



THAÍS CAINÃ TEIXEIRA VALENTE

**EXPRESSÃO GÊNICA E ATIVIDADE DE
CATALASE E FENILALANINA AMONIA LIASE
ATIVADAS POR INDUTORES DE
RESISTÊNCIA EM CAFEIEIRO**

LAVRAS - MG

2012

THAÍS CAINÃ TEIXEIRA VALENTE

**EXPRESSÃO GÊNICA E ATIVIDADE DE CATALASE E
FENILALANINA AMONIA LIASE ATIVADAS POR INDUTORES DE
RESISTÊNCIA EM CAFEIEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende

LAVRAS - MG

2012

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

Valente, Thaís Cainã Teixeira.

Expressão gênica e atividade de catalase e fenilalanina amonia
liase ativadas por indutores de resistência em cafeeiro / Thaís Cainã
Teixeira Valente. – Lavras : UFLA, 2012.

67 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Mário Lúcio Vilela Resende.

Bibliografia.

1. *Coffea arabica*. 2. Indução de resistência. 3. PCR em tempo
real. 4. Ferrugem do cafeeiro. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 631.523

THAÍS CAINÃ TEIXEIRA VALENTE

**EXPRESSÃO GÊNICA E ATIVIDADE DE CATALASE E
FENILALANINA AMONIA LIASE ATIVADAS POR INDUTORES DE
RESISTÊNCIA EM CAFEIEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2012.

Dr. Luciano Vilela Paiva UFLA

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros UFLA

Dr. Antônio Chalfun Júnior UFLA

PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

LAVRAS - MG

2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por me guiar para que chegasse até aqui.

Aos meus pais e irmãos, que sempre foram os maiores idealizadores e que sempre fizeram de tudo para que eu pudesse chegar onde estou.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT), pela concessão de bolsa durante o curso através da CAPES.

Ao meu orientador, Mário Lúcio Vilela Resende, pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho.

Ao professor Dr. Luciano, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade e disponibilização do Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA para realização de parte do experimento.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pelos valiosos ensinamentos.

Aos membros da banca por aceitarem o convite de participar.

Ao Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA e a todos que dele fazem parte, principalmente ao Fabrício e Eliete, pela disponibilidade.

À Aninha e à Vanessa, pelo apoio e ajuda na realização de todo o trabalho e companheirismo em todas as horas.

Ao Pedro, pela importante ajuda no experimento.

À Lívia, por me ajudar na montagem do experimento, nas coletas e principalmente por repassar seus conhecimentos de biologia molecular para execução deste trabalho.

Ao André Lima, pela paciência e disponibilidade em ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo: Pedro, Vanessa, Aninha, Márcia, Moises, Kátia, Sandra, Eliane, Bruno, Dario, Joyce, Rodolfo, Camila, Marcelo e Manoel, pela convivência diária e disposição para ajudar.

Aos meus amigos de Lavras, em especial, Ana Catarina, Dalíllia, Pauline, Cinara, Renatinho, Luisa, Laisa e Nayara pela amizade sincera e pelos bons momentos.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, é uma das doenças mais destrutivas do cafeeiro, podendo ocasionar grandes perdas na produção. Diante disso, estudos vêm sendo realizados a partir da perspectiva do controle dessa doença pela ativação de mecanismos de defesa inerentes às plantas. A análise da expressão de genes relacionados à defesa, assim como a análise da atividade de enzimas de defesa, em resposta ao tratamento com moléculas eliciadoras é uma ferramenta importante para estudar estes mecanismos. Este trabalho foi realizado com o objetivo de analisar a expressão quantitativa de dois importantes genes, *CAT* e *PAL*, que codificam para as proteínas catalase e fenilalanina amônia-liase, e avaliar a atividade destas proteínas envolvidas no mecanismo de defesa induzida de plantas a patógenos. Avaliou-se o efeito do NEFID (extrato de folha de cafeeiro), fosfito de manganês e associação de NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês em mudas de cafeeiro suscetíveis à ferrugem, inoculadas e não inoculadas com *Hemileia vastatrix*. Para a análise do perfil de expressão gênica, utilizou-se a técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR). Os genes *CAT* e *PAL* foram induzidos em cafeeiro por todos os tratamentos, tendo os perfis de expressão sido bastante variados em relação ao indutor utilizado e ao período analisado, tanto na análise molecular quanto na análise bioquímica. Os maiores níveis de expressão dos genes *CAT* e *PAL* ocorreram em plantas induzidas por NEFID sem inoculação com *H. vastatrix*. Após a inoculação em mudas de cafeeiro induzidas, observaram-se variações entre as expressões destes genes, dos indutores e os tempos analisados, e os maiores níveis de expressão para os dois genes ocorreram em plantas tratadas com NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês. A atividade da enzima PAL apresentou um perfil diferente em relação à atividade da enzima CAT, de modo que há uma menor atividade da enzima PAL para a maioria dos períodos analisados.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. Ferrugem do cafeeiro. Indução de resistência. PCR em tempo real.

ABSTRACT

The coffee leaf rust, caused by *Hemileia vastatrix*, is one of the most destructive disease of coffee, can cause great losses in production. Therefore, studies are being conducted from the perspective of controlling this disease by activating defense mechanisms inherent to the plants. Expression analysis of defense-related genes, as well as, the analysis of the enzyme activity of defense, in response to treatment with elicitors molecules is an important tool for studying the mechanisms of induced resistance. This work was conducted to analyze the quantitative expression of two important genes, *CAT* and *PAL*, which encode to catalase and phenylalanine ammonia-lyase proteins, and evaluate the activity of these proteins involved in the mechanism of induced defense of plant to pathogens. We evaluated the effect of NEFID (coffee-leaf extract formulation), manganese phosphite and association NEFID + copper phosphite + manganese phosphite in coffee seedlings susceptible to rust, inoculated and not inoculated with *Hemileia vastatrix*. To analyze the gene expression profile, we used the technique of polymerase chain reaction in real time (qRT-PCR). The *CAT* and *PAL* genes were induced in coffee by all treatments, with the expression profiles have been widely varied with respect to the inducer used and the period analyzed, both in the molecular analysis as in biochemical analysis. The highest levels of expression of *CAT* and *PAL* genes found in plants induced by NEFID without inoculation with *H. vastatrix*. After inoculation in induced coffee seedlings, were observed variations between the expression of these genes, the inductors and the times analyzed, and the higher levels of expression for both genes were found in plants treated with phosphite NEFID + copper phosphite + manganese phosphite. The PAL activity showed a different profile in relation to the CAT activity, so that there is less activity of the enzyme PAL for most of the periods analyzed.

Keywords: *Coffea arabica*. Coffee leaf rust. Induced defense. Real time PCR.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO GERAL.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Importância da cultura do cafeeiro.....	13
2.2	Interação Coffea arabica – Hemileia vastatrix.....	13
2.3	Ativação da expressão de genes de resistência.....	15
2.4	Resistência induzida em plantas contra patógenos.....	16
2.4.1	Explosão oxidativa.....	21
2.4.2	Metabolismo de fenilpropanóides.....	24
	REFERÊNCIAS.....	26
	SEGUNDA PARTE- ARTIGO.....	36
	ARTIGO 1: Expressão de genes de defesa induzidos por formulação à base de extrato de folha de cafeeiro e fosfitos em cafeeiro contra Hemileia vastatrix.....	36

PRIMEIRA PARTE
INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2012), estima-se que a produção de café para a safra de 2012 será entre 48,97 e 52,27 milhões de sacas de 60 quilos do produto beneficiado. O resultado representa um crescimento entre 12,6% e 20,2%, quando comparado com a produção obtida na temporada anterior, que foi de 43,48 milhões de sacas. Esse crescimento se deve, principalmente ao ano de alta bienalidade.

Diversos fatores podem afetar a produtividade do cafeeiro e, dentre esses fatores, destacam-se as doenças. A principal doença do cafeeiro, a ferrugem alaranjada, é causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk & Br e ocorre em todas as regiões produtoras de café do mundo (VOSSEN, 2005). Para minimizar os prejuízos causados, é necessário desenvolver estratégias de controle da ferrugem. Deste modo, o estudo e a caracterização de mecanismos de defesa do cafeeiro contra o patógeno é importante para o entendimento da interação planta-patógeno e desenvolvimento de estratégias de controle dessa doença. Quanto maior o conhecimento dos fatores que determinam a resistência, mais eficaz será o controle da doença (SILVA et al., 2006).

Neste contexto, pode-se incluir a resistência induzida em plantas contra patógenos, que está associada a um conjunto de respostas de defesa. A ativação dessas respostas em plantas depende da eficiência do hospedeiro em reconhecer a presença de patógenos por meio de mecanismos de percepção e transdução de sinais, que envolvem, entre outros, alterações transitórias no fluxo de íons através da membrana plasmática e mudanças no estado de fosforilação de várias proteínas. Como consequência desse processo, ocorre a ativação de fatores de transcrição no núcleo da célula vegetal, com a expressão subsequente de genes de defesa. Outras respostas de resistência podem incluir alterações estruturais, o

acúmulo de espécies reativas de oxigênio, a síntese de outros metabólitos secundários e a produção de uma ampla variedade de moléculas de defesa, tais como proteínas antimicrobianas (SCHENK et al., 2000).

A resistência também pode ser ativada em plantas suscetíveis, após a infecção localizada por fitopatógenos ou em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos, sendo conhecida como “resistência sistêmica adquirida” (SAR) ou “resistência sistêmica induzida” (ISR) (HAMMERSCHMIDT; MÉTRAUX; LOON, 2001; STICHER; MAUCHI-MANI; MÈTRAUS, 1997). A forma clássica da SAR pode ser ativada pela exposição da planta alvo a patógenos virulentos, avirulentos e não-patógenos ou pela utilização de moléculas eliciadoras, ácido salicílico, ácido 2,6 dicloro-isonicotínico (INA) ou ácido benzo-(1,23)-thiadiazole-7-carbotióico (BTH) (STICHER; MAUCHI-MANI; MÈTRAUS, 1997).

Diante disso, a perspectiva promissora do controle de doenças através da ativação dos mecanismos de defesa inerentes das plantas, pela utilização de produtos bióticos ou abióticos, não tóxicos, tem estimulado vasta pesquisa, visando ao esclarecimento dos aspectos bioquímicos e moleculares envolvidos na SAR. Tem sido demonstrado, em diferentes interações hospedeiro-patógeno estudadas, que a indução da SAR resulta na ativação de diferentes mecanismos bioquímicos de resistência (GUZZO, 2004). Uma das estratégias que tem sido utilizada para elucidar as bases moleculares da resistência induzida envolve o estudo da expressão gênica em plantas, após o tratamento com patógenos, eliciadores ou indutores químicos ativadores da SAR (KOHLENER; SCHWINDLING; CONRATH, 2002; SCHENK et al., 2000; XIAO; TANG; ZHOU, 2001).

A utilização de fertilizantes foliares, como os fosfitos, tem ganhado importância no controle de doenças (DATNOFF; SEEBOLD; CORREA, 2001), sendo citados na literatura como indutores de resistência. Outra forma de

controle que pode ser utilizada e desperta o interesse dos especialistas da área é o controle de doenças por meio da utilização de produtos naturais com extratos de plantas ou sub-produtos da cadeia produtiva do café (TOYOTA, 2008).

Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi estudar a expressão de genes e a atividade de proteínas de defesa ativadas em cafeeiro suscetível à ferrugem pela aplicação de indutores de resistência à base de extrato de folhas de cafeeiro e fosfitos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da cultura do cafeeiro

O café é uma das mais importantes fontes de divisas para o Brasil, sendo o principal produtor e exportador desta *commodity*. A produção de café é essencial para cerca de 50 países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, representando assim uma contribuição importante para seu Produto Interno Bruto (PIB) (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION - ICO, 2012).

Essa cultura apresenta alguns problemas fitossanitários, que causam severas perdas quando não tomadas medidas de controle eficazes. Dentre as doenças do cafeeiro, as principais são: ferrugem, causada por *Hemileia vastatrix* Berk. & Br; cercosporiose, causada por *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke; antracnose dos frutos (CBD), causada por *Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge, ainda não presente no Brasil; galhas causadas pelos nematóides do gênero *Meloidogyne*; mancha-de-Phoma, causada por *Phoma tarda* Boerema & Bollen, entre outras (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

2.2 Interação *Coffea arabica* – *Hemileia vastatrix*

A ferrugem tem como agente causal o fungo *Hemileia vastatrix*, uma doença que pode levar a perdas de 30% na produção de *Coffea arabica* se nenhuma medida de controle for aplicada. Este agente patogênico estabelece uma interação biotrófica com o hospedeiro e é totalmente dependente de células vivas das plantas para crescer e reproduzir (AZINHEIRA et al., 2010; NUNES et al., 2009; RAMIRO et al., 2009; SILVA et al., 2006; TALHINHAS et al., 2010).

