

**EXTRATO DE CASCA DE CAFÉ E ÓLEO DE
TOMILHO NO CONTROLE DE *Cercospora*
coffeicola Berk & Cooke EM CAFEEIRO**

RICARDO BORGES PEREIRA

2006

RICARDO BORGES PEREIRA

**EXTRATO DE CASCA DE CAFÉ E ÓLEO DE TOMILHO NO
CONTROLE DE *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke EM CAFEIEIRO**

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

Orientador
Prof. Dr. Eduardo Alves

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

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

Pereira, Ricardo Borges

Extrato de casca de café e óleo de tomilho no controle de *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke em cafeeiro / Ricardo Borges Pereira. – Lavras: UFLA, 2006.

79p. : il.

Orientador: Eduardo Alves.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Cafeeiro. 2. *Cercospora coffeicola*. 3. Indução de resistência. 4. Extratos vegetais. 5. Óleos essenciais. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.7394

RICARDO BORGES PEREIRA

**EXTRATO DE CASCA DE CAFÉ E ÓLEO DE TOMILHO NO
CONTROLE DE *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke EM CAFEIEIRO**

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

APROVADA em 28 de julho de 2006.

Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu DFP-UFLA

Prof. Dr. Élberis Pereira Botrel DAG-UFLA

Prof. Dr. Eduardo Alves
Departamento de Fitopatologia/UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

DEDICATÓRIA

A Deus,

que esteve sempre comigo em toda a minha caminhada,
dando-me força quando em mim já não havia e
que sempre me estimulou a seguir em frente.

A meus pais e irmãos,

Túlio, Sivia, Túlio Jr. e Virgínia, que muito amo,
que compartilharam de meus ideais, compreenderam-me,
incentivaram-me, viveram comigo meus problemas
e sempre tentaram solucioná-los, dando-me apoio incondicional,
até mesmo quando a distância nos separava,
ajudando-me a superar todos os obstáculos
dividindo comigo minhas dificuldades.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus e meus familiares, pelo incentivo, amor e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, me dando-me boas oportunidades.

A Universidade Federal de Lavras pela oportunidade e auxílios concedidos para a realização do mestrado.

A CAPES pela bolsa concedida.

Ao professor Eduardo Alves, pela amizade, orientação e compreensão.

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

Aos amigos Daniel, Frederico, Igor, Josimar e Pedro pela amizade sincera e apoio em todos os momentos difíceis de minha vida.

Aos amigos de mestrado, Alex, Cleilson, Daniella, Eduardo, Franklin, Hermínio, Joel, Leo Girão, Liliana e Regiane, pela amizade e os momentos inesquecíveis durante nossa convivência.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, em especial Carla e Moisés, pela convivência e amizade.

Aos graduandos Fabrício, Henrique, Jerônimo e Katiucia, que muito contribuíram para a realização dos trabalhos.

Aos amigos da cidade de Lavras, Ísis, Josiane e Ramon, que, nos momentos difíceis, sempre me acolheram.

Aos amigos da Fitopatologia: Alessandra, Ângelo, Cristiano, Deila, Dejânia, Edson, Ellen, Fernanda e Jadir, pelas conversas e amizade.

A todos os servidores técnico-administrativos do Departamento de Fitopatologia, em especial a Eloísa Leite, pela paciência e amizade.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, pelos ensinamentos e pelos exemplos de profissionais comprometidos com a pesquisa e a educação.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para o cumprimento desta importante etapa da minha vida.

Agradeço

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1 Extrato de casca de café e óleo de tomilho no controle de <i>Cercospora coffeicola</i> Berk & Cooke em cafeeiro	1
1 INTRODUÇÃO GERAL	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO	5
2.1 Importância da cultura do café	5
2.2 Problemas da cafeicultura brasileira	5
2.2.1 Mercado do café	5
2.2.2 Problemas fitossanitários	6
2.2.2.1 Cercosporiose do cafeeiro	6
2.3 Mecanismo de defesa em plantas	8
2.4 Indução de resistência	9
2.5 Extratos vegetais no controle de fitopatógenos	11
2.6 Óleos essenciais no controle de fitopatógenos	14
2.7 Estudo histopatológico de <i>Cercospora coffeicola</i>	17
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO 2 Extrato de casca de café e óleo essencial de tomilho na germinação, crescimento micelial e incidência de <i>Cercospora coffeicola</i>	27
RESUMO	28
ABSTRACT	29
1 INTRODUÇÃO	30
2 MATERIAL E MÉTODOS	32

2.1 Localização	32
2.2 Obtenção do extrato de casca de café	32
2.3 Obtenção do inóculo	32
2.4 Ensaio I: Efeito do extrato de casca de café e óleo essencial de tomilho sobre a germinação de conídio de <i>C. coffeicola</i>	33
2.5 Ensaio II: Efeito do extrato de casca de café e óleo essencial de tomilho sobre o crescimento micelial de <i>C. coffeicola</i>	34
2.6 Preparo das mudas de cafeeiro	35
2.7 Ensaio III: Efeito de doses do extrato de casca de café na proteção de plantas de cafeeiro contra <i>C. coffeicola</i>	36
2.8 Ensaio IV: Efeito das doses do óleo essencial de tomilho na proteção de plantas de cafeeiro contra <i>C. coffeicola</i>	36
2.9 Análises estatísticas	37
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.1 Efeito de doses do extrato de casca de frutos de café e óleo essencial de tomilho na germinação de conídio de <i>C. coffeicola</i>	38
3.1.1 Extrato de casca de café	38
3.1.2 Óleo essencial de tomilho	40
3.2 Efeito de doses do extrato de casca de café e óleo essencial de tomilho sobre o crescimento micelial de <i>C. coffeicola</i>	42
3.2.1 Extrato de casca de café	42
3.2.2 Óleo essencial de tomilho	43
3.3 Efeito de doses do extrato de casca de café e óleo essencial de tomilho sobre a incidência de <i>C. coffeicola</i> em mudas de cafeeiro	47
3.3.1 Extrato de casca de café	47
3.3.2 Óleo essencial de tomilho	50
4 CONCLUSÃO	52
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

CAPÍTULO 3 Caracterização bioquímica e ultra-estrutural de folhas de cafeeiro pulverizadas previamente com extrato de casca de café e óleo essencial de tomilho, e inoculadas com <i>C. coffeicola</i>	56
RESUMO	57
ABSTRACT	58
1 INTRODUÇÃO	59
2 MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1 Preparo das mudas de cafeeiro	60
2.2 Coleta e armazenagem de amostras	61
2.3 Caracterização dos mecanismos envolvidos na proteção do cafeeiro a <i>Cercospora coffeicola</i>	61
2.3.1 Quantificação de proteínas totais	61
2.3.2 Determinação da atividade de peroxidases	62
2.3.3 Quantificação de lignina	62
2.4 Estudo histopatológico <i>C. coffeicola</i>	63
2.4.1 Instalação do experimento e inoculação	63
2.5 Coleta das amostras para microscopia	64
2.5.1 Preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura	64
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
3.1 Caracterização bioquímica	65
3.1.1 Atividade de peroxidases	65
3.1.2 Determinação de lignina	68
3.2 Estudo do efeito do ASM, ECC e OET no processo inicial de infecção de <i>C. coffeicola</i> em folhas de café, por meio da microscopia eletrônica de varredura	70
4 CONCLUSÃO	75
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
CONSIDERAÇÕES FINAIS	79

RESUMO

PEREIRA, Ricardo Borges. **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.*

Os objetivos deste trabalho foram: (i) avaliar o efeito de diferentes doses do extrato de casca de frutos de café (ECC) e óleo essencial de tomilho (OET) na germinação e no crescimento micelial de *Cercospora coffeicola*; (ii) avaliar a eficiência do ECC e OET como possíveis indutores de resistência em casa-de-vegetação; (iii) caracterizar bioquimicamente os efeitos dos indutores de resistência, ECC e OET, usando como marcadores a atividade das enzimas peroxidases e a lignificação; (iv) e observar por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) os efeitos destes na germinação e no desenvolvimento do fungo. De acordo com os resultados observados, o ECC não apresentou efeito fungitóxico aos conídios de *C. coffeicola*, promovendo uma maior germinação em relação à testemunha. O OET apresentou efeito fungitóxico aos conídios, nas concentrações de 500, 1000 e 2000ppm. No ensaio de crescimento micelial, todas as doses do ECC e OET inibiram o crescimento micelial em relação à testemunha. Nos experimentos realizados em casa-de-vegetação, o ECC (150g.L⁻¹) e o OET (500ppm), apresentaram melhor controle da cercosporiose, 28,1% e 20%, respectivamente, em relação à testemunha. Em relação à caracterização das respostas de defesa, as plantas somente tratadas com ECC apresentaram pico de atividade de peroxidases no sétimo e décimo primeiro dias após tratamento. As plantas inoculadas apresentaram comportamento semelhante. As plantas tratadas com OET apresentaram picos de atividade no segundo e terceiro dias após tratamento, voltando a atingir o pico no nono dia, no qual mantiveram-se até o décimo quarto dia. As plantas inoculadas apresentaram pico apenas no primeiro dia após inoculação. Não foram observadas diferenças significativas na concentração de lignina aos 14 dias após pulverização entre os tratamentos testados. Observou-se em MEV que o ECC promoveu melhor germinação dos conídios e desenvolvimento do fungo, diferentemente do OET, que reduziu a germinação dos conídios e o desenvolvimento do fungo em todos os tempos.

* **Comitê de Orientação:** Eduardo Alves – UFLA (Orientador); Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

PEREIRA, Ricardo Borges. **Coffee peel extract and thyme oil in the control of *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke in coffee**. 2006. 79p. Dissertation (Master in Phytopathology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The objectives of this work were: (i) to assess the effect of different doses of coffee berry husk extract (CHE) and thyme essential oil (TEO) on the germination and mycelial growth of *Cercospora coffeicola*; (ii) to assess the efficiency of CHE and TEO as possible resistance inducers in green house conditions; (iii) to biochemically characterize the effects of the resistance inducers CHE and TEO through the assay of peroxidase activity and lignification; (iv) to observe through scanning electron microscopy (SEM), the effects of these inducers on the spore germination and fungal development. It was observed that CHE had no fungitoxic effect on *C. coffeicola* conidia, promoting higher conidia germination in comparison with the control. TEO presented fungitoxic effect to the conidia in the concentrations of 500, 1000 and 2000ppm. The mycelial growth was inhibited in all CHE and TEO doses applied. In the green house trials, CHE (150g.L⁻¹) and TEO (500ppm) reduced *C. coffeicola* incidence to 28.1% and 20%, respectively, in comparison with the control treatment. Plants that received only CHE had peaks of peroxidases activity in the seventh and eleventh days after treatment and, when inoculated the plants had similar behavior. Plants treated with TEO showed activity peaks in the second and third days after treatment, having another peak in the ninth day which was observed until the fourteenth day. In the inoculated plants it was observed a peak only in the first day after inoculation. There were not significant differences in the lignin concentrations fourteen days after treatment spraying. It was observed through SEM that CHE promoted better conidial germination and fungal development; on the other hand TEO reduced conidial germination and fungal development in all the times evaluated.

* **Advising Committee:** Eduardo Alves - UFLA (Adviser), Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Co-adviser).

CAPÍTULO 1

EXTRATO DE CASCA DE CAFÉ E ÓLEO DE TOMILHO NO CONTROLE DE *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke EM CAFEIRO

1 INTRODUÇÃO GERAL

O cafeeiro é uma planta originária das regiões altas da Etiópia (Graner & Godoy Junior, 1967). A grande maioria das histórias que cercam essa planta, envolve a bebida de seus frutos como alimento e estimulante.

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, com produção de 40,62 milhões de sacas no ano safra 2005/2006, representando uma das principais fontes de divisas para o país. Minas Gerais destaca-se como o maior produtor nacional, com 20,1 milhões de sacas e as regiões Sul e Oeste Mineiro contribuem com mais da metade desta produção, ou seja, 13,2 milhões de sacas (Conab, 2006).

Devido ao aumento na demanda pelo café, principalmente nos países de clima mais frio, seu cultivo tem sido sempre crescente. No entanto, a cultura ainda apresenta alguns problemas que contribuem para a redução de sua produção, sendo as doenças uma das principais causas das perdas no campo. Dentre as principais doenças, tem-se a ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix*, a cercosporiose causada por *Cercospora coffeicola* e a mancha-de-phoma, causada por *Phoma* sp., entre outras menos frequentes, como as antracnoses do complexo *Colletotrichum* spp.

A cultura do café é, atualmente, uma das que utilizam maiores quantidades de defensivos no controle de doenças, com perigo de contaminação ao meio ambiente e ao aplicador. Os gastos de fungicidas para o controle de doenças fúngicas em uma lavoura de café adensado, do primeiro ao sexto ano, representam, aproximadamente, 36,86% dos gastos com os insumos e materiais de consumo (Agrianual, 1999).

Para que a cafeicultura continue desempenhando esse importante papel na economia brasileira, ela necessita ser auto-sustentável, a partir de um

conjunto de práticas de manejo, as quais devem ser empregadas de maneira correta e eficiente. Dentre as diversas práticas, destaca-se o manejo integrado de doenças de plantas (Guzzo et al., 2001; Marchi et al. 2002).

Como medida alternativa de controle das doenças, existe o controle biológico, o qual utiliza microrganismos antagônicos, que tenham ação direta sobre o microrganismo patogênico; tem-se também a indução de resistência em plantas, que envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes nela existentes, em resposta a tratamentos com agentes bióticos e abióticos (Bettiol, 1991).

A resistência induzida ativa mecanismos de defesa representados por barreiras bioquímicas ou estruturais, aumentando a resistência geral da planta (Uknes *et al.*, 1996; Oliveira et al., 1997). A proteção obtida contra determinado patógeno pode ser local ou sistêmica, dependendo do intervalo de tempo entre o tratamento inicial (indutor) e a inoculação do patógeno (desafiador). A sua duração pode ser de poucos dias a algumas semanas ou, mesmo, durar todo o ciclo de vida da planta (Pascholati & Leite, 1995), passando, assim, a funcionar como um mecanismo de defesa constitutivo da mesma.

No Brasil, a cafeicultura orgânica também tem aumentado muito nos últimos anos, devido à alta remuneração que a atividade oferece nos anos de boa produção. Segundo Associação de Cafeicultura Orgânica do Brasil (ACOB), a produção de café orgânico no Brasil representa cerca de 0,5% do total nacional, sendo 80% desta exportada a preços superiores aos do café convencional (Rodrigues, 2005). Com esse crescimento, têm-se buscado novas alternativas de manejo de doenças e pragas, que atendam às rigorosas normas de produção, a qual possui um conceito simplificado de que a cafeicultura orgânica é um modelo de agricultura sem o uso de agrotóxicos.

Baseado nestas exigências, o uso de extratos vegetais e óleos essenciais com potenciais ações no controle de doenças do cafeeiro poderá contribuir para

o aumento da produção, uma vez que seus usos não oferecem risco ao ambiente.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos avaliar o efeito direto do extrato de casca de café e óleo de tomilho sobre *Cercospora coffeicola*, bem como a eficácia destes produtos no controle da cercosporiose, buscar as melhores doses e, por meio de análises bioquímicas e ultra-estruturais, observar o modo de ação destes compostos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da cultura do café

O gênero *Coffea* abrange mais de 100 espécies botânicas conhecidas, no entanto, somente as espécies *Coffea arabica* L. e *C. canephora* Pierre são cultivadas em regiões tropicais e subtropicais. A maior parte do café produzido mundialmente é da espécie *C. arabica*, ocupando, aproximadamente, 70% das áreas cultivadas (Mônaco, 1977).

O Brasil é o maior produtor e o segundo maior consumidor de café do mundo, com uma produção estimada em 40,62 milhões de sacas na safra 2006/2007. O aumento da produção deve-se, principalmente, à bienalidade e à melhoria dos tratamentos culturais (podas, desbrotas, adubações e controle fitossanitário), impulsionadas pela melhoria dos preços de mercado, a partir do segundo semestre de 2005 (Conab, 2006). Como consumidor, o país fica atrás somente dos EUA, com aumento do consumo à taxa de 1,6% ao ano. O consumo nacional equivale a, aproximadamente, 50% do total consumido por todos os outros países produtores (Agrianual, 2006).

O Brasil é o maior exportador mundial de café, tendo exportado 27,1 milhões de sacas no ano 2004/05 e 20,5 milhões no ano de 2005/06 (Jornal Coffee Business, 2006), tendo importante contribuição para o PIB.

2.2 Problemas da cafeicultura brasileira

2.2.1 Mercado do café

A cafeicultura no Brasil representa uma fatia considerável do agronegócio brasileiro, gerando uma receita, no ano safra 2002/2003, de 1,2 bilhão de dólares (Agrianual, 2004). Os principais destinos de exportação de café brasileiro são, Alemanha, Estados Unidos, Itália e Japão.

No final da década de 1990 e início da década de 2000, 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, 2004).

