

INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE DA CERCOSPORIOSE DO CAFEIEIRO: ANÁLISE DE GENES RELACIONADOS À DEFESA

Sandra Eliza Guimarães¹, Mário Lúcio Vilela Resende², Deila Magna dos Santos³, Ana Cristina Andrade Monteiro⁴, Victor Augusto Maia Vasconcelos⁵,
Manoel Batista da Silva Júnior⁶

(Recebido: 27 de agosto de 2015 ; aceito: 20 de janeiro de 2016)

RESUMO: Objetivou-se, neste trabalho, avaliar o efeito de indutores de resistência, formulações à base de extratos vegetais e fungicida na proteção de mudas de cafeeiro no controle de *Cercospora coffeicola*. Além disso, objetivou-se selecionar os tratamentos alternativos que se destacaram no controle da cercosporiose e estudar seu efeito como indutor de resistência, por meio da análise da expressão de genes de defesa. Os tratamentos aplicados foram: Greenforce CuCa, Greenforce KP e ET64-DT, que são formulações à base de extratos vegetais (estão sob sigilo de patente - PI 0603575-2), fertilizante mineral, acibenzolar-S-metil (ASM), e como controle, o fungicida epoxiconazol + piraclostrobina. Foram realizadas avaliações semanais de incidência da cercosporiose para cálculo da área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) da doença. Após análise deste experimento, foram escolhidos os dois melhores tratamentos alternativos para avaliar o potencial de indução de resistência dos mesmos. Para isso, foi instalado um segundo experimento para analisar a expressão de genes que são traduzidos nas enzimas lipoxigenase, catalase, glutatona peroxidase e quitinase. A aplicação do fungicida epoxiconazol + piraclostrobina resultou em controle mais efetivo da incidência da doença, diferindo dos demais tratamentos testados. Os produtos Greenforce CuCa e ASM, na dose 0,05 g.L⁻¹, proporcionaram redução de 38 e 35%, respectivamente, da AACPI da cercosporiose, diferindo dos demais tratamentos. Na análise da expressão gênica da resposta aos indutores, observou-se que a maior expressão dos genes que codificam as enzimas lipoxigenase, catalase, glutatona peroxidase e quitinase ocorreu às 24 horas, após aplicação do ASM, e às 48 horas para o Greenforce CuCa, havendo diferença de um tratamento para o outro nestes períodos. Plantas que foram pulverizadas com Greenforce CuCa apresentaram, também, maior expressão do gene da lipoxigenase às 72 horas após a aplicação deste produto, diferindo do ASM. Com este trabalho, foi possível verificar que os produtos Greenforce CuCa e ASM controlam a cercosporiose por meio da indução de genes de defesa em cafeeiro

Termos para indexação: Indução de resistência, espécies reativas de oxigênio, PR- proteína, oxidação de lipídeos.

RESISTANCE INDUCTORS IN CONTROL OF COFFEE CERCOSPORIOSE: ANALYSIS OF GENES RELATED TO DEFENSE

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effect of resistance inducers, plant extract-based formulations and fungicide over the protection of coffee seedlings in controlling *Cercospora coffeicola*. In addition, the objective was to select alternative treatments that highlight in control of *Cercospora leaf spot* and study its effect as resistance inducer through the defense gene expression analysis. The treatments applied were: Greenforce CuCa, Greenforce KP, ET64-DT, which are plant extracts-based formulations (are under patent secrecy - PI 0603575-2), mineral fertilizer, acibenzolar-S-methyl (ASM) and, as control, the epoxiconazole + pyraclostrobin fungicide. We conducted weekly evaluations of incidence of cercosporiose to calculate the area under the curve of disease incidence progress (AUCDIP). After analysis of this experiment, the two best alternative treatments to evaluate the resistance-inducing potential of them were chosen. For this, a second experiment was carried out in order to analyze the expression of genes that are translated into the lipoxigenase, catalase, glutathione peroxidase and chitinase enzymes. The application of epoxiconazole + pyraclostrobin fungicide resulted in more effective control of the incidence of the disease, differing from the other treatments tested. The Greenforce CuCa and ASM, 0.05 g.L⁻¹, products resulted in a reduction of AUCDIP of cercosporiose by 38 and 35%, respectively, differing from the other treatments. In the analysis of gene response expression to induce, it was observed that the highest expression of the genes encoding the lipoxigenase, catalase, glutathione peroxidase and chitinase enzymes occurred at 24 hours after application of ASM and 48 hours for Greenforce CuCa, no difference from one treatment to the other in these periods. Plants were sprayed with Greenforce CuCa showed a higher expression of the lipoxigenase gene at 72 hours after application of this product, differed from the ASM. With this work, we found that Greenforce CuCa and ASM products control *Cercospora leaf spot* through the induction of defense genes in coffee.

