

## INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DO CAFEIEIRO À *Coccus viridis*

Flávia Maria Alves<sup>1</sup>; Flávio Lemes Fernandes<sup>1,2</sup>; Filipe Henrique Gentil<sup>1</sup>; Francisco Pinheiro Vieira<sup>1</sup>; Luiz Otávio Duarte Silva<sup>1</sup>; Vinícius Mendes Rodrigues de Oliveira<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Agrárias, Campus de Rio Paranaíba - Universidade Federal de Viçosa- flavia.maria@ufv.br

<sup>2</sup>Laboratório de Entomologia Agrícola, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Viçosa

**RESUMO:** As plantas desenvolveram estratégias sofisticadas para enfrentar o ataque de insetos herbívoros. Mudanças no conteúdo de alcalóides e compostos fenólicos foram investigados em plantas de café em resposta à herbivoria pela *Coccus viridis* (Green, 1889) (Hemiptera: Coccidae). Cultivadas em estufas, as plantas de café foram infestadas artificialmente com o coccídeo. Amostras de folhas foram realizadas aos 15, 30, 45 e 60 dias após a infestação, e cromatografia líquida de alta eficiência foi empregada para identificar e quantificar alguns compostos alcalóides e fenólicos induzidas pela coccídeo em cada data de amostragem. Dos compostos analisados, a cafeína foi o principal alcalóide do café detectada em folhas completamente desenvolvidas, e sua concentração em plantas infestadas aumentou em uma taxa duas vezes maior que nas plantas controle. Compostos fenólicos principais do café foram os ácidos cafêico e clorogênico, e um aumento significativo em seus índices foram observados somente nas plantas infestadas por *C. viridis*. Uma relação positiva e significativa foi observada entre as concentrações de alcalóides e compostos fenólicos e do nível de infestação por adultos e ninfas de *C. viridis*. Este é o primeiro estudo a mostrar aumento dos níveis de alcalóides e compostos fenólicos do café em resposta a herbivoria por insetos escala. Estudos futuros deverão investigar se tais compostos desempenham um papel na resistência do cafeeiro e de defesa contra a coccídeo, e como eles afetam o conjunto de artrópodes associados a plantas de café.

**Palavras-chave:** Café, escala de verde, os insetos phytosuccivorous, cafeína, alcalóides, compostos fenólicos, o metabolismo secundário.

## INDUCED RESPONSE OF *Coffea arabica* to Coccidae

**ABSTRACT** – Changes in alkaloid and phenolic contents were investigated in coffee plants as a response to herbivory by the coffee green scale, *Coccus viridis* (Green, 1889) (Hemiptera: Coccidae), a insect-pest of coffee and several other perennial cultivated plants. Greenhouse-grown, eleven-month-old coffee plants were artificially infested with the coccid in parallel with control, uninfested plants. Leaf samples were taken at 15, 30, 45, and 60 days after infestation, and high performance liquid chromatography was used to identify and quantify some alkaloid and phenolic compounds induced by the coccid in each sampling date. Of the compounds investigated, caffeine was the main coffee alkaloid detected in fully-developed leaves, and its concentration in infested plants increased in a rate twice as high as in control plants. Main coffee phenolics were caffeine and chlorogenic acids, and a significant increase in their contents were observed only in plants infested by *C. viridis*. A positive and significant relationship was observed between alkaloid and phenolic concentrations and the infestation level by adults and nymphs of *C. viridis*. This is the first study to show increased levels of coffee alkaloids and phenolics in response to herbivory by scale insects. Future studies should investigate whether these compounds play a role in coffee resistance and defence against the coccid, and how they affect the assemblage of arthropods associated with coffee plants.