Este aspecto da procura pela qualidade no mercado internacional do café exigiu do Brasil uma modernização da produção, tanto pelo uso de melhores cultivares, como pelo controle fitossanitário e cuidados na pós-colheita. Os cafés brasileiros têm-se mostrado cada vez mais competitivos (Nojosa, 2003).

A cafeicultura representa uma contribuição importante para o PIB dos países produtores e consumidores, porém, a distribuição das riquezas geradas pelo mercado do café entre os países produtores e consumidores é muito desequilibrada. Em 2001, o mercado do café gerou cerca de 70 bilhões de dólares, contudo, em função desses desequilíbrios, 92% da receita foi retida por países consumidores e 8% ficaram com os países produtores (Nojosa, 2003).

2.2.2 Problemas fitossanitários

Além dos problemas de mercado, a produção cafeeira tem como um dos principais obstáculos a ocorrência de uma série de doenças causadas por patógenos. Entre essas doenças, podem-se citar a ferrugem do café, causada por *Hemileia vastatrix*; a cercosporiose, causada por *Cercospora coffeicola*; a antracnose dos frutos (CBD), causada por *Colletotrichum kahawae* e ainda não presente no Brasil; o nematóide das galhas, *Meloidogyne* spp.; a mancha-de-ascochyta, causada por *Ascochyta coffeae*; e mancha-de-phoma, causada por *Phoma* spp.; entre outras (Zambolim et al., 2005).

2.2.2.1 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. *C. coffeicola* pertence à família Dematiaceae, ordem Moniliales, classe dos fungos mitospóricos (Godoy et al., 1997).

Atualmente, está presente de forma endêmica em quase todas as regiões que apresentam condições favoráveis, constituindo-se numa doença de importância econômica, causando desfolha e reduzindo a produção, além de prejuízos pela depreciação da qualidade da bebida do café (Chalfoun, 1997).

Ataques mais intensos de doenças no campo ocorrem, principalmente, em regiões mais altas, chegando a causar perdas de 30% na produção (Carvalho & Chalfoun, 2001). Os prejuízos com a cercosporiose ganharam maior importância econômica com a implantação de lavouras nos cerrados e em áreas de baixa fertilidade natural (Pozza et al., 2000).

Nas folhas, o sintoma é caracterizado por manchas circulares de coloração castanho-clara a castanho-escura (0,5-0,8cm de diâmetro), com centro branco-acinzentado, quase sempre envolvido por um halo amarelo, dando à lesão aspecto de olho. No centro das lesões, são formados os esporodóquios escuros do fungo, onde são produzidos conídios hialinos, multisseptados, com 100-270µm de comprimento por 3-4µm de diâmetro, agrupados em fascículos. A presença de uma única lesão na folha é suficiente para que a planta produza maior quantidade de etileno, provocando a queda da mesma (Chalfoun, 1997).

Nos frutos, a doença pode iniciar-se quatro meses após a floração, causando lesões deprimidas de coloração castanho-clara, dispostas no sentido do pedúnculo-coroa do fruto. Quando atacados no estágio ainda verde e verde-cana, os frutos amadurecem precocemente, iniciando por um avermelhamento a partir da lesão, provocando chochamento e queda prematura dos grãos. Em frutos mais desenvolvidos, a lesão aumenta de tamanho, tornando-se mais escura e a casca permanece aderida ao pergaminho, dificultando o processo de despulpamento (Chalfoun, 1997).

Em condições de viveiro, causa desfolha intensa, provocando atraso no desenvolvimento e raquitismo das mudas (Godoy et al., 1997).

Solos com baixa fertilidade ou com desequilíbrio nutricional, principalmente em cálcio, potássio e nitrogênio, predispõem a planta a um ataque mais intenso do patógeno. Alta umidade relativa e temperaturas amenas são condições ideais para o desenvolvimento do fungo, pois o mesmo desenvolve-se em temperaturas entre 10°C e 25°C. Condições de alta luminosidade e alta carga pendente também contribuem para o desenvolvimento da doença, pois os frutos drenam grande parte dos nutrientes das folhas para completar seu desenvolvimento e, assim, a folha se torna desnutrida, apresentando uma maior incidência da doença (Zambolim, 2003).

Como medidas de controle da doença, algumas práticas culturais podem ser adotadas, principalmente em condições de viveiro, como o controle da irrigação, a luminosidade, e a utilização de substratos equilibrados e com boas propriedades físicas. O controle químico pode ser realizado por meio de aplicações de fungicidas cúpricos alternados com fungicidas sistêmicos. Triazóis e strobilurina são bem utilizados, pois, com as mesmas aplicações, já se realiza também o controle da ferrugem (Godoy et al., 1997).

2.3 Mecanismo de defesa em plantas

As plantas detêm uma rede de mecanismos de defesa contra patógenos, podendo esses serem pré-formados ou, mesmo, pós-formados em resposta de defesa ao processo de infecção. Os mecanismos de defesa pré-formados consistem de barreiras físicas, como a parede celular primária, composta de celulose, hemicelulose e pectina, e parede celular secundária, podendo essa ser reforçada pela deposição de lignina, impregnação de sílica, ceras, suberina e cutina (Ride, 1983).

Outro importante mecanismo de defesa são os produtos do metabolismo

primário e secundário dos vegetais. Existem, nos vegetais, proteínas cujos genes têm sua expressão regulada por sinais liberados pelo processo de infecção, denominadas PRps (proteínas relacionadas à patogênese). As PRps podem apresentar funções variadas, quando induzidas por sinais endógenos ou exógenos à planta (Loon, 1999).

Além das PRps, as enzimas relacionadas à síntese de fitoalexinas, bem como a lignificação e a deposição de calose podem ter sua síntese aumentada em resposta ao processo de infecção (Hammond-Kosack & Jones, 2000).

A maioria das PRps tem sua síntese ativada ou potencializada por indutores de resistência, conferindo amplo espectro de resistência a vários patógenos. A avaliação temporal da expressão de PRps em plantas tratadas com indutores (bióticos ou abióticos) é um excelente indicativo do seu efeito protetor e a durabilidade desse efeito, podendo, assim, estabelecer um cronograma de recomendação para a aplicação dos indutores (Cavalcanti 2005).

2.4 Indução de resistência

Desde o início do século XX, visando encontrar medidas de controle de doenças de plantas, pesquisadores vêm estudando o fenômeno da indução de resistência. Beauverie & Ray (1901), citados por Kessmann et al. (1994), foram os pioneiros nesses estudos, demonstrando que estirpes fracas de *Botrytis cinerea* tornavam plantas de *Begonia* sp. resistentes às estirpes virulentas do fungo.

Baseando-se nesta alternativa de controle, vários pesquisadores têm investigado metodologias eficazes para a determinação dos possíveis componentes estruturais e bioquímicos que possam conferir resistência às plantas.

A indução de resistência em plantas contra fitopatógenos representa um método alternativo no controle de doenças, o qual ativa os mecanismos de

defesa da planta que se encontram na forma latente. Resende et al. (2004), afirmam que a resistência induzida em plantas pode ocorrer pelo tratamento com agentes bióticos (microrganismos viáveis ou inativados) ou abióticos. Segundo Garcia (1990), esta resistência poderá ocorrer devido a estímulos diferentes da doença. Como exemplo dessa utilização, cita-se o uso de substâncias como AS (ácido salicílico) e o ASM (acibenzolar-S-metil) para a ativação da resistência que, em outras culturas, como trigo, são bem conhecidas atualmente (Stadnik, 1999; Moraes, 1998; Görlach et al., 1996).

O ácido salicílico foi o primeiro composto produzido por plantas a ter sua atividade como indutor de resistência sistêmica adquirida (SAR). Posteriormente, um análogo de AS, ácido 2,6 dicloroisonicotínico (INA) foi o primeiro composto sintético a ativar a resistência sistêmica adquirida (SAR). Entretanto, tanto AS como INA são fitotóxicos para a maioria das plantas cultivadas e, portanto, não possuem potencial para serem usados comercialmente como protetores de plantas. Recentemente, outro análogo do AS, o éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7 carbotióico (BTH), um composto do grupo benzotiadiazole, comportou-se como ativador potente de SAR, possibilitando a proteção em condições de campo, contra um amplo espectro de patógenos em diversos cultivos (Gorlach et al., 1996).

Estudos recentes têm focado o modo de ação de produtos sintetizados em laboratório a partir do AS, caracterizados como ativadores de resistência de plantas, principalmente o BTH (Moraes, 1998; Morris et al., 1998; Oswald et al., 1998).

Quando a planta reconhece alguma substância eliciadora, ela ativa seu sistema de defesa, que pode ter diferentes mecanismos de ação, as quais podem ser bioquímicos: PRps (quitinases, glucanases e peroxidases), fitoalexinas e fenóis, e estruturais, como, lignina, ceras, papilas e etc. (Pascholati et al. 1995).

Martins et al. (1998) verificaram ação protetora do ASM em mudas de

café, o qual foi capaz de, em condições controladas, induzir proteção contra *Hemileia vastatrix* por até 10 semanas. Esse efeito indutor do ASM contra ferrugem do cafeeiro foi confirmado por Nojosa (2003), em cujo trabalho o tratamento com ASM proporcionou controle de 56,82% em folhas destacadas e 52% em mudas de café. Nas plantas tratadas com ASM, foi possível observar aumento considerável nos teores de clorofila *a* e *b*, nos teores de lignina e na atividade de peroxidases.

A resistência induzida apresenta algumas vantagens no controle de fitopatógenos, como diminuição do impacto ambiental, amplo espectro de controle, estabilidade devido à ação de diferentes mecanismos de resistência, caráter sistêmico persistente e natural da proteção, economia de energia metabólica e presença do potencial genético para resistência em todas as plantas suscetíveis (Pascholati, 2002).

2.5 Extratos vegetais no controle de fitopatógenos

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.

Existem vários relatos da eficiência de extratos vegetais na inibição do crescimento micelial e germinação de fungos fitopatogênicos, em testes *in vivo* e em casa-de-vegetação.

Bonaldo et al. (2001) observaram que extrato de *Eucalyptus citriodora*, quando aplicado 72, 48 e 24 horas antes da inoculação de *Colletotrichum lagenarium* em pepino, reduziu o número e tamanho das lesões. Extratos de *Piper longum* L. foram capazes 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). 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). Extrato de *Sargassum filipendula*, em várias concentrações, inibiu o crescimento fúngico de *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Penicillium sp.* e *Fusarium oxysporum* (Martinez-Lozano et al., 2000).

Kritzinger et al. (2005) observaram a presença de substâncias antimicrobianas em extratos etanólicos e cetônicos de *Vigna unguiculata*, reduzindo, significativamente, o crescimento fúngico de *Alternaria alternata* e *Fusarium proliferatum*.

Alguns trabalhos demonstram que extratos de plantas têm apresentado resultados significativos na redução da severidade da doença. No patossistema tomateiro e *Xanthomonas vesicatoria*, Pereira et al. (2004) observaram que plantas tratadas com extrato de vassoura-de-lobeira (*Solanum lycocarpum* infectado com *Crinipellis pernicioso*) (VLA) apresentaram menor área abaixo da curva de progresso da lesão, inferior apenas ao ASM e Ecolife® e superior às frações parciais de extração de quitosana, provenientes de quitina de carapaça de caranguejo e de micélio de *C. pernicioso*. Resende et al. (2004) observaram diminuição na área abaixo da curva de progresso da doença em plantas tratadas sete dias antes da inoculação com extrato aquoso de folha de café infectada com *H. vastatrix*.

Pesquisas demonstram que a utilização de extratos de casca de café (ECC) e de folhas de café infectadas com ferrugem (EFID) apresenta bons resultados na proteção de cafeeiro contra *Phoma sp.* e *Cercospora coffeicola*. Resende et al. (2004) observaram uma diminuição na percentagem da mancha-de-phoma de 20% e 38%, para ECC e EFID, respectivamente. Amaral (2005) observou uma diminuição na cercosporiose de 40% e 37% em plantas tratadas

com ECC e EFIF. No mesmo patossistema *C. coffeicola* e cafeeiro, estudando o comportamento das enzimas peroxidases do guaiacol (POX) e polifenoloxidasas (PPO), Amaral (2005) observou que, em plantas tratadas com ECC, o maior pico de atividade destas enzimas foi detectado aos 20 e 15 dias após tratamento das mudas, respectivamente, enquanto que mudas tratadas com VLA tiveram picos de atividades aos 15 dias. No patossistema *Xanthomonas vesicatoria* e tomateiro, Ribeiro Júnior et al. (2004), também trabalhando com VLA, observaram que os picos de atividade das enzimas POX e PPO ocorriam aos nove dias após tratamento das mudas.

Em relação à quantificação de lignina solúvel em ácido, alguns trabalhos têm demonstrado incrementos significativos dos teores, quando comparados com a testemunha. Amaral (2005) tratou mudas de cafeeiro com ECC, porém não obteve incrementos significativos no teor de lignina em relação à testemunha absoluta. No entanto, o EFID induziu maior quantidade de lignina, diferindo estatisticamente de todos os demais tratamentos. Plantas de tomate tratadas com VLA apresentaram tecido mais lignificado, com e sem inoculação de *X. vesicatoria* (Ribeiro Júnior et al., 2004) e, em cacaueteiro, utilizando este mesmo extrato, também foi observado um aumento no acúmulo de lignina em plantas com e sem inoculação com *Verticillium dahliae* (Cavalcanti et al., 2004).

Até o momento, pesquisas com cafeeiro têm associado a reação de hipersensibilidade (HR) com 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.

Trabalhos comprovam o potencial de extratos de plantas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica, inibindo o crescimento micelial e

a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas (indicando presença de algum composto eliciador) e ativação de PRps (POX e PPO).

Na cafeicultura, a utilização de extratos vegetais em campo ainda é praticamente inexistente e a maioria dos trabalhos tem sido realizada *in vitro* ou em casa-de-vegetação.

Produtos de origem natural podem ser ativadores de resistência de plantas de cafeeiro contra fungos patogênicos. Futuramente, a agricultura orgânica poderá ser a principal beneficiada, pois nesse sistema é proibido o uso de produtos oriundos da indústria petroquímica. Esta ativação pode vir pela utilização de subprodutos da cadeia produtiva do café, como casca de frutos que é um produto natural, de fácil obtenção e produzido em grandes quantidades ou por outras formas, como extratos e óleos de plantas.

2.6 Óleos essenciais no controle de fitopatógenos

As plantas aromáticas têm sido vistas como fontes de substâncias químicas de atividades biológicas intensas. O aroma que elas exibem podem exercer atração em alguns organismos ou, ao contrário, toxidez, repelindo-os. Esse princípio torna as plantas aromáticas poderosas fontes de agentes biocidas largamente estudadas na agricultura, por apresentarem atividades bactericida e fungicida. Dentro do contexto da agricultura alternativa, tais compostos poderiam funcionar seletivamente no controle de diversas pragas e doenças agrícolas e inofensivamente ao ambiente (Shan Villar, 2002).

Nos últimos anos, a exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes em óleos essenciais de plantas pode se constituir, ao lado da indução de resistência, em mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças de plantas, capazes de minimizarem o progresso das doenças e seus efeitos sobre a produção (Teuscher, 1990). Estudos têm obtido resultados promissores com o uso de óleos essenciais no controle da ferrugem da soja e

demais patossistemas, embora a maioria dos trabalhos tenha sido realizada em testes *in vitro* e em casa-de-vegetação.

Trabalhos desenvolvidos com óleos essenciais obtidos a partir de plantas medicinais da flora nativa têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas e outros compostos de defesa, indicando a presença de compostos com característica de eliciador.

Stangarlin et al. (1999) detectaram, por meio de cromatografia delgada, a presença de compostos fungitóxicos em óleo derivados de plantas medicinais, inibindo o desenvolvimento de *Colletotrichum graminicola*. Observaram também a presença de duas frações fungitóxicas bem definidas nos extratos de erva cidreira, cânfora e alfavaca. Lemos et al. (1990), avaliando os óleos essenciais de dez plantas brasileiras quanto às suas atividades antimicrobianas, verificaram que o óleo essencial de *Lippia sidoides* exibiu grande atividade contra todos os microrganismos testados, como *Saccharomices cerevisiae*, *Aspergillus flavus* e *Cryptococcus neoformans*. Bastos (1997), utilizando óleo de *Piper aduncum* (500 e 1000ppm), reduziu totalmente a germinação e o crescimento micelial de *Crinipellis pernicioso*. A atividade fungitóxica do óleo essencial de *Corymbia citriodora* foi comprovada contra *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora* sp., *Alternaria alternata* e *Colletotrichum graminicola*, em testes *in vitro*, nos quais a inibição do crescimento micelial destes patógenos foi de 100% (Bonaldo et al., 1998).