Infecções intensas desse patógeno no campo ocorrem, normalmente, nos meses de dezembro a janeiro, com um grande progresso da doença nos meses de março a abril. Já na estação seca ocorre queda acentuada de folhas, reduzindo-se a incidência da doença (POZZA, 2008).

Segundo Zambolim e Vale (2003), a severidade da ferrugem e os prejuízos ocasionados na produção do cafeeiro, de modo geral, variam de região para região e de ano para ano em decorrência da carga pendente dos cafeeiros e das condições climáticas prevalentes.

A ferrugem do cafeeiro é de difícil controle, mas resultados satisfatórios são obtidos pelo uso de fungicidas cúpricos e sistêmicos, em aplicações sistemáticas durante a estação chuvosa, dependendo da severidade da doença (ZAMBOLIM et al., 2002). O controle é comumente realizado mediante pulverizações foliares e também por meio de aplicações via solo com fungicidas sistêmicos associados ou não a inseticidas. Porém, o uso inadequado destes fungicidas pode selecionar novas raças fisiológicas resistentes do patógeno (AGRIOS, 2005).

A resistência do café contra *H. vastatrix* se desenvolve após o contato entre fungo e planta. O acúmulo de calose e lignina foi observado nas paredes celulares tanto de plantas de café resistentes como suscetíveis, porém, esse acúmulo foi detectado mais rapidamente nas plantas resistentes que nas plantas suscetíveis (MARTINS; MARIA; MORAES, 1985; RIJO; MEDEIROS; RODRIGUES, 1982; RIJO; RODRIGUES, 1978). As fitoalexinas também foram relacionadas com a resistência à ferrugem por alguns autores (GUEDES, 1983; MARTINS; ROVERATTI; MORAES, 1986; RODRIGUES; BITTENCOURT; RIJO, 1975). Outros eventos bioquímicos/citológicos como produção de radicais livres, lignificação e encapsulamento do haustório, reação de hipersensibilidade e produção de quitinases foram recentemente ressaltados (SILVA; GUERRA-GUIMARÃES; NICOLE, 2005). O acúmulo de substâncias

do tipo fitoalexinas, lignina e proteínas de defesa é provavelmente apenas uma parte da resposta de defesa do cafeeiro, porém estes e os demais mecanismos dessa resistência não estão claramente definidos.

2.3 Ativação da expressão de genes de resistência

A análise da expressão gênica é de fundamental importância para o estudo das vias metabólicas e de sinalização, as quais sustentam processos celulares e de desenvolvimento. Embora vários métodos têm sido utilizados para quantificar a expressão gênica, a reação em cadeia polimerase quantitativo em tempo real (RT-qPCR) é considerada o padrão pela sua sensibilidade, especificidade, dinâmica e capacidade de produção elevada (BUSTIN et al., 2005; FREEMAN; WALKER; VRANA, 1999; UDVARDI; CZECHOWSKI; SCHEIBLE, 2008). Esta técnica pode detectar quantidades muito baixas de um transcrito alvo, mesmo se apenas poucas cópias estiverem presentes na amostra (WONG; MEDRANO, 2005).

Diferentes procedimentos para normalizar dados de RT-qPCR têm sido propostos ao longo dos anos e evoluindo por meio de técnicas como o tamanho da amostra, o RNA total ou quantificação de DNA genômico, e controle de moléculas artificiais, para técnicas que levam em conta variações da amostra, tais como diferenças na quantidade e qualidade de RNA, e eficiências de transcrição reversa ou PCR (CRUZ et al., 2009; HUGGETT et al., 2005; TESTE et al., 2009; WALKER et al., 2009).

A identificação de genes de hospedeiros envolvidos em respostas de defesa é importante para a elucidação dos mecanismos de resistência em plantas contra fitopatógenos. Nos últimos anos, vários trabalhos foram realizados para elucidar as vias de defesa de sinalização em plantas que leva à resistência e que são acionados após o reconhecimento de um agente patogênico ou por

tratamento com eliciadores de respostas de defesa (GANESH et al., 2006; GUZZO; HARAKAVA; TSAI, 2009; MEDEIROS et al., 2009). Neste sentido, a análise de perfis de expressão de genes em resposta à infecção e o tratamento com moléculas de sinalização fornece uma base para identificar as características comuns e / ou antagonistas entre vias de defesa (SCHENK et al., 2000).

2.4 Resistência induzida em plantas contra patógenos

A resistência em plantas contra doenças está associada à eficiência do hospedeiro em reconhecer a presença de patógenos através de mecanismos de percepção e transdução de sinais (GUZZO; HARAKAVA, 2007). A resistência induzida pode ser ativada em plantas por uma série de substâncias, evitando ou atrasando a entrada e/ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos, por meio de mecanismos de defesa próprios (ATHAYDE SOBRINHO; FERREIRA; CAVALCANTI, 2005; NOJOSA; RESENDE; RESENDE, 2005). Cavalcanti et al. (2006) e Resende et al. (2004) mencionam que a resistência induzida em plantas pode ocorrer por meio do tratamento com eliciadores de origem biótico (extratos vegetais, microrganismos ou parte desses) ou abiótico (substâncias químicas).

Avanços na pesquisa envolvendo a indução de resistência em plantas vêm sendo acompanhados pelo surgimento de novos produtos comerciais que apresentam maior eficácia, estabilidade e menor impacto ao ambiente, sendo capazes de propiciar melhorias na produtividade agrícola, devido à redução de perdas ocasionadas por estresses bióticos e abióticos, dentro do conceito de amplo espectro de ação, conferido por estes indutores. Neste contexto, resultados promissores têm sido alcançados com o uso do indutor químico de resistência acibenzolar S-metil (ASM, produto do grupo benzotiazole ou

BTH). A aplicação do produto proporcionou proteção contra *H. vastatrix* em mudas de cafeeiro das cultivares Mundo Novo e Catuaí Vermelho M-99 (GUZZO et al., 2001; MARCHI; BORGES; RESENDE, 2002). Esse efeito indutor do ASM contra a ferrugem também foi confirmado por Nojosa (2003), quando o tratamento com ASM proporcionou uma percentagem de controle de 56,82% em folhas destacadas e de 52% em mudas de cafeeiro. Nas plantas tratadas com ASM foi possível observar um aumento considerável nos teores de clorofila *a* e *b*, nos teores de lignina e na atividade de peroxidase. Outros estudos elucidaram a capacidade do ASM, em condições controladas, de induzir proteção contra *H. vastatrix* por até 10 semanas (MARTINS et al., 1998).

Com o advento do sequenciamento genômico em larga escala e o desenvolvimento de tecnologias como o microarranjo, por exemplo, é possível agora monitorar a expressão de milhares de genes simultaneamente (AHARONI; VORST, 2001; SHERLOCK, 2000). Nardi et al. (2006), por meio da técnica de microarranjo, observaram que a pulverização com ASM em cafeeiro induziu a expressão de genes de defesa, típicos da resistência sistêmica adquirida. A principal resposta nas folhas foi a expressão de genes relacionados à explosão oxidativa e ao aumento de barreiras físicas e químicas (glutathione-S-transferase, superóxido dismutase, peroxidase, quitinase e lipoxigenase). Guzzo, Harakava e Tsai (2009), por meio da técnica de PCR em tempo real, também identificaram genes relacionados à SAR em cafeeiro a partir de mRNAs isolados de plantas suscetíveis cultivar Mundo Novo após o tratamento com ASM. Os genes encontrados estão envolvidos em diversos processos relacionados à resistência contra fitopatógenos como: formação de espécies ativas de oxigênio, resposta de hipersensibilidade, morte celular programada, síntese e transporte de metabólitos antimicrobianos, percepção e transdução de sinal, síntese de proteínas relacionadas à patogênese, metabolismo de lipídios, degradação controlada de proteínas e manutenção e desenvolvimento celular.

Outra forma de controle de fungos patogênicos que tem despertado o interesse dos especialistas é baseada na utilização de extratos vegetais (CHANG et al., 2008). Existem vários relatos na literatura de diversas substâncias de origem biológica que agem como indutores de resistência. Extratos de plantas no controle de fitopatógenos vêm recebendo grande importância nos trabalhos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PRPs), indicando presença de algum composto eliciador (BARGUIL et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2006; MEDEIROS et al., 2009; SANTOS et al., 2007).

Na cafeicultura, a maioria dos trabalhos com a utilização de extratos vegetais tem sido realizada *in vitro* ou em casa de vegetação, em campo foram realizados poucos trabalhos. Resende et al. (2007) e Universidade Federal de Lavras - UFLA (2006) solicitaram o depósito de patente para formulação à base de extratos de folhas de café e formulação à base de cascas de frutos de café. Tais formulações, as quais têm como principal matéria prima folhas de cafeeiro que caem ao solo (devido a doenças, colheita de frutos, podas e outros estresses) e subproduto do beneficiamento dos grãos (endocarpo, mesocarpo e exocarpo), podem ser usadas com ou sem espalhantes-adesivos ou outros adjuvantes, para o controle de doenças em vários cultivos.

A utilização de extratos de casca de café e de folhas de café infectadas com ferrugem proporcionou proteção de mudas de café contra os patógenos *Phoma costarricensis* e *Cercospora coffeicola* (AMARAL, 2005; RESENDE et al., 2004). Foi observada diminuição na percentagem da mancha-de-Phoma de 20% e 38%, para extrato de casca de café e extrato de folhas de café com ferrugem, respectivamente (RESENDE et al., 2004). Para cercosporiose, observou-se diminuição na percentagem da doença em 40% e 37% em plantas tratadas com extrato de casca de café e extrato de folhas de café com ferrugem,

respectivamente (AMARAL, 2005). Em testes de campo, o extrato de folhas de café com ferrugem proporcionou uma diminuição na porcentagem da cercosporiose do cafeeiro orgânico de 34,2% em relação ao tratamento padrão com o produto comercial Viça-café Plus[®].

Em estudo realizado em cafeeiro Catuaí Vermelho IAC/144, Toyota (2011) avaliou o efeito da aplicação de extratos vegetais sobre a ferrugem. O NEFID (extrato de folha de cafeeiro) reduziu a severidade da doença em 30% e 40%, no ano de 2009 e 2010, respectivamente, quando comparados à testemunha. Em estudo similar, Monteiro (2011) avaliou a proteção das mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo contra ferrugem e aferiu que o uso do NEFID apresentou 60% de redução da severidade da ferrugem em mudas de cafeeiro.

Conforme relatado, estudos com a resistência induzida no manejo de doenças em cafeeiro por meio de extratos vegetais já apresentam resultados promissores. Além disso, a aplicação de formulações à base de extratos vegetais associados a fosfitos têm sido estudadas recentemente. Monteiro (2011), com o objetivo de avaliar o efeito da associação NEFID + Fosfito de cobre + Fosfito de manganês no manejo da ferrugem em mudas de cafeeiro, constatou a redução em 84% severidade da ferrugem e apresentou 85% de inibição da germinação dos esporos de *H. vastatrix*.

Os nutrientes minerais influenciam, de uma maneira ou de outra, a incidência ou severidade da doença. Muitos compostos produzidos através de rotas metabólicas secundárias são formados após o contato com o patógeno, proporcionando maior resistência às doenças. Esses compostos são geralmente enquadrados como fitoalexinas, que se acumulam ao redor dos sítios de infecção, dependendo da disponibilidade dos vários nutrientes (GRAHAM; WEBB, 1991).

Vários micronutrientes são cofatores de enzimas envolvidas na rota dos fenilpropanóides, principal rota de síntese de fitoalexinas (GRAHAM; WEBB,

1991). Entre os produtos comercializados como fertilizantes foliares ricos em micronutrientes, os fosfitos são aqueles mais frequentemente relatados na literatura como indutores de respostas de defesa em plantas, incluindo a síntese de fitoalexinas (JACKSON et al., 2000; NOJOSA, 2003; NOJOSA; RESENDE; RESENDE, 2005). Os fosfitos têm sido formulados com sais de manganês, cobre ou zinco, e recomendados para o controle de oomicetos e de fungos causadores de podridões do colo, raiz, troncos e frutos (RESENDE et al., 2008).