Index terms: Resistance induction, oxygen reactive species, PR-protein, lipid oxidation.

^{1,2,3,4,5,6}Universidade Federal de Lavras/UFLA - Departamento de Fitopatologia/DFP - Cx. P. 3037- 37.200-000 - Lavras - MG
sandra_ufla@yahoo.com.br, mlucio@dfp.ufla.br, deilamagna@hotmail.com, monteiroaca@yahoo.com.br, victoraugusto_m@hotmail.com,
dfp@dfp.ufla.br

1 INTRODUÇÃO

A cercosporiose, também conhecida como mancha circular, mancha parda ou olho de pombo, é uma doença bastante antiga nos cafezais das Américas e, no Brasil, sua ocorrência data de 1887 (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997). O agente causal dessa doença é o fungo *Cercospora coffeicola* Berk & Cook, que é considerada uma das principais doenças do cafeeiro (ROMERO et al., 2010). Espécies do gênero *Cercospora* produzem a toxina cercosporina, que é ativada na presença de alta intensidade luminosa (DAUB; HERRERO; CHUNG, 2005). Essa toxina resulta em necrose da célula vegetal, que é o sintoma típico da doença (DAUB; CHUN, 2007).

O controle da doença deve-se iniciar com cuidados desde a formação das mudas, evitando condições favoráveis à doença por meio de práticas culturais, utilizando-se de substratos com nutrientes balanceados, controle da irrigação e do excesso de insolação nas mudas. Entretanto, a principal medida de controle é a utilização de fungicidas de contato ou sistêmicos, tanto em aplicação via solo como foliar (PATRICIO; BRAGHINI, 2011). Porém, devido aos prejuízos causados pela utilização indiscriminada de fungicidas, recentemente pesquisadores vêm buscando medidas de controle alternativo, como a utilização de indutores de resistência, fertilizantes foliares e formulações à base de extratos vegetais, que possuem eliciadores que induzem resistência nas plantas.

Estudos elucidam a utilização de extratos à base de subprodutos da cadeia do cafeeiro, no controle da cercosporiose em cafeeiro. Pereira et al. (2008) constataram que extratos à base de cascas de café reduziram o número de lesões da cercosporiose do cafeeiro. Já Costa et al. (2014), verificaram o controle desta doença em condições de campo, aumento do enfolhamento e produtividade com a utilização de formulações à base de subprodutos da lavoura cafeeira.

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 tenham sido utilizados para quantificar a expressão gênica, a reação em cadeia polimerase quantitativo em tempo real (qRT-PCR) é considerada o padrão pela sua sensibilidade,

especificidade, dinâmica e capacidade de produção elevada (UDVARDI; CZECHOWSKI; SCHEIBLE, 2008). Assim, a análise de perfis de expressão de genes, em resposta à infecção e ao tratamento com moléculas de sinalização, fornece uma base para identificar as características comuns e/ou antagonistas entre vias de defesa (Schenk et al., 2000).

Os vegetais respondem à estresse biótico e abiótico de várias maneiras; entre elas formando uma explosão oxidativa, que resulta em um aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), antes mesmo que apareçam os sintomas na planta (PITZSCHKE; FORZANI; HIRT, 2006). Estes processos oxidativos têm papel crucial nos estágios iniciais da indução de respostas de defesa, por meio da expressão de genes de defesa e respostas adaptativas (GECHEV et al., 2006).

Todas as EROs são extremamente reativas e citotóxicas, o OH e o O₂ produzidos são tão reativos que suas produções devem ser minimizadas rapidamente. O H₂O₂, quando em alta concentração na célula inibe a fixação de carbono, uma vez que muitas enzimas do ciclo de Calvin são extremamente sensíveis ao H₂O₂ (HU et al., 2009). Essas moléculas causam peroxidação lipídica, desnaturação protéica e mutação no DNA, podendo levar à disfunções metabólicas irreparáveis e até morte celular (LUKASIK; GOLAWSKA; WÓJCICKA, 2012). A inativação efetiva das EROs exige a ação de uma série de enzimas trabalhando em sincronia. Os mecanismos de destruição das EROs envolvem as enzimas antioxidantes e pró-oxidantes, tais como: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), dehidroascorbato redutase (DHAR), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), glutationa redutase (GR), glutationa peroxidase (GPX) (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002), além dos antioxidantes não enzimáticos.