Rios et al. (2003) utilizaram o óleo essencial de citronela *in vitro*, para avaliar a percentagem de crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum*, agente da flor preta do morangueiro, doença que pode causar grandes perdas na produção de morangos. Os autores observaram que o óleo de citronela, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, reduziu parcialmente o crescimento micelial

de *C. acutatum*, enquanto que, na concentração de 20%, ocorreu inibição total deste crescimento.

Nim (*Azadirachta indica*) é uma planta muito utilizada na medicina e na agricultura. Na agricultura usa-se o seu óleo essencial como produto fitossanitário, pois este não contamina o ambiente.

A eficiência deste óleo essencial foi comprovada em trabalho desenvolvido contra *C. pernicioso*, agente causal da vassoura-de-bruxa, em cacauero. Nesse estudo *in vitro*, mesmo em baixas concentrações do óleo (1%), observou-se a inibição total do crescimento micelial fúngico (Barbosa et al., 2004).

Amaral et al. (2005), estudando o comportamento da essência do cravo-da-índia (*Sisymbrium aromaticum*) sobre crescimento fúngico em sementes de arroz, soja, milho e feijão, observaram que o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou ação fungicida nas concentrações de 0,5% a 0,1%, agindo, possivelmente, na parede celular do fungo.

Uma outra espécie, conhecida popularmente por tomilho (*Thymus vulgaris* L.), apresenta constituintes ativos reconhecidos cientificamente, como timol e carvacrol, com características similares a de bactericidas e de fungicidas (Pinto et al., 2001). Zambonelli et al. (1996), utilizando o óleo de tomilho a 800ppm, observaram que houve uma redução no crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Pythium ultimum*, causando degeneração das hifas e extravasamento do citoplasma celular. Em trabalhos realizados em casa-de-vegetação, Almada et al. (1998) observaram a ação fungitóxica do óleo essencial de tomilho a 20% em plantas de pepino inoculadas com *Pseudoperonospora cubensis*. Medice (2005) observou redução na severidade da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*), variando de 35% a 62%, em plantas tratadas separadamente sete dias antes da inoculação com óleo de *Corymbia citriodora*, citronela, nim e tomilho a 3000ppm. Medice (2005) relatou um efeito

direto do óleo de tomilho a 3000ppm sobre a formação de urédias e urediniósporos de *P. pachyrhizi* e que plantas tratadas apresentavam as folhas verdes e túrgidas, quando comparadas com a testemunha somente inoculada, que apresentavam-se amareladas e em estágio avançado de senescência. No mesmo estudo, foi observado, por meio da microscopia eletrônica de varredura, que plantas tratadas com óleo de tomilho a 3000ppm apresentavam urédias menores e urediniósporos murchos e em menor número. Como verificado por Zambonelli et al. (1996), com outros fitopatógenos, o óleo de tomilho foi capaz de causar degeneração das hifas e extravasamento do citoplasma celular, indicando um efeito fungitóxico sobre os patógenos.

Como verificado nestes trabalhos, é possível controlar fitopatógenos utilizando produtos naturais, os quais propiciam aos agricultores uma agricultura sustentável, a baixo custo, não poluem o meio ambiente e resultam em alimentos saudáveis para a população. Atualmente, óleos, como o de nim e tomilho, já vêm sendo utilizados em cafeeiro para o controle de pragas, como o bicho mineiro, o que poderia reduzir ainda mais o custo, se os mesmos apresentarem efeito sobre os patógenos estudados.

2.7 Estudo histopatológico de *Cercospora coffeicola*

Na interação planta-patógeno, a maioria dos eventos que levam ao estabelecimento de relações parasíticas ou à resistência da hospedeira, ocorre na célula, tanto do patógeno como da planta hospedeira. Detalhes de tais modificações têm sido obtidos por meio de estudos bioquímicos, enzimológicos e moleculares, mas, sua visualização só tem sido possível por meio dos estudos morfológicos. Para a visualização de tais processos de infecção, o microscópio de luz (ML), o microscópio eletrônico de transmissão (MET) e o microscópio eletrônico de varredura (MEV) têm proporcionado inestimáveis contribuições.

Como exemplo, no caso da ferrugem da soja, essas técnicas têm sido

utilizadas há bastante tempo. McLean & Byth (1980) estudaram os eventos de pré-penetração e penetração de urediniósporos de *P.pachyrhizi* em cultivares suscetíveis, resistentes e altamente resistentes (Tainung-3, Tainung-4 e PI-200492). Em todas as cultivares, não foi encontrada nenhuma diferença em relação ao desenvolvimento do tubo germinativo, mas houve diferença na porcentagem de urediniósporos germinados, formação de apressório e penetração. Os cultivares Tainung-3 e Tainung-4 apresentaram-se resistentes à germinação dos urediniósporos, portanto, a resistência dessas cultivares é de pré-penetração e penetração. Já a cultivar PI-200492 não apresentou resistência à germinação dos urediniósporos, pois eles germinavam e penetravam no tecido do hospedeiro, mas não conseguiam desenvolver, portanto, essa resistência ocorre na fase de pós-penetração.

Trabalhos ultra-estruturais utilizando a microscopia eletrônica de varredura e transmissão, com o patógeno *C. coffeicola* em cafeeiro, relacionados com os eventos de pré-penetração, penetração e colonização, são raros. Amaral (2005), por meio da microscopia eletrônica de varredura, observou uma cutícula mais espessa formada na superfície abaxial de folhas de cafeeiro tratadas com silício $1,5\text{mL.L}^{-1}$, pela ocorrência do acúmulo de cera na superfície foliar.

Pozza et al. (2004) observaram, em três cultivares diferentes de cafeeiro tratadas com silicato de cálcio, um aumento no espessamento da cutícula dessas plantas, devido, também, ao acúmulo de cera, principalmente na cultivar Catuaí. A camada de cera torna a superfície hidrofóbica, impedindo a formação do filme de água, importante para os processos vitais da patogênese, como a germinação e penetração, além de impedir o acúmulo de substâncias antifúngicas na cutícula (Pascholati & Leite, 1985).

Até o momento, não se tem conhecimento concreto do tipo de barreiras produzidas pela planta de café contra a ação de *C. coffeicola*, se essas são bioquímicas (fitoalexinas, fenóis, quitinases e glucanases) ou físicas (lignina,

papilas, gomas, ceras, etc.).

Estudos são necessários para o esclarecimento das respostas de defesa, pré-formadas e pós-formadas, pela planta contra patógenos. O mesmo acontece para o efeito de óleos essenciais. Tem sido verificado o fato dos mesmos poderem controlar doenças, mas o mecanismo pelo qual esses atuam ainda não é esclarecido.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABID, M. et al. Preliminary screening of some plants for their nematicidal activity against *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Mediterrânea**, Bari, v.25, n.2, p.155-157, 1997.

AGRIANUAL 1999. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: **FNP Consultoria e Comércio**, 1999. 521p.

AGRIANUAL 2004. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: **FNP Consultoria e Comércio**, 2004. 496p.

AGRIANUAL 2006. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: **FNP Consultoria e Comércio**, 2006. p.209-222.

ALMADA, C.B.J.; LIMA.C.Z.R.L,Z; POSSAMAI, C.J. Controle alternativo do Míldio (*Pseudoperonospora cubensis* Berk e Curt) em pepino (*Cucumis sativus* L). **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p.294, ago. 1998.(Resumo).

AMARAL, D.R. **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais**. 2005. 96p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG.

AMARAL, M.F.Z.J.; BARA, M.T.F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v.2. n.22, p.5-8, 2005.

BANÕS, S.B. et al. 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.

BARBOSA, S. et al. NIM (*Azadirachta indica*) como candidato para controle biológico de fungos patogênicos do cacau (*Theobroma cacao*) (EMBRAPA/CENARGEN-BRASILIA-DF) **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.S159, ago. 2004.(Resumo).

BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.441-443, set. 1997.

BECKETT, A.; HEATH, I.B.; MCLAUGHLIN, D.J. **An atlas of fungal ultrastructure**. London: Longman, 1974.

BETTIOL, W. (Ed). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. 388p. (Documentos,15).

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 em Fitopatologia) -Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

BONALDO, S. et al. Inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos e indução de fitoalexinas por *Eucalypto citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.229, ago. 1998. (Resumo).

CARVALHO, V.L.; CHALFOUN, S.M. **Cercospora**: doença do cafeeiro também chamada de "olho-pardo" ou "olho-de-pomba. Lavras, 2001. (Informe Tecnológico, 26).

CAVALCANTI, F.R. **Resistência induzida a *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro e *Verticillium dahliae* em cacaueteiro por extratos naturais: caracterização bioquímica, fisiológica e purificação parcial de eliciadores protéicos**. 2005.192p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CAVALCANTI, F.R. et al. 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. 105.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Março 2006**: segunda previsão da safra de café 2006/2007. Disponível em: <http://www.abic.com.br/arquivos/abic_prevconab_10abr06.pdf>. Acesso em: 17 maio 2006.

COSTA, M.J.N.; CAMPOS, V.P.; OLIVEIRA, D.F. Toxicidade de extratos vegetais e de esterco a *Meloidogyne incognita*. **Summa Phytopathologica**, v.27, n.2, p.22-23, 2001.

DIAS, C.R. et al. 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.

GARCIA, E.G. **Estudio de substancias foliares del cafeto asociadas al mecanismo de resistencia a *Hemileia vastatrix* Berk & Br.** 1990. (Tesis de Maestria)-Universidad de Costa Rica, San José.

GODOY, C.V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C.L. Doenças do cafeeiro. In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. Cap.17, v.2, p.184-200.

GÖRLACH, J. et al. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance activates gene expression and disease reduction in wheat. **The Plant Cell**, v.8, p.629-643, 1996.

GRANER, E.A.; GODOY JUNIOR, C. **Manual do cafeeiro**. São Paulo: USP, 1967. 320p.

GUZZO, S.D. et al. Ação protetora do acibenzolar-S-metil em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arq. Inst. Biológico**, v.68, n.1, p.89-94, 2001.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J.D.G. Responses to plant pathogenesis. In: BUCHANAN, B.; GUISSÉ, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. London, 2000. p.1102-1156.

JORNAL COFFEE BUSINESS. **Produção exportável em 2005**. Disponível em: <http://www.coffeebusiness.com.br/tabelas/producao_exportavel.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2006.

KESSMANN, H. et al. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.32, p.439-459, 1994.

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.

KRITZINGER, Q.; LALL, N.; AVELING, T.A.S. Antimicrobial activity of cowpea (*Vigna unguiculata*) leaf extracts. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v.71, n.1, p.45-48, 2005.

LEE, S.E. et al. 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.

LEMO, T.L.G. et al. Antimicrobial activity of essential oils of brasilian plants. **Phytoterapy Research**, Chichester, v.4, n.2, p.82-84, 1990.

LOON, L.C. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: DATTA, S.K.; MUTHUKRISHNAN, S. (Ed.). **Pathogenesis-related protein**. Boca Raton: CRC, 1999. p.1-19.

MARCHI, C.E.; BORGES, M.F.; RESENDE, M.L.V. Proteção induzida por benzotriazolone contra a ferrugem-alaranjada (*Hemileia vastatrix*) em cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v.26, n.5, p.1103-1106, 2002.

MARTINEZ-LOZANO, S.J. et al. Antifungal activity of extract of *Sargassum filipendula*. **Phyton-International Journal Of Experimental Botany**, San Nicolas. v.66, p.179-182, 2000.

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.

MARTINS, E.M. et al. Ação protetora do acibenzolar-S-metil (Bion) em plantas de cafeeiro contra ferrugem. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 24., 1998, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas, MG: Poço de Caldas, 1998. p.177-178.

MARTINS, E.M.F. et al. Comparative induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants non specific inducers from different fungal and bacterial origins. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.10, p.521-529, 1985.

MCLEAN, R.J.; BYTH, D.E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhiziz*) in soybean. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.31, p.951-956, 1980.

MEDICE, R. **Avaliação de óleos essenciais no controle da *Phakopsora pachyrhizi* agente da ferrugem asiática da soja em casa-de-vegetação**. 2005. 32p. Monografia. (Graduação em Agronomia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

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

MORRIS, S.W. et al. Induced resistance responses in maize. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, p. 643-658, 1998.

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

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

OSWALD, W. et al. Acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo em resposta ao tratamento com o ativador de defesa vegetal "Bion". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.266, 1998 (Resumo).

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 fito doenças, 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. Cap.22, v.1, p.417-454.

PEREIRA, R.B. et al. Produtos comerciais e extratos naturais no controle da mancha bacteriana causada por *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.260, ago. 2004. Suplemento.

PINTO, J.E.B.P. et al. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 222p.

POZZA, A.A.A. et al. 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.

RESENDE, M.L.V. et al. Induction of resistance against *Phoma costaricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. **The International Joint Workshop on PR-Proteins and Induced Resistance**, Helsingor, Dinamarca, p.79, 2004.

RIBEIRO-JÚNIOR, P.M. et al. Lignificação induzida por extratos naturais e produtos comerciais em tomateiro infectado por *Xanthomonas vesicatoria*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.261, ago. 2004. Suplemento.

RIDE, J.P. Cell walls and other structural barriers in defense. **Biochemical Plant Pathology**, p.215-235, 1983.

RIJO, L. et al. Does gene SH₅ confer to certain coffee-rust associations a reaction near immunity? A histopathological study. **Café Cacao Thé**, Paris, v.35, n.3, p.167-176, July/Sept. 1991.

RIOS, S.A. et al. Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds, agente causal da flor preta do morangueiro (fragaria x *Ananassa dulch.*) com extrato de citronela (*Cymbopogon* sp.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 2003, Uberlândia. **Resumos...** Uberlândia, 2003. CD-Room.

RODRIGUES, W.L. Alta do preço do café convencional afeta o avanço do orgânico. **Guia Bioagri**. Disponível em: <http://www.guiabioagri.com.br/index.php?option=com_content&task=view&id=158&Itemid=2>. Acesso em: 20 dez. 2005.

SHAN VILLAR, A.Y. K. **Constituição química e atividade fungitóxica de extratos de *Thymus vulgaris* L.** 2002. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVA, M.C. et al. 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.

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. (PhD Thesis)-University of Hohenheim, Stuttgart.

STANGARLIN, J.R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.11, p.16-21,1999.

TEUSCHER, E. **Pharmazeutische biologie.** Braunschweig: Vieweg, 1990.

UKNES, S. et al. Reduction of risk for growers: methods for the development of disease-resistant crops. **New Phytologist**, Cambridge, v.133, n.1, p.3-10, May 1996.

Zambolim, 2003. **Produção integrada de café.** Viçosa: UFV/DFP, 2003. 710p.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, E.M. Doenças do cafeeiro (*Coffea arábica* e *C. canephora*). In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.165-180.

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

CAPÍTULO 2

**EXTRATO DE CASCA DE CAFÉ E ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO
NA GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO MICELIAL E INCIDÊNCIA DE
*Cercospora coffeicola***

RESUMO

PEREIRA, Ricardo Borges. Extrato de casca de café e óleo essencial de tomilho na germinação, crescimento micelial e incidência de *Cercospora coffeicola*. In: _____. **Extrato de casca de café e óleo de tomilho no controle de *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke em cafeeiro**. 2006. Cap. 2, p.27-55. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Com o presente trabalho objetivou-se avaliar o efeito de diferentes doses do extrato de casca de café (ECC) e óleo essencial de tomilho (OET) na germinação e no crescimento micelial de *Cercospora coffeicola*. Além disso, buscou-se avaliar a eficiência do ECC e OET como possíveis indutores de resistência em mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo em casa-de-vegetação. Testou-se o ECC, nas diluições de 200; 150; 100; 50 e 10g.L⁻¹, e OET, nas concentrações de 2000, 1000, 500, 250 e 125ppm. Foram adicionados aos experimentos, acibenzolar-S-metil (ASM) 0,2mg.mL⁻¹ e uma testemunha. No ensaio de crescimento micelial, foi adicionado propilenoglicol a 2% nos tratamentos que consistiam OET. Sete dias após a aplicação dos tratamentos, as plantas foram inoculadas via pulverização. Foram realizadas cinco avaliações da incidência da cercosporiose e os dados transformados para área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI). De acordo com os resultados observados no ensaio de germinação, o ECC não apresentou efeito fungitóxico aos conídios de *C. coffeicola*. O OET apresentou efeito tóxico aos conídios, nas concentrações de 500, 1000 e 2000ppm, com redução na germinação de 27%, 30% e 45%, respectivamente. O ASM reduziu a germinação em 13,7% em relação à testemunha. No ensaio de crescimento micelial, todas as doses do ECC exerceram efeito inibitório do índice de crescimento micelial (ICM) em relação à testemunha. O mesmo foi observado para os tratamentos com OET. Em casa-de-vegetação, não foram observadas diferenças entre as doses de 50, 100, 150 e 200g.L⁻¹ do ECC, e entre todas as doses do OET. O ECC (150g.L⁻¹) e o OET (500ppm), apresentaram melhor controle da cercosporiose, 28,1% e 20%, respectivamente, em relação à testemunha.

