

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E EXPRESSÃO DE GENES DE DEFESA EM CAFEIEIRO A *Cercospora coffeicola*

DIOGO MANZANO GALDEANO

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Vegetal,
Segurança Alimentar e o Ambiente
Orientadora: Sylvia Dias Guzzo

São Paulo

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Núcleo de Informação e Documentação - Biblioteca
Instituto Biológico
Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo

Galdeano, Diogo Manzano

Indução de resistência e expressão de genes de defesa em cafeeiro a *Cercospora coffeicola* /
Diogo Manzano Galdeano. -- São Paulo, 2010.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Sanidade Vegetal, Segurança Alimentar e o Ambiente.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Sylvia Dias Guzzo.

Versão do título para o inglês: Induction of resistance and defense gene expression in coffee against *Cercospora coffeicola*.

1. Cercosporiose 2. Acibenzolar-S-metil 3. Harpina 4. *Saccharomyces cerevisiae* 5. *Bacillus thuringiensis* 6. qRT-PCR (Reação em cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa Quantitativa) I. Guzzo, Sylvia Dias II. Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação III. Título



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

Pós-Graduação
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo - SP
pg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: Diogo Manzano Galdeano

**Título: INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E EXPRESSÃO DE GENES DE DEFESA
EM CAFEIRO A *Cercospora coffeicola***

Orientadora: Sylvia Dias Guzzo

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Vegetal, Segurança Alimentar e o Ambiente

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

Profa. Dra.: Sylvia Dias Guzzo

Instituição: Instituto Biológico - IB

Assinatura:

Profa. Dra.: Patrícia Cia

Instituição: Instituto Agronômico de Campinas - IAC

Assinatura:

Prof. Dr.: Ricardo Harakava

Instituição: Instituto Biológico - IB

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Biológico de São Paulo, pela oportunidade de realizar este trabalho;

À minha orientadora, Dra. Sylvia Dias Guzzo, pela dedicação, atenção, amizade, pelo auxílio e pelos conhecimentos que me ensinou durante todo o trabalho;

Ao Dr. Ricardo Harakava pelo auxílio na utilização do aparelho para as análises de qRT-PCR em tempo real e pelas sugestões durante a realização do trabalho;

À Dra. Flávia R. A. Patrício do Laboratório de Fitopatologia do Centro Experimental Central do Instituto Biológico por ter cedido o isolado IBLF78 de *Cercospora coffeicola*;

À Dra. Patrícia Cia por aceitar o convite de participação da banca de avaliação;

À Dra. Edviges Maristela Pituco do Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico por disponibilizar o aparelho para as análises de qRT-PCR em tempo real;

À Cooperativa Escola dos Alunos de ETE Dep. Paulo Ornellas Carvalho de Barros (Garça, SP) pelo fornecimento de sementes e plântulas de cafeeiro cultivar Mundo Novo;

Ao Roberto Castro, representante comercial da Syngenta®, por ter fornecido o produto comercial Bion®500WG;

À EDEN Bioscience Corporation por ter fornecido o produto comercial Messenger®;

Aos funcionários do Instituto Biológico, em especial, a Celso Bezerra de Jesus pela manutenção das sementes e plântulas de cafeeiro;

Ao Dr. Marcos Cesar Gonçalves pelo apoio e amizade;

Aos amigos Patrícia Hassato, Gabriel Vaz, Theresa de Oliveira, Carolina Krebs, Carolina Valenzuela, Tânia Regina, Armando Toshikatsu, Renata Soares, Filipe Gomes, Marcos Lima, Ciro Rovani, Rodrigo Bina, Tatiana Cunha, Paulo M., Renata Maia, Gustavo e Evandro Duarte pelas horas de apoio, descontração e pela amizade;

A equipe do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, Dra. Cleusa M. Lucon, Marcela Boro, Clarice de Jesus, Verônica Nogueira, Andrea F., Bruna Gamma, Patrícia Haddad pelos momentos compartilhados, e em especial, Patrícia Lima pela sinceridade, amizade, alegria, pelo apoio e pelos pensamentos;