**Key words:** Coffee, green scale, phytosuccivorous insects, caffeine, alkaloids, phenolics, secondary metabolism.

## INTRODUÇÃO

As plantas desenvolveram estratégias sofisticadas para enfrentar o ataque de insetos herbívoros. Estas incluem tanto as defesas constitutivas (por exemplo, tricomas, compostos tóxicos secundários e paredes espessas) e induzidas. A defesa constitutiva pode ser subdividida em indireta (produção de misturas voláteis de odor para atrair os inimigos naturais do atacante) e defesa direta (produção de proteínas antidigestivas, proteases, lectinas tóxicas ou compostos secundários) (Dicke & Hilker, 2003; Karban e Baldwin, 1997; Walling, 2000). (). diretas .

Fenólicos de café, ou seja, ácidos clorogênicos e cafêico e alcalóides, incluindo a cafeína e outras metilxantinas, são tóxicos compostos secundários (Akazawa & Wada, 1961; Nathanson, 1984; Frischknecht et al, 1986;. Appel, 1993). Estes compostos podem desempenhar um papel importante na suscetibilidade a pragas de insetos (Nardini et al, 2002;. Magalhães et al 2010).

*Coccus viridis* (Green, 1889) (Hemiptera: Coccidae) é um inseto-praga generalista com uma longa lista de hospedeiros que abrange 57 famílias de plantas, incluindo diversas espécies de plantas perenes como o *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (Rubiaceae), especialmente para as plantas jovens e aquelas cultivadas sob plantio denso (Hollingsworth, 2000).

Adultos de *C. viridis* 3-4 mm de comprimento, enquanto as ninfas (crawlers) têm menos de 1 mm de comprimento, as ninfas têm intensa movimentação e são responsáveis pela escolha dos locais de alimentação. Adultos e ninfas alimentam de seiva das plantas, suas excretas açucaradas favorecem o desenvolvimento de fungos na superfície foliar reduzindo a fotossíntese (LePelley, 1968).

Eles geralmente permanecem neste local de alimentação a menos que sua posição se torna desfavorável. A fêmea adulta não se move (Mau e Kessing 2006; Roba, 1936; Fredrick, 1943; Zucchi et al, 1993;. Dekle & Fasulo, 2001.; Picanço et al, 2009).

Alguns estudos têm sido realizados para identificar os compostos químicos presentes em plantas de café e sua relação com a resistência de plantas a insetos-pragas, especialmente bicho mineiro do café e da broca do café (Clarke e Macrae, 1989; Kushalapa e Eskes, 1989; Magalhães et al. , 2008, 2010). No entanto, há uma escassez de informações sobre as mudanças na química da planta, envolvendo a interação entre as plantas de café e a cochonilha verde *C. viridis*. Assim o objetivo do trabalho foi realizar o estudo da indução de resistência do cafeeiro a *C. viridis*.

## MATERIAL E MÉTODOS

As plantas de *C. arabica* da variedade Catuaí Vermelho (IAC linhagem 15) foram cultivadas em uma casa de vegetação na Universidade Federal de Viçosa, sob temperatura de  $25 \pm 5$  °C, umidade relativa de 50-70% e fotofase de 12 h. Areia grossa foi utilizada como substrato para as plantas. Antes de usar, a areia foi esterilizada por 24 h em uma solução aquosa de HCL 10%, lavadas 10 vezes com água de torneira para reduzir a acidez, e lavada com água destilada para remover a matéria orgânica, argila e nutrientes. Uma parte da areia foi transferida para bandejas plásticas (80 cm de comprimento x 5 cm de largura x 10 cm) e foram utilizadas para a semeadura 20 sementes. Após a emergência, as plântulas foram regadas diariamente até atingir o estágio de duas folhas cotiledonares, quando foram transplantadas para vasos cheios com a areia tratada. Um balde de tamanho semelhante foi colocado embaixo de cada vaso para recolher a solução nutritiva que, eventualmente, foi drenada. Os nutrientes foram fornecidos diariamente através da aplicação de 0,5 litros de solução nutritiva contendo as seguintes concentrações de macronutrientes ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) 3,0 N, 9,0 K, 1,0 P, 4,0 Ca, 2,1 S e de micronutrientes ( $\text{mol L}^{-1}$ ) 46 B, 0,3 de Cu, 60 Fe, 2,0 Mg, 36 Mn, 0,5 Mo e 0,1 Zn. A água destilada foi adicionada ao volume drenado para completar 0,5 litro. O pH da solução foi ajustado para a faixa de 5,5 a 6,5 com NaOH ou HCl  $0,1 \text{ mol m}^{-3}$  (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil), e esta solução final foi reaplicado à areia de cada vaso, respectivamente. A folha de alumínio foi colocada para cobrir os potes e evitar o desenvolvimento de algas. Ninfas e adultos foram coletadas em diferentes lavouras de café. Os insetos foram transferidos para plantas jovens de café da variedade Catuaí Vermelho.