* **Comitê de Orientação:** Eduardo Alves – UFLA (Orientador); Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

PEREIRA, Ricardo Borges. Coffee peel extract and thyme essential oil in the germination, mycelial growth and incidence of *Cercospora coffeicola*. In: _____. **Coffee peel extract and thyme oil in the control of *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke in coffee**. 2006. Chap. 2, p.27-55. Dissertation (Master in Phytopathology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The present work was carried out with the objective to assess the effect of different coffee husk extract (CHE) and thyme essential oil (TEO) doses on the germination and mycelial growth of *Cercospora coffeicola*. Moreover, the efficacy of CHE and TEO as possible resistance inducers was evaluated on coffee seedlings 'Mundo Novo' in green house conditions. CHE was tested in the 200, 150, 100, 50 and 10 g.L⁻¹ dilutions and TEO in the concentrations of 2000, 1000, 500, 250 and 125ppm. The controls were acibenzolar-S-metil (ASM), 0.2mg.mL⁻¹, and no treatment after inoculation. In the mycelial growth assay, propyleneglycol 2% was used as surfactant for TEO treatments. Seven days after treatment, seedlings were inoculated via spraying. The experiment was evaluated five times regarding disease incidence and the data transformed to the area under the incidence progress curve (AUIPC). In the germination assay, CHE had no fungitoxic effect on the conidia of *C. coffeicola*, while TEO showed toxic effect to the conidia in the concentrations of 500, 1000 and 2000ppm, reducing the germination in 27%, 30% and 45%, respectively. ASM reduced the germination in 13.7% in comparison with the control. In the mycelial growth assay, all the doses of CHE had inhibitory effect on the mycelial growth index (MGI) when compared with the control treatment. The same was observed for TEO treatments. In the greenhouse experiments no differences were observed between 50, 100, 150 and 200g.L⁻¹ doses of CHE, as well as between all doses of TEO. CHE (150g.L⁻¹) and TEO (500ppm) reduced *C. coffeicola* incidence to 28.1% and 20%, respectively, in comparison to the control treatment.

* **Advising Committee:** Eduardo Alves - UFLA (Adviser), Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a ferrugem e a cercosporiose estão entre as principais doenças causadoras de perdas na produtividade do cafeeiro. Estima-se que as perdas relacionadas apenas ao ataque por *C. coffeicola* sejam da ordem de 30% a 40% da produção, na ausência de medidas de controle dessa doença (Matiello & Almeida, 1997).

A cercosporiose tem como agente causal o fungo *Cercospora coffeicola* Berk e Cooke. Essa é uma doença de grande importância para a cultura do cafeeiro, pois, além de causar perdas na produção, deprecia a qualidade da bebida do café. A doença apresenta grande disseminação no campo, onde está presente praticamente em todo o ano. O principal método de controle é o uso de fungicidas protetores e sistêmicos, no entanto, métodos alternativos, como a nutrição mineral, podem auxiliar no manejo da doença.

Uma das estratégias para controlar o ataque de patógenos em plantas, e que tem sido muito estudada atualmente, é a indução de resistência. Contudo, o uso eficiente da resistência induzida depende, sobretudo, da disponibilidade de eficientes indutores. Por isso, o estudo de indutores de origem biótica ou abiótica, para controlar doenças como cercosporiose, ainda são necessários.

Vários trabalhos demonstraram a eficiência de extratos vegetais no controle de doenças em diversas culturas, como cercosporiose e ferrugem do cafeeiro (Santos, 2006), murcha-de-verticillium em cacaueteiro, mancha bacteriana em tomateiro (Cavalcanti, 2005) e mancha de phoma em cafeeiro (Barguil, 2004), entre outras. Resende et al. (2004) observaram uma diminuição na percentagem da mancha de phoma de 20% e 38%, em plantas previamente tratadas com extrato de casca de frutos de café e extrato de folhas de café infectadas com ferrugem, e Amaral (2005), com os mesmos extratos, constatou

redução na cercosporiose de 40% e 37%, respectivamente, para cada extrato.

Trabalhos desenvolvidos com óleos essenciais obtidos a partir de plantas medicinais da flora nativa têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela presença de compostos eliciadores.

Zambonelli et al. (1996), utilizando o óleo de tomilho a 800ppm, observaram que houve uma redução no crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Pythium ultimum*, causando degeneração das hifas e extravasamento do citoplasma celular. Almada et al. (1998), em estudo realizado em casa-de-vegetação, observaram a ação fungitóxica do óleo de tomilho em plantas de pepino inoculadas com *Pseudoperonospora cubensis*. Medice (2005) observou redução na severidade da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) variando de 35% a 62%, em plantas tratadas sete dias antes da inoculação com óleo de *Corymbia citriodora*, citronela, nim e tomilho.

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar o efeito direto, *in vitro*, de diferentes doses do extrato de casca de frutos de café e óleo essencial de tomilho na germinação e no crescimento micelial de *Cercospora coffeicola*. Além disso, buscou-se avaliar a eficiência do extrato de casca de frutos de café e óleo essencial de tomilho como possíveis indutores de resistência em mudas de cafeeiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização

Os experimentos deste trabalho foram realizados 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 (altitude de 960m, longitude de -44,97° e latitude de -21,22°).

2.2 Obtenção do extrato de casca de café

Cascas de frutos de café (pericarpo), provenientes de lavoura em cultivo orgânico, 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.

2.3 Obtenção do inóculo

O inóculo de *C. coffeicola* foi obtido de plantas naturalmente infectadas, provenientes de lavouras localizadas no Setor de cafeicultura, no Campus da UFLA. Folhas com sintomas foram coletadas, lavadas superficialmente em água corrente e submetidas a câmara úmida por três dias, para a esporulação do fungo. Os conídios formados foram, então, destacados da superfície foliar com pincel de cerdas macias e água destilada.

Posteriormente, a suspensão de conídios foi filtrada em camada dupla de gaze e teve sua concentração ajustada para $1,5 \times 10^3$ conídios.mL⁻¹, em câmara de contagem.

2.4 Ensaio I: Efeito do extrato de casca de café e óleo essencial de tomilho sobre a germinação de conídio de *C. coffeicola*

O ensaio foi realizado com o objetivo de verificar o efeito fungitóxico do extrato de casca de café e óleo essencial de tomilho sobre a germinação de conídios de *C. coffeicola*. Os tratamentos consistiram de extrato de casca de café a 200; 150; 100; 50 e 10g.L⁻¹ e óleo essencial de tomilho nas concentrações de 2000, 1000, 500, 250 e 125ppm. Foram também adicionadas uma testemunha padrão de indução de resistência (acibenzolar-S-metil 0,2mg.mL⁻¹) e uma testemunha com água destilada.

Foram utilizadas placas de Petri estéreis, de 6cm de diâmetro, às quais foi adicionado, previamente, meio AA (ágar-água) 2%. Em seguida, adicionaram-se 10mL das soluções constituintes dos tratamentos nas placas e 1mL da suspensão de conídios a $1,5 \times 10^3$ conídios.mL⁻¹. A suspensão de conídios foi, então, espalhada com alça de Drigalski e as placas acondicionadas em BOD a 25°C, onde permaneceram por 24 horas, com fotoperíodo de 12 horas.

Para cada tratamento, utilizaram-se duas placas, as quais foram divididas em quatro quadrantes, sendo avaliados 30 conídios por quadrante, num total de oito repetições.

Após a incubação, a germinação foi paralisada com solução de lactoglicerol e, em microscópio de luz, foi avaliada a porcentagem de germinação dos conídios.

2.5 Ensaio II: Efeito do extrato de casca de café e óleo essencial de tomilho sobre o crescimento micelial de *C. coffeicola*

O ensaio foi realizado com o objetivo de verificar o efeito fungitóxico do extrato de casca de café e óleo essencial de tomilho sobre o crescimento micelial de *C. coffeicola*. Testou-se o extrato de casca de café nas diluições de 200; 150; 100; 50 e 10g.L⁻¹ e o óleo essencial de tomilho nas diluições de 2000, 1000, 500, 250 e 125ppm. Foram também adicionadas uma testemunha padrão de indução de resistência (acibenzolar-S-metil 0,2mg.mL⁻¹), uma testemunha somente com água destilada e uma testemunha com 2% de propilenoglicol.

Para a realização do experimento, foram utilizadas placas de Petri estéreis de 9cm de diâmetro e meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) 2%. O meio de cultura foi preparado em etapas. Primeiramente, a batata foi descascada, picada, fervida em água destilada e, em seguida, o caldo coado. O caldo da batata foi separado em quantidades iguais, colocando-se 125mL em cada erlenmayer de 250mL, ao qual também foram adicionados ágar e dextrose. Em seguida, foram autoclavados.

O extrato de casca de café e óleo de tomilho foram diluídos em água estéril. Os meios de cultura autoclavados foram fundidos e, após queda da temperatura (40°C), acrescidos de 125mL das soluções, completando, assim, o volume para 250mL, de modo que as diluições finais atingissem as estabelecidas pelo ensaio. Nos tratamentos que consistiam de óleo essencial de tomilho, adicionaram-se ao meio, no momento da mistura, 2% de propilenoglicol (surfactante). Na testemunha, utilizou-se apenas água estéril. Após a adição dos tratamentos, cada meio foi homogeneizado e vertido em oito placas. Cada placa foi inoculada no centro, com um disco de 6mm de diâmetro contendo micélio de *C. coffeicola*, posicionado de modo que o fungo entrasse diretamente em contato com o meio. Em seguida, as placas foram acondicionadas em BOD a 25°C, onde permaneceram até o final das avaliações,

com fotoperíodo de 12 horas.

O ensaio estabelecido foi o de delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa.

Foram realizadas avaliações de quatro em quatro dias após a inoculação e, em seguida, calculado o índice de crescimento micelial (ICM), determinado pela adaptação da fórmula proposta por Maguire (1962)

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

em que:

ICM = índice de crescimento micelial; C_1, C_2, C_n = diâmetro do micélio na primeira, segunda e última avaliação; N_1, N_2, N_n = número de dias após a inoculação.

2.6 Preparo das mudas de cafeeiro

Para a realização dos experimentos em casa-de-vegetação (ensaio 3 e 4), foram utilizadas sementes de café cultivar Mundo Novo 379/19 suscetíveis a *C. coffeicola*, cedidas pela EPAMIG. As sementes foram germinadas em areia, até que atingissem o estágio de ‘palito de fósforo’ e em seguida, transplantadas para bandejas contendo substrato Plantmax[®], onde receberam solução nutritiva até a formação do terceiro par de folhas verdadeiras. Em seguida, foram transplantadas para vasos de quatro litros contendo substrato composto por terra, areia e esterco bovino, na proporção de 2:1:1, quando receberam adubações complementares com adubo NPK mais micronutrientes.

As mudas foram conduzidas em casa-de-vegetação, onde receberam irrigações diárias.

2.7 Ensaio III: Efeito de doses do extrato de casca de café na proteção de plantas de cafeeiro contra *C. coffeicola*

No experimento, testou-se o extrato de casca de café nas diluições de 200; 150; 100; 50 e 10g.L⁻¹. Foram também adicionados ao experimento acibenzolar-S-metil 0,2mg.mL⁻¹ e uma testemunha somente inoculada.

Quando as plantas adquiriram 10 pares de folhas verdadeiras, foram pulverizadas, com as soluções que compunham os tratamentos, até o ponto de escorrimento. Após sete dias, as plantas foram inoculadas com a suspensão de conídios de *C. coffeicola*, por meio de uma pulverização foliar da face superior e inferior das folhas e, imediatamente após, submetidas a uma câmara úmida por um período de 14 horas.

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados com quatro repetições e parcela constituída de seis plantas. Foram realizadas cinco avaliações, com intervalos de 15 dias, nas quais foram quantificados número de folhas totais da mudas e número de folhas lesionadas.

Foi calculada a área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) para cada tratamento, seguindo a fórmula de Campbell & Madden (1990)

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

em que:

X = intensidade da doença; t = tempo; n = número de avaliações no tempo.

2.8 Ensaio IV: Efeito das doses do óleo essencial de tomilho na proteção de plantas de cafeeiro contra *C. coffeicola*

No experimento, testou-se o óleo essencial de tomilho nas diluições de 1000, 500, 250 e 125ppm. Foram também adicionados ao experimento acibenzolar-S-metil 0,2mg.mL⁻¹ (ASM) e uma testemunha somente inoculada.

Quando as plantas adquiriram 10 pares de folhas verdadeiras, foram pulverizadas e, sete dias após, inoculadas. O tratamento das mudas, a inoculação e as avaliações foram realizados conforme descrito no ensaio III.

2.9 Análises estatísticas

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 e, para comparar o tratamento adicional com os demais, utilizou-se o teste de Dunnett. Para a confecção dos gráficos de regressão, utilizou-se o programa Excel, do Microsoft Office XP, 2003.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito de doses do extrato de casca de frutos de café e óleo essencial de tomilho na germinação de conídio de *C. coffeicola*

3.1.1 Extrato de casca de café

Pôde-se observar, de acordo com a Figura 1, que todas as doses do extrato de casca de fruto de café (ECC) apresentaram germinações superiores ao acibenzolar-S-metil $0,2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ASM), provavelmente por esses apresentarem, em sua fração solúvel, quantidades significativas de carboidratos e proteínas extraídos da casca dos frutos de café. O tratamento adicional com ASM diferiu significativamente, pelo teste de Dunnett ($P = 0,05$), das doses do ECC (Tabela 1). As doses 10 e $50\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ não diferenciaram entre si e em relação à testemunha (dose 0), no entanto, doses de 100 , 150 e $200\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ apresentaram germinações superiores à da testemunha, porém, não se diferenciaram entre si, pelo teste de Scott Knott ($P = 0,05$). O ECC, nas doses estudadas, não apresentou efeito inibitório da germinação de *C. coffeicola*, tendo ocorrido até estímulo. Resultados similares foram obtidos por Bonaldo et al. (1998), quando utilizaram extrato bruto de *Eucalyptus citriodora*, ocorrendo estímulo à germinação de conídios de *Colletotrichum graminicola*, embora tenha reduzido entre 14% e 34% a formação de apressórios em concentrações do extrato superiores a 10%.

Na menor e maior dose do ECC, foi observada a germinação de 2,9% e 6,9%, respectivamente, superiores em relação à testemunha, enquanto que o tratamento com o ASM $0,2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, causou inibição da germinação em 13,7%, em relação à testemunha.

Segundo Kúc (2001), geralmente, os indutores de resistência no *sensu stricto* não atuam diretamente sobre o patógeno. Contudo, no *sensu amplo*, podem atuar induzindo resistência e afetando o patógeno diretamente.

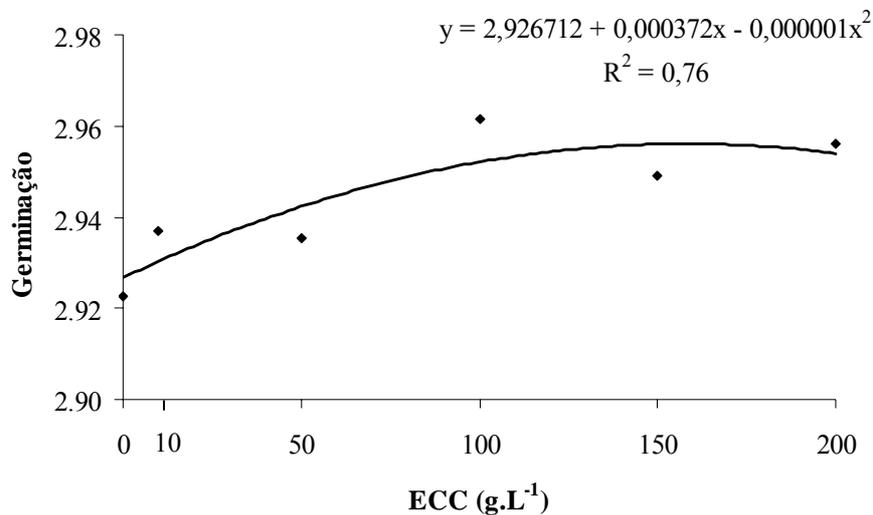


FIGURA 1. Efeito de doses do extrato de casca de frutos de café (ECC) (0, 10, 50, 100, 150 e 200g.L⁻¹) na germinação de conídios de *C. coffeicola*. Dados transformados para arcosen da \sqrt{x} .

TABELA 1. Efeito das doses do extrato de casca de frutos de café (ECC) (200, 150, 100, 50 e 10g.L⁻¹) e acibenzolar-S-metil (ASM) (0,2mg.mL⁻¹) na germinação de conídios de *C. coffeicola*.

Tratamentos	Germinação ¹					
	0	10	50	100	150	200
ECC (g.L ⁻¹)	2,922*	2,937*	2,935*	2,961*	2,949*	2,956*
ASM (0,2mg.mL ⁻¹)	2,846					

* = significativo, pelo teste de Dunnett (P = 0,05); ns = não significativo, pelo teste de Dunnett (P = 0,05). ¹Dados transformados para arcosen da \sqrt{x} .