Diante da necessidade de buscar medidas alternativas de controle da cercosporiose do cafeeiro, objetivou-se, neste trabalho, avaliar indutores de resistência, formulação à base de extratos vegetais e fungicida na proteção de mudas de cafeeiro contra *C. coffeicola*. Para elucidar a ação das formulações utilizadas, os tratamentos alternativos mais promissores foram selecionados para a análise da expressão de genes que codificam enzimas de defesa da planta, por meio da técnica de PCR em tempo real.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo das mudas de cafeeiro

As sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L. Cv. Mundo Novo, seleção 376/4), utilizadas por apresentarem susceptibilidade à cercosporiose, foram adquiridas na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig), Centro Tecnológico do Sul de Minas, Lavras, MG, semeadas em bandejas de plástico contendo areia lavada e, na fase de “orelha de onça”, foram transplantadas para sacos de polietileno de 2,0 kg, contendo substrato composto por terra, areia e esterco bovino (2:1:1, v/v/v).

As mudas foram mantidas em casa de vegetação durante todo o período experimental, irrigadas e adubadas periodicamente, conforme recomendação de Guimarães et al. (1999).

2.1 Obtenção do inóculo e inoculação de *Cercospora coffeicola*

Para obtenção de esporos de *C. coffeicola*, utilizou-se metodologia proposta por Souza et al. (2011), com algumas adaptações. Oito discos de micélio de *C. coffeicola*, cultivadas em meio V8, foram macerados e, posteriormente, depositados em 20 mL de meio V8 líquido (100 mL de suco V8 em 900 mL de água destilada), em erlenmeyer de 125 mL, colocados sob agitação contínua (110 rpm). Após quatro dias, o conteúdo de cada erlenmeyer foi vertido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio ágar-água (2%). Estas placas foram mantidas abertas, em BOD a 25 °C, sob luz contínua. Após secagem do meio (3-4 dias) foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada, para a remoção dos conídios formados.

A inoculação foi realizada apenas para o experimento de avaliação de produtos alternativos no controle da cercosporiose. Foi realizada pulverização foliar da suspensão de conídios de *C. coffeicola* (concentração 2×10^4 conídios por mL). Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas.

2.2 Obtenção de formulações e produtos comerciais

As formulações à base de extratos vegetais testadas neste trabalho foram: Greenforce CuCa, Greenforce KP e ET64-DT (estão sob sigilo de patente PI 0603575-2), cedidos pela Agrofittes Tecnologia Agrícola (empresa incubada na Universidade Federal de Lavras).

Também foi utilizado o fertilizante mineral, Fulland®, adquirido da Empresa Satis Ltda. Como padrão de indução de resistência, foi escolhido o acibenzolar-S-metil (ASM), Bion®, adquirido da Syngenta Proteção de Cultivos Ltda e, como padrão de controle convencional foi utilizado o fungicida epoxiconazol + piraclostrobina, Opera®, adquirido da Basf SA.

2.3 Produtos alternativos na proteção de mudas de cafeeiro contra a cercosporiose

Para o experimento de avaliação do controle da cercosporiose, foram utilizados os tratamentos descritos na Tabela 1. As doses dos produtos foram utilizadas seguindo as recomendações dos fabricantes, exceto para o ASM, em que as doses utilizadas foram sugeridas de acordo com estudos anteriores, com testes de dose e subdoses para mudas. As mudas de cafeeiro, com quatro pares de folhas, foram pulverizadas com os tratamentos até o ponto de escorrimento, quinzenalmente, totalizando 3 aplicações. Sete dias após a primeira aplicação do produto foi realizada a inoculação com *C. coffeicola*, conforme metodologia descrita anteriormente.

Foram realizadas cinco avaliações semanais da incidência da doença, quantificadas pelo número de folhas com sintomas da cercosporiose, em relação ao total avaliado. A partir desses dados, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) da doença em cada tratamento, segundo a fórmula de Shaner e Finney (1977).

2.4 Estudo de expressão gênica

Para o experimento de análise da expressão gênica, da resposta das plantas aos agentes indutores de resistência, foram utilizadas mudas de cafeeiro produzidas conforme descrito no item 2.1, cultivadas em condições controladas, em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFLA, e transferidas para câmara de crescimento vegetal do tipo Fitotron, com 4 pares de folhas totalmente expandidas, aclimatadas, por uma semana, sob as seguintes condições: temperatura média de 25°C, umidade relativa de 70% e luminosidade de 12 horas claro/escuro. A partir dos resultados do experimento anterior, foram selecionados os tratamentos Greenforce CuCa e ASM na dose $0,05\text{gL}^{-1}$, para a realização do experimento de expressão gênica, além da testemunha pulverizada com água. Os tratamentos foram aplicados em uma única dose, conforme Tabela 1, até o ponto de escorrimento nas folhas.