As folhas medianas de cada planta foram coletadas, aos 15, 30, 45 e 60 dias após a infestação. Ao tirar as folhas das plantas infestadas, o presente coccídeos foram cuidadosamente removidos com um pincel. As folhas foram secas a 40°C por duas semanas durante o qual elas perderam 70% do seu teor de água. As folhas secas foram moídas, e amostras de 1 g foram pesadas, misturados com 30 ml de metanol e colocados em banho-maria por 4 horas a 60 °C para a extração fitoquímica. O extrato resultante foi passada por um papel de filtro, concentrados em evaporador rotatório e rediluted em metanol, para um volume final de 3 ml. As amostras foram posteriormente filtradas novamente sob vácuo em um extrator de fase sólida C18 (Guerreiro-Filho & Mazzafera, 2000, 2003; Ramiro et al, 2006).

Para definir os picos e o tempo de retenção de cada composto estudado, foram utilizados para as determinações cromatográficas: ácido clorogênico (ácido 5-O-cafeoil-D-quinico), cafeína (1,3,7-trimetilxantina), ácido cafêico (ácido 3,4-di-hidroxi-cinâmico), aminofilina (1,3-dimethylxantine) alantoína, teobromina (3,7-dimethylxantine) e (2,5-dioxo-4-imidazo lidinyurea).

Os extratos obtidos foram diluídos em 10 ml metanol. Alíquotas de 0,5 ml foram obtidos a partir de cada amostra e diluídos em metanol: água (1: 1) a um volume de 10 ml e 2 ml desta solução foram diluídas a 10 ml com a mesma mistura de solventes. Esta última solução foi filtrada através de uma unidade de filtragem com membrana PTFE (0,45 mm e malha de 13 mm de diâmetro). Uma alíquota de 20 ml da solução filtrada foi utilizada para a injeção no cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC) Shimadzu modelo LC-10AD (duas bombas) com um detector SPD-10AV dual (Quioto, Japão), adaptado para detectar compostos alcalóides ( cafeína e metilxantinas relacionados) com  $\lambda = 272$  nm, em um canal e para a detecção de compostos fenólicos (isto é, os ácidos cafêico e clorogênico) em  $\lambda = 320$ nm no canal dois. O HPLC foi equipado com um sistema de comunicação Shimadzu CBM-10A. Os compostos de interesse foram separados por uma coluna de fase reversa RP-18 (LiChrosorb: 250 mm x 4,6 mm x 5 mm), utilizando uma mistura metanol: solução de água com 1,0 mM de HCl em gradiente (0,1-7,0 min (17: 83%), 7,1-37,0 min (23: 77%) e 37,1-40,0 min (100: 0%), a uma vazão de 1,0 ml min<sup>-1</sup> segundo Magalhães et al. (2008). Os padrões químicos foram individualmente injetados na coluna e também injetados em conjunto para determinar o tempo de retenção. O aumento das concentrações de cada padrão (1, 5, 10, 20, 100 e 200 mg ml<sup>-1</sup>) foram injetados na coluna para o estabelecimento da curva de calibração de cada padrão e eventual quantificação das amostras obtidas a partir da folhas de café pelo método do padrão externo. As quantificações foram realizadas em triplicata para cada lote de folhas utilizadas na extração.