3.1.2 Óleo essencial de tomilho

O óleo essencial de tomilho a 500, 1000 e 2000ppm reduziu significativamente a germinação de conídios de *C. coffeicola* em 27,6%, 30% e 45,1%, em relação à testemunha, pelo teste de Scott Knott ($P = 0,05$), enquanto que, no tratamento com ASM 2mg.L^{-1} , observou-se redução de 13,7% em relação à testemunha. O OET a 125 e 250ppm, apesar de não possuir diferenças significativas em relação à testemunha, reduziu a germinação em 4,5% e 9,2%, respectivamente. Doses de 500 e 1000ppm não diferiram estatisticamente entre si, reduzindo a germinação em 27,6% e 30% em relação à testemunha. O OET a 2000ppm diferiu de todas as demais concentrações, apresentando 45,1% de inibição da germinação em relação à testemunha. O tratamento adicional com ASM 2mg.L^{-1} diferiu estatisticamente somente do OET 1000 e 2000ppm, pelo teste de Dunnett ($P = 0,05$) (Tabela 2).

O óleo essencial de tomilho apresentou efeito inibitório à germinação de conídios de *C. coffeicola*, à medida em que se aumentou a concentração do óleo. A DL_{50} do óleo essencial de tomilho para a germinação de conídios de *C. coffeicola* foi estimada em 4440ppm.

Resultados do presente estudo foram semelhantes aos de Bastos (1997), utilizando óleo de *Piper aduncum* a 500 e 1000ppm. Barbosa et al. (2004) com óleo essencial de nim a 1%, constataram a redução total da germinação de *Crinipellis pernicioso* e Bonaldo et al. (1998), utilizando óleo de *Corymbia citriodora*, observaram inibição de 100% da germinação de *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora* sp., *Alternaria alternata* e *C. graminicola*. Wilson et al. (1997), observaram atividade antifúngica de *Thymus sygis* 0,78%, uma espécie de tomilho vermelho, na germinação de *Botrytis cinerea*, 40 horas após inoculação.

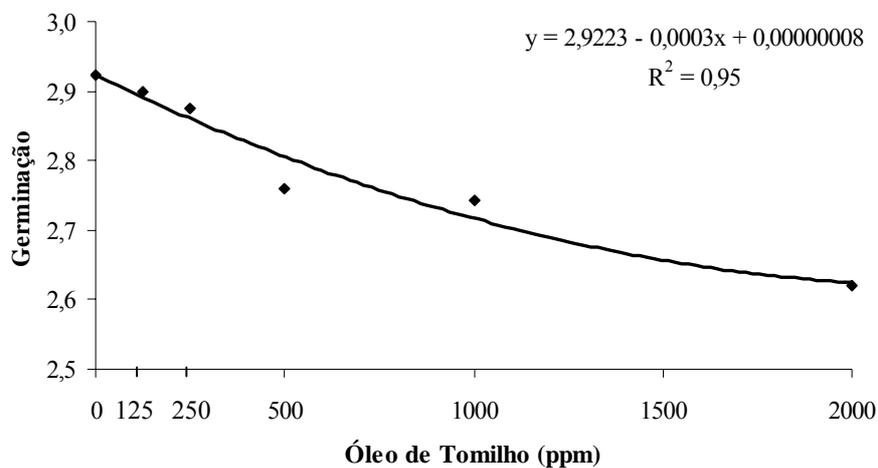


FIGURA 2. Efeito de doses do óleo essencial de tomilho (OET) (0, 125, 250, 500, 1000 e 2000ppm) na germinação de conídios de *C. coffeicola*. Dados transformados para arcosen da \sqrt{x} .

TABELA 2. Efeito de doses do óleo essencial de tomilho (OET) (2000, 1000, 500, 250 e 125ppm) e acibenzolar-S-metil (ASM) ($0,2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) na germinação de conídios de *C. coffeicola*.

Tratamentos	Germinação ¹					
OET (ppm)	0	125	250	500	1000	2000
	2,922 ^{ns}	2,899 ^{ns}	2,874 ^{ns}	2,759 ^{ns}	2,743*	2,620*
ASM ($0,2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	2,846					

* = significativo, pelo teste de Dunnett ($P = 0,05$); ns = não significativo, pelo teste de Dunnett ($P = 0,05$). ¹Dados transformados para arcosen da \sqrt{x} .

3.2 Efeito de doses do extrato de casca de café e óleo essencial de tomilho sobre o crescimento micelial de *C. coffeicola*

3.2.1 Extrato de casca de café

Todas as doses do extrato de casca de frutos de café (ECC) exerceram efeito inibitório no crescimento micelial do fungo em relação à testemunha (dose 0). Com o aumento das doses do ECC, observou-se um menor crescimento (Figura 3).

O crescimento do fungo foi afetado diretamente, caracterizando um efeito fungitóxico. Normalmente, 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).

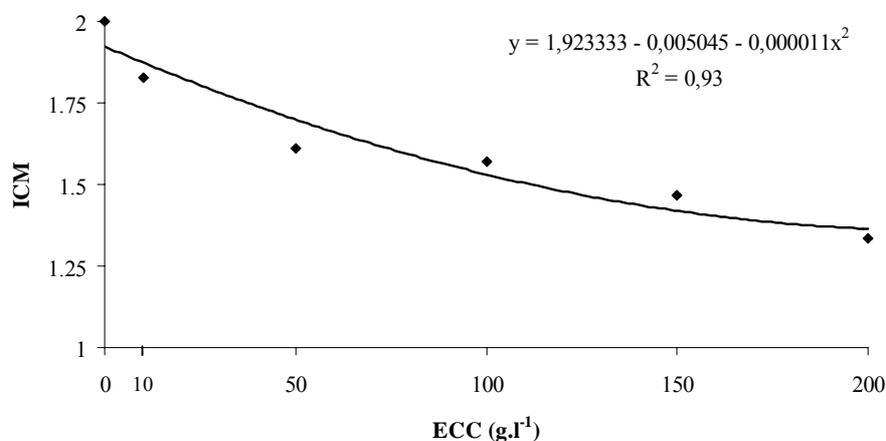


FIGURA 3. Efeito de doses do extrato de casca de frutos de café (ECC) (0, 10, 50, 100, 150 e 200g.L⁻¹) sobre o índice de crescimento micelial (ICM) de *C. coffeicola*.

Resultados diferentes foram obtidos por Amaral (2005) que, realizando ensaio *in vitro* com o ECC 100g.L⁻¹, não observou diferenças significativas em relação à testemunha. Outros resultados semelhantes foram relatados por Barguil (2004), quando inoculou com *Phoma costarricensis*, que também observou que, além do extrato não ser tóxico ao fungo, promoveu o crescimento do fungo superior ao da testemunha.

O tratamento adicional com ASM 2mg.L⁻¹ diferiu estatisticamente de todas as doses do ECC, exceto da 200g.L⁻¹, pelo teste de Dunnett (P = 0,05) (Tabela 3).

A DL₅₀ do ECC foi calculada em 410g.L⁻¹.

TABELA 3. Efeito das doses do extrato de casca de frutos de café (ECC) (200, 150, 100, 50 e 10g.L⁻¹) e acibenzolar-S-metil (ASM) (0,2mg.mL⁻¹) sobre o índice de crescimento micelial (ICM) de *C. coffeicola*.

Tratamentos	ICM					
	0	10	50	100	150	200
ECC (g.L ⁻¹)	2,000*	1,829*	1,611*	1,570*	1,466*	1,333 ^{ns}
ASM (0,2mg.mL ⁻¹)	1,212					

* = significativo, pelo teste de Dunnett (P = 0,05); ns = não significativo, pelo teste de Dunnett (P = 0,05).

3.2.2 Óleo essencial de tomilho

Todas as doses do óleo essencial de tomilho (OET) diferenciaram-se entre si e em relação à testemunha. Com o aumento da concentração OET, observou-se um menor crescimento fúngico (Figura 4 e 5). O desenvolvimento do fungo foi afetado diretamente quando utilizou-se o OET, caracterizando um efeito fungitóxico.

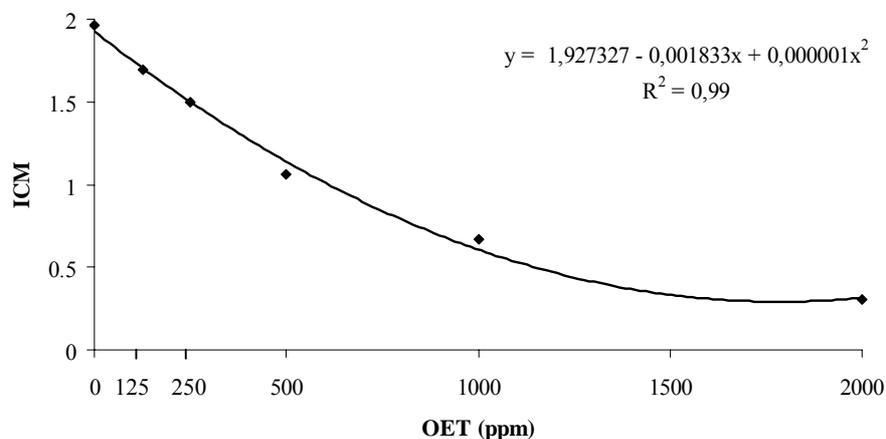


FIGURA 4. Efeito de doses do óleo essencial de tomilho (OET) (0, 125, 250, 500, 1000 e 2000ppm) sobre o índice de crescimento micelial (ICM) de *C. coffeicola*.

Resultados similares foram obtidos por Souza et al. (2004), utilizando OET adicionado ao meio, que observaram inibição do crescimento micelial de *Rhizopus* sp., *Penicillium* spp., *Eurotium repens* e *Aspergillus niger*, nas concentrações de 500, 1000, 1500 e 2000ppm. Outros trabalhos também têm mostrado o efeito antimicrobiano do OET, como os de Maruzzella & Ligguori, (1958), Beuchat (1976) e Farag et al. (1989).

Com relação às diferentes concentrações do OET, o ASM 2mg.L⁻¹ diferiu estatisticamente de todas as doses do OET, pelo teste de Dunnett (P = 0,05) (Tabela 4).

A DL₅₀ do OET foi calculada em 621ppm.

Não foi possível, a partir dos resultados obtidos e da natureza dos experimentos (experimentos de indução de resistência), correlacionar o potencial antifúngico e redução de lesão *in vivo*, neste estudo, tampouco fazer observação de disseminação de princípio ativo sistematicamente.

TABELA 4. Efeito do óleo essencial de tomilho (OET) (2000, 1000, 500, 250 e 125ppm) e do acibenzolar-S-metil (ASM) (0,2mg.mL⁻¹) sobre o índice de crescimento micelial (ICM) de *C. coffeicola*.

Tratamentos	ICM					
OET	0	125	250	500	1000	2000
(ppm)	1,967*	1,694*	1,499*	1,065*	0,667*	0,305*
ASM	1,212					
(0,2mg.mL⁻¹)						

* = significativo, pelo teste de Dunnett (P = 0,05); ns = não significativo, pelo teste de Dunnett (P = 0,05).

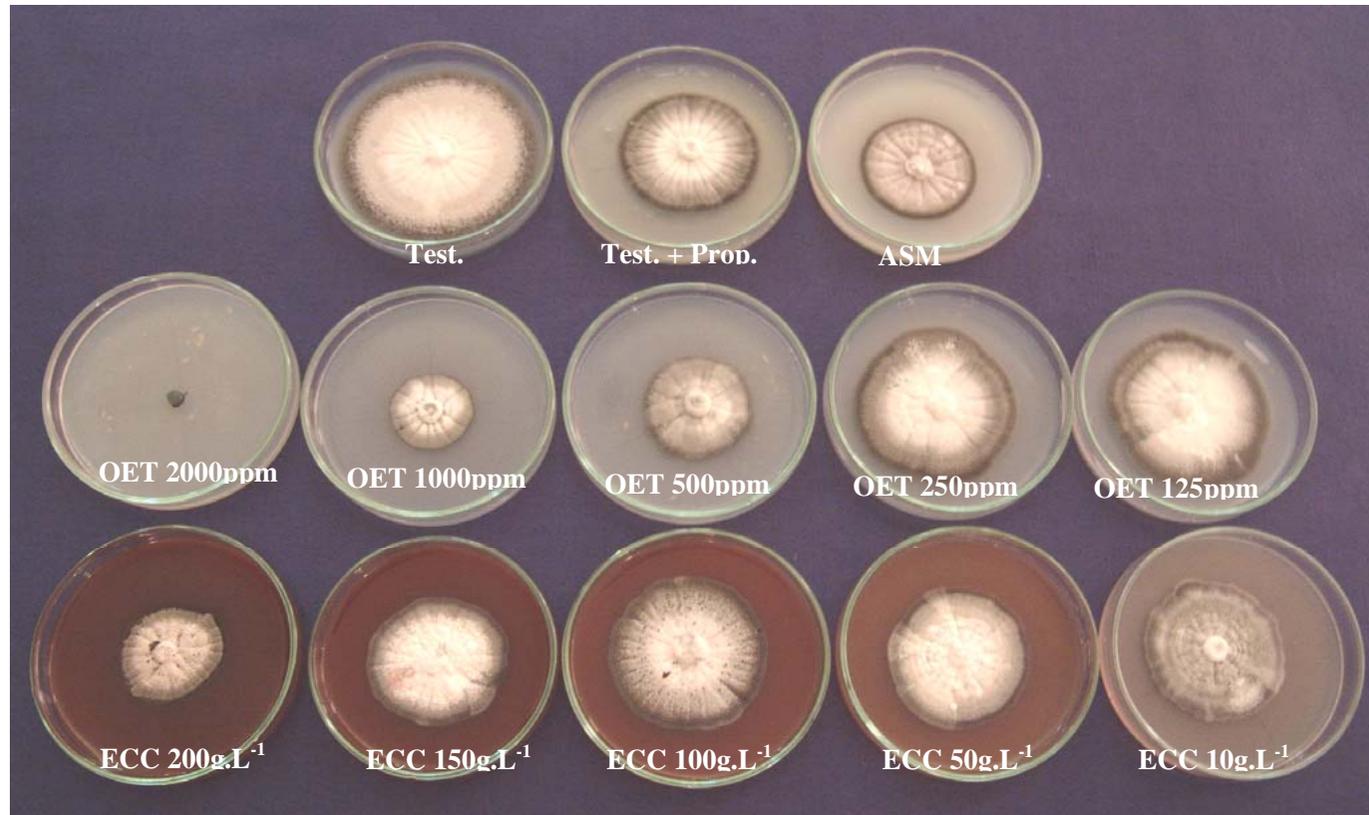


FIGURA 5. Efeito do óleo essencial de tomilho (OET), extrato de casca de frutos de café (ECC) e ASM $0,2\text{mg.mL}^{-1}$, testemunha (Test.) e testemunha mais 2% de propilenoglicol (surfactante) (Test. + Prop.) sobre o crescimento micelial de *C. coffeicola*.

3.3 Efeito de doses do extrato de casca de café e óleo essencial de tomilho sobre a incidência de *C. coffeicola* em mudas de cafeeiro

3.3.1 Extrato de casca de café

As áreas abaixo da curva de progresso da incidência da cercosporiose (AACPI) apresentaram diferenças significativas, pelo teste Scott Knott ($P = 0,05$), 82 dias após pulverização, para as doses ECC (Figura 5). Observou-se diminuição de 12,4%, 11,3%, 28,1% e 9,6% na AACPI, em relação à testemunha (dose 0), para os tratamentos 50, 100, 150 e 200g.L⁻¹ de água, respectivamente, enquanto que o ASM 0,2mg.mL⁻¹ apresentou redução de 30,5%. A proteção de mudas de cafeeiro não foi proporcional à concentração do ECC. O tratamento adicional com ASM 0,2mg.mL⁻¹ não diferiu significativamente, pelo teste de Dunnett ($P = 0,05$), das doses 50, 100, 150 e 200g.L⁻¹ (Tabela 5).

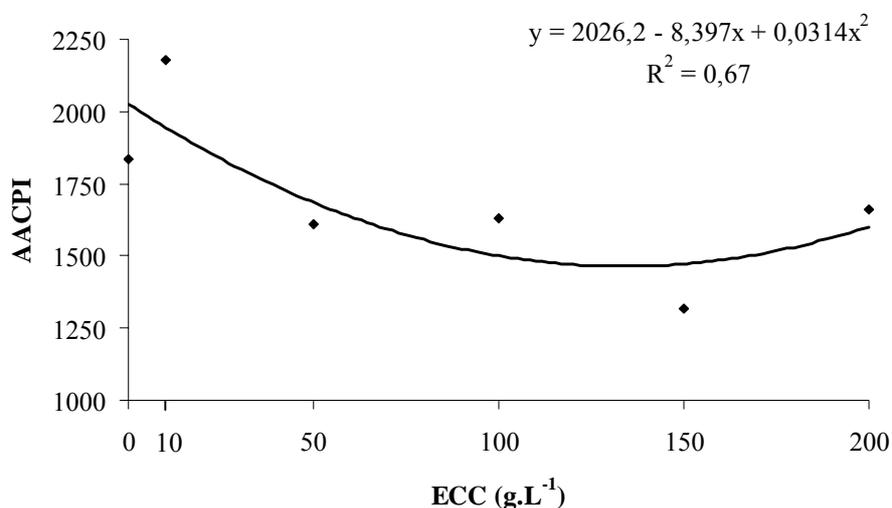


FIGURA 6. Efeito de doses do extrato de frutos de café (ECC) (0, 10, 50, 100, 150 e 200g.L⁻¹) na redução da área abaixo da curva de progresso da incidência da cercosporiose (AACPI), em mudas de cafeeiro.

