

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ULTRA-ESTRUTURAL DE FOLHAS DE CAFEIEIRO TRATADAS COM EXTRATO DE CASCA DE CAFÉ E ÓLEO DE TOMILHO, E INOCULADAS COM *Cercospora coffeicola*

PEREIRA, R.B.¹; LUCAS, G.C.²; ALVES, E.³; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.⁴; BOTELHO, A.O.⁵

¹Doutorando em Fitopatologia, Bolsista PG/CNPq, Depto. de Fitopatologia, UFLA, C.P. 3037, 37200-000, Lavras, MG, e-mail: ricardoborgespereira@yahoo.com.br; ² Aluna do Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG; ³ Prof. Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG; ⁴ Bolsista FAPEMIG, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG; ⁵ Bolsista CNPQ, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Resumo:

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito indutor de resistência (ECC 150g.L⁻¹ e OET 500ppm), quantificando a atividade da enzima peroxidase e lignificação, e observar por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) os efeitos destes na germinação e desenvolvimento dos conídios de *Cercospora coffeicola*. Plantas tratadas com ECC apresentaram pico de atividade de peroxidases aos 7 e 11 dias após tratamento. Plantas tratadas com OET apresentaram picos no segundo, terceiro e nono dias após tratamento, mantendo-se até o décimo quarto dia. Não houve diferenças nas concentrações de lignina. ECC não afetou a germinação e o desenvolvimento dos conídios nas observações em MEV, diferentemente do OET.

Palavras-chave: Peroxidases, lignina.

BIOCHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL CHARACTERIZATION OF COFFEE LEAVES TREATED WITH COFFEE PEEL EXTRACT AND THYME OIL, AND INOCULATED WITH *Cercospora coffeicola*

Abstract:

The objective of the present study was (i) to assess the effect of the resistance inducers CPE 150g.L⁻¹ and TEO 500ppm, by quantifying the peroxidase enzyme activity and lignification, and (ii) to observe through scanning electron microscopy (SEM) the effects of these inducers in the germination and development of *Cercospora coffeicola* conidia. Plants treated with CPE presented a peak of peroxidase activity in 7 and 11 days after treatment. Plants treated with TEO presented peaks in the second, third and ninth days after treatment, maintaining it up to the tenth day. There weren't any differences in the concentrations of lignin during the evaluation period. After SEM evaluation it was observed that CPE didn't affect the germination and development of the conidia, contrasting with the results observed in the TEO treatment.

Keywords: Peroxidases, lignin.

Introdução

A indução de resistência em plantas vem sendo estudada em diversos patossistemas. Trabalhos estão sendo realizados com o intuito de descobrir e desenvolver novos eliciadores capazes de ativar, de forma eficiente, mecanismos de defesa em plantas.

A aplicação de produtos de origem natural, como subprodutos da cadeia produtiva do café (casca de frutos de café) ou alguns óleos (nim e tomilho), que já vêm sendo utilizados em cafeeiro para o controle de pragas (bicho mineiro), pode ser ativador de resistência de plantas de cafeeiro contra fungos patogênicos.

De modo geral, este trabalho teve por objetivo estudar o efeito do extrato de casca de frutos de café e óleo essencial de tomilho na indução de resistência em cafeeiro contra a cercosporiose do cafeeiro, utilizando como marcadores as enzimas peroxidases e a lignificação. Além disso, buscou-se observar, por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), os efeitos desses na germinação e no desenvolvimento do fungo.

Material e Métodos

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), na cidade de Lavras, MG.

O ECC foi obtido por meio de cascas de frutos de café (pericarpo) provenientes de lavoura em cultivo orgânico. Estas foram secas em estufa a 60°C por 48 horas e moídas até a obtenção de uma fração fina, em seguida, 100gramas dessa fração foram ressuspensos em 500mL de água destilada e a suspensão foi conduzida à extração a quente (fervura), por 2

horas, sob refluxo. Após o tempo de extração, a suspensão foi filtrada a vácuo e teve seu volume completado para 500mL com água destilada. Seguiu-se o armazenamento em freezer a -20°C até a utilização experimental. Este extrato foi então, denominado ECC 200g.L⁻¹, do qual partiram as demais diluições testadas.