Diversos trabalhos têm apresentado resultados satisfatórios com a utilização de fosfitos como possíveis eliciadores de resistência contra doenças do cafeeiro. Em mudas de cafeeiro, produtos contendo fosfitos foram eficazes no controle de *Phoma costaricensis*, reduzindo a severidade da mancha de phoma, sem diferir em relação aos fungicidas tebuconazole e fosetyl-Al (NOJOSA, 2003; NOJOSA et al., 2009). Esses autores também observaram que a aplicação de fosfitos nas mudas proporcionou acúmulo de lignina e de fenóis solúveis. Pulverizações de fosfitos de potássio, manganês e zinco em cafeeiros adultos por dois anos consecutivos (de dezembro a julho) proporcionaram em ano de alta produção, reduções de 30% e 25%, respectivamente, na severidade da ferrugem e cercosporiose; no ano de baixa produção, reduções respectivas de 53% e 32% na severidade da ferrugem e cercosporiose foram alcançadas. Como consequência, aumentos de 26% e 44% no enfolhamento das plantas foram detectados, nos anos de alta e baixa produtividade, respectivamente (RIBEIRO JÚNIOR, 2008). Utilizando-se pulverizações com fosfito de cobre, em ano de baixa produção, observou-se redução de 81% na severidade da ferrugem, semelhante ao controle obtido com pulverizações com o fungicida epoxiconazole + piraclostrobin (TOYOTA, 2008).

Em experimentos realizados com mudas de cafeeiro pulverizadas com fosfitos de potássio, manganês e cobre e inoculadas com *C. coffeicola*, Ribeiro Júnior (2008) e Toyota (2008) verificaram maiores atividades das enzimas de

defesa peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase e aumento no teor de fenóis solúveis totais.

Diante do exposto, nota-se que estudos de resistência induzida em cafeeiro já apresentam resultados preliminares promissores. A aplicação de produtos indutores de resistência, especialmente aqueles baseados em extratos e produtos naturais, representa uma alternativa promissora e sustentável para o controle de doenças que afetam as diversas cultivares. No entanto, o mecanismo de indução de resistência que esses produtos ativam, bem como a natureza das respostas moleculares e bioquímicas de defesa de cafeeiro contra *H. vastatrix*, não está elucidado.

Dentre os fenômenos relevantes da resistência induzida, além do aumento da expressão de genes relacionados à defesa, estão a reação de hipersensibilidade, a produção de compostos antimicrobianos, a explosão oxidativa e a ativação da rota dos fenilpropanóides, que é a via biossintética da formação da lignina e outros metabólitos secundários.

2.4.1 Explosão oxidativa

A explosão oxidativa é uma das respostas mais rápidas de defesa da planta após o reconhecimento do patógeno. Essa resposta corresponde à geração de espécies ativas de oxigênio (EAO's) (H_2O_2 , O^{2-} , OH^-). As EAO's ocorrem normalmente no metabolismo celular, porém, quando acumuladas tornam-se tóxicas à célula (MOLLER, 2001). Para detoxificar essas EAO's acumuladas, a célula dispõe de vários mecanismos que estão envolvidos na proteção celular, como as moléculas antioxidantes, enzimas simples, e um sistema mais complexo de detoxificação. Conhecidos como “scavengers”, várias enzimas reguladoras impedem a ação tóxica das EAO's à célula vegetal (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

Trabalhos publicados recentemente obtiveram resultados positivos na super expressão de genes relacionados à explosão oxidativa com o uso do indutor de resistência ASM em cafeeiro (GUZZO; HARAKAVA; TSAI, 2009) e a formulação a base de extrato de folhas de café (NEFID) em tomateiro (MEDEIROS et al., 2009). Em plantas de café cultivar Mundo Novo, susceptível a quase todas as raças de *H. vastatrix*, a maioria dos genes foram ativados pelo ASM, codificando 18% de proteínas relacionadas à explosão oxidativa e morte celular (GUZZO; HARAKAVA; TSAI, 2009). A explosão oxidativa está entre um dos maiores grupos com regulação alterada dos genes depois do tratamento com a formulação NEFID em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) infectados com mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*), dos quais genes como glutathione S-transferase e superóxido dismutase foram detectados através da técnica de microarranjo (MEDEIROS et al., 2009).

Durante a resposta de defesa, o primeiro passo da geração de EAO's a partir do oxigênio molecular (O_2) é a formação do radical ou ânion superóxido em um processo mediado, geralmente, pelas enzimas NADPH-oxidase ligada à membrana plasmática ou peroxidase ligada à parede celular (GRANT; LOAKE, 2000; MEHDY et al., 1996; OLMOS et al., 2003). O radical superóxido é altamente tóxico e pode rapidamente regenerar o oxigênio molecular ou ser convertido a peróxido de hidrogênio pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Figura 1). As enzimas catalases atuam posteriormente, detoxificando o peróxido de hidrogênio (APEL; HIRT, 2004).

As catalases (CAT) são enzimas que convertem o H_2O_2 em H_2O e O_2 (Figura 1). As plantas possuem várias isoformas de catalase, as quais estão presentes nos peroxissomas e glioxissomas. São as principais enzimas de detoxificação do H_2O_2 em plantas e podem dismutar diretamente o H_2O_2 ou oxidar substratos, tais como metanol, etanol, formaldeído e ácido fórmico. As

enzimas CAT funcionam como canal de limpeza do H_2O_2 celular (BREUSEGEM et al., 2001).

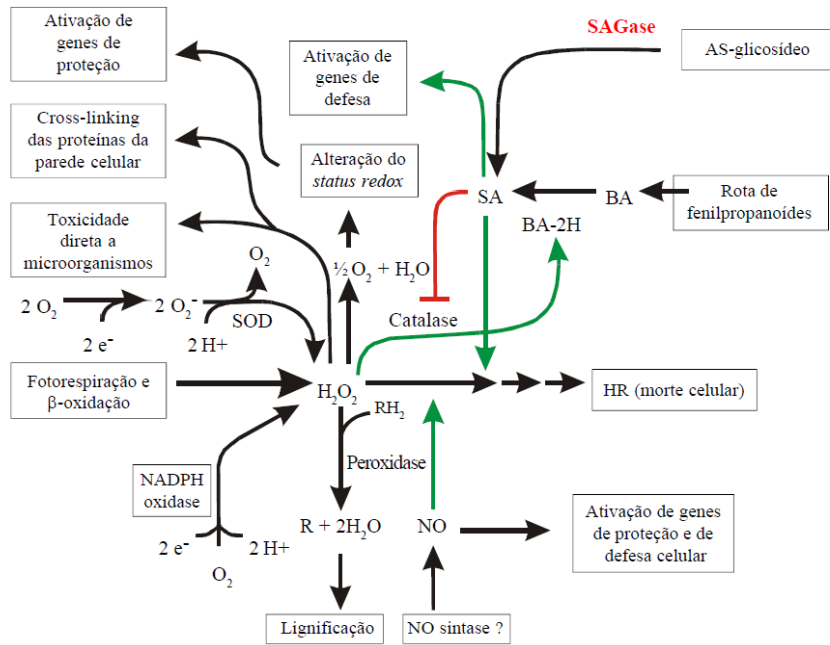


Figura 1 Interconexões de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO) e ácido salicílico (AS) para a ativação e coordenação das múltiplas reações de defesa das plantas. SOD (superóxido dismutase), SAGase (AS glicosiltransferase) e BA-2H (ácido benzoico 2-hidrolase). Adaptado de Hammond-Kosack e Jones (2000)

2.4.2 Metabolismo de fenilpropanóides

O metabolismo dos fenilpropanóides inclui uma série complexa de caminhos bioquímicos que proporcionam às plantas milhares de combinações. Muitos destes são intermediários na síntese de substâncias estruturais das células, como a lignina (BOATRIGT et al., 2004). Estes caminhos se ramificam gerando várias substâncias com funções essenciais no desenvolvimento da planta e interações ambientais, atuando enzimas fundamentais para a biossíntese da lignina (ALLINA et al., 1998). A biossíntese da lignina envolve uma série de enzimas, dentre elas a fenilalanina amônia-liase (PAL).

A PAL está relacionada com a resistência de plantas a patógenos, notadamente, por estar envolvida no primeiro passo da síntese dos fenilpropanóides, com participação de fenilalanina e sua conversão em ácido-transcinâmico, catalizada pela PAL, resultando em compostos como fitoalexinas e, principalmente, lignina (Figura 2), que confere maior resistência à parede celular das plantas aos patógenos (NAKAZAWA; NOZUE; YASUDA, 2001).

A atividade da PAL é influenciada por vários fatores externos e internos, como: hormônios, níveis de nutrientes, luz, infecção por patógenos e ferimentos. A invasão de fungos, por exemplo, induz a transcrição do mRNA que codifica para essa enzima, aumentando assim sua síntese e, conseqüentemente, estimulando a produção de compostos fenólicos (JONES, 1984).

O controle pós-transcricional parece exercer importante papel na regulação da atividade da PAL, podendo estar associada com a fosforilação desta enzima ou com a inibição pelo ácido cinâmico, produto da reação catalisada pela mesma. A partir do ácido cinâmico são produzidos diversos fenilpropanóides simples, via uma série de reações de hidroxilação, metilação e desidratação, tais como os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico, sinápico e as

cumarinas simples, além dos ácidos salicílico, benzóico e p-hidroxibenzóico (DIXON; PAIVA, 1995).

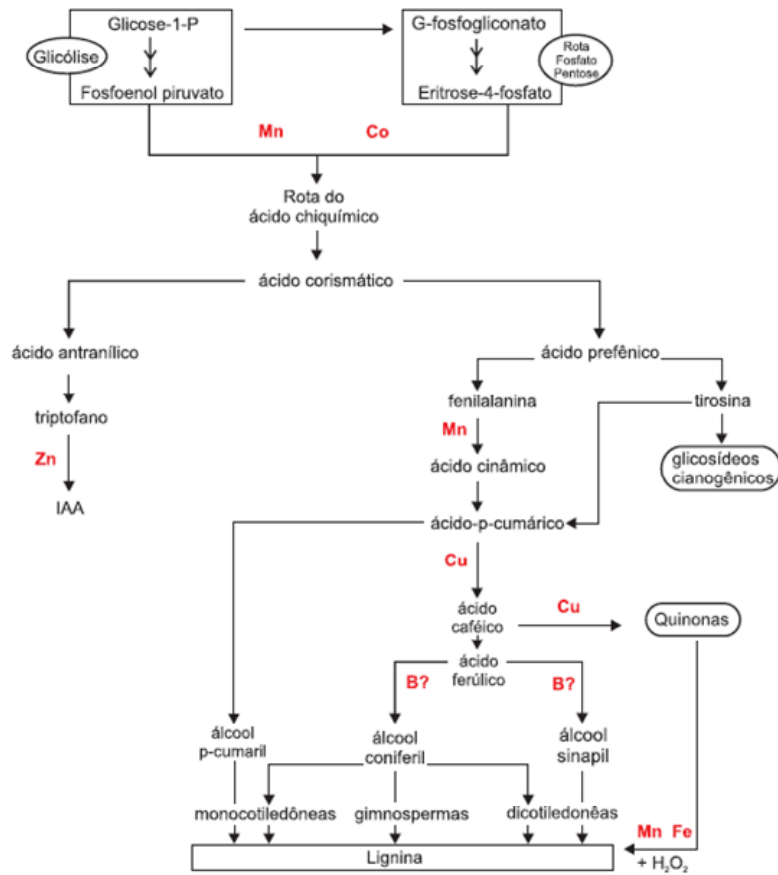


Figura 2 Micronutrientes como cofatores enzimáticos na rota para a síntese de lignina e fenóis a partir do ácido chiquímico (GRAHAM; WEBB, 1991)

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. New York: Academic, 2005. 922 p.

AHARONI, A.; VORST, O. DNA microarrays for functional plant genomics. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 48, n. 1/2, p. 99-118, Jan. 2001.

ALLINA, S. M. et al. 4-coumarate: coenzyme A ligase in hybrid poplar: properties of native enzymes, cDNA cloning, and analysis of recombinant enzymes. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 116, n. 2, p. 743-754, Feb. 1998.

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

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biotechnology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, Sept. 2004.

ATHAYDE SOBRINHO, C.; FERREIRA, P. T. O.; CAVALCANTI, L. S. C. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 51-80.

