais no controle da mancha bacteriana causada por *Xanthomona campestris* pv. *vesicatoria* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 260, ago. 2004. Suplemento.

RESENDE, M. L. V.; BARGUIL, B. M.; RESENDE, R. S.; BESERRA JÚNIOR, J. E. A.; SALGADO, S. M. L. Induction of resistance against *phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. **The International Joint Workshop on PR-Proteins and Induced Resistance.** Elsinore, Dinamarca, p. 79. 2004.

RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; CAVALCANTI, L. S.; AGUILAR, M. A. G.; SILVA, L. H. C. P.; PEREZ, J. O.; ANDRADE, G. C. G.; CARVALHO, G. A.; CASTRO, R. M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 621-628, Oct. 2002.

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.

RIJO, L.; RODRIGUES Jr. , C. J.; SILVA, M. C.; VASCONCELOS, M. I. Does gene SH₃ confer to certain coffee-rust associations a reaction near immunity? A

histopatological study. *Café Cacao Thé*, Paris, v. 35, n. 3, p. 167-176, July/Sept. 1991.

SÁNCHEZ, E.; SOTO, J. M.; GARCIA, P. C.; LÓPEZ-LEFEBRE, L.; RIVERO, R. M.; RUIZ, J. M.; ROMERO, L. Phenolic compounds and oxidative metabolism in green bean plants under nitrogen toxicity. *Australian Journal of Plant Physiology*, Collingwood, v. 27, n. 10, p. 973-978, 2000.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SIEGEL, B. Z. Plant peroxidases – an organismic perspective. *Plant Growth Regulation*, Dordrecht, v. 12, n. 3, p. 303-312, Feb. 1993.

SILVA, M. C.; NICOLE, L.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RODRIGUES Jr. , C. J. Hypersensitive cell death and post-haustorial defense responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 60, p. 169-183, 2002.

SMITH, C. J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. *The New Phytologist*, Cambridge, v. 132, n. 1, p.1-45, Jan. 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*, Clare, v. 165, n. 5, p. 1069-1075, Nov. 2003.

STADNIK, M. J. **Induction of resistance in wheat by a benzothiadiazole-derivative against the powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*): practical aspects and mechanisms of action.** 1999. Theis (Ph. D.) - University Hohenheim, Stuttgart, Germany.

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. 1994.

STANGARLIN, J. R. , SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. , CRUZ, M. E. S. & NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 2, n. 11, p.16- 21. Nov./dez. 1999.

YIN, Mei-chin; TSAO, Shih-ming. Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species. **Internacional Journal of Food Microbiology** Amsterdam, v. 49, n.; 1/2, p. 49-56, Aug. 1999.

XUE, L.; CHAREST, P. M.; JABAHI-HARE, S. H. Systemic induction of peroxidases, 1,3- β -glucanases, chitinases, and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, n. 4, p. 359-365, Apr. 1998.

ZADOKS, J. C. The costs of change in plant protection. **Journal of Plant Protection**, Kuala Lumpur, v. 9, p. 151-159, 1992.