Como medimos vários compostos secundários das mesmas plantas ao longo do tempo, foi realizada uma análise de medidas repetidas de variância sobre os dados, que combina a análise univariada e multivariada. Assim, os resultados da quantificação de fitoquímicos foram submetidos análise multivariada com medidas repetidas (Proc GLM, SAS Institute, 2002) para testar a hipótese nula de inexistência de diferenças entre os tratamentos ao longo do tempo para todos os compostos estudados, assegurando um valor de significância de  $P < 0,05$ . O teor do composto foi analisada em cada data por meio de análise de medidas repetidas de variância univariada (ANOVA) com uma estrutura de covariância antedepence (Proc MIXED, do SAS Institute, 2002). O modelo de análise de variância incluiu o efeito

principal para momento, o tratamento e a interação dos efeitos principais. Este modelo foi escolhido porque tinha um critério de informação Akaike (AIC) menor que o de outros modelos e um número significativo de log de verossimilhança ( $P < 0,05$ ) em relação à estrutura composta de simetria de covariância (Littlell et al., 2006). Se a interação tempo  $\times$  tratamento foi significativa ( $P < 0,05$ ), análise de regressão linear foram utilizados para reconhecer a tendência da concentração de fitoquímicos, em cada tratamento ao longo do tempo. Além disso, a relação entre o número de adultos e ninfas de coccídeos e da concentração dos fitoquímicos presentes nas folhas de café foram analisadas utilizando análise de regressão linear (Proc REG, SAS Institute, 2002). Os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância foram verificadas utilizando o procedimento PROC GPLOT univariada e do SAS (SAS Institute, 2002), e nenhuma transformação foi necessária.

## RESULTADOS

O sistema cromatográfico permitiu a identificação e quantificação de alantoína, cafeína teobromina, ácido, aminofilina clorogênico, ácido caféico e no tempo de retenção de 13,54, 10,85, 12,01, 14,02, 15,05 e 16,71 min, respectivamente. Entre estes compostos, teofilina, teobromina e alantoína foram detectados em baixas concentrações infestadas ( $3,36 \pm 1,21$ ,  $0,41 \pm 0,15$  e  $1,91 \pm 0,60$ ) e plantas não-infestadas ( $3,31 \pm 1,79$ ,  $0,70 \pm 0,37$  e  $0,63 \pm 0,39$ ) e não foram consideradas nas análises subseqüentes.

Medidas repetidas análise de variância multivariada indicam uma redução significativa da interação tratamento  $\times$  tempo na concentração global fitoquímico em folhas de café (Wilk's Lambda = 0,003; F8, 9 = 383,21,  $P < 0,001$ ), embora um efeito significativo de tratamento principal (Wilk's Lambda = 0,003; F3, 14 = 1,687,  $P < 0,001$ ) e tempo também foi detectada (Wilk's Lambda = 0,003; F8, 9 = 382,38,  $P < 0,001$ ). Após os resultados da ANOVA de medidas repetidas e regressão análises para cada fitoquímico confirmou que as suas concentrações variaram de forma diferente em plantas infestadas e não infestadas ao longo do tempo (Tabela 1), com plantas infestadas sempre apresentando encostas significativa ( $P < 0,05$ ) e maior em relação aos não infestadas por plantas (Figura 1). Nas plantas controle, no entanto, o conteúdo de ácido clorogênico fenóis e ácido caféico não se alterou ao longo do tempo ao contrário daqueles do alcalóide de cafeína, que aumentou ao longo do tempo nessas unidades, embora a taxa de aumento não foi tão alta como nas plantas infestadas (Figura 1).

A densidade da população de adultos e ninfas de *C. viridis* variou entre plantas infestadas durante o curso do experimento. As plantas tinham números de adultos variando de 1 a 17 e estágios imaturos do coccidae variando de 1 a 100. Mais importante ainda, uma relação positiva e significativa foi observada entre o número de ninfas e adultos de *C. viridis* no cafeeiro e as concentrações dos três fitoquímicos (Figura 2).