Aos alunos da pós-graduação Emerson, Mariana Piccolomini, Isabel Cristina, Thalita M., Francesli e Raphaela Dell'Aqua pelo convívio, pelos ensinamentos, pelas risadas e pela amizade;

À Erica A. S. Pedro pela paciência, dedicação, alegria de viver, pelas risadas, pelo carinho, amor, pelos ensinamentos, por estar sempre ao meu lado e me apoiar em tudo;

Aos meus pais, Duílio e Helena, e ao meu irmão, Lívio, pelo apoio, conhecimento pela compreensão e amizade;

A Capes pela concessão da bolsa de estudos.

“Sem a curiosidade que me move, que me inquieta, que me insere na busca, não aprendo nem ensino”.

(Paulo Freire)

GALDEANO, D. M. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E EXPRESSÃO DE GENES DE DEFESA EM CAFEIEIRO A *Cercospora coffeicola*. São Paulo. 2010. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

RESUMO

Uma das abordagens promissoras para o controle de *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke, agente causal da cercosporiose do cafeeiro, consiste na utilização de agentes bióticos ou abióticos, menos tóxicos ao homem e ao meio ambiente, que atuem como indutores de resistência ativando os mecanismos de defesa inerentes das plantas. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram determinar a indução de resistência em cafeeiro suscetível à cercosporiose utilizando os agentes bióticos, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), o produto comercial Dipel PM[®] à base de *Bt*, polissacarídeos extraídos de *Saccharomyces cerevisiae* e proteína harpina, e o agente abiótico, acibenzolar-S-metil (ASM), além da caracterização de genes associados à indução de resistência na interação *Coffea arabica* – *C. coffeicola*. Para isso, cafeeiros suscetíveis ao patógeno foram tratados com os agentes e após 72 h inoculados com uma suspensão de conídios de *C. coffeicola*, sendo posteriormente avaliados quanto à severidade 30 e 60 dias após a inoculação do patógeno. Foi constatado que o ASM (25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$), o produto Dipel PM[®] (5, 10 e 20 mg mL^{-1}), os polissacarídeos de *S. cerevisiae* (400 Eq μg de manose mL^{-1}) e a proteína harpina (7,5; 15 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) protegeram os cafeeiros 'Mundo Novo' contra cercosporiose, quando avaliados 30 dias após a inoculação com o patógeno. No entanto, somente o ASM, a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, protegeu as plantas de cafeeiro contra *C. coffeicola* 60 dias após a inoculação do patógeno. Entretanto, quando a proteína harpina (15 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e os polissacarídeos de *S. cerevisiae* (400 Eq μg de manose mL^{-1}) foram re-aplicados nas plantas 30 dias após um tratamento prévio com os estes agentes, protegeram os cafeeiros contra cercosporiose quando os sintomas foram avaliados 60 dias após a inoculação com *C. coffeicola*. Contudo, o ASM protegeu os cafeeiros contra a doença com uma ou duas aplicações foliares na

concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os ensaios *in vitro* revelaram que o ASM, os polissacarídeos de *S. cerevisiae* e a harpina não inibiram o desenvolvimento micelial de *C. coffeicola*. Além disso, os metabólitos voláteis produzidos por *B. thuringiensis* não interferiram diretamente no desenvolvimento de *C. coffeicola*, porém, os compostos da bactéria, difusíveis no meio de cultura, o inibiram *in vitro*. O ASM, a harpina e os polissacarídeos de *S. cerevisiae* não inibiram a germinação dos conídios de *C. coffeicola in vitro*, porém, as concentrações 30 e 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de harpina estimularam significativamente a germinação dos mesmos. Tendo sido comprovada a proteção em cafeeiro à cercosporiose pela aplicação de ASM e proteína harpina, estes indutores foram utilizados nos estudos de expressão gênica. A expressão temporal avaliada por RT-PCR quantitativo revelou que o gene codificador de β -1,3-glucanase aumentou acentuadamente em cafeeiro tratado com ASM, 48 e 72 h após a inoculação com *C. coffeicola*, quando comparado com as plantas controle tratadas com água ou apenas inoculadas com o patógeno nos mesmos intervalos de tempo. Porém, esse gene foi ativado pela presença de *C. coffeicola* em plantas não tratadas com o indutor de resistência somente 7 dias após a inoculação. A proteína harpina induziu a expressão do gene codificador de ACC oxidase em cafeeiro sem a presença do patógeno, enquanto que em cafeeiro tratado com ASM, a expressão desse gene aumentou apenas 72 h após a inoculação com *C. coffeicola*. O aumento quantitativo da expressão dos genes codificadores de ascorbato peroxidase e proteína LRR ocorreu pela presença de *C. coffeicola* após 48 h em plantas apenas inoculadas.

Palavras-chave: Cercosporiose, *Bacillus thuringiensis*, acibenzolar-S-metil, harpina, *Saccharomyces cerevisiae*, qRT-PCR

GALDEANO, D. M. INDUCTION OF RESISTANCE AND DEFENSE GENE EXPRESSION IN COFFEE AGAINST *Cercospora coffeicola*. São Paulo. 2010. Dissertation (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

ABSTRACT

A promising alternative to control brown eye spot caused by *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke in coffee plants, consist in the use of biotic or abiotic agents, less harmful to human health and the environment, that act as inducers of natural disease resistance in plants. In this sense, this study has the purpose to verify the induction of resistance in susceptible coffee plants to brown eye spot employing as biotic agents, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), the commercial *Bt* formulation Dipel PM[®], polysaccharides extracted from *Saccharomyces cerevisiae* and harpin protein, and as abiotic agent, the synthetic compound acibenzolar-S-methyl (ASM), besides the characterization of the genes associated with induction of resistance on the interaction *Coffea arabica* – *C. coffeicola*. For the studies, susceptible coffee plants 'Mundo Novo' were treated with the agents and after 72 h inoculated with a suspension of *C. coffeicola* conidia and the symptoms were evaluated 30 and 60 days after the inoculation with the pathogen. The results revealed that ASM (25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$), Dipel PM[®] (5, 10 and 20 mg mL^{-1}), polysaccharides from *S. cerevisiae* (400 Eq μg of mannose mL^{-1}) and the harpin protein (7,5; 15 and 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) protected the coffee plants against brown eye spot, when evaluated 30 days after inoculation with the pathogen. However, only the ASM, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, protected the coffee plants against *C. coffeicola* 60 days after inoculation with the pathogen. On the other hand, when the harpin protein (15 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and the polysaccharides from *S. cerevisiae* (400 Eq μg of mannose mL^{-1}) were re-applied on plants previously treated with these agents 30 days before, the coffee plants were protected against brown eye spot, even when the symptoms were evaluated 60 days after inoculation with *C. coffeicola*. Nevertheless, the ASM protected the coffee plants against the disease with one or twice foliar applications in the concentration of 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The *in vitro*

assays revealed that the ASM, the polysaccharides from *S. cerevisiae* and the harpin protein did not inhibit the mycelial growth of *C. coffeicola*. Moreover, the volatile metabolites produced by *B. thuringiensis* did not directly affect the mycelial growth of *C. coffeicola* in culture medium, while bacterial diffusible compounds inhibited it. The ASM, harpin protein and polysaccharides from *S. cerevisiae* did not inhibit the *in vitro* germination of *C. coffeicola* conidia. However, the concentrations of harpin 30 and 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ significantly stimulated the germination of the pathogen. Since the ability of ASM and harpin as resistance inducers in coffee plants against brown eye spot was verified, these inducers were employed in gene expression studies. The temporal gene expression evaluated by quantitative RT-PCR revealed that the gene encoding β -1,3-glucanase markedly increased in coffee plants treated with ASM, 48 and 72 h after inoculation with *C. coffeicola*, when compared with control plants treated with water or just inoculated with the pathogen in the same time intervals. However, a quantitative increase in the expression of this gene was also detected in non-induced plants only 7 days after pathogen inoculation. In the harpin-treated coffee plants, the relative expression level of ACC oxidase transcripts markedly occurred 72 h after the resistance-inducer treatment, while in ASM-treated plants, the expression level of this gene increased only 72 h after inoculation with *C. coffeicola*. Increased quantitative expression of genes encoding ascorbate peroxidase and LRR protein was induced by *C. coffeicola* in non-treated plants, 48 h after inoculation.