TABELA 1 - Tratamentos e doses utilizados na proteção de mudas de cafeeiro contra a cercosporiose, em casa de vegetação.

Tratamento	Produto	Dose (L ⁻¹)
1	ASM	0,05 g
2	ASM	0,1 g
3	Fertilizante mineral	5 mL
4	Greenforce CuCa*	1,53 mL
5	Greenforce KP*	15 mL
6	ET64 – DT*	15 mL
7	Epoxiconazol + piraclostrobina	1,5 mL
8	Testemunha inoculada	---

*Formulações à base de extratos vegetais que estão sob sigilo de patente PI 0603575-2

As coletas das folhas foram realizadas após a aplicação dos produtos nos tempos: 0, 24, 48 e 72 horas após a aplicação (haa). Foram coletados 2 pares de folhas superiores totalmente expandidas, em cada tempo de coleta, envolvidas em papel alumínio, identificadas, imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer, a -80 °C, até o momento das extrações do RNA total.

O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e, aproximadamente, 30 mg de cada amostra macerada foi utilizada para a extração de RNA total, a qual foi realizada utilizando o kit SV Total RNA Isolation System (Promega®), seguindo o protocolo do fabricante para tecidos de plantas.

As amostras que apresentaram alto grau de integridade e pureza, verificadas através de uma PCR convencional, foram usadas para a síntese de cDNA, em que se utilizou o kit 'Super Script® III First-Strand Synthesis Super Mix' (Invitrogen), seguindo protocolo sugerido pelo fabricante. As amostras (cDNA) foram armazenadas a -20°C até o uso.

Primers específicos de genes de sinalização e defesa na interação cafeeiro-patógeno foram desenhados com o auxílio do software Integrated DNA Technologies (IDT) (<http://www.idtdna.com/site>) e sintetizados pela Sigma Aldrich (Tabela 2). Os genes utilizados neste estudo foram selecionados a partir de estudos em café arábica e , após resultados positivos para não formação de dímeros, a eficiência de anelamento foi verificada através de PCR convencional. Os genes GAPDH e RPL7 foram utilizados como constitutivos, por serem estáveis e constituintes normais das células, foram selecionados a partir dos estudos

de Barsalobres-Cavallari et al. (2009), além de também se apresentarem eficientes nos testes descritos acima.

A análise da expressão gênica por qRT-PCR foi realizada em sistema de detecção de sequências ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems), usando SYBR Green®.

Para cada reação, as amostras que continham o cDNA foram diluídas 10 vezes, adicionando-se 0,4 µL de cada par primer e 5,0 µL de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems TM). A reação foi completada com 3,6 µL de água livre de nuclease (nuclease-free water) (Ambion™), para um volume final de 10,0 µL, por amostra. As amostras foram processadas em réplicas e 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).

Os resultados foram normalizados, usando CTs (ciclo Threshold) obtidos para controles endógenos, presentes na mesma reação. O CT foi determinado pelo número de ciclos nos quais a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha Threshold. O método usado foi o CT comparativo.

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

TABELA 2 - Sequências dos primers utilizados para a análise de qRT-PCR.

Genes	Sequência dos primers (5'-3')	Tamanho do fragmento	Nº acesso
<i>Catalase</i> (CAT) MN-SSH2-H06	F: CAGGCACATGGATGGATCTGGTG R: TGGCTATGATTTGCTCCACCAACC	153	DQ124022 ^a
<i>Glutathionaperoxidase</i> (GPX) HT-SSH2-F10	F: GCGTGTGCGAAGCAATTCTCGATTCT R: GTGGCCATCGTACGATCTGACC	172	DQ123923 ^a
<i>Lipoxigenase</i> (LPX) HT-SSH1-C08	F: CGGCGACTAATCCCTAATGAAA R: GTCTAACACGCGCCAAGTATT	136	DQ123948 ^a
<i>Quitinase</i> (CHI)	F: GGAAGAAGTGGCAGCCTA R: GCAGGGTCAGGATAGGA	169	DQ124034 ^b
<i>GAPDH</i>	F: TTGAAGGGCGGTGCAAA R: AACATGGGTGCATCCTTGCT	59	SGN-U347734 ^b
<i>Rpl7</i>	F: GACCTTGCCCATGAGATCCTGAC R: CCAGCATCGCCTCCTTCAACATAG	136	SGN-U351477 ^b

Legenda: ^aNúmero de acesso de acordo com o GenBank; ^bNúmero de acesso de acordo com SOL Genomics Network; F: sequência do *primer forward*; R: sequência do *primer reverse*.