Ensaio I: Quantificação de proteínas totais, atividade de peroxidases e lignina.

Utilizaram-se mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo 379/19, com três pares de folhas. Os tratamentos avaliados foram extrato de casca de frutos de café (ECC) 150g.L⁻¹, óleo essencial de tomilho (OET) 500ppm, acibenzolar S-metil (ASM) 0,2mg.mL⁻¹ e uma testemunha inoculada e não inoculada. O delineamento utilizado foi de blocos casualizados, com três repetições e parcela experimental de três plantas. A inoculação com *Cercospora coffeicola* foi realizada via pulverização de uma suspensão de conídios a 1,5 x 10³ conídio.mL⁻¹, sete dias após a pulverização dos tratamentos. As coletas foram realizadas um, dois, quatro, sete, oito, nove, 11 e 14 dias após a aplicação dos tratamentos, coletando-se todas as folhas. Na ocasião da última coleta, também foram coletadas folhas para a quantificação de lignina. A obtenção do sobrenadante para as análises de proteína e atividades de peroxidases seguiu a metodologia de Pereira (2006).

As proteínas solúveis contidas nos extratos foram aferidas pelo ensaio de Bradford (1976), e a atividade de peroxidases foi determinada de acordo com a metodologia de Kar & Mishra (1976), utilizando-se guaiacol como substrato para enzimas peroxidases na presença de H₂O₂. Os resultados foram expressos em unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína por minuto (UA.mg P⁻¹.min⁻¹). A quantificação de lignina foi determinada conforme metodologia proposta por Monties (1989).

Ensaio II: Estudo histopatológico de *C. coffeicola*.

Mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo 379/19, com três pares de folhas foram tratadas via pulverização com ECC 150g.L⁻¹, OET 500ppm, ASM 0,2mg.mL⁻¹ e uma testemunha (água). Após sete dias, quatro folhas de cada tratamento (terceiro par) foram coletadas, lavadas em água destilada e acomodadas em bandejas plásticas desinfestadas com álcool, nas quais, foram colocadas no fundo, esponjas de látex em lâmina umedecidas e cobertas com papel alumínio perfurado. Em cada folha, foram desenhados na superfície abaxial, quatro círculos de 1cm de diâmetro com caneta de marca permanente, onde foram colocados gotas de 25µL da suspensão de conídios de *C. coffeicola*. As bandejas foram cobertas com plástico transparente e colocadas em câmara de crescimento a 25°C.

As coletas das amostras para observação em MEV foram realizadas a quatro, oito, 16 e 48 horas após inoculação, mediante cortes circulares de 5mm de diâmetro, dentro de cada círculo, realizados com um bisturi. Os fragmentos foram colocados em microtubos de 1,5mL contendo fixador (Karnovsky's modificado) e armazenados em geladeira a 4°C.

As amostras foram preparadas seguindo a metodologia utilizada no Laboratório de Microscopia e Análise Ultra-estrutural do Departamento de Fitopatologia/UFLA.

As análises estatísticas foram realizadas em software estatístico SISVAR v. 4.3 Build 45, do Departamento de Ciências Exatas da UFLA, 1999-2004. Para os testes de médias, foram utilizados os testes de Scott Knott e Tukey. Para a confecção dos gráficos de regressão, utilizou-se o programa Excel, do Microsoft Office XP, 2003.

Resultados e Discussão

Ensaio I: (a) Atividade de peroxidases.

Como mostrado na Figura 4A, plantas tratadas com ASM apresentaram picos de atividade aos dois e 11 dias após a pulverização (DAP), assim como a testemunha não tratada e não inoculada, porém esta com atividade inferior.