AZINHEIRA, H. G. et al. Non-host resistance responses of *Arabidopsis thaliana* to the coffee leaf rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Botany**, Ottawa, v. 88, n. 7, p. 621-629, July 2010.

BARGUIL, B. M. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 535-537, out. 2005.

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

BREUSEGEM, F. V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Shannon, v. 161, n. 3, p. 405-414, May 2001.

BUSTIN, S. A. et al. Quantitative realtime RT-PCR e a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 34, n. 3, p. 597-601, June 2005.

CAVALCANTI, F. R. et al. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 372-380, jul./ago. 2006.

CHANG, H. T. et al. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 14, p. 6266-6270, Feb. 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira café safra 2012: primeira estimativa, janeiro/2012**. Disponível em:
<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_01_10_10_54_22_boletim_cafe_1a_estimativa.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2012.

CRUZ, F. et al. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 23, n. 4, p. 607-616, Feb. 2009.

DATNOFF, L. E.; SEEBOLD, K. W.; CORREA, F. J. Use of silicon for integrated disease management: reducing fungicide applications and enhancing host plant resistance. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDORFER, G. H. (Ed.). **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Elsevier Science, 2001. p. 171-184.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 7, p. 1085-1097, July 1995.

FREEMAN, W. M.; WALKER, S. J.; VRANA, K. E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **BioTechniques**, Natick, v. 26, n. 1, p. 112-122, Jan. 1999.

GANESH, D. et al. Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. **Plant Science**, Shannon, v. 170, n. 6, p. 1045-1051, Jan. 2006.

GRAHAM, R. D.; WEBB, M. J. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. In: MORTVEDT, J. J. et al. (Ed.). **Micronutrients in Agriculture**. 2nd ed. Madison: Soil Science Society of America, 1991. p. 329-370.

GRANT, J. J.; LOAKE, G. J. Role of Reactive oxygen inter mediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 124, n. 1, p. 21-30, Jan. 2000.

GUEDES, M. E. Formação de fitoalexinas em interações incompatíveis *Coffea arabica*-*Hemileia vastatrix*. In: SIMPÓSIO SOBRE FERRUGENS DO CAFEIEIRO, 1., 1983, Oeiras. **Anais...** Oeiras: Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, 1983. p. 21-31.

GUZZO, S. D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 2004. 236 p. Tese (Doutorado em Engenharia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2004.

GUZZO, S. D. et al. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 89-94, 2001.

GUZZO, S. D.; HARAKAVA, R. Mecanismos envolvidos na resistência induzida em plantas a doenças: sinalização e expressão de genes de defesa. In: REUNIÃO BRASILEIRA DOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS, 3., 2007, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2007. p. 281-301.

GUZZO, S. D.; HARAKAVA, R.; TSAI, S. M. Identification of coffee genes expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with hemileia vastatrix. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 10, p. 625-638, Oct. 2009.

HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J. P.; LOON, L. C. van. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu, may 2000. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 1-6, Feb. 2001.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiology, 2000. p. 1102-1156.

HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalization: strategies and considerations. **Genes and Immunity**, London, v. 6, n. 6, p. 279-284, Apr. 2005.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Total production of exporting countries**. Disponível em: <<http://dev.ico.org/prices/po.htm>>. Acesso em: 29 jan. 2012.

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

JONES, D. H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulations of its induction, and its role in plant development. **Phytochemistry**, Oxford, v. 23, n. 7, p. 1349-1359, 1984.

KOHLER, A.; SCHWINDLING, S.; CONRATH, U. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the *NPR1/NIM1* gene in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 128, n. 3, p. 1046-1056, June 2002.

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

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

MARTINS, E. M.; MARIA, A.; MORAES, W. B. C. Histological studies of compatible interaction of coffee leaves and *Hemileia vastatrix*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, n. 3, p. 627-636, out. 1985.

MARTINS, E. M.; ROVERATTI, D. S.; MORAES, W. B. C. Elicitation of stress metabolites in coffee leaves by non pathogens. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 3, p. 683-693, 1986.

MEDEIROS, F. C. L. et al. Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, n. 1, p. 175-183, Jan. 2009.

MEDHY, M. C. et al. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 98, n. 2, p. 365-374, Oct. 1996.

MOLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 561-591, Sept. 2001.

MONTEIRO, A. C. A. **Associação de indutores de resistência para o manejo da ferrugem do cafeeiro e análise bioquímica da resposta de defesa induzida**. 2011. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

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

NARDI, B. et al. Differential responses of *Coffea arabica* L. leaves and roots to chemically induced systemic acquired resistance. **Genome**, Ottawa, v. 49, n. 12, p. 1594-1605, Dec. 2006.

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

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

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

NUNES, C. C. et al. Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, Melbourne, v. 38, n. 5, p. 445-452, Aug. 2009.

OLMOS, E. et al. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells: by-2 line. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 381, p. 291-301, Jan. 2003.

POZZA, E. A. Importância das doenças foliares do cafeeiro. In: NÚCLEO DE ESTUDOS EM FITOPATOLOGIA. **Manejo fitossanitário da cultura do cafeeiro**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2008. v. 1, p. 81-94.

RAMIRO, D. A. et al. Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 58, n. 5, p. 944-955, May 2009.

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. In: THE INTERNATIONAL JOINT WORKSHOP ON PR-PROTEINS AND INDUCED RESISTANCE, 1., 2004, Helsingor. **Resumes...** Helsingor: IJW, 2004. p. 79.

_____. **Manejo fitossanitário da cultura do cafeeiro**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2008. v. 1, 35 p.

_____. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 213-221, maio/jun. 2007.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 123-130, jan./fev. 2003.

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

RIJO, L.; MEDEIROS, E.; RODRIGUES, C. J. Immunity of coffee orange rust association: histopathological aspects. **Garcia de Orta**, Lisboa, v. 9, n. 1, p. 101-103, 1982.

RIJO, L.; RODRIGUES, C. J. Processo de infecção da *Hemileia vastatrix* em cultivares suscetíveis e resistentes de *Coffea arabica* L. **Garcia de Orta, Serie de Estudos Agronômicos**, Lisboa, v. 5, p. 23-24, 1978.

RODRIGUES, J. C. J.; BITTENCOURT, A. J.; RIJO, L. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 13, p. 49-70, 1975.

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

SCHENK, P. M. et al. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 21, p. 11655-11660, Oct. 2000.

SHERLOCK, G. Analysis of large-scale gene expression data. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 12, n. 2, p. 201-205, Apr. 2000.

SILVA, M. C. et al. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 119-147, 2006.

SILVA, M. C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; NICOLE, M. Cytological and biochemical mechanisms involved in coffee leaf rust resistance. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E.; VÁRZEA, V. M. P. (Ed.). **Durable resistance to coffee leave rust**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 249-283.

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

TALHINHAS, P. et al. Overview of the functionalvirulent genome of the coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 23., 2010, Bali. **Proceedings...** Bali: ASIC, 2010. p. 414-422.

TESTE, M. et al. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Molecular Biology**, London, v. 10, n. 1, p. 99-101, Oct. 2009.

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

_____. **Indutores de resistência e os eventos bioquímicos de defesa do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) contra *Hemileia vastatrix***. 2011. 94 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

UDVARDI, M. K.; CZECHOWSKI, T.; SCHEIBLE, W. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. **Plant Cell**, Rockville, v. 20, n. 7, p. 1736-1737, July 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Mario Lúcio Vilela de Resende et al. **Formulação para indução de resistência em plantas, a base de extrato vegetal obtido de folhas do cafeeiro**. BR n. PI 0603575-2, 2 ago. 2006.

VOSSEN, H. A. M. van der. State-of-the-art of developing durable resistance to biotrophic pathogens in crop plants, such as coffee leaf rust. In: ZAMBOLIM, L.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; VÁRZEA, V. M. P. (Ed.). **Durable resistance to coffee leaf rust**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 1-30.

WALKER, C. G. et al. Evaluation of real-time PCR endogenous control genes for analysis of gene expression in bovine endometrium. **BMC Molecular Biology**, London, v. 10, n. 1, p. 100-110, Jan. 2009.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, Natick, v. 39, n. 1, p. 75-85, 2005.

XIONG, F.; TANG, X.; ZHOU, J. M. Expression of 35S::*Pto* globally activates defense-related genes in tomato plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 126, n. 4, p. 1637-1645, Aug. 2001.

ZAMBOLIM, L. et al. Epidemiologia e controle integrado da ferrugem-do-cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 369-450.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. Estratégias múltiplas no manejo integrado de doenças do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 137-153, jan./fev. 2003.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Doenças do cafeeiro (*C. arabica* 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.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1: Expressão de genes de defesa induzidos por formulação à base de extrato de folha de cafeeiro e fosfitos em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*

RESUMO

A indução de resistência em plantas é uma das abordagens promissoras para o manejo da ferrugem alaranjada do cafeeiro (*Coffea arabica*). Esta consiste na utilização de agentes bióticos ou abióticos, menos tóxicos ao homem e ao meio ambiente, que ativem os mecanismos de defesa inerentes das plantas. Desta forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a indução de resistência na interação *Coffea arabica* - *H. vastatrix*, por meio de análise molecular e bioquímica. Foram utilizados os indutores NEFID (extrato de folha de cafeeiro), fosfito de manganês e associação de NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês e caracterizou-se os níveis de expressão quantitativa de dois genes de defesa, *CAT* e *PAL*, que codificam para as proteínas catalase e fenilalanina amônia-liase e avaliou-se a atividade dessas proteínas. Os genes *CAT* e *PAL* foram induzidos em cafeeiro por todos os tratamentos, apresentando perfis de expressão bastante variados em relação ao indutor utilizado e ao período analisado, tanto na análise molecular quanto na análise bioquímica. Os maiores níveis de expressão dos genes *CAT* e *PAL* ocorreram em plantas induzidas por NEFID sem inoculação com *H. vastatrix*. Após a inoculação em mudas de cafeeiro induzidas, observaram-se variações entre as expressões destes genes, dos indutores e os tempos analisados, e os maiores níveis de expressão para os dois genes ocorreram em plantas tratadas com NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês. A atividade da enzima PAL apresentou um perfil diferente em relação à atividade da enzima CAT, de modo que há uma menor atividade da enzima PAL para a maioria dos períodos analisados.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. Ferrugem do cafeeiro. Indução de resistência. PCR em tempo real.

ABSTRACT

Induction of resistance in plants is one of the promising alternatives to the control coffee leaf rust (*Coffea arabica*). This consists in the use of biotic and abiotic agents, less harmful to human health and the environment, that activate defense mechanisms inherent in the plants. In this work was executed in order to evaluate the induction of resistance in the interaction *C. arabica* - *Hemileia vastatrix*, by means of molecular and biochemical analysis. Were used NEFID (coffee-leaf extract formulation), manganese phosphite and association NEFID + copper phosphite + manganese phosphite and characterized quantitative levels of expression of two defense genes, CAT and PAL, which encoding the proteins catalase and phenylalanine ammonia-lyase and evaluated the activity of these proteins. However, the expression profile of activated genes was distinct for the three resistance inducers. The *CAT* and *PAL* genes were induced in coffee by all treatments, exhibiting the expression profiles widely varied with respect to the inducer used and the period analyzed, both in the molecular analysis as in biochemical analysis. The highest levels of expression of *CAT* and *PAL* genes found in plants induced by NEFID without inoculation with *H. vastatrix*. After inoculation in induced coffee seedlings, were observed variations between the expression of these genes, the inductors and the times analyzed, and the higher levels of expression for both genes were found in plants treated with phosphite NEFID + copper phosphite + manganese phosphite. The *PAL* activity showed a different profile in relation to the *CAT* activity, so that there is less activity of the enzyme *PAL* for most of the periods analyzed.

Keywords: *Coffea arabica*. Coffee leaf rust. Induced defense. Real time PCR.

Introdução

O café é uma das mais importantes fontes de divisas para o Brasil, sendo o principal produtor e exportador mundial desta *commodity*. A produção de café é essencial para cerca de 50 países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, representando assim uma contribuição importante para seu Produto Interno Bruto (PIB) (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION - ICO, 2012). No entanto, existem alguns fatores que limitam a produtividade desta cultura, dentre eles destaca-se a ferrugem alaranjada (*Hemileia vastatrix* Berkeley e Broome), que pode ocasionar danos de até 50% da produção caso não sejam tomadas medidas de controle adequadas (ZAMBOLIM et al., 2002).