As plantas de café infestadas por *C. viridis* acumularam maiores teores de ácido cafeína, caféico e clorogênico em relação às plantas não infestadas por um período de 45 dias após a infestação. A nosso conhecimento este é o primeiro estudo a documentar a indução de metabólitos secundários de café por um inseto escala. Várias espécies de plantas têm mostrado uma resposta induzida ao ataque de insetos fitófagos (Kessler e Baldwin, 2002; Rohde et al., 2004). No café, no entanto, há uma escassez de estudos sobre a resposta induzida a insetos-alimentação (Ramiro et al. 2006, Melo et al. 2006, Magalhães et al. 2010).

O papel dos compostos fenólicos do café e alcalóides em plantas resistentes contra *C. viridis* merece atenção em futuras investigações. Compostos fenólicos, incluindo os ácidos clorogênicos e caféico, que foram fortemente induzidos no presente estudo, foram conhecidos pelo seu papel na defesa das plantas (Bennett & Wallsgrove, 1994). Os compostos fenólicos e ácidos clorogênicos, ácidos caféico, cafeína e os alcalóides são considerados como compostos pesticidas. Recentemente, (Leis et al., 2009) o ácido clorogênico identificado como fator de resistência de tripes em crisântemo, e (Kim & Sano, 2008) sugeriram que a cafeína estimula os sistemas de defesa endógenos das plantas através da ativação direta ou indireta da expressão gênica.

## CONCLUSÕES

O presente estudo centrou-se nas mudanças na química do cafeeiro induzida pelo *C. viridis* mostrando que os alcalóides e compostos fenólicos aumentaram em plantas infestadas. Estudos futuros deverão investigar se tais compostos desempenham um papel na resistência do cafeeiro e de defesa contra a coccídeo, e como eles afetam o conjunto de artrópodes associados às plantas de café.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Clarke RJ & Macrae R (1989) Coffee. 1st edn. Elsevier Applied Science Publishers, London, UK.  
Constabel CP & Ryan CA (1998) A survey of wound and methyl jasmonate induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. *Phytochemistry* 47: 507-511.  
Dicke M & Hilker M (2003) Induced plant defences: from molecular biology to evolutionary ecology. *Basic and Applied Ecology* 4: 3-14.  
Green TR & Ryan CA (1972) Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* 175: 776-777.

- Guerreiro Filho O & Mazzafera P (2000) Caffeine does not protect against the leaf miner *Perileucoptera coffeella*. *Journal of chemical ecology* 26: 1447-1464.
- Hollingsworth RG (2000) Green scale as a quarantine pest in Hawaii. *Chronica Horticulturae* 10: 15-17.
- Hollingsworth RG, Armstrong JW & Campbell E (2002) Caffeine as a repellent for slugs and snails. *Nature* 417: 915-916.
- Karban R & Baldwin, IT (1997) *Induced Responses to Herbivory*. University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Lepelley RH (1968) *Coccus viridis* (Green) The green scale. *Pests of Coffee* (ed. by RH Lepelley), pp. 353-355. Longmans, Green & Co., London and Harlow.
- Magalhães STV, Guedes RNC, Lima ER & Demuner AJ (2008) Coffee leaf volatiles and egg laying by the coffee leaf miner *Leucoptera coffeella*. *Crop Protection* 27: 1038-1041.
- Nardini M, Cirillo E & Sacaccini C (2002) Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50: 5735-5741.
- Nathanson JA (1984) Caffeine and related methylxanthines: possible naturally occurring pesticides. *Science* 226: 184-187.
- Ramiro DA, Guerreiro-Filho O & Mazzafera P (2006) Phenol contents, oxidase activities, and the resistance of coffee to the leaf miner *Leucoptera coffeella*. *Journal Chemical of Ecology* 32: 1977-1988.