ASM inoculado apresentou picos de atividade aos oito DAP e um pequeno pico ao 14 dias, ambos superiores à testemunha inoculada (Figura 1A). Plantas tratadas com ECC apresentaram atividade de enzimas peroxidases superiores em todas as coletas, com picos aos sete e 11 DAP, semelhante à testemunha, porém, com atividades superiores. Plantas tratadas com ECC e inoculadas apresentaram comportamento semelhante às somente tratadas, assim como a testemunha em relação à testemunha não inoculada. O maior pico da atividade foi quantificada aos 11 DAP das mudas com ECC 150g.L⁻¹ (Figura 1B). Plantas tratadas com OET 500ppm apresentaram picos de atividade no primeiro e segundo DAP, voltando atingir o pico no nono dia, mantendo-se até o décimo quarto dia. Plantas tratadas com OET e inoculadas apresentaram pico no primeiro DAP, caindo no segundo e mantendo-se até o décimo quarto enquanto que a testemunha apresentou pequeno pico de atividade no quarto DAP (Figura 1C).

Diante dos resultados obtidos nos experimentos, pôde-se observar que o ECC não teve efeito direto sobre o patógeno, porém, induziu resistência, em mudas de cafeeiro, contra a cercosporiose, fato confirmado pelo aumento na atividade das enzimas peroxidases.

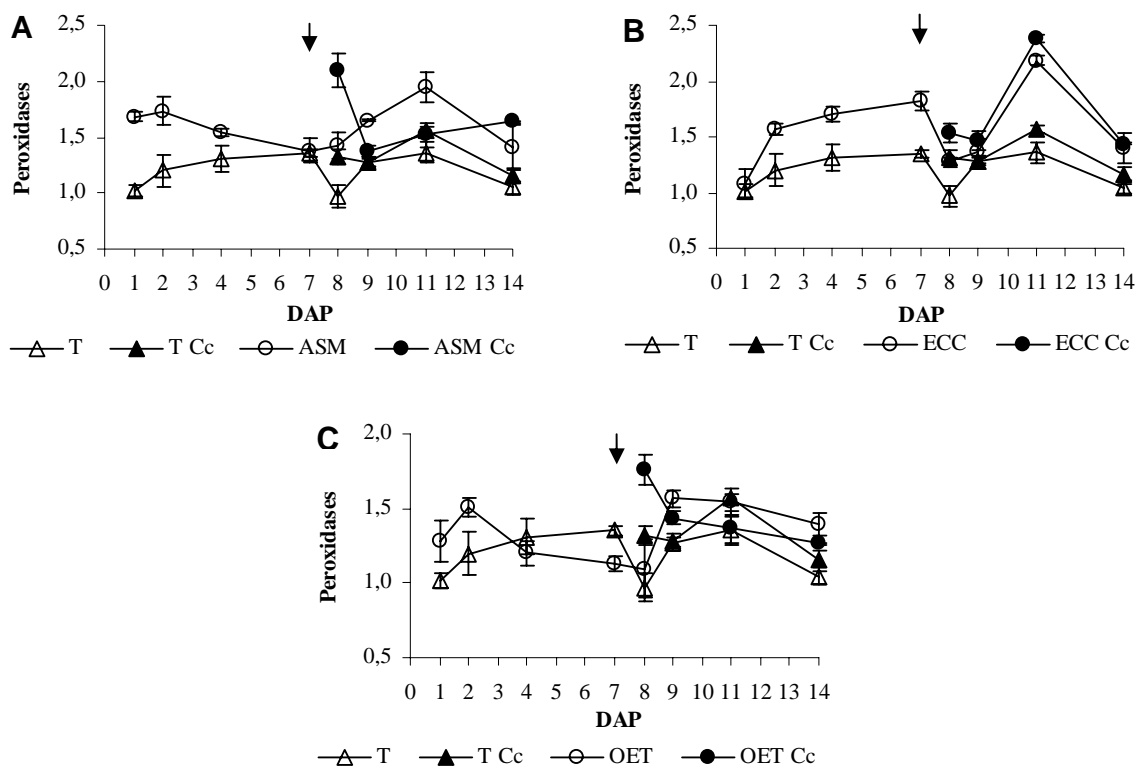


Figura 1 - Atividade de enzimas peroxidases ($U.A.mgP^{-1}.min^{-1}$) em folhas de cafeeiro, aos 1, 2, 4, 7, 8, 9, 11 e 14 dias após pulverização (DAP), com os tratamentos, T (Testemunha) e ASM ($0,2mg.mL^{-1}$) (A); T (Testemunha) e ECC ($150g.L^{-1}$) (B); T (Testemunha) e OET (500ppm) (C). Setas indicam o momento da inoculação com *C. coffeicola* (Cc).