O controle químico tem sido a prática mais utilizada na proteção de plantas contra patógenos por apresentar rápido efeito e ser de fácil aplicação. Entretanto, o uso intensivo destas moléculas pode levar à seleção de novas raças resistentes de patógenos e à quebra da resistência genética de hospedeiros (LORENZO et al., 2011). Portanto, uma estratégia eficaz e de menor impacto ambiental para o manejo da ferrugem do cafeeiro é a indução dos mecanismos de defesa da planta. Trabalhos têm sido conduzidos com o intuito de testar novos compostos eliciadores capazes de ativar, de forma eficiente, estes mecanismos.

Segundo Chang et al. (2008), o uso de produtos naturais no manejo de doenças de plantas é uma alternativa ao uso de fungicidas. Dentre as opções de manejo, os extratos vegetais ricos em substâncias bioativas são capazes de atuarem como indutores de resistência, como exemplo, o extrato de casca de café, no controle da mancha-de-phoma (BARGUIL et al., 2005), da cercosporiose (AMARAL, 2005; SANTOS et al., 2007) e da ferrugem-do-cafeeiro (SANTOS et al., 2007). Outros possíveis ativadores de resistência utilizados no controle de doenças de plantas são os fosfitos. Apesar de serem registrados como fertilizantes foliares, aparentemente possuem modo de ação

duplo no controle de doenças de plantas, agindo diretamente sobre patógenos e também indiretamente, induzindo respostas de defesa na planta (DATNOFF; SEEBOLD; CORREA, 2001; NOJOSA; RESENDE; RESENDE, 2005).

Diante disso, os objetivos da realização deste trabalho foram estudar a expressão de genes que codificam para a catalase e fenilalanina amônia liase e a atividade dessas enzimas ativados em mudas de cafeeiro suscetível por indutores de resistência à base de extrato de folhas de cafeeiro e fosfitos.

Material e métodos

Obtenção do material vegetal

O bioensaio de indução de resistência foi conduzido em casa de vegetação utilizando mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo seleção MG-379-19, como material suscetível a *H. vastatrix*.

Sementes para formação das mudas foram adquiridas da Estação Experimental da Epamig, Centro Tecnológico do Sul de Minas, Lavras, MG, e semeadas em bandejas de isopor (72 células) contendo o substrato Vida Verde[®]. As mudas foram mantidas em casa de vegetação durante todo o período experimental até sua utilização, quando apresentaram três a quatro pares de folhas definitivas.

Obtenção do inóculo de *H. vastatrix*

Folhas naturalmente infectadas com *H. vastatrix* foram coletadas em lavouras cafeeiras no município de Lavras, MG. Em seguida, os urediniósporos foram retirados das folhas mediante raspagem, utilizando-se um pincel de ponta macia (nº 1), e acondicionados em microtubos de 2,0 mL, por um período máximo de 48 horas, até a utilização.

Para a inoculação, foi preparada uma suspensão de urediniósporos de *H. vastatrix*, na concentração de 1×10^5 urediniósporos mL^{-1} de água destilada. Antes da inoculação, a viabilidade do inóculo foi testada, determinando-se a percentagem de urediniósporos germinados em lâminas escavadas contendo água destilada e mantidas no escuro por 14 horas a 22°C.

Obtenção dos indutores

A formulação à base de folhas de cafeeiro (NEFID) foi processada no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo da UFLA, sendo a mesma ajustada para grau Brix (% de sólidos solúveis) = 1.5. A forma de processamento e a composição da mesma encontram-se sob sigilo de patente (UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS - UFLA, 2006).

Foram utilizados também produtos comerciais à base de fosfito de cobre Fulland[®] (20% de P_2O_5 e 4% Cu), adquirido da empresa Sudoeste Agropecus Ltda. e o fosfito de manganês, Reforce[®] Mn (51,0% de P_2O_5 e 9,7% de Mn), adquirido da Agrichem do Brasil Ltda.

Bioensaio de indução de resistência em cafeeiro e inoculação com *Hemileia vastatrix*

As mudas de cafeeiro foram pulverizadas com NEFID, fosfito de manganês ($5,0 \text{ mL L}^{-1}$) e com a mistura NEFID + fosfito cobre ($2,5 \text{ mL L}^{-1}$) + fosfito de manganês ($2,5 \text{ mL L}^{-1}$), e como testemunha utilizou-se plantas pulverizadas apenas com água.

A inoculação com *H. vastatrix* foi realizada 168 horas (sete dias) após a pulverização dos tratamentos, por meio da pulverização nas folhas da suspensão de urediniósporos.

O material vegetal para análise da expressão gênica foi coletado nos tempos de 12, 24, 72, 180, 192, 216 e 240 horas após a aplicação dos

tratamentos. Os tempos de coleta das amostras foliares para análise bioquímica foram realizados 12, 24, 48, 72, 168, 180, 192, 216, 240 e 336 horas após a aplicação dos produtos.

Em cada tempo foram coletadas folhas de sete mudas de cafeeiro por parcela, em cada tempo de coleta, que foram envolvidas em papel alumínio, identificadas, imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer, a -80°C , até o momento do isolamento do RNA total e preparo do material para as análises bioquímicas.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFLA, em delineamento de blocos casualizados, com três repetições e sete plantas (três mudas para as análises bioquímicas e quatro mudas para as análises moleculares) por repetição para cada tempo de coleta.

Extração e quantificação do RNA total

Os materiais utilizados na extração (cadinhos, pistilos, ponteiras, tubos, etc) foram submersos em DEPC (*diethylpyrocarbonate*) 0,05% (v/v) *overnight* e autoclavados por 20 minutos para inativar RNAses.

Os RNAs totais de tecido vegetal de cafeeiro foram extraídos utilizando o protocolo Pine Tree descrito por Chang, Puryear e Cairney (1993) e adaptado para microextração neste experimento. Em cada microtubo, contendo aproximadamente 100 mg do material macerado em nitrogênio líquido, foram adicionados 1 mL de tampão de extração [2% (p/v) CTAB (*cethyltrimethylammonium bromide*), 2% (p/v) PVP (*polivinilpirrolidona*), 100 mM de Tris-HCL, 25 mM de EDTA, 2 M de NaCl] e 20 μL de β -mercaptoetanol. Em seguida, realizou-se homogeneização em vórtex e a mistura foi incubada por 20 minutos, à temperatura de 65°C . Após esse período, foram adicionados 1mL de solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e, em seguida, agitadas e centrifugadas por trinta minutos, a 12.000 g, à temperatura de

4° C. O sobrenadante foi, então, transferido para um novo tubo, ao qual se adicionou o mesmo volume da solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguido de homogeneização e novamente centrifugação por trinta minutos, a 12.000 g, à temperatura de 4° C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, e adicionado $\frac{1}{4}$ do volume de cloreto de lítio a 10 M e fez-se rápida homogeneização por inversão. As amostras foram deixadas *overnight* a 20 °C, para a precipitação. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 30 minutos, a 12.000 g, à temperatura de 4° C e o sobrenadante descartado. O *pellet* formado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% (v/v), seguido de uma centrifugação por 10 minutos, a 12.000 g, à temperatura de 4 °C. Após a lavagem, realizou-se a solubilização do RNA. O *pellet* foi ressuscitado em 20 µL de água milli-Q autoclavada e armazenadas em freezer a -80° C. A integridade do RNA foi visualizada em gel de agarose 1,0%, corado com GelRed™.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop™ Espectrophotometer ND-100 (NanoDrop Technologies™).

Tratamento com DNase

As amostras de RNA total foram tratadas com TURBO™ DNase I (Ambion), segundo especificações do fabricante, para a eliminação de eventual DNA presente.

A integridade do RNA foi verificada através de uma PCR convencional (controle negativo) para constatar a pureza das amostras, ou seja, a ausência de bandas no gel, comprovando a inexistência de DNA. As amostras contaminadas foram retratadas com o inibidor Turbo DNA-free Kit (Ambion), conforme as especificações do fabricante, para eliminação de contaminação de DNA residual. A integridade do RNA foi visualizada em gel de agarose 1,0%, corado com GelRed™.

As amostras tratadas com DNase foram novamente quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop™ Espectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies™).

Síntese de cDNA

As amostras que apresentaram alto grau de integridade e pureza foram usadas para a síntese de cDNA utilizando-se o kit ‘SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix’ (Invitrogen), seguindo protocolo sugerido pelo fabricante. As amostras foram armazenadas a -20°C até o uso.

Desenho de *primers* para os genes catalase e fenilalanina amônia-liase de cafeeiro

Utilizando o programa ‘Primer3’, *primers* adequados para PCR quantitativo em tempo real foram desenhados especificamente para os genes catalase e fenilalanina amônia-liase de cafeeiro (Tabela 1). Além desses genes, foram desenhados *primers* para amplificar genes que foram usados como controle constitutivo nas reações de RT-qPCR. Os genes escolhidos codificam proteínas ‘*housekeeping*’ de funções constitutivas e presentes em níveis similares nas diferentes fases como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e *14-3-3* (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009). Os *amplicons* apresentaram tamanhos entre 80 e 150 pares de bases.

Tabela 1 Sequências dos *primers* utilizados para a análise de qRT-PCR.

Genes	Sequência dos <i>primers</i>	Referências
<i>CAT</i>	F: 5' GCAGCTGGAAACTACCCTGA 3' R: 5' AAGCCAAGCTGCTCATTCTC 3'	Guzzo, Harakava e Tsai (2009)
<i>PAL</i>	F: 5' GATGGGAAAGGGCACTGATA 3' R: 5' GATGCCAGAGTACCCCTGAA 3'	Kretschmar e Baumann (1999)
<i>GAPDH</i> <i>H</i>	F: 5' TTGAAGGGCGGTGCAAA 3' R: 5' AACATGGGTGCATCCTTGCT 3'	Barsalobres-Cavallari et al. (2009)
<i>14-3-3</i>	F: 5' TGTGCTCTTTAGCTTCCAAACG 3' R: 5' CTTACGAGACATATTGTCTTACTCAA 3'	Barsalobres-Cavallari et al. (2009)

(*CAT*) catalase. (*PAL*) fenilalanina amônia liase. (*GAPDH*) gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. (*14-3-3*) proteína. (R) sequência do *primer reverse*. (F) sequência do *primer forward*.

Análise quantitativa em tempo real da expressão de genes de defesa

A análise da expressão gênica quantitativa por qRT-PCR foi realizada em sistema de detecção de sequências ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) do Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA, usando SYBR Green[®], o qual se baseia na capacidade do fluoróforo de intercalar as fitas duplas de cDNA. As condições térmicas da reação foram 2 minutos, a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, finalizando com 15 segundos a 95°C. Os dados gerados foram armazenados e analisados no programa 7500 Fast Software (Versão 2.1).

Para cada reação, foram utilizados 80 ng de cDNA, 0,4 µL de cada *primer* e 5,0 µL de Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied BiosystemsTM). A reação foi completada com 3,6 µL de água livre de nuclease (*nuclease-free water*) (AmbionTM), para um volume final de 10,0 µL por amostra. As amostras foram processadas em tríplicas. Os resultados foram normalizados usando CTs (ciclo *Threshold*) obtidos para controles endógenos

presentes na mesma reação. O C_T foi determinado pelo número de ciclos no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha *Threshold*. O método usado foi o C_T comparativo.

A normalização foi realizada utilizando-se a equação $\Delta C_T = C_T$ (gene alvo) - C_T (controle endógeno). A calibração foi determinada pela fórmula $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (amostra) - ΔC_T (calibrador). O calibrador é uma amostra usada como base para resultados de expressão comparativa, neste caso, o calibrador foi a testemunha em cada tempo de coleta. A quantificação relativa foi obtida pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Após serem analisados, os dados gerados pelo programa 7500 Fast Software (Versão 2.1) foram exportados para o programa Microsoft Excel, para realização dos cálculos de ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$ e da quantificação relativa (RQ) para a posterior construção dos gráficos.

Para verificar o efeito dos indutores sobre a expressão de cada gene, os cálculos de quantificação relativa foram realizados utilizando-se como calibrador os dados obtidos a partir das amostras controle, pulverizadas com água para os tratamentos não inoculados, e para os tratamentos inoculados, plantas pulverizadas com água e inoculadas com o patógeno, para os respectivos tempos de coleta.

A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão do gene 14-3-3 e GAPDH utilizados como controle endógeno para compensar variações internas na PCR. Os resultados foram normalizados usando C_{Ts} (Ciclo Threshold) obtidos para controles endógenos presentes na mesma reação.