2.5 Delineamento experimental

O experimento de avaliação do controle da cercosporiose em mudas de cafeeiro foi instalado em delineamento de blocos casualizados (DBC), com 8 tratamentos, três blocos (repetições) e a parcela experimental constituída por seis plantas. As mudas selecionadas continham quatro pares de folhas totalmente expandidas, sendo que foram selecionadas para avaliação apenas os dois pares de folhas superiores totalmente expandidos. O experimento foi repetido duas vezes e os dados da AACPI de cada experimento foram submetidos, individualmente, à análise de variância e, posteriormente, comparados conforme proposto por Pimentel-Gomes (2009), para verificar a possibilidade de análise conjunta dos dados. Como as condições para análise conjunta foram atendidas, os dados combinados foram avaliados quanto às pressuposições da análise de variância ($p = 0,05$). A comparação de médias, quando significativas pelo teste F, foi realizada pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar v. 4.3 (FERREIRA, 2000).

No experimento de expressão gênica, o delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com 3 repetições, 3 plantas por parcela e 3 tratamentos, analisados em 4

tempos (0, 24, 48 e 72 horas após aplicação -haa), as folhas referentes às 3 plantas da parcela foram misturadas, formando um *pool*, totalizando 36 amostras a serem analisadas. As análises dos efeitos das interações tratamento e tempo foram feitas através do teste de Tukey, 5% de probabilidade, utilizando o software Sisvar v.4.3 (FERREIRA, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise da AACPI, observou-se que o fungicida epoxiconazol + piraclostrobina proporcionou um controle da doença mais efetivo, quando comparado aos demais tratamentos testados (Figura 1). A aplicação do Greenforce CuCa e do ASM na dose 0,05 g.L⁻¹, também resultou em redução na severidade da doença, diferindo dos demais tratamentos, que diferiram da testemunha inoculada. O fungicida epoxiconazol + piraclostrobina proporcionou controle de 77%, seguido do Greenforce CuCa com 38% e ASM, na dose 0,05 g/L, com 35% (Figura 1).

Os resultados para o experimento de expressão gênica da resposta aos indutores Greenforce CuCa e ASM, ao longo de 0, 24, 48 e 72 horas após os tratamentos, estão apresentados na Figura 2.

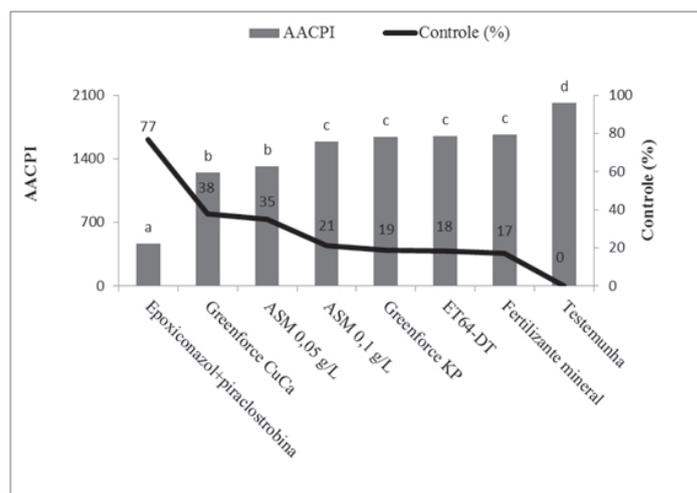


FIGURA 1 - Efeito dos tratamentos sobre a cercosporiose em mudas de café. Área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) da doença. Controle da cercosporiose em porcentagem após os tratamentos com produtos químicos e extratos vegetais. Barras com mesma letra não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