(b) Lignina.

Não houve resposta para os teores de lignina entre os tratamentos, pelo teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade (dados não mostrados).

Ensaio II: Estudo histopatológico de *C. coffeicola*.

Em todos os tratamentos testados, observou-se que os conídios de *C. coffeicola* iniciaram a germinação por volta de quatro horas após inoculação. Nas plantas pulverizadas previamente com ASM, observou-se, quatro horas após a inoculação, que a germinação ocorreu de maneira semelhante à testemunha, assim como as plantas tratadas com ECC $150g.L^{-1}$. Entretanto, nas plantas tratadas com OET 500ppm, observou-se inibição da germinação de conídios de *C. coffeicola*. Provavelmente, o óleo essencial de tomilho apresentou efeito fungitóxico (Figura 2 – quadro esquerdo).

Nas observações realizadas às oito horas após inoculação, pôde-se perceber a formação de pequenas hifas na superfície foliar em plantas tratadas com ASM, com ECC e na testemunha inoculada. Os conídios presentes em folhas tratadas com o ECC apresentavam-se bem desenvolvidos, visto que a superfície foliar ainda apresentava grande quantidade do extrato aderido. Sabe-se que a casca de frutos de café possui, em sua fração solúvel, quantidades significativas de carboidratos, proteínas, taninos e vários compostos, que podem ter favorecido o crescimento fúngico. O OET, oito horas após inoculação, apresentou germinação reduzida, conforme observado anteriormente (Figura 2 – quadro esquerdo).

Nas observações realizadas às 16 e 48 horas após inoculação, como mostra na Figura 2 – quadro direito, os conídios já se apresentavam em estádios avançados de desenvolvimento em plantas tratadas com ASM, ECC e testemunha. O ECC 16 e 48 horas após inoculação apresentou um crescimento superior ao da testemunha, enquanto que, em plantas tratadas com OET, o crescimento ainda mostrava-se reduzido.

O ASM, como em todas observações, não mostrou efeito fungitóxico à germinação de *C. coffeicola*. Provavelmente, no ato da inoculação, a folha já não apresentava resíduo do produto em quantidades significativas que poderiam prejudicar a germinação dos conídios. O mesmo parece não ter ocorrido em plantas tratadas com OET, em que os conídios tiveram sua germinação diretamente afetada pela presença do óleo.

Em estudo realizado por Medice et al. (2007), com o patossistema soja *Phakopsora pachyrhizi*, observações realizadas em microscópio eletrônico de varredura mostraram que plantas tratadas com OET 3000ppm, sete dias antes da inoculação, apresentavam urédias menores, urediniósporos murchos e em menor número. Como verificado por Zambonelli et al. (1996), com outros fitopatógenos, o óleo de tomilho causou degeneração das hifas, indicando um efeito fungitóxico do óleo de tomilho sobre os patógenos.