Extração e análises enzimáticas

Para as análises enzimáticas, cada amostra congelada foi pesada (1 g) e triturada em nitrogênio líquido com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, adicionaram-se 6 mL de tampão acetato de sódio 50 mM

pH 5,2, 1 mM de EDTA, 1 mM de β -mercaptoetanol e agitou-se por 20 segundos. O extrato obtido foi centrifugado (12.000 g por 15 minutos a 4 °C) e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C, para posterior análise.

A proteína total do extrato enzimático foi mensurada de acordo com o método de Bradford (1976), usando uma curva padrão de albumina sérica bovina. A atividade da catalase (CAT; EC 1.11.1.6) foi determinada seguindo o método de Havir e McHale (1987), utilizando o coeficiente de extinção molar de $39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, sendo expressa como μmol de H_2O_2 oxidado por miligrama de proteína por minuto. A atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL, EC 4.3.1.5) foi medida de acordo com Mori, Sakurai e Sakuta (2001) e os valores foram expressos em μmol de ácido-transcinâmico miligrama de proteína por minuto, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $30,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

As médias das atividades enzimáticas, em cada tempo de coleta, quando significativas pelo teste F, foram comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) utilizando-se o programa SAS V 9.0 (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE - SAS INSTITUTE, 1999).

Resultados

Expressão quantitativa relativa dos genes *CAT* e *PAL* em folhas de mudas de cafeeiro induzidos por NEFID, NEFID + fosfito cobre + fosfito de manganês e fosfito de manganês e não inoculadas com *H. vastatrix*

O estudo do efeito dos indutores sobre a expressão dos genes *CAT* e *PAL* em mudas de cafeeiro na ausência do patógeno, durante os tempos de coleta, revelou que a expressão quantitativa relativa do gene *CAT* foi maior em plantas tratadas com NEFID em relação aos demais tratamentos 12, 72, 192, 216 e 240 horas após a pulverização (HAP) (Figura 3A). Esse mesmo tratamento

apresentou o maior nível de expressão às 216 HAP para o gene *CAT*, no entanto, nos períodos de 24 e 180 HAP houve uma queda expressão desse gene e, no último tempo de análise, observou-se uma queda considerável na sua expressão em relação à testemunha. Plantas tratadas com a combinação NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês, no período de 24 HAP, e plantas tratadas com fosfito de manganês às 180 HAP, apresentaram maior expressão do gene *CAT* do que os demais tratamentos. (Figura 3A).

A expressão do gene *PAL* foi maior em mudas de cafeeiro tratadas com NEFID nos tempos de 72 e 216 HAP, como observado para o gene *CAT*, esse mesmo tratamento proporcionou o maior nível de expressão para o gene *PAL* às 216 HAP. Nos períodos de 12 e 192 HAP, a expressão foi similar entre plantas tratadas com NEFID e NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês, além disso, a expressão de ambas foi superior em relação ao tratamento fosfito de manganês (Figura 3B). Para o fosfito de manganês, apenas no tempo de 24 HAP houve uma superexpressão desse gene, para os demais tempos de coleta, houve uma subexpressão. No período de 240 HAP observou-se uma redução da expressão do gene *PAL* para todos os tratamentos. Além disso, é possível observar que no último tempo de análise, o nível de expressão gênica foi similar entre todos os tratamentos (Figura 3B).

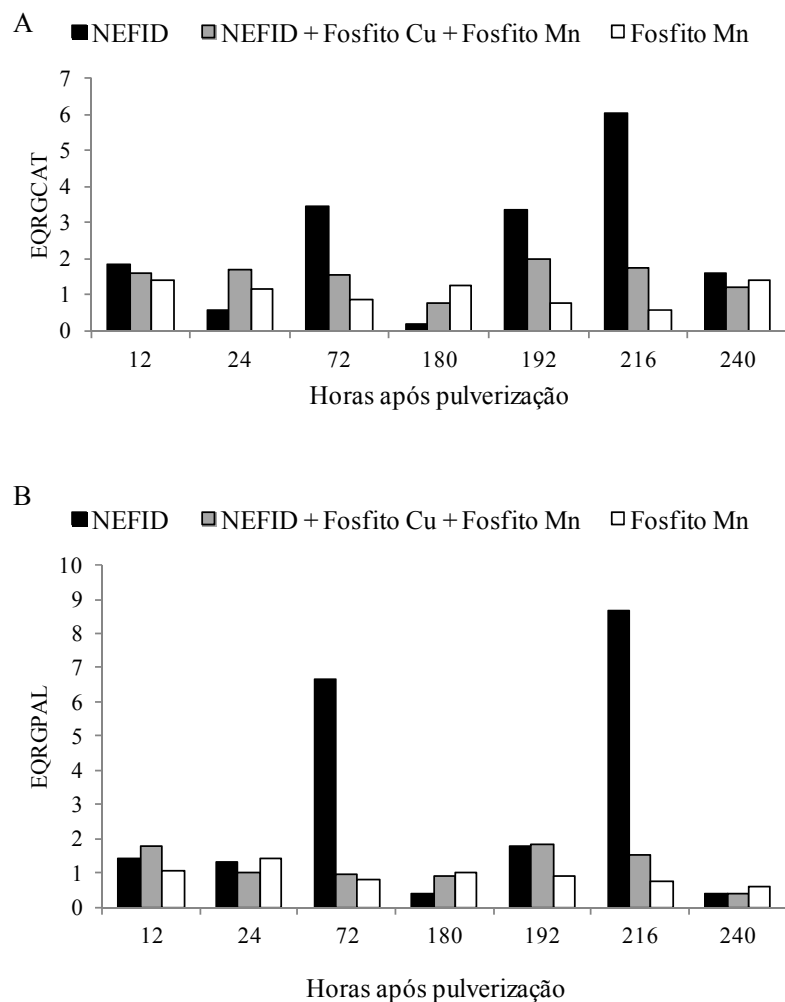


Figura 3 Perfil da expressão quantitativa relativa por PCR em tempo real (qRT-PCR) dos genes *CAT* (EQRGCAT) (A) e *PAL* (EQRGPAL) (B), nos tempos 12, 24, 72, 180, 192, 216 e 240 horas após pulverização de mudas de café com NEFID, NEFID + fosfito cobre + fosfito de manganês e fosfito de manganês, sem inoculação do patógeno. Colunas representam a indução média de transcritos relativos aos controles não induzidos e não inoculados, no mesmo período, com valores dados a partir da média de cDNA dos três blocos. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão dos genes *GAPDH* e *14-3-3*

Expressão quantitativa relativa dos genes *CAT* e *PAL* em folhas de mudas de cafeeiro pulverizadas com NEFID, NEFID + fosfito cobre + fosfito de manganês e fosfito de manganês e inoculadas com *H. vastatrix*.

Após a inoculação, realizada aos 168 HAP, a expressão do gene *CAT* foi significativamente maior no tempo 24 horas após a inoculação (HAI), que corresponde a 192 HAP, nas mudas tratadas com NEFID e NEFID + fosfito cobre + fosfito de manganês em comparação com o fosfito de manganês, no qual apresentou-se subexpresso. O nível máximo de expressão do gene *CAT* induzida pelo patógeno ocorreu em mudas pulverizadas com NEFID + fosfito cobre + fosfito de manganês, 24 horas após a inoculação (período referente a 192 HAP). Nos demais tempos, 12, 48 e 72 HAI, foi observada uma subexpressão desse para todos os tratamentos (Figura 4A).

A expressão do gene *PAL* foi inferior, em relação à testemunha inoculada, no período de 12 HAI, para todos os tratamentos (Figura 4B), no entanto, foi observado um aumento significativo nos níveis de transcritos em mudas tratadas com NEFID e fosfito de manganês às 48 HAI. No período de 72 HAI, apenas as plantas tratadas com a combinação NEFID + fosfito cobre + fosfito de manganês aumentaram o nível de expressão do gene *PAL*, os demais tratamentos apresentaram uma redução. (Figura 4B).

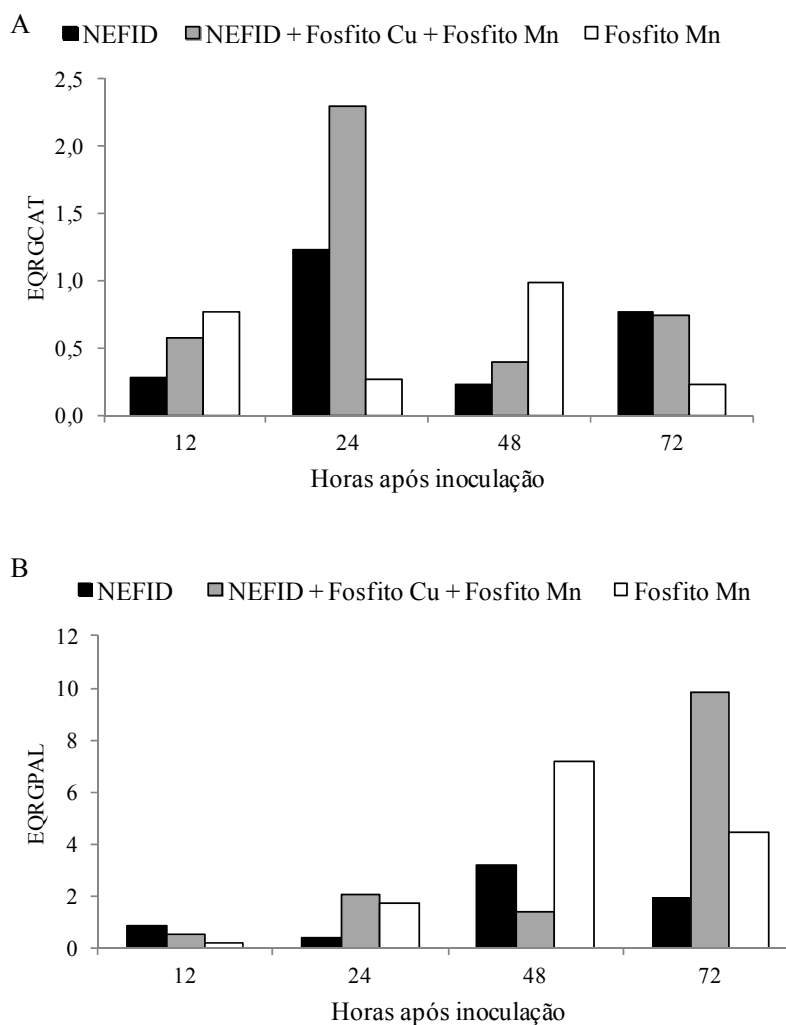


Figura 4 Perfil da expressão quantitativa relativa por PCR em tempo real (qRT-PCR) dos genes *CAT* (EQRGCAT) (**A**) e *PAL* (EQRGPAL) (**B**), nos tempos 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação das mudas de café com *H. vastatrix*, equivalentes a 180, 192, 216 e 240 horas após a pulverização com os indutores NEFID, NEFID + fosfito cobre + fosfito de manganês e fosfito de manganês. Colunas representam a indução média de transcritos gênicos em plantas induzidas e inoculadas relativas aos controles induzidos e não inoculados, no mesmo período, com valores dados a partir da média de cDNA dos três blocos. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão dos genes *GAPDH* e *14-3-3*

Atividade das enzimas CAT e PAL em folhas de mudas de cafeeiro pulverizadas com NEFID, NEFID + fosfito cobre + fosfito de manganês e fosfito de manganês e não inoculadas com *H. vastatrix*

A atividade da enzima catalase (CAT), na primeira avaliação, 12 horas após a pulverização (HAP), apresentou-se maior em plantas tratadas com NEFID, no qual obteve atividade duas vezes maior em relação à testemunha (Figura 5A). No período seguinte, 24 HAP, todos os tratamentos apresentaram uma atividade superior em relação à testemunha. Às 48 HAP, apenas as plantas tratadas com fosfito de manganês apresentaram atividade da CAT superior à testemunha (Figura 5A). No período de 72 HAP, somente as plantas tratadas com NEFID tiveram aumento considerável na atividade da CAT, pois apresentou-se duas vezes maior em relação aos demais tratamentos e à testemunha. Às 180 e 192 HAP, as plantas pulverizadas somente com água apresentaram atividade desta enzima superior em relação aos demais tratamentos analisados. Entretanto, no período de 216 HAP, a atividade da CAT aumentou para todos os tratamentos, principalmente para NEFID + fosfito cobre + fosfito de manganês, no qual apresentou atividade duas vezes maior em relação aos demais tratamentos e à testemunha. No período de 240 HAP, NEFID e NEFID + fosfito cobre + fosfito de manganês tiveram atividade inferior à testemunha. No último tempo analisado, somente as plantas tratadas com NEFID apresentaram atividade da CAT superior à testemunha (Figura 5A).

A atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) apresentou um perfil diferente em relação à atividade da CAT. No período de 12 e 48 HAP, todos os tratamentos proporcionaram atividade da PAL inferior à testemunha, no entanto, no período de 24 HAP, houve um aumento dessa atividade para todos os tratamentos (Figura 5B). Plantas tratadas com fosfito de manganês apresentaram máxima atividade da PAL no período de 72 HAP, sendo duas vezes maior em relação aos demais tratamentos que se mantiveram próximo à atividade

observada na testemunha (Figura 5B). No período de 168 HAP, houve um pico da atividade da PAL, e todos os tratamentos apresentaram atividade pouco superior à testemunha. Às 180 HAP, somente as mudas de cafeeiro tratadas com NEFID apresentaram uma atividade superior à testemunha (Figura 5B). Já às 192 HAP, todos os tratamentos proporcionaram aumento da atividade da PAL, mas apenas as plantas tratadas com a combinação NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês apresentaram aumento significativo em relação à testemunha. No período de 216 HAP, todos os tratamentos analisados não se diferenciaram à testemunha, mas às 240 HAP, as plantas tratadas com a combinação NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês, novamente apresentaram aumento em relação à testemunha e aos demais tratamentos. No último período analisado, o perfil dos tratamentos foi semelhante entre os tratamentos, e pouco superior à testemunha.

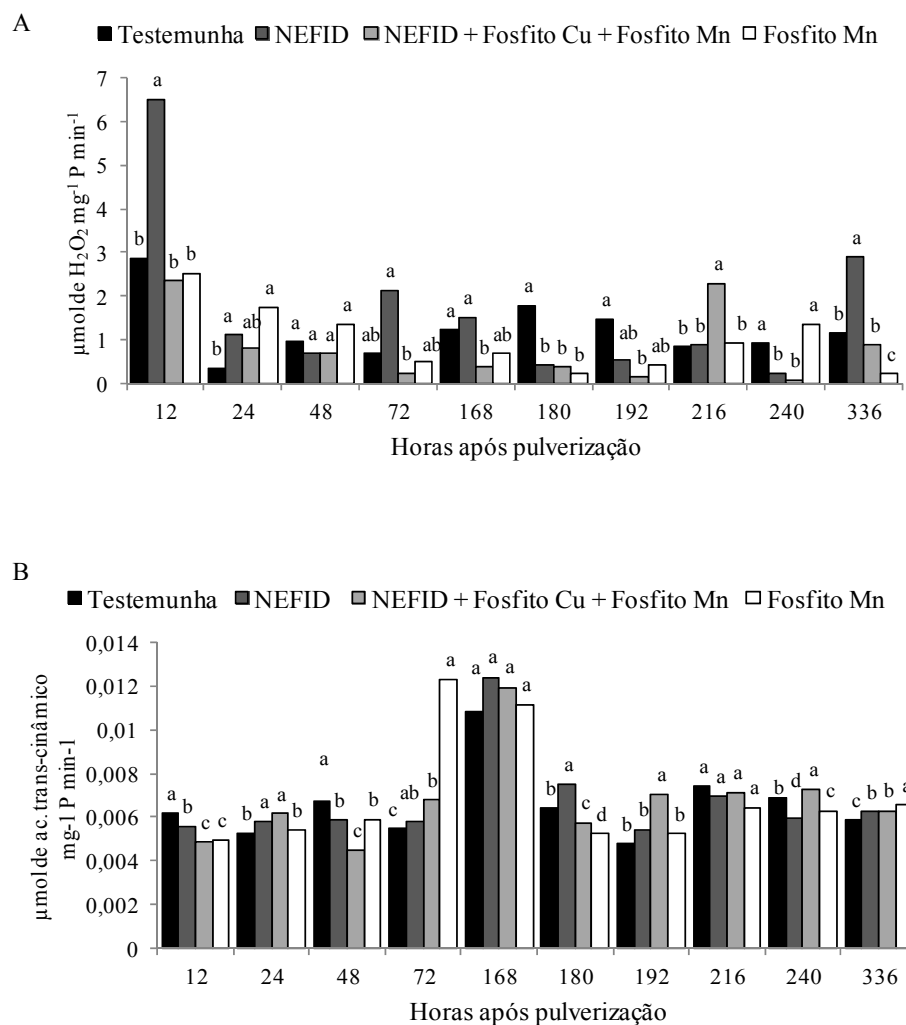


Figura 5 Atividade da catalase (CAT) (μmol de peróxido de hidrogênio por mg de proteína por minuto) (A) e fenilalanina amônia liase (PAL) (μmol de ácido trans-cinâmico por mg de proteína por minuto) (B), nos tempos 12, 24, 48, 72, 168, 180, 192, 216, 240 e 336 horas após a pulverização com os indutores NEFID, NEFID + fosfito cobre + fosfito de manganês e fosfito de manganês

Atividade das enzimas CAT e PAL em folhas de mudas de cafeeiro após pulverização com NEFID, NEFID + fosfito cobre + fosfito de manganês e fosfito de manganês e inoculação com *H. vastatrix*

As mudas de cafeeiro tratadas com NEFID + fosfito cobre + fosfito de manganês e fosfito de manganês isoladamente apresentaram atividade da enzima CAT superior em relação à testemunha no período de 12 horas após inoculação (HAI) (Figura 6A). Nos períodos de 24 a 72 HAP, todos os tratamentos apresentaram atividade desta enzima inferior à testemunha e, somente no último período analisado, plantas tratadas com fosfito de manganês apresentaram atividade da CAT duas vezes maior em relação à testemunha e aos demais tratamentos (Figura 6A).

A atividade da enzima PAL nos períodos de 12 a 48 HAI foi superior em relação à testemunha para todos os tratamentos. Porém, nos períodos seguintes, 72 e 168 HAP, todos os tratamentos apresentaram atividade desta enzima inferior à testemunha.

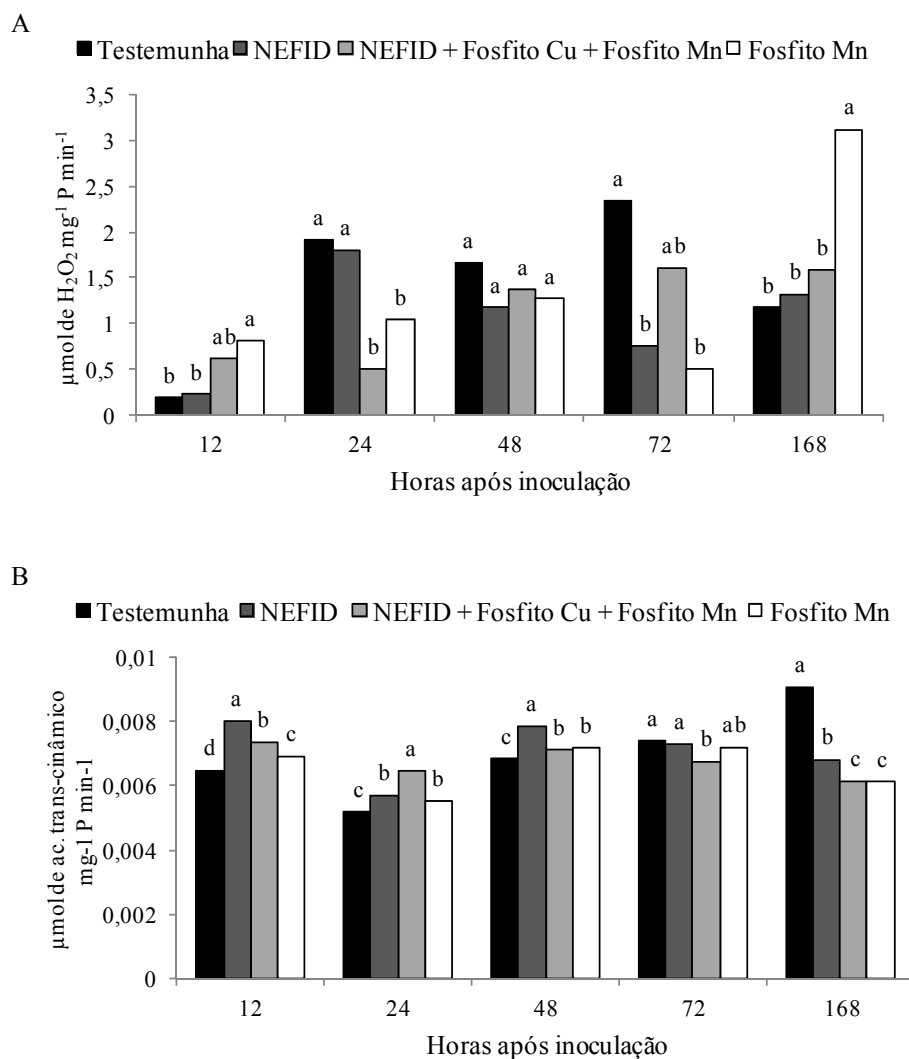


Figura 6 Atividade da catalase (CAT) (μmol de peróxido de hidrogênio por mg de proteína por minuto) (A) e fenilalanina amônia liases (PAL) (μmol de ácido trans-cinâmico por mg de proteína por minuto) (B), nos tempos nos tempos 12, 24, 48, 72 e 168 horas após a inoculação das mudas de cafeeiro com *H. vastatrix*, equivalentes a 180, 192, 216, 240 e 336 horas após a pulverização com os indutores NEFID, NEFID + fosfito cobre + fosfito de manganês e fosfito de manganês

Discussão

O perfil de expressão dos genes *PAL* e *CAT* e a atividade destas enzimas, importantes componentes das reações de defesa induzida em mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo, susceptível ao fungo *H. vastatrix*, foram estudados no presente trabalho em resposta à pulverização com os indutores NEFID, mistura NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês e fosfito de manganês.

Monteiro (2011) avaliou o efeito de extratos vegetais associados a fosfitos no manejo da ferrugem em mudas de cafeeiro, e os tratamentos que apresentaram os melhores resultados foram utilizados neste presente trabalho. A associação dos indutores de resistência NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês proporcionou 84% de controle da ferrugem em mudas do cafeeiro, o uso do NEFID apresentou 60% de redução da severidade da ferrugem em mudas de cafeeiro e o tratamento com fosfito de manganês proporcionou 70% de controle da ferrugem em mudas de cafeeiro.

As espécies ativas de oxigênio (EAOs) podem contribuir para o reforço da resistência a doenças nos tecidos vegetais. Entretanto, altas concentrações de H_2O_2 , uma EAO, podem causar peroxidação lipídica e levar à perda da integridade da membrana do órgão da planta. EAOs nos tecidos vegetais podem ser eliminadas pela enzima *CAT*, que atua eliminando os efeitos nocivos do excesso de H_2O_2 sobre os tecidos vegetais (LAMB; DIXON, 1997). O aumento na atividade de enzimas antioxidantes como a *CAT* pode traduzir uma proteção da planta contra ataque do patógeno. No presente estudo, a atividade da *CAT* em mudas tratadas com NEFID, sem inoculação com *H. vastatrix*, foi superior em relação à testemunha sem inoculação às 12, 24, 72, e 336 HAP (Figura 5A). Pulverizações com o NEFID aumentaram a atividade da *CAT* possivelmente pelo fato de que este extrato de folhas de cafeeiro infectadas possui eliciadores

que imitam o ataque do patógeno. Estes eliciadores são reconhecidos pelas plantas de cafeeiro, que ativam suas respostas de defesa, tais como o aumento na atividade de enzimas de defesa, que também foi observado pela aplicação de formulações à base de extratos de folhas e de casca de frutos de café contra doenças do cafeeiro e também do tomateiro (MEDEIROS et al., 2009; PEREIRA et al., 2008).