Não foi observada diferença significativa na AACPI para a dose 10g.L⁻¹, em relação à testemunha, pelo teste Scott Knott (P = 0,05).

A redução no progresso da cercosporiose pelo ECC, observada no presente estudo, confirma o efeito semelhante verificado por outros autores. Amaral (2005), trabalhando com o mesmo patossistema, aplicou o ECC 100g.L⁻¹ de água e obteve redução de 40% na AACPI, quando comparado à testemunha, Barguil (2004) observou que o ECC 100g.L⁻¹ de água influenciava negativamente o tamanho e o número de lesões de *Phoma costarricensis*. Santos (2006) testou o ECC 100g.L⁻¹ de água em campo, observando redução de 34% na incidência da cercosporiose em relação ao Viça-café, considerada testemunha padrão. A DL₅₀ estimada do ECC, a qual provavelmente apresentaria o maior controle da cercosporiose (20,61%), é de 134g.L⁻¹.

TABELA 5. Efeito das doses do extrato de casca de frutos de café (ECC) (200, 150, 100, 50 e 10g.L⁻¹) e acibenzolar-S-metil (ASM) (0,2mg.mL⁻¹) na área abaixo da curva de progresso da incidência da cercosporiose (AACPI), em mudas de cafeeiro.

Tratamentos	AACPI					
ECC (g.L⁻¹)	0	10	50	100	150	200
	1836*	2180*	1607 ^{ns}	1628 ^{ns}	1320 ^{ns}	1660 ^{ns}
ASM (0,2mg.mL⁻¹)	1276					

* = significativo, pelo teste de Dunnett (P = 0,05); ns = não significativo, pelo teste de Dunnett (P = 0,05).

De acordo com a curva de progresso da incidência da cercosporiose (Figura 7), nas avaliações realizadas aos 15 e 30 dias após inoculação, todos os tratamentos apresentaram incidência semelhante, exceto o ECC 10g.L⁻¹, que apresentou incidência superior a todos os tratamentos em todas as avaliações.

Aos 45, 60 e 75 dias após inoculação, o ASM $0,2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ apresentou incidência cerca de 30%, 35% e 43,5% inferior à incidência da testemunha e ECC $150\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ apresentou incidência 32%, 36% e 40,7%, também inferiores à testemunha.

A casca de frutos de café possui, em sua fração solúvel, carboidratos, proteínas, taninos e vários compostos fenólicos. Conforme Molina et al. (1974), 42% do peso dos frutos de café cereja correspondem à polpa, considerada resíduo do beneficiamento do fruto seco. Em sua composição constam, principalmente, compostos fenólicos (ácido clorogênico e flavonóides). Compostos fenólicos nas células vegetais, quando presentes em alta concentração, ou oxidados de fenóis simples a quinonas, podem constituir-se em componentes de defesa do vegetal contra fatores externos (Nicholson & Hammerschmidt, 1992; Pascholati & Leite, 1994).

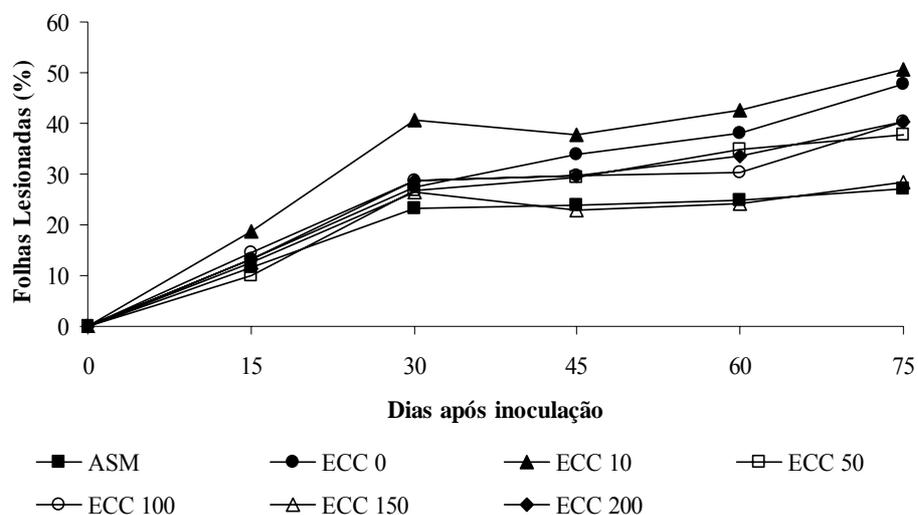


FIGURA 7. Curva de progresso da incidência da cercosporiose em mudas de café inoculadas com *C. coffeicola*. Extrato de casca de frutos de café (ECC) ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e Acibenzolar-S-metil (ASM) ($0,2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

3.3.2 Óleo essencial de tomilho

No experimento realizado em casa-de-vegetação, com diferentes concentrações do OET, assim como no experimento anterior, o ASM $0,2\text{mg.mL}^{-1}$ reduziu significativamente a AACPI em relação à testemunha. O OET 125, 250, 500, 1000 e 2000ppm não diferiu estatisticamente em relação ao ASM $0,2\text{mg.mL}^{-1}$ pelo teste de Dunnett ($P = 0,05$) (Tabela 6).

TABELA 6. Efeito das doses do óleo essencial de tomilho (OET) (2000, 1000, 500, 250 e 125ppm) e acibenzolar-S-metil (ASM) ($0,2\text{mg.mL}^{-1}$) na área abaixo da curva de progresso da incidência da cercosporiose (AACPI), em mudas de cafeeiro.

Tratamentos		AACPI				
OET (ppm)	0	125	250	500	1000	2000
	2350*	2007 ^{ns}	1920 ^{ns}	1890 ^{ns}	1936 ^{ns}	2076 ^{ns}
ASM ($0,2\text{mg.mL}^{-1}$)	1610					

* = significativo, pelo teste de Dunnett ($P = 0,05$); ns = não significativo, pelo teste de Dunnett ($P = 0,05$).

Trabalhos semelhantes foram realizados por Almada et al. (1998), em casa-de-vegetação, os quais observaram efeito fungitóxico do OET 20% em plantas de pepino inoculadas com *Pseudoperonospora cubensis*. Medice (2005), trabalhando com ferrugem da soja, observou redução na severidade da doença variando de 35% a 62%, em diferentes cultivares tratadas sete dias antes da inoculação com OET 0,3%. A autora relatou também o efeito direto do óleo na formação de urédias e urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. Hassanzadeh (2006) observou redução significativa de *Erwinia amylovora* em maçã, quando tratada com OET, em combinação com oxicloreto de cobre.

De acordo com a Figura 8, em todas as avaliações, aos 15, 30, 45, 60 e

75 dias após inoculação, o ASM $0,2\text{mg.mL}^{-1}$ apresentou menor incidência da doença em relação à testemunha, enquanto que os tratamentos com OET permaneceram com incidências superiores ao ASM e inferiores à testemunha, com comportamento similar entre as doses.

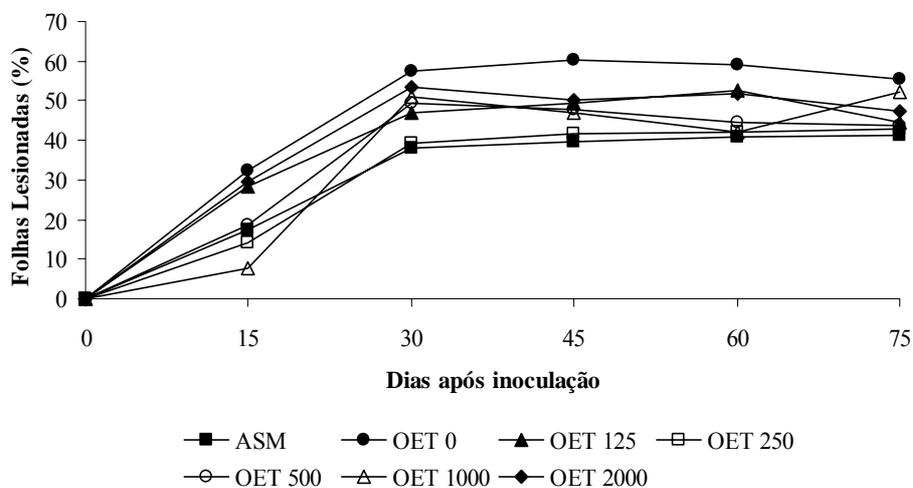


FIGURA 8. Curva de progresso da incidência da cercosporiose em mudas de café inoculadas com *C. coffeicola*. Óleo essencial de tomilho (OET) (ppm) e Acibenzolar-S-metil (ASM) ($0,2\text{mg.mL}^{-1}$).

Aos 30, 45, 60 e 75 dias após inoculação, o ASM $0,2\text{mg.mL}^{-1}$ reduziu a incidência da cercosporiose em 33,5%, 34,6%, 30,7% e 25,7%, em relação à testemunha, enquanto que o OET 500ppm, a melhor dose, porém, significativamente semelhante às demais, pelo teste Tukey ($P = 0,05$), apresentou controle de 30,7%, 31,3%, 29% e 23,1%, em relação à testemunha.

4 CONCLUSÃO

- O extrato de casca de frutos de café não apresentou efeito fungitóxico na germinação de conídios de *Cercospora coffeicola*, no entanto, reduziu significativamente o crescimento fúngico de *C. coffeicola*.
- Verificou-se efeito fungitóxico do óleo essencial de tomilho sob a germinação e o crescimento micelial de *C. coffeicola*.
- O extrato de casca de frutos de café e o óleo essencial de tomilho mostraram-se promissores no controle da cercosporiose do cafeeiro, respectivamente nas concentrações de 150g.L⁻¹ e 500ppm, quando aplicados sete dias antes da inoculação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMADA, C.B.J.; LIMA.C.Z.R.L,Z; POSSAMAI, C.J. Controle alternativo do Míldio (*Pseudoperonospora cubensis* Berk e Curt) em pepino (*Cucumis sativus* L). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23 p.294, ago. 1998. (Resumo).

AMARAL, D.R. **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais**. 2005. 96p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BARBOSA, S. et al. NIM (*Azadirachta indica*) como candidato para controle biológico de fungos patogênicos do cacau (*Theobroma cacao*) (EMBRAPA/CENARGEN-BRASÍLIA-DF) **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.S159, ago. 2004.(Resumo).

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

BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.441-443, set. 1997.

BEUCHAT, L.R. Sensitivity of vibrio parahemolyticus to spicies and organic acids. **Journal of Food Sciense**, Chicago, v.41, n.4, p.899-902, July/Aug. 1976.

BONALDO, S. et al. Inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos e indução de fitoalexinas por *Eucalipto citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23 p.229, ago. 1998. (Resumo).

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

CAVALCANTI, F.R. **Resistência induzida a *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro e *Verticillium dahliae* em cacauero por extratos naturais: caracterização bioquímica, fisiológica e purificação parcial de eliciadores protéicos**. 2005.192p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FARAG, R.S.; DAW, Z.Y.; ABO-RAYA, S.H. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. **Journal of Food Science**, Chicago, v.54, n.1, p.54-74, Jan./Feb. 1989.

HASSANZADEH, N. An attempt to increase the efficacy of copper compounds emended with essential oils against fire blight. **Acta Hort.**, (ISHS), v.704, p.265-270, 2006. Disponível em: <http://www.actahort.org/books/704/704_37.htm>. Acesso em: 05 jul. 2006.

KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **European Journal of Plant Pathology**, Dodrecht, v.107, n.1, p.7-12, Jan. 2001.

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

MARUZZELLA, J. C.; LIGGUORI, L. The in vitro antifungal activity of essential Oliz. **Journal of the Amarican Pharmaceutical Association**, Washington, v.47, p.250-258, 1958.

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

MEDICE, R. **Avaliação de óleos essenciais no controle da *Phakopsora pachyrhizi* agente da ferrugem asiática da soja em casa-de-vegetação**. 2005. 32p. Monografia. (Graduação em Agronomia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MOLINA, M.R. et al. Pulpa y pergaminô de café. VIII. Estúdios básicos sobre la desidratacion de la pulpa de café. **Turrialba**, Turrialba, v.24, n.3, p.280-284, jul./sept.1974.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.30, p.369-389, 1992.

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

RESENDE, M.L.V. et al. Induction of resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. **The International Joint Workshop on PR-Proteins and Induced Resistance.** Helsingor, Dinamarca, p.79, 2004.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. Revisão **Anual de patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.2, p.1-51, 1994.

SANTOS, F.S. **Epidemiologia e manejo de doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) sob cultivo orgânico.** 2006. 146p. Tese (Doutorado de Fitopatologia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SOUZA, S.M.C. et al. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.3, p.685-690, maio/jun. 2004.

WILSON, C.L. et al. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v.81, n.2, p.204-210, 1997.

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

CAPÍTULO 3

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ULTRA-ESTRUTURAL DE
FOLHAS DE CAFEIEIRO PULVERIZADAS PREVIAMENTE COM
EXTRATO DE CASCA DE CAFÉ E ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO,
E INOCULADAS COM *C. coffeicola***

RESUMO

PEREIRA, Ricardo Borges. Caracterização bioquímica e ultra-estrutural do efeito da aplicação de extrato de casca de café e óleo de tomilho em folhas de cafeeiro. In: _____. **Extrato de casca de café e óleo de tomilho no controle de *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke em cafeeiro.** 2006. Cap. 3, p.56-78. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O presente trabalho teve por objetivo estudar o efeito do extrato de casca de frutos de café (ECC) e óleo essencial de tomilho (OET) na indução de resistência em cafeeiro contra a cercosporiose, usando como marcadores, as peroxidases e a lignificação. Além disso, observar por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), os efeitos destes na germinação e no desenvolvimento do fungo. Para a caracterização da resposta de defesa das plantas e observação em MEV, foram testados o ECC 150g.L⁻¹, OET 500ppm, ASM 0,2mg.mL⁻¹ e uma testemunha. Foram utilizadas mudas da cultivar Mundo Novo, cultivadas em substrato Plantmax[®]. As plantas foram tratadas e, após sete dias, inoculadas. As coletas do tecido para a determinação das atividades de peroxidases foram realizadas 24, 48, 96 e 168 horas após tratamento das mudas, com os mesmos tempos após inoculação das mesmas. A coleta para determinação de lignina foi realizada 14 dias após tratamento. As plantas foram pulverizadas e, após sete dias, tiveram suas folhas destacadas e inoculadas. As amostras a serem observadas em MEV foram coletadas 4, 8, 16 e 48 horas após inoculação, e preparadas segundo a metodologia estabelecida pela UFLA. As plantas somente tratadas com ECC apresentaram pico de atividade de peroxidases no sétimo e décimo primeiro dias após tratamento. As plantas inoculadas apresentaram comportamento semelhante. As plantas tratadas com OET apresentaram picos de atividade no segundo e terceiro dias após tratamento, voltando a atingir o pico no nono dia, no qual mantiveram-se até o décimo quarto dia. As plantas inoculadas apresentaram pico apenas no primeiro dia após inoculação. Não foram observadas diferenças significativas na concentração de lignina aos 14 dias após pulverização entre os tratamentos testados. Observou-se em MEV que o ECC promoveu melhor germinação dos conídios e desenvolvimento do fungo, diferentemente do OET, que reduziu a germinação dos conídios e o desenvolvimento do fungo em todos os tempos.