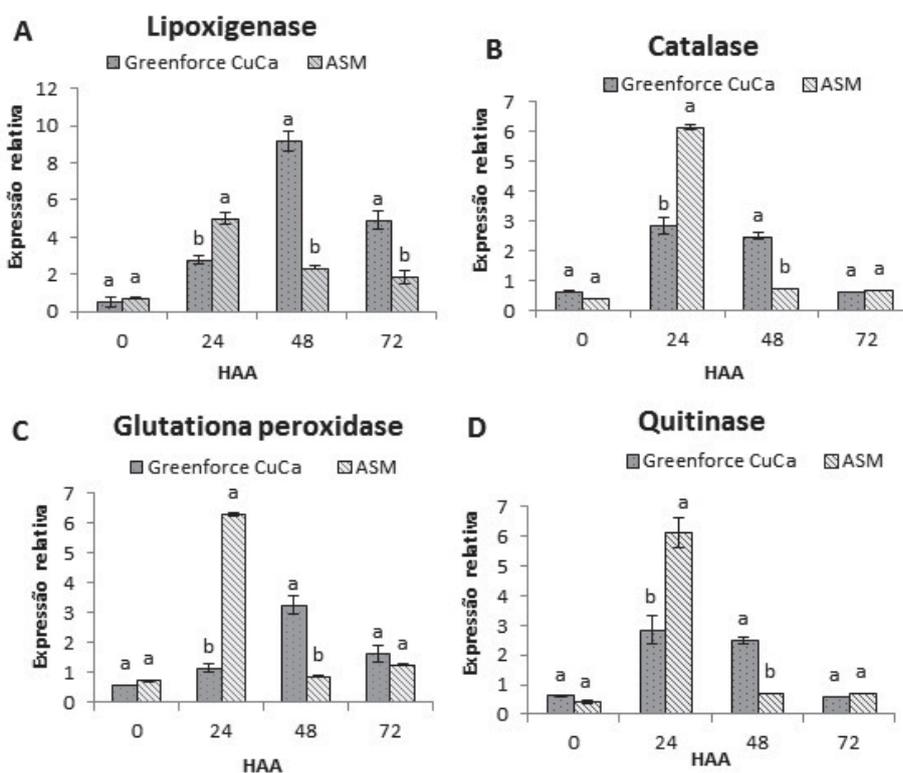


FIGURA 2 - Efeito dos tratamentos Greenforce CuCa e ASM em mudas de café. Expressão relativa dos genes que codificam para as enzimas lipoxigenase (A), catalase (B), glutaciona peroxidase (C), quitinase (D), nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas, após aplicação dos tratamentos. Os genes GAPDH e o RPL7 foram usados como controle endógeno. Barras de erros representam o erro padrão da média de três repetições. As letras nas barras de erros representam a análise dos efeitos de cada produto aplicados ao longo do tempo, conforme Tukey, a 5% de probabilidade.

No período de 0 hora após os tratamentos, não houve diferença entre o Greenforce CuCa e ASM, em nenhum dos genes estudados. Observou-se que a maior expressão dos genes que codificam as enzimas lipoxigenase, catalase, glutathione peroxidase e quitinase ocorreu às 24 horas após aplicação do ASM e às 48 horas para o Greenforce CuCa, havendo diferença de um tratamento para o outro nestes períodos. Plantas que foram pulverizadas com Greenforce CuCa apresentaram, também, maior expressão do gene da lipoxigenase às 72 horas após a aplicação deste produto, diferindo do ASM. Nos demais genes estudados, não houve diferença entre os tratamentos às 72 horas após a sua aplicação.

A utilização de indutores de resistência atua de maneira efetiva no controle da cercosporiose do cafeeiro. Estudos comprovam que, tanto em campo, quanto em casa de vegetação, o uso de produtos à base de extratos provenientes da cadeia produtiva do café e o indutor ASM são efetivos agentes de controle contra doenças do café (COSTA et al., 2014).

No trabalho de Patrício et al. (2007), foi observada uma diminuição dos sintomas da cercosporiose em 55% com aplicação do ASM, na dose $0,025\text{ g L}^{-1}$ enquanto que, no presente trabalho, o mesmo produto proporcionou redução dos sintomas em torno de 36%, na dose de $0,05\text{ g L}^{-1}$.

Com relação às duas concentrações do ASM testadas neste trabalho, observou-se que a menor concentração ($0,05\text{ g L}^{-1}$) proporcionou maior controle da cercosporiose. Patrício et al. (2007) avaliaram o efeito do ASM, nas concentrações 25, 50 e $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, na proteção de cafeeiros 'Catuai' e 'Obatã' contra o fungo *C. coffeicola*; eles verificaram um menor controle para a maior dose, correspondendo, respectivamente, à uma proteção de 47, 74 e 25%, nas aplicações em intervalo de 96 horas entre tratamento e inoculação do patógeno. Segundo Barguil et al. (2005), a falta de resposta ao aumento da dosagem é um indicativo da indução de resistência em plantas.

Em relação aos extratos à base de subprodutos da cadeia produtiva do café, observou-se neste trabalho que o Greenforce CuCa proporcionou uma significativa redução dos sintomas da doença, com valores equiparados ao controle químico padrão e ao indutor comercial ASM, dado não evidenciado para o outro extrato ET-64 DT. Este efeito pode ser atribuído a alguns dos componentes do Greenforce CuCa: cobre e cálcio, que supre a planta nestes elementos e pode intervir no desenvolvimento da cercosporiose, uma vez que esta doença tem relação com o estado nutricional da planta (POZZA et al., 2000).

Em seus estudos, Costa et al. (2014) verificaram que formulação à base de subprodutos das indústrias de café controla a cercosporiose em condições de campo, além de promover uma redução da desfolha e aumento de produtividade, o que comprova a atuação destes produtos em mudas e em plantas adultas, corroborando com este estudo em que os níveis de controle foram semelhantes.