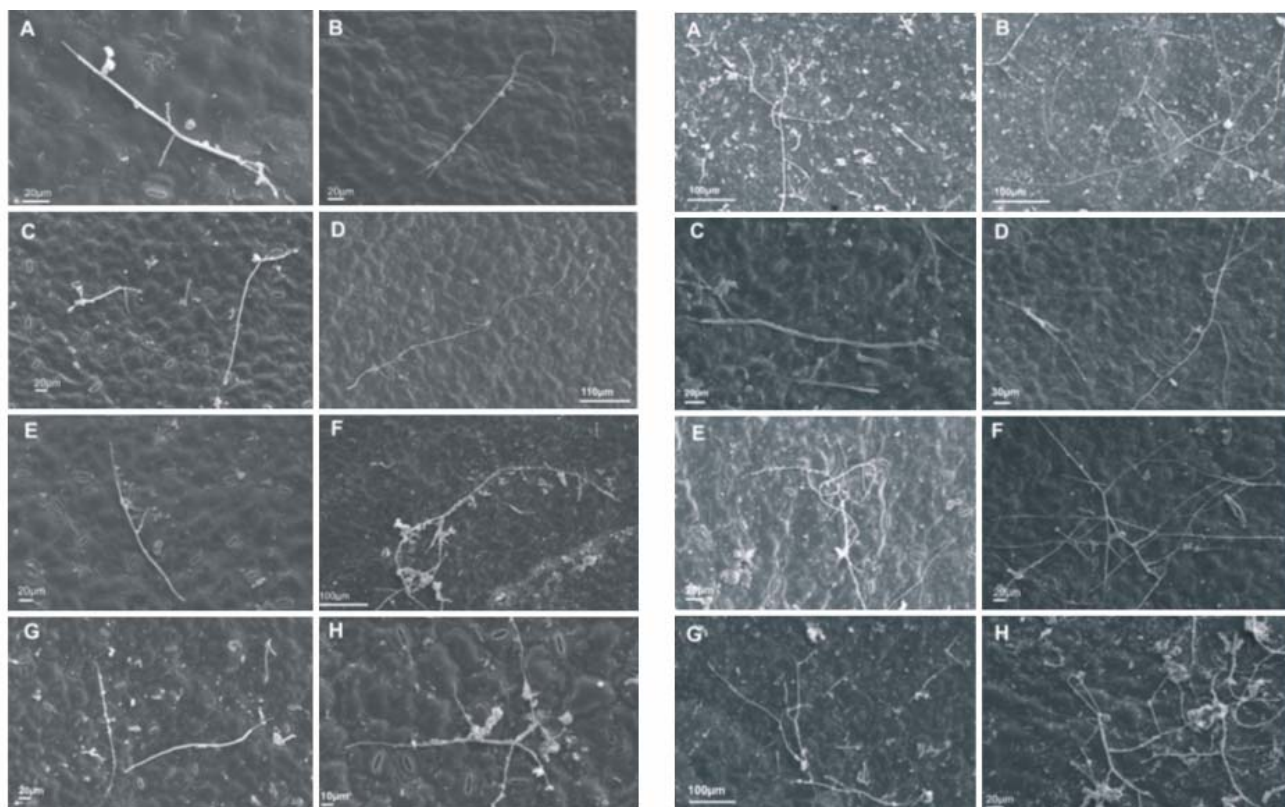


Figura 2. Eletromicrografia de varredura de folhas de cafeeiro inoculadas com *C. coffeicola*. Quadro esquerdo (A) ASM, (B) ECC, (C) OET e (D) Testemunha, 4h após inoculação e (E) ASM, (F) ECC, (G) OET e (H) Testemunha, 8h após inoculação. Quadro direito (A) ASM, (B) ECC, (C) OET e (D) Testemunha, 16h após inoculação e (E) ASM, (F) ECC, (G) OET e (H) Testemunha, 48h após inoculação.

Conclusão

O ECC apresentou o maior pico de atividade de peroxidases no nono dia após inoculação, e o OET no segundo e terceiro dia. O ECC não inibiu a germinação de conídios no ensaio de MEV, diferentemente do OET.

Referências Bibliográficas

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, 1976. v.72, n1/2, p.248-254.

KAR, M.E. & MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase actives during rice leaf senescence. **Plant Physiology** 57: 315-319. 1976.

MEDICE, R. et al. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi*. **Ciência e Agrotecnologia**. v.1, n.1, p83-90, 2007.

MONTIES, B. et al. **Methods in Plant Biochemistry**. New York: Academic Press, 1989. v.1, p.113-158.

PEREIRA, R.B. **Extrato de casca de café e óleo de tomilho no controle de *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke em cafeeiro**. 2006. 79p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ZAMBONELLI, A. et al. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. **Journal of Phytopathology**, v.144, p.491-494, 1996.