* **Comitê de Orientação:** Eduardo Alves – UFLA (Orientador); Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

PEREIRA, Ricardo Borges. Biochemical and ultra-structural characterization of the effect of coffee peel extract and thyme oil application on coffee leaves. In: _____. **Coffee peel extract and thyme oil in the control of *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke in coffee.** 2006. Chap. 3, p.56-78. Dissertation (Master in Phytopathology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The present work was aimed at studying the effect of coffee husk extract (CHE) and thyme essential oil (TEO) on the resistance induction against brown eye spot on coffee leaves through peroxidase activity and lignification. It was also observed through scanning electron microscopy (SEM), the effects of these possible inducers on spore germination and fungal development. For the characterization of the defense responses of plants and observation in SEM, CHE (150g.L⁻¹), TEO (500ppm), ASM 0.2mg.mL⁻¹ and non-treated control were tested. 'Mundo Novo' seedlings were cultivated in Plantmax™. The plants were treated and, after seven days, inoculated. The tissue sampling for peroxidase activity determination was made at 24, 48, 96 and 168 hours after seedling treatment and after seedling inoculation. Sampling to determine lignin formation was carried 14 days after treatment. The plants were sprayed and, after seven days, their leaves were detached and inoculated. The samples used for observation in SEM were collected 4, 8, 16 and 48 hours after inoculation, and prepared according to methodology already established at UFLA. Plants that received only CHE had peaks of peroxidase activity in the seventh and eleventh days after treatment and, when inoculated the plants had similar behavior. Plants treated with TEO showed activity peaks in the second and third days after treatment, having another peak in the ninth day which was observed until the fourteenth day. For the inoculated plants it was observed a peak only in the first day after inoculation. There were no significant differences in the lignin concentrations fourteen days after spraying treatments. It was observed through SEM that CHE promoted better conidial germination and fungal development; on the other hand TEO reduced conidial germination and fungal development at all time points evaluated.

***Advising Committee:** Eduardo Alves - UFLA (Adviser), Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Co-adviser).

1 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. Podem ser citados: a ativação de genes de proteínas relacionados a patogênese (PRps) e os genes de enzimas que regulam rotas do metabolismo secundário de substâncias do tipo fitoalexinas ou outros compostos de defesa, como lignina (Sticher et al., 1997). Estes genes podem ser ativados por eliciadores bióticos, como formas avirulentas do patógeno, raças incompatíveis, extratos fúngicos, extratos vegetais, óleos essenciais (Stangalin & Pascholati, 1997) ou eliciadores abióticos, como acibenzolar-S-metil, entre outros.

Existe uma carência de estudos utilizando a microscopia eletrônica de varredura e transmissão na investigação do parasitismo de plantas, visando ao controle de doenças com a utilização de extratos vegetais e óleos essenciais.

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, utilizando como marcadores as enzimas peroxidases e a lignificação. Além disso, buscou-se observar, por meio da microscopia eletrônica de varredura, os efeitos desses na germinação e no desenvolvimento do fungo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo das mudas de cafeeiro

Para a realização dos experimentos, em casa-de-vegetação, foram utilizadas sementes de café cultivar Mundo Novo 379/19 suscetíveis a *C. coffeicola*, cedidas pela EPAMIG. As sementes foram germinadas em areia, até que atingissem o estágio de ‘palito de fósforo’ e em seguida, transplantadas para bandejas contendo substrato Plantmax[®], onde receberam solução nutritiva e irrigações diárias, evitando qualquer tipo de estresse às mudas, até a formação do terceiro par de folhas verdadeiras.

A obtenção destas mudas teve como propósito fornecer material foliar para a avaliação dos caracteres bioquímicos envolvidos na resposta de defesa.

Foram testados somente os tratamentos que apresentaram maior eficiência no controle da cercosporiose, nos experimentos do capítulo anterior. No caso do extrato de casca de frutos de café, testou-se a diluição de 150g.L⁻¹ e do óleo essencial de tomilho, à concentração de 500ppm. Foram também adicionados ao experimento uma testemunha padrão de indução de resistência (acibenzolar-S-metil 0,2mg.mL⁻¹) e uma testemunha. As plantas foram divididas em tratadas e inoculadas, e tratadas e não inoculadas.

Quando as mudas apresentaram o terceiro par de folhas verdadeiras completamente expandido, tiveram as faces inferior e superior de suas folhas pulverizadas com as soluções do extrato e do óleo, até o ponto de escorrimento.

O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados, com três blocos e parcela experimental composta de três plantas.

2.2 Coleta e armazenagem de amostras

As coletas foram realizadas 24, 48, 96 e 168 horas após pulverização do extrato de casca e óleo de tomilho, coletando folhas das plantas tratadas, mais a testemunha e, após a inoculação do fungo, novamente foram coletadas amostras às 24, 48, 96 e 168 horas. As mudas foram inoculadas mediante pulverização da suspensão de conídios nas faces inferiores e superiores de suas folhas e, logo após, submetidas a uma câmara úmida por um período de 14 horas.

Na ocasião da última coleta, também foram realizadas as coletas das plantas para a realização das análises de lignina. Todas as folhas das plantas foram coletadas (primeiro, segundo e terceiro par de folhas) e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, a fim de se evitar oxidação. Em seguida, foram armazenadas a -80°C até o momento da maceração.

Para a caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa, aproximadamente 3g de folhas das mudas de café de cada tratamento (com e sem inoculação) foram macerados em almofariz com tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,2, contendo NaCl 0,5M e 0,4% de ácido cítrico. Posteriormente, a mistura foi filtrada em pano de seda e a suspensão centrifugada a 12.000g por 20 minutos, a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi mantido a -80°C até o momento das análises. Estes extratos foram utilizados para a determinação de proteínas totais, pelo método de Bradford (1976) e quantificação da atividade de enzimas peroxidases.

2.3 Caracterização dos mecanismos envolvidos na proteção do cafeeiro a *Cercospora coffeicola*

2.3.1 Quantificação de proteínas totais

A proteína solúvel contida nos extratos foi aferida pelo ensaio de Bradford (1976), utilizando soluções de albumina sérica bovina (BSA), para se fazer a calibração da curva padrão do reagente de Bradford.

A quantificação das proteínas totais torna-se necessária, pois, o resultado das atividades das enzimas peroxidases são expressas em unidade de atividade por miligrama de proteína (U.A.mg de proteína⁻¹).

2.3.2 Determinação da atividade de peroxidases

A atividade de peroxidases de guaiacol foi determinada pela adição de 100µL do extrato enzimático ajustado para 2mL de uma solução contendo acetato de sódio 50mM pH 5,2, guaiacol 20mM e peróxido de hidrogênio 20mM. Após incubação a 30°C por 10 minutos, a absorbância foi aferida a 480_{nm} (Urbanek et al., 1991). Os resultados foram expressos em unidade enzimática (U.E.)/mg de proteína.

2.3.3 Quantificação de lignina

O teor de lignina foi determinado pelo método do ácido tioglicólico, segundo Monties (1989), com algumas modificações. A partir do material armazenado, 0,2g de tecidos foliares foram pesados, de cada uma das repetições de cada tratamento. A extração de pigmentos foi realizada com a adição de 5mL de acetona 85%, por um período de 24 horas. Após a extração com acetona, o material foi centrifugado, o sobrenadante descartado e deixado em repouso até a secagem. Depois de seco, o material foi tratado com 5mL de ácido tioglicólico e ácido clorídrico 2N (1:10v/v), por 4 horas a 100°C; em seguida, foi centrifugado, lavado com água e novamente centrifugado, quando foram adicionados 5 mL de hidróxido de sódio 0,5N por 18 horas para a extração do ácido lignotioglicólico do precipitado. As amostras foram centrifugadas novamente e o sobrenadante foi acidificado com 200µl de ácido clorídrico concentrado e incubado no gelo por 4 horas. Após isso, o precipitado foi coletado, ressuspenso em hidróxido de sódio 0,5N e a absorbância a 280_{nm} foi determinada em espectrofotômetro. A quantidade de lignina foi calculada com base em uma curva padrão, construída

com diferentes concentrações de lignina padrão (alkali, 2-hidroxipropil éter) e os dados foram expressos em $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de matéria fresca.

2.4 Estudo histopatológico *C. coffeicola*

2.4.1 Instalação do experimento e inoculação

Foram utilizadas mudas de café com seis meses de idade, cultivadas em bandejas com substrato Plantmax[®], as quais foram submetidas aos melhores tratamentos do experimento do capítulo anterior, extrato de casca de frutos de café $150\text{g}.\text{L}^{-1}$ e do óleo essencial de tomilho, à concentração de 500ppm. Foram também adicionadas ao experimento uma testemunha padrão de indução de resistência (acibenzolar-S-metil $0,2\text{mg}.\text{mL}^{-1}$) e uma testemunha somente inoculada.

Aos sete dias após tratamento das mudas, foram coletadas quatro folhas de cada tratamento, destacando-se a folha do terceiro e quarto pares, as quais foram lavadas com água corrente com detergente e secas, depois acomodadas em bandejas, de plástico desinfestadas com álcool. Foi colocada no fundo das bandejas uma esponja de látex em lâmina, umedecida com água destilada e coberta com papel alumínio perfurado, para permitir a passagem da umidade. Em seguida, foram desenhados quatro círculos de 1cm de diâmetro com caneta de marca permanente na superfície abaxial de cada folha. No centro de cada círculo, foi colocada uma gota de $30\mu\text{L}$ de suspensão de conídios de $1,5 \times 10^3$ conídios. mL^{-1} de *C. coffeicola*. Após a inoculação, as bandejas foram cobertas com plástico transparente e colocadas em câmara de crescimento a 25°C , até o final das coletas.

2.5 Coleta das amostras para microscopia

As coletas das amostras a serem observadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas nos tempos de 4, 8, 16 e 48 horas após inoculação. As coletas foram feitas por meio de cortes circulares de 5mm de diâmetro, realizados com bisturi, dentro de cada círculo onde foram inoculadas. Os fragmentos foram colocados em microtubos de 1,5mL contendo fixador (Karnovsky's modificado) e, em seguida, armazenados em geladeira a 4°C.

O preparo e a observação das amostras em MEV foram realizadas no Laboratório de Microscopia e Análise Ultra-Estrutural (LME), no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG.

2.5.1 Preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura

Depois do material ser imerso em solução fixativa (Karnovsky's modificado), pH 7,2, por um período de no mínimo 24 horas, oito fragmentos de cada tratamento foram transferidos para uma solução tampão de cacodilato 0,05M e lavados três vezes, durante 10 minutos. As secções foram transferidas para solução de tetróxido de ósmio 1,0% em água por 1 hora, lavadas em água destilada por três vezes e desidratadas em uma série de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%, por três vezes). Após essa desidratação, as amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030 para substituição da acetona por CO₂ e complementação da secagem. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio *stubs* com fita de carbono sobre uma película de papel alumínio e cobertos com ouro no evaporador Balzers SCD 050 para observação em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40. As imagens foram geradas e registradas digitalmente, havendo diversas imagens para cada amostra nas condições de trabalho de 20Kv e distância de trabalho de 9mm. As imagens geradas foram gravadas e abertas no Software Photopaint do pacote Corel Draw 12.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização bioquímica

3.1.1 Atividade de peroxidases

O aumento da atividade de proteínas relacionadas à patogênese em folhas de cafeeiro suscetível foi associado com a expressão de indução de resistência induzida local (foliar) por ASM $0,2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, ECC $150\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e OET na concentração de 500ppm.

Com relação à atividade de peroxidases de guaiacol ao longo do período adotado para o experimento de coleta de material fresco, plantas pulverizadas com todos os tratamentos mostraram respostas de aumento em relação às testemunhas, considerando plantas somente tratadas e tratadas e inoculadas.

Como mostrado na Figura 1, plantas somente tratadas com ASM apresentaram picos de atividade no segundo e décimo primeiro dias após a pulverização, assim como a testemunha, porém essa com atividade inferior. ASM inoculado apresentou picos de atividade no oitavo dia após pulverização e um pequeno pico no décimo quarto dia, ambos superiores à testemunha inoculada. Resultados similares foram obtidos por Amaral (2005), em plantas de café, quando tratadas com ASM, que observou picos de atividade desta mesma enzima aos 15 dias após tratamento (oito dias após inoculação com *C. coffeicola*). Em alguns patossistemas, esse pico de atividade ocorre antes. Em plantas de tomate tratadas com ASM sem inoculação e inoculadas, o pico dessa enzima ocorreu aos nove dias (Ribeiro Júnior et al., 2004). No patossistema tomate - *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, o pico de atividade das enzimas peroxidases ocorreu aos 14 dias (Soylu et al., 2003).

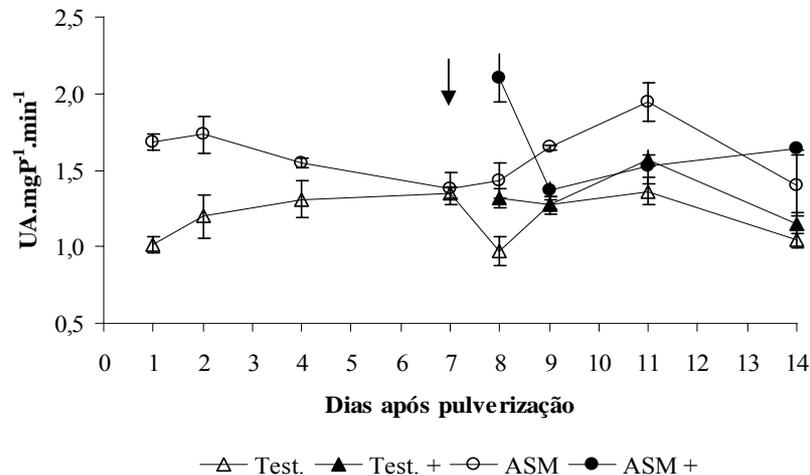


FIGURA 1. Atividade de peroxidases de guaiacol (POX) em folhas de cafeeiro, após tratamentos das mudas via pulverização foliar com ASM 0,2mg.mL⁻¹. + indica plantas tratadas e inoculadas. Seta indica inoculação com *C. coffeicola*. Barras de erros indicam o desvio padrão.

Plantas somente tratadas com ECC apresentaram atividade de enzimas peroxidases superiores em todas as coletas, com picos aos 7 e 11 dias após tratamento das mudas, 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 desta enzima foi quantificada aos 11 dias após tratamento das mudas com ECC 150g.L⁻¹, Amaral (2005) observou maior pico desta atividade aos 20 dias após tratamento das mudas com ECC 100g.L⁻¹ e posterior inoculação aos sete dias. Plantas, quando submetidas à inoculação, geralmente apresentam atividade de peroxidases superiores às não inoculadas. Mazzafera et al. (1989) também concluíram que o tecido infectado de cultivares Catuaí e Mundo Novo apresentou atividades de peroxidases superiores aos não infectados.

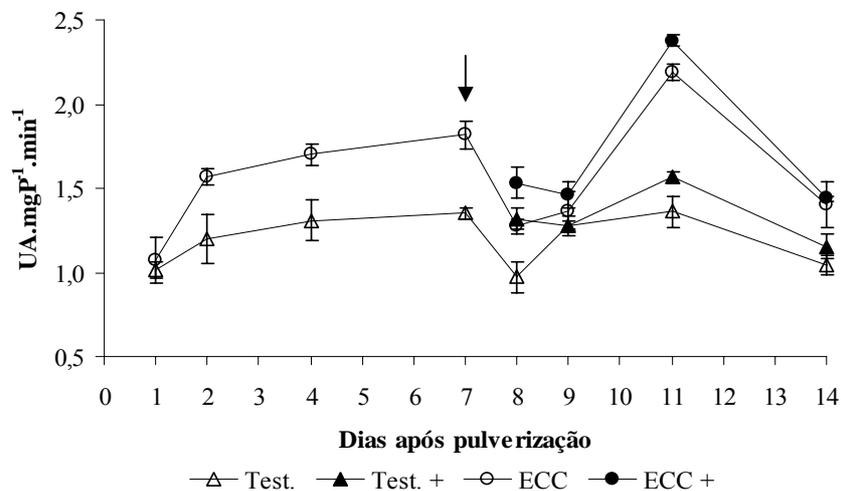


FIGURA 2. Atividade de peroxidases de guaiacol (POX) em folhas de café, após tratamentos das mudas via pulverização foliar com ECC 150g.L⁻¹. + indica plantas tratadas e inoculadas. Seta indica inoculação com *C. coffeicola*. Barras de erros indicam o desvio padrão.

Plantas somente tratadas com OET 500ppm apresentaram picos de atividade de peroxidases no primeiro e segundo dias após tratamento das mudas, voltando atingir o pico no nono dia, mantendo-se até o décimo quarto dia. Plantas tratadas com OET e inoculadas apresentaram pico no primeiro dia após inoculação, caindo no segundo e mantendo-se até o décimo quarto enquanto que a testemunha inoculada apresentou pequeno pico de atividade no quarto dia após inoculação (Figura 3).

Diante dos resultados obtidos neste ensaio bioquímico, também dos obtidos no capítulo 2, pôde-se observar que o extrato de casca de café não teve efeito direto sobre o patógeno, porém, induziu resistência, em mudas café, contra a cercosporiose, fato confirmado pelo aumento na atividade das enzimas peroxidases.