Em estudos de mecanismos moleculares envolvidos na indução de resistência de plantas contra patógenos, observa-se expressão de diferentes genes de defesa, que estão associados com a indução de resistência em plantas (GANESH et al., 2006). Semelhantemente, observou-se, neste trabalho, que os produtos ASM e Greenforce CuCa induzem à expressão de genes de defesa em cafeeiro.

Os dados apresentados comprovam que o Greenforce CuCa proporcionou uma resposta rápida com a expressão do gene que codifica, para a enzima lipoxigenase. Os tecidos vegetais, quando danificados mecanicamente ou por patógenos, sofrem degradação de lipídios, cujos produtos iniciais são os hidroperóxidos resultantes da ação das lipoxigenases (BUCHANNAN; GRISSEM; JONES, 2006). A lipoxigenase é uma enzima-chave para a formação do ácido jasmônico que, a partir do ácido α -linolênico, leva à formação do ácido jasmônico, um importante hormônio que sinaliza para respostas a patógenos necrotróficos (PIETERSE et al., 2014).

O mecanismo antioxidante é importante para as plantas, uma vez que expor as plantas a estresses bióticos e abióticos pode aumentar a produção das espécies reativas de oxigênio. Este sistema enzimático de defesa antioxidante tem limitado a propagação dos processos oxidativos, permitindo que as células mantenham a sua viabilidade contra a penetração de fungos em tecidos vegetais (DJEBALI et al., 2011); que seria fundamental para o controle da cercosporiose, uma vez que esta inicia sua penetração cerca de 36 horas após o contato com os tecidos (SOUZA et al., 2011), indicando que quanto mais rápida for a defesa das plantas induzida pelos agentes indutores, maior será o sucesso de controle desta doença.

Com relação ao gene que codifica a enzima catalase, o produto ASM promoveu maior expressão às 24 horas após sua aplicação. Esta enzima está envolvida na decomposição das espécies reativas de oxigênio que são também uma das respostas de

defesa associada à SAR (MHAMDI et al., 2010). Com relação ao produto Greenforce CuCa, sua maior expressão para catalase foi verificada 24 e 48 horas, após a aplicação.

Catalases são enzimas indispensáveis para desintoxicação das células das plantas em condições de estresse, uma vez que elas são responsáveis pela dismutação direta de H₂O₂ em H₂O e O₂, removendo este peróxido gerado nos peroxissomos por oxidases envolvidas na oxidação de ácidos graxos, fotorrespiração e catabolismo de purinas (GILL; TUTEJA, 2010).

Com relação à glutatona peroxidase, sua maior expressão ocorreu com o indutor ASM, após 24 horas de aplicação e com Greenforce CuCa, após 48 horas. Esta enzima atua nos mecanismos antioxidantes eliminando as espécies reativas de oxigênio. A glutatona é um marcador da saúde celular e sua queda é indicativa de lesão oxidante (NAVROT et al., 2006).

A enzima quitinase apresentou maior expressão com aplicação do ASM, às 24 haa e com aplicação do Greenforce CuCa às 48 haa. Em estudos de expressão gênica relacionando o indutor ASM, observa-se que, para a quitinase, este agente induz uma resposta rápida, logo nas primeiras horas após a aplicação. Porém, para o Greenforce CuCa, a quitinase teve uma expressão mais prolongada. Extratos vegetais apresentam atividade eliciadora em plantas, e são capazes de aumentar a atividade de enzimas relacionadas à defesa induzida como a quitinase (CAVALCANTI; RESENDE, 2005).

Os dados apresentados neste trabalho, juntamente com as pesquisas que estão sendo feitas, evidenciam que a cercosporiose em mudas pode ser controlada com agente de indução de resistência, incluindo os produtos à base de extratos vegetais, tornado uma ferramenta importante no manejo de doenças de forma segura e menos tóxica ao ambiente. Além disso, é possível inferir que o uso de eliciadores abióticos, como o Greenforce CuCa e ASM, é capaz de ativar os mecanismos de defesa da planta através da expressão de genes que são traduzidos em enzimas do sistema antioxidante, que protege a célula dos danos causados pelo patógeno.

4 CONCLUSÕES

Dentre os produtos alternativos de controle, o Greenforce CuCa e o ASM foram efetivos no controle da cercosporiose do cafeeiro, comparados ao fungicida padrão.