O aumento da atividade da CAT em mudas tratadas com a mistura dos indutores NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês e fosfito de manganês aplicado isoladamente e inoculadas com *H. vastatrix* foi observado no período de 12 HAI, mas nos tempos seguintes, 24 e 48 HAI, ocorreu um decréscimo na atividade dessa enzima, comparando com a testemunha (Figura 6A). Diante disso, podemos analisar que alguns mecanismos de resistência são ativados após a inoculação das plantas com agentes patogênicos. Em plantas resistentes essa ativação de respostas de defesa a agentes patogênicos é rápida, impedindo ou reduzindo a colonização, o que não ocorre em plantas suscetíveis, pois esse processo é lento. O tratamento prévio com indutores de resistência pode preparar plantas suscetíveis, por meio da ativação rápida de respostas de defesa, e assim reduzir a intensidade de doenças causadas por esses patógenos. Esse preparo ou sensibilização, também chamado de *priming*, também foi demonstrado em *Arabidopsis thaliana* (CONRATH; PIETERSE; MAUCH-MANI, 2002).

Neste estudo o gene *CAT* apresentou perfil de expressão distinto quando os indutores de resistência NEFID, NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês foram aplicados. Este gene apresentou maior nível de expressão às 12, 72, 192, 216 e 240 horas após a pulverização com NEFID em relação aos demais indutores (Figura 3A). Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Nardi et al. (2006), que observaram indução da expressão de genes de defesa relacionados à explosão oxidativa trabalhando com mudas de cafeeiro pulverizadas com eliciadores abióticos. No entanto, após inoculação com *H.*

vastatrix, apenas com NEFID e a combinação NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês, as plantas apresentaram maior expressão do gene *CAT* e, somente no período de 24 HAI, o nível de expressão da combinação dos indutores foi quase duas vezes maior que o nível proporcionado pela aplicação do NEFID isoladamente (Figura 4A). Na interação incompatível de *C. arabica* - *H. vastatrix*, a grande liberação de H₂O₂ pode ser um dos primeiros sinais de reconhecimento bem sucedido do patógeno (RAMIRO et al., 2009). Neste estudo, foi possível observar que o fosfito de manganês aplicado sozinho não foi capaz de induzir a expressão do gene *CAT* em cafeeiro. Após a inoculação com *H. vastatrix*, a repressão deste gene pode ser atribuída ao silenciamento gênico, que se refere a uma série de mecanismos por meio dos quais a expressão de um ou mais genes é regulada negativamente (VAUCHERET et al., 2001).

O perfil da expressão do gene e a atividade da enzima *CAT* nas plantas de cafeeiro não inoculadas pode ter sido influenciado pelo metil-salicilato a partir da inoculação de *H. vastatrix*. O metil-salicilato é um composto volátil que atua na defesa das plantas, sendo liberado em maior quantidade quando a planta sofre ataque de patógenos. Este composto é transmitido para partes distantes da planta e também para plantas adjacentes (SHULAEV; SILVERMA; RASKIN, 1997).

A fenilalanina amônia liase (*PAL*) é uma das principais enzimas que atuam na formação dos precursores da lignina, a qual atua na resposta de defesa das plantas por reforçar as paredes celulares contra invasão dos patógenos, catalisando a desaminação da fenilalanina a ácido trans-cinâmico (RAES et al., 2003). A atividade da enzima *PAL* apresentou um perfil diferente em relação à atividade da enzima *CAT*, de modo que há uma menor atividade da enzima *PAL* para a maioria dos períodos analisados. Esta tendência de queda na atividade da *PAL* durante o experimento foi relatada também por Cavalcanti et al. (2006) em plantas de tomateiro desafiadas com *Xantomonas vesicatoria*. Analisando todos

os tratamentos, a atividade da PAL se mostrou superior em relação à testemunha somente nos períodos 24, 72, 168, 192 e 336 HAP (Figura 5B), no qual é observada uma atividade máxima desta enzima no tempo de 72 HAP em plantas tratadas com fosfito de manganês (Figura 5B). Silva et al. (2002), estudando a atividade da PAL em *C. arabica*, em diferentes tempos após inoculação com *H. vastatrix*, observou um pico de atividade aos dois dias após inoculação que foi relacionado ao início da morte celular e outro pico aos cinco dias após inoculação e foi relacionado com acumulação tardia de compostos fenólicos e lignificação da parede celular do hospedeiro (GUERRA-GUIMARÃES; GUEDES, 1993; SILVA et al., 1998), este trabalho pode justificar o perfil de oscilação desta enzima. A atividade da PAL foi potencializada por *H. vastatrix* em plantas tratadas com NEFID as 12 e 48 HAI e com NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês às 24 HAI, este resultado pode ser atribuído ao efeito *priming*.

A expressão do gene *PAL* foi avaliada e, em geral, antes da inoculação, manteve superior nas plantas pulverizadas com NEFID nos períodos de 72 e 216 HAP em relação à testemunha (Figura 3B). Em plantas tratadas com o extrato NEFID, uma combinação de elicitores provenientes do patógeno inativado e de oligômeros de tecido vegetal, ativaram sinais que estimulam respostas de defesa na cultura do tomateiro contra *Xanthomonas vesicatoria* (MEDEIROS, 2009). No presente estudo, após a inoculação com *H. vastatrix*, o perfil de expressão do gene *PAL* se mostrou de maneira inversa ao perfil do gene *CAT*. Pode-se observar que ocorreu um aumento da expressão do gene *PAL* a partir das 48 HAI, no entanto, em plantas induzidas por NEFID, foram detectados baixos níveis de transcritos (Figura 4B). Silva et al. (2006) observaram, por análise histoquímica, a presença de numerosas hifas de penetração 48 HAI de plantas de cafeeiro susceptíveis, o que poderia justificar esse aumento da expressão da *PAL* nesse instante. Além disso, um nível máximo de expressão do gene *PAL* foi

observado 48 HAI para as mudas de cafeeiro tratadas com fosfito de manganês e às 72 HAI para as plantas tratadas com a combinação NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês (Figura 4B). Guzzo (2004) sugere que, inicialmente após a inoculação, ocorre maior ativação de genes relacionados aos mecanismos iniciais de percepção e transdução de sinais, que vão sinalizar a célula vegetal para induzir a expressão de genes e síntese subsequente de compostos de defesa.

Diante dos dados apresentados, foi observado que os enzimáticos não se correlacionaram com a expressão gênica. Desta forma, podemos inferir que existem várias isoformas para as enzimas CAT e PAL. Entretanto, os *primers* foram desenhados para uma isoforma específica de cada gene estudado. Já a atividade enzimática detectou várias isoformas, ou seja, vários produtos gênicos, que estão ali representados.

A ativação das respostas de defesa é complexa e, durante uma interação planta-patógeno, é esperado detectar aumentos e decréscimos de níveis de expressão e atividade dos diversos genes e proteínas envolvidos na defesa vegetal, durante todo o curso do processo infeccioso.

A indução de resistência de cafeeiro por NEFID, de acordo com os níveis de transcritos dos genes *CAT* e *PAL* induzidos, mostra-se promissora para o controle da ferrugem do cafeeiro, embora seja fundamental considerar a relevância dos eventos pós-transcricionais de regulação da expressão gênica.

Conclusões

Os tratamentos com NEFID, NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês e fosfito de manganês induziram a expressão dos genes *CAT* e *PAL* em mudas de cafeeiro susceptíveis à ferrugem, tendo estes genes os perfis de expressão variados em relação ao indutor utilizado e ao período analisado.

Os maiores níveis de expressão dos genes *CAT* e *PAL* ocorreram em plantas induzidas por NEFID sem inoculação com *H. vastatrix*. Após a inoculação em mudas de café induzidas, observaram-se variações entre as expressões destes genes, dos indutores e os tempos analisados, e os maiores níveis de expressão para os dois genes ocorreram em plantas tratadas com NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês.

A atividade da enzima PAL apresentou um perfil diferente em relação à atividade da enzima CAT, de modo que há uma menor atividade da enzima PAL para a maioria dos períodos analisados. Folhas de café tratadas com fosfito de manganês, não inoculadas com *H. vastatrix*, apresentaram aumento na atividade de PAL às 72 HAP, o que diferenciou o perfil, no qual se manteve similar nos demais tempos. Maior atividade da CAT foi observada em folhas de café, não inoculadas com *H. vastatrix*, tratadas com NEFID e fosfito de manganês às 24 HAP e NEFID + fosfito de cobre + fosfito de manganês às 216 HAP.

No primeiro período, 12 HAI, foi observado aumento na atividade para as enzimas CAT e PAL induzidas por todos os tratamentos analisados.

REFERÊNCIAS

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

BARGUIL, B. M. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costaricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 535-537, out. 2005.

BARSALOBRES-CAVALLARI, C. F. et al. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. **BMC Molecular Biology**, London, v. 10, p. 1-11, Jan. 2009.

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

CAVALCANTI, F. R. et al. Activities of oxidant enzymes and photosynthetic response in tomato pré-treated by plant activators and inoculated by *Xanthomonas vesicatoria*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 68, n. 4/6, p. 198-208, Apr./June 2006.

CHANG, H. T. et al. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 14, p. 6266-6270, Feb. 2008.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 11, n. 1, p. 113-116, Mar. 1993.

CONRATH, U.; PIETERSE, C. M. J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant-pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 210-216, 2002.

DATNOFF, L. E.; SEEBOLD, K. W.; CORREA, F. J. Use of silicon for integrated disease management: reducing fungicide applications and enhancing host plant resistance. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDORFER, G. H. (Ed.). **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Elsevier Science, 2001. p. 171-184.

GUERRA-GUIMARÃES, L.; GUEDES, M. E. M. Association between phenylalanine and tyrosine ammonia-lyase activities with accumulation of total phenolic content in complex *Coffea* sp. – *Hemileia vastatrix*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 6., 1993, Montreal. **Proceedings...** Montreal: ICPP, 1993. p. 232.

GUZZO, S. D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 2004. 236 p. Tese (Doutorado em Engenharia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2004.

GUZZO, S. D.; HAKAKAVA, R.; TSAI, S. M. Identification of coffee genes expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with *hemileia vastatrix*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 10, p. 625-638, Oct. 2009.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Total production of exporting countries**. Disponível em: <<http://dev.ico.org/prices/po.htm>>. Acesso em: 29 jan. 2012.

KRETSCHMAR, J. A.; BAUMANN, T. W. Caffeine in *Citrus* flowers. **Phytochemistry**, Oxford, v. 52, n. 1, p. 19-23, Jan. 1999.

LAMB, C.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 251-275, 1997.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001.

LORENZO, G. et al. Engineering plant resistance by constructing chimeric receptors that recognize damage-associated molecular patterns (DAMPs). **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 585, n. 11, p. 1521-1528, June 2011.

MEDEIROS, F. C. L. et al. Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, n. 1, p. 175-183, Jan. 2009.

MONTEIRO, A. C. A. **Associação de indutores de resistência para o manejo da ferrugem do cafeeiro e análise bioquímica da resposta de defesa induzida**. 2011. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

MORI, T.; SAKURAI, M.; SAKUTA, M. Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. **Plant Science**, Shannon, v. 160, n. 2, p. 355-360, Jan. 2001.

NARDI, B. et al. Differential responses of *Coffea arabica* L. leaves and roots to chemically induced systemic acquired resistance. **Genome**, Ottawa, v. 49, n. 12, p. 1594-1605, Dec. 2006.

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

PEREIRA, R. B. et al. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1287-1296, out. 2008.

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

RAMIRO, D. A. et al. Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 58, n. 5, p. 944-955, May 2009.

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

SHULAEV, V.; SILVERMAN, P.; RASKIN, I. Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. **Nature**, London, v. 385, n. 6618, p. 718-721, Feb. 1997.

SILVA, M. C. et al. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 119-147, 2006.

_____. Cytological and biochemical aspects associated with the hypersensitive reaction in coffee plants infected with Orange rust - *Hemileia vastatrix*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 17., 1998, Edinburgh. **Abstract...** Edinburgh: ICPP, 1998. v. 2, p. 1.2.35.

SILVA, M. C. et al. Hypersensitive cell death and pos-haustorial defence responses arrest the Orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, n. 4, p. 169-183, Apr. 2002.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS/STAT® user's guide**. Version 8. Cary, 1999. Software.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Mario Lúcio Vilela de Resende et al. **Formulação para indução de resistência em plantas, a base de extrato vegetal obtido de folhas do cafeeiro**. BR n. PI 0603575-2, 2 ago. 2006.

VAUCHERET, H. et al. The action of *ARGONAUTE1* in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 18, n. 10, p. 1187-1197, May 2004.

ZAMBOLIM, L. et al. Epidemiologia e controle integrado da ferrugem-do-cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 369-450.