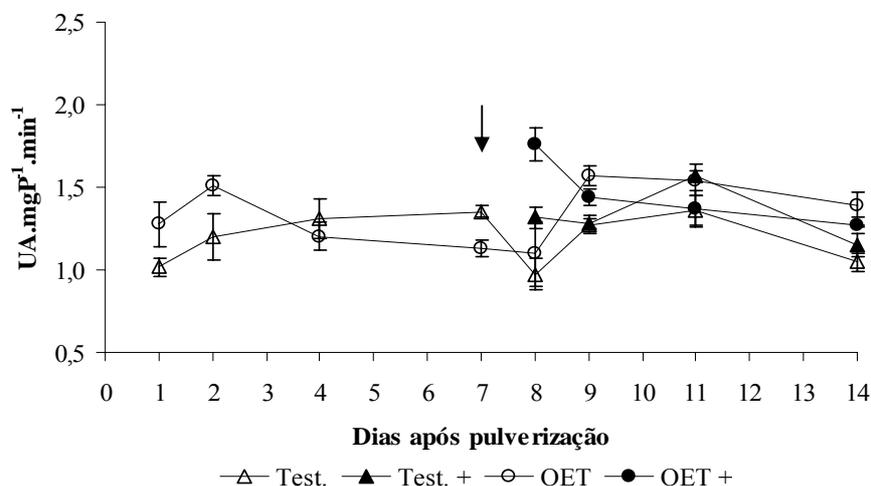


FIGURA 3. Atividade de peroxidases de guaiacol em folhas de café, após tratamentos das mudas via pulverização foliar com OET 500ppm. + indica plantas tratadas e inoculadas. Seta indica inoculação com *C. coffeicola*. Barras de erros indicam o desvio padrão.

3.1.2 Determinação de lignina

Não houve diferenças significativas dos teores de lignina, pelo teste de Scott Knott ($P = 0,05$) (Figura 4). Os tratamentos inoculados apresentaram concentrações de lignina pouco superiores aos não inoculados, com exceção do ASM 2mg.L^{-1} , que apresentou maior concentração de lignina no tratamento sem inoculação. Essa diferença também foi observada por Amaral (2005), em experimento realizado com *C. coffeicola*, quando feita a quantificação aos 20 dias após tratamento das mudas.

Amaral (2005) também obteve um acréscimo da concentração de lignina em plantas tratadas com ECC 100g.L^{-1} 20 dias antes e inoculadas com *C. coffeicola* 13 dias antes das coletas, porém esse não diferiu significativamente da testemunha. Neste ensaio, não foi observada diferença nas concentrações de lignina entre os tratamentos, pois a coleta foi realizada aos 14 dias após

tratamento das mudas. Provavelmente, o tempo foi insuficiente para tal observação.

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 álcoois coniferil, sinapil e p-cumaril (Dence & Lin, 1992; Taiz & Zeiger, 1998).

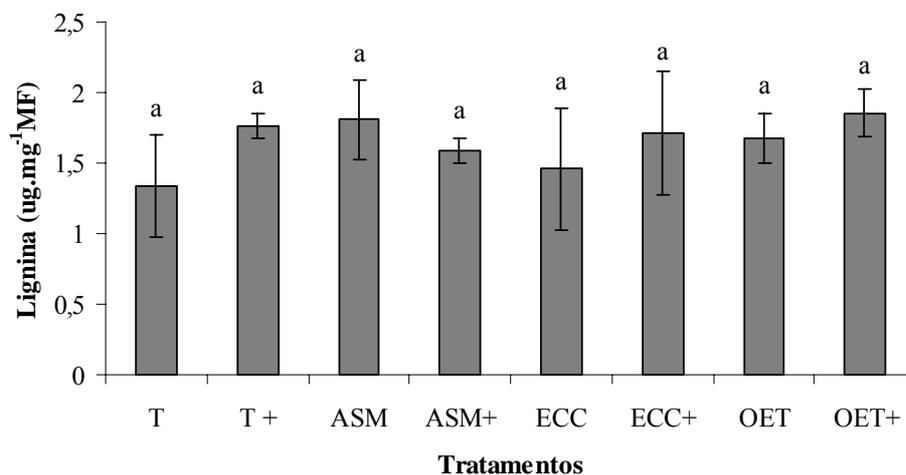


FIGURA 4. Concentração de lignina ácido solúvel (micrograma de lignina por miligrama de matéria fresca) em folhas de mudas de cafeeiro, aos 14 dias após pulverização com os tratamentos. Testemunha (T), Acibenzolar-S-metil (ASM) 0,2mg.mL⁻¹, Extrato de casca de frutos de café (ECC) 150g.L⁻¹, Óleo essencial de tomilho (OET) 500ppm. + significa plantas tratadas e inoculadas com *C. coffeicola*, aos sete dias após pulverização. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott (P = 0,05). Barras de erros indicam desvio padrão.

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 ao desenvolvimento (Nicholson & Wood, 2001; Pascholati & Leite, 1995; Misaghi, 1982; Hammerschmidt & Kúc, 1982; Ride, 1983).

Até o momento, nas pesquisas com cafeeiro tem se associado a reação de hipersensibilidade com acúmulo da 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 dos tecidos 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).

3.2 Estudo do efeito do ASM, ECC e OET no processo inicial de infecção de *C. coffeicola* em folhas de café, por meio da microscopia eletrônica de varredura

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 5).

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. Esses resultados são compatíveis com os apresentados no Capítulo 2, no ensaio de germinação, em que o OET inibiu a germinação de conídios de *C. coffeicola* (Figura 5).

Nas observações realizadas às 16 e 48 horas após inoculação, como mostra na Figura 6, 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. As observações corroboram como os resultados obtidos no Capítulo 2, no qual o OET mostrou efeito fungitóxico ao crescimento micelial de *C. coffeicola*.

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 (2005), 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.

Existem poucos trabalhos utilizando a microscopia eletrônica como ferramenta na investigação do parasitismo de plantas em patossistemas, visando ao controle de doenças, com a utilização de extratos vegetais e óleos essenciais.

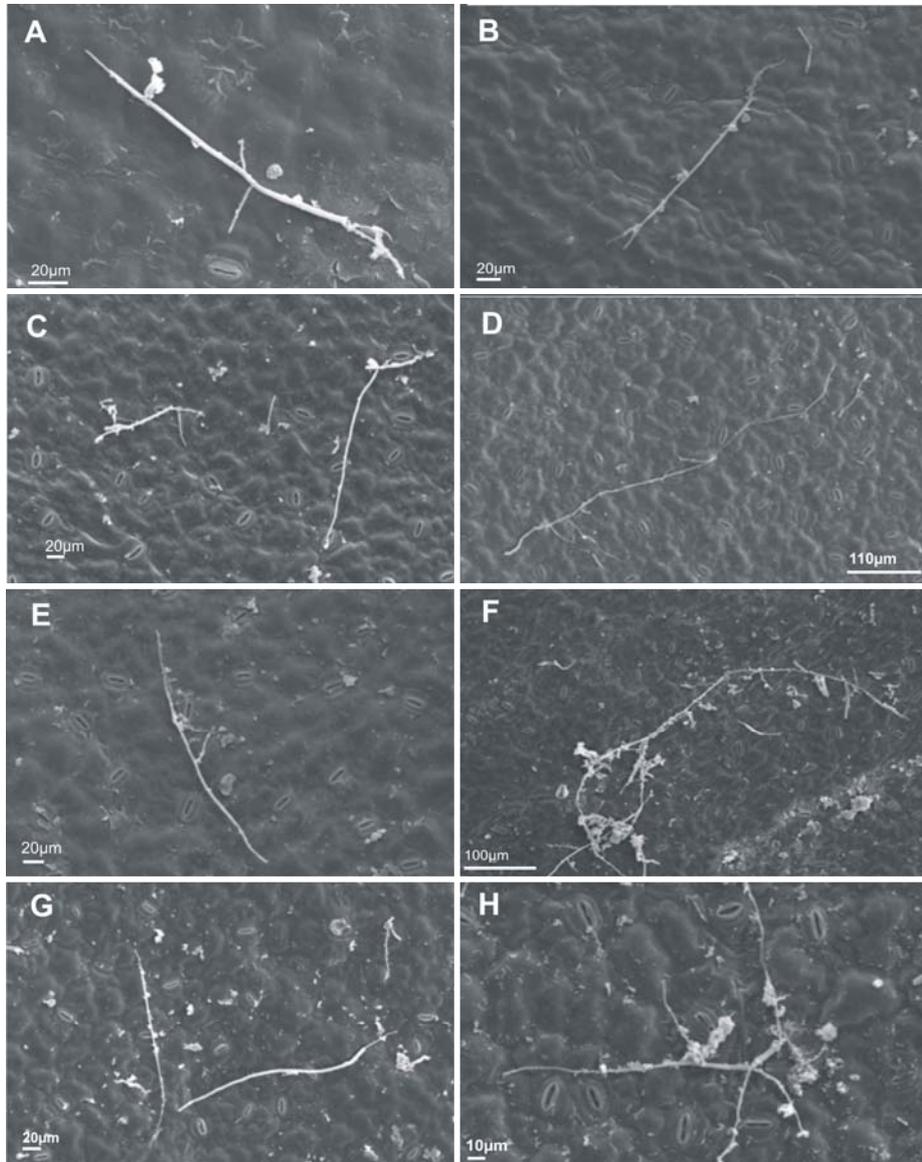


FIGURA 5. Eletromicrografia de varredura de folhas de cafeeiro inoculadas com *C. coffeicola*. (A) ASM, (B) ECC, (C) OET e (D) Testemunha, 4h após inoculação e (E) ASM, (F) ECC, (G) OET e (H) Testemunha, 8h após inoculação.

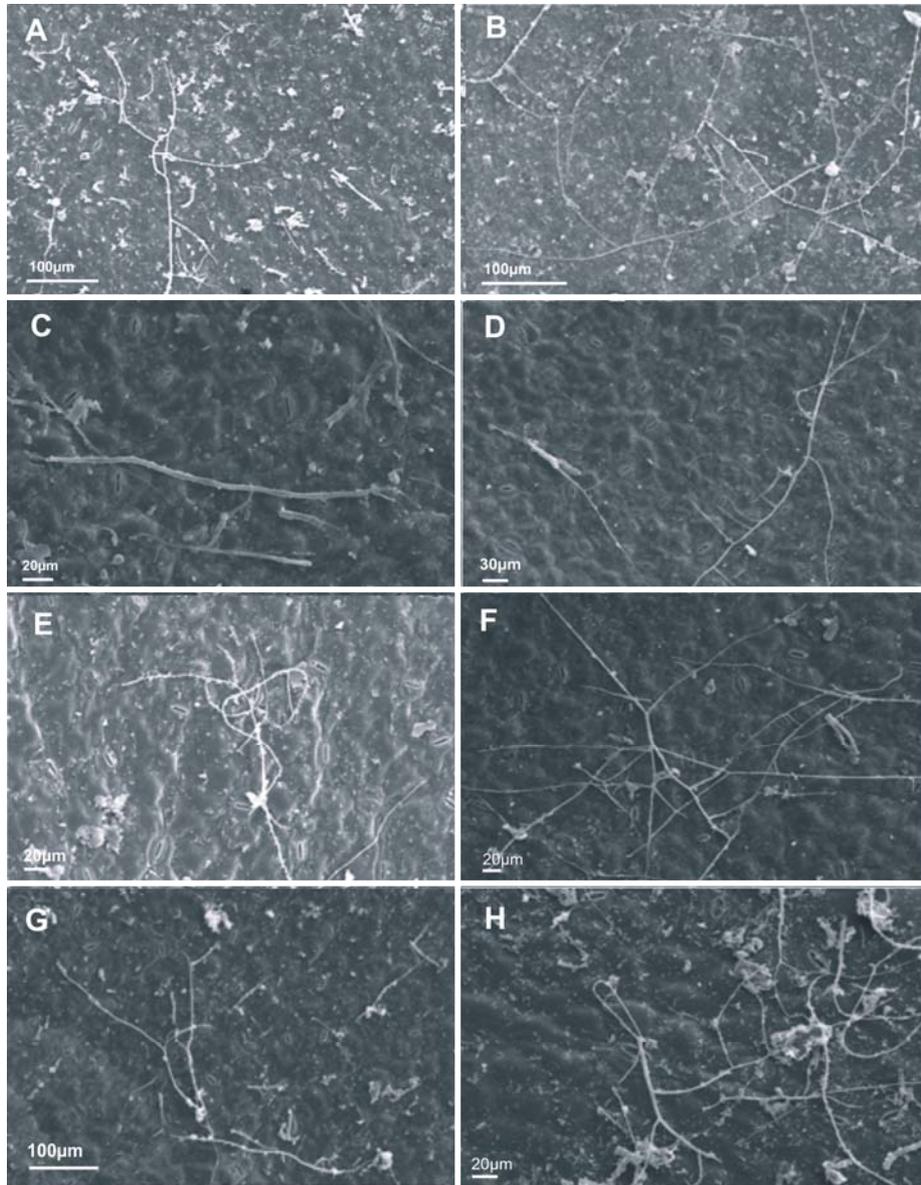


FIGURA 6. Eletromicrografia de varredura de folhas de cafeeiro inoculadas com *C. coffeicola*. (A) ASM, (B) ECC, (C) OET e (D) Testemunha, 16h após inoculação e (E) ASM, (F) ECC, (G) OET e (H) Testemunha, 48h após inoculação.

4 CONCLUSÃO

- O maior pico de atividade de peroxidases ocorreu no quarto dia após inoculação em plantas tratadas com extrato de casca de frutos de café e no segundo e terceiro dias após inoculação, em plantas tratadas com óleo essencial de tomilho.
- No ensaio de microscopia eletrônica de varredura, observou-se que o extrato de casca de fruto de café não causou efeito direto à germinação dos conídios de *C. coffeicola*, potencializando o crescimento do fungo.
- O óleo essencial de tomilho reduziu a germinação e crescimento dos conídios, caracterizando um efeito fungitóxico do óleo ao patógeno.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, D.R. **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais.** 2005. 96p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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.

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.

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

MARTINS, E.M.F.; MORAES, W.B.C. Development of *Hemileia vastatrix* in coffee plants with genetic and induced resistance. **Journal of Physiopathology**, Berlin, v.144, n.11/12, p.519-526, Dec. 1996.

MARTINS, E.M.F. et al. Comparative induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants non specific inducers from different fungal and bacterial origins. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.10, p.521-529, 1985.

MAZZAFERA, P.; GONÇALVES, W.; FERNANDES, J.A.R. Fenóis, peroxidases e polifenoloxidasas na resistência do cafeeiro a *Meloidogyne incognita*. **Bragantia**, Campinas, v.48, n.2, p.131-142, 1989.

MEDICE, R. **Avaliação de óleos essenciais no controle da *Phakopsora pachyrhizi* agente da ferrugem asiática da soja em casa-de-vegetação.** 2005. 32p. Monografia. (Graduação em Agronomia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

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

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

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. Cap.22, v.1, p.417-454.

RIBEIRO JÚNIOR, P.M. et al. Lignificação induzida Por extratos naturais e produtos comerciais em tomateiro infectado por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.261, ago. 2004. Suplemento.

RIDE, J.P. Cell walls and other structural barriers in defense. **Biochemical Plant Pathology**, p.215-235, 1983.

RIJO, L. et al. Does gene SH₅ confer to certain coffee-rust associations a reaction near immunity? A histopathological study. **Café Cacao Thé**, Paris, v.35, n.3, p.167-176, July/Sept. 1991.

SILVA. M.C. et al. 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.

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.

STANGALIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathology**, Jaboticabal, v.23, p.346, 1997.

STICHER, L.; MAUCH MANI, B.; METRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.35, p.235-270, 1997.

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

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologia Plantarum**, Warsaw, v.13, n1, p.43-50, 1991. by

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sociedade tem se mostrado, cada vez mais, preocupada com o meio ambiente e com a utilização de produtos ecologicamente corretos, porém, de baixo custo e com um bom nível de controle. A indução de resistência contra fitopatógenos, tida como um avanço na agricultura, representa um método alternativo no controle de doenças, que pode ser obtido por meio da utilização de subprodutos da cadeia produtiva do café, como casca de frutos de café, e por meio de óleos essenciais, como o óleo de tomilho.

A partir dos experimentos conduzidos neste trabalho, verificou-se que o extrato de casca de frutos de café e o óleo essencial de tomilho podem ser utilizados na proteção do cafeeiro contra o ataque de *Cercospora coffeicola*, pois os mesmos apresentaram redução na incidência da doença, quando aplicados sete dias antecedentes à inoculação. Nas observações realizadas em microscopia eletrônica de varredura, pode-se observar que o extrato de casca de frutos de café não apresentou efeito fungitóxico aos conídios do fungo, enquanto que, para o óleo essencial de tomilho, esse efeito foi verificado.

No entanto, faz-se necessária a realização de novos experimentos em casa-de-vegetação, no sentido de verificar o efeito do extrato da casca de frutos de café e óleo essencial de tomilho em aplicações consecutivas em espaços de tempo predeterminados, visando um controle da doença por um período mais prolongado e de maneira mais eficiente. Como complemento a este trabalho, estudos com microscopia eletrônica de varredura e transmissão devem ser realizados, para se entender como ocorre o processo de desenvolvimento do patógeno dentro do tecido hospedeiro. Esses estudos podem ajudar a esclarecer sobre o tipo de barreiras (químicas e estruturais) que podem levar à resistência da planta.