Greenforce CuCa e ASM induzem, de forma diferente, a expressão de genes que codificam para enzimas relacionadas à resistência, sendo que o produto ASM proporciona maior expressão dos genes que codificam lipoxigenase, catalase, glutatona peroxidase e quitinase às 24 haa, enquanto que Greenforce CuCa promove uma maior expressão deste genes às 48 haa.

5 REFERÊNCIAS

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, May 2002.

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, set./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, n. 1, p. 1-11, 2009.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2006. 1341 p.

CAVALCANTI, L. S.; RESENDE, M. L. V. Efeito da época de aplicação e dosagem do acibenzolar-S-metil na indução de resistência à murcha-de-Verticillium em cacauzeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 67-71, jan./fev. 2005.

COSTA, B. H. G. et al. Suppression of rust and brown eye spot diseases on coffee by phosphites and By-products of coffee and citrus industries. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 162, n. 10, p. 635-642, Oct. 2014.

DAUB, M. E.; CHUNG, K. R. **Cercosporin: a photoactivated toxin in plant disease**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 2007. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/online/feature/Cercosporin/>>. Acesso em: 27 out. 2014.

DAUB, M. E.; HERRERO, S.; CHUNG, K. R. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. **FEMS Microbiology Letters**, Birmingham, v. 252, n. 2, p. 197-206, Nov. 2005.

- DJÉBALI, N. et al. Hydrogen peroxide scavenging mechanisms are components of *Medicago truncatula* partial resistance to *Aphanomyces euteiches*. **European Journal Plant Pathology**, Dordrecht, v. 131, n. 4, p. 559-571, July 2011.
- FERREIRA, D. F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 2000. 66 p.
- 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.
- GECHEV, T. S. et al. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **Bioessays**, Weinheim, v. 28, n. 11, p. 1091-1101, 2006.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Bali, v. 48, n. 12, p. 909-930, Dec. 2010.
- GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C. L. Doenças do café. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia, doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. Viçosa, MG: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 184-200.
- GUIMARÃES, P. T. G. et al. Café. In: RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; VENEGA, V. H. A. (Ed.). **Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: CFSEMG, 1999. p. 289-302.
- HU, Z. H. et al. Effects of feeding *Closterana choreta* on hydrogen peroxide accumulation and activities of peroxidase, catalase, and ascorbate peroxidase in *Populus simonii* x *P. pyramidalis* "Opera 8277" leaves. **Acta Physiologica Plantarum**, Amsterdam, v. 31, n. 5, p. 995-1002, 2009.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_T$. **Methods**, Minnesota, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001.
- LUKASIK, I.; GOLAWSKA, S.; WÓJCICKA, A. Effect of cereal aphid infestation on ascorbate content and ascorbate peroxidase activity in triticale. **Polish Journal of Environmental Studies**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 1937-1941, June 2012.
- MHAMDI, A. et al. Cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase contributes to redox homeostasis and the regulation of pathogen responses in Arabidopsis leaves. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 1112-1123, July 2010.
- NAVROT, N. et al. Identification of a new family of plant proteins loosely related to glutaredoxins with four CxxC motifs. **Photosynthesis Research**, Hague, v. 89, n. 2/3, p. 71-79, Sept. 2006.
- PATRICIO, F. R. A.; BRAGHINI, M. T. Efeito de fungicidas triazóis sobre o controle da cercosporiose em mudas de café. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 2, p. 241-249, abr./jun. 2011.
- PATRÍCIO, F. R. A. et al. Effectiveness of acibenzolar-S-methyl, fungicides and antibiotics for the control of brown eye spot, bacterial blight, brown leaf spot and coffee rust in coffee. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 152, n. 1, p. 29-39, Sept. 2007.
- PEREIRA, R. B. et al. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1287-1296, out. 2008.
- PIETERSE, C. M. J. et al. Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 52, p. 347-375, Aug. 2014.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 15. ed. Piracicaba: FEALQ, 2009. 451 p.
- PITZSCHKE, A.; FORZANI, C.; HIRT, H. Reactive oxygen species signaling in plant. **Antioxidants and Redox Signaling**, New Rochelle, v. 8, n. 9/10, p. 1756-1764, Oct. 2006.
- POZZA, A. A. A. et al. Intensidade da mancha de olho pardo em mudas de café em função de doses de N e K em solução nutritiva. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 26, n. 1, p. 29-33, Jan. 2000.
- ROMERO, G. et al. Partial resistance to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in coffee (*Coffea Arabica* L.): genetic analysis and molecular characterization of putative candidate genes. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 25, n. 4, p. 685-697, Apr. 2010.

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.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 70, p. 1183-1186, 1977.

SOUZA, A. G. C. et al. Infection process of *Cercospora coffeicola* on coffee leaf. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, n. 1, p. 6-11, Jan. 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.