Keywords: Brown eye spot, *Bacillus thuringiensis*, acibenzolar-S-methyl, harpin, *Saccharomyces cerevisiae*, qRT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estádios de desenvolvimento de cafeeiro 'Mundo Novo', do plantio das sementes até a formação de mudas. A: "Palito de fósforo"; B: "Orelha de onça"; C: Pares de folhas verdadeiras.....18
- Figura 2 - Folhas de cafeeiro suscetível 'Mundo Novo' tratadas com acibenzolar-S-metil (ASM), 72 h antes da inoculação de *C. coffeicola*, e avaliadas 30 dias após a inoculação do patógeno. A, B, C, D e E: 0, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ASM, respectivamente.....33
- Figura 3 - Folhas de cafeeiro suscetível 'Mundo Novo' tratadas com acibenzolar-S-metil (ASM), 72 h antes da inoculação de *C. coffeicola*, e avaliadas 60 dias após a inoculação do patógeno. A, B, C, D e E: 0, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ASM, respectivamente.....35
- Figura 4 - Crescimento micelial de *Cercospora coffeicola* em BDA acrescido de acibenzolar-S-metil (ASM). A, B, C, D e E: 0, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ASM, respectivamente.....37
- Figura 5 - Índice de crescimento micelial (ICM) de *Cercospora coffeicola* sob diferentes concentrações de acibenzolar-S-metil (ASM). As concentrações de 25, 50, 100 e 200 μg de ingrediente ativo (i.a.) mL^{-1} foram incorporadas em meio BDA. ^{ns}- não significativo.....38
- Figura 6 - Folhas de cafeeiro suscetível 'Mundo Novo' tratadas com *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), 72 h antes da inoculação de *Cercospora coffeicola* e avaliadas 30 dias após a inoculação do patógeno. A, B e C: 0, 4,5 e 6,0 x 10⁸ unidades formadoras de colônia mL^{-1} , respectivamente, de *Bt* isolado do produto comercial Dipel PM[®].....42
- Figura 7 - Crescimento micelial de *Cercospora coffeicola*, em BDA, exposto a compostos voláteis produzidos por *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), isolado de produto comercial Dipel PM[®]. A: Controle; B e C: 4,5 e 6,0 x 10⁸ UFC de *Bt* mL^{-1} , respectivamente.....44
- Figura 8 - Crescimento micelial de *Cercospora coffeicola*, em BDA, exposto a compostos difusíveis produzidos por *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), isolado de produto comercial Dipel PM[®]. A: Controle; B e C: 4,5 e 6,0 x 10⁸ UFC de *Bt* mL^{-1} , respectivamente.....45
- Figura 9 - Índice de crescimento micelial (ICM) de *Cercospora coffeicola* sob compostos difusíveis e voláteis produzidos por *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), isolado de produto comercial Dipel PM[®], utilizado nas concentrações 4,5, 6,0 e 9,0 x 10⁸

- unidades formadoras de colônia (UFC) mL⁻¹. *- significativo a 5%; ^{ns}- não significativo.....45
- Figura 10 - Folhas de cafeeiro suscetível 'Mundo Novo' tratadas com polissacarídeos extraídos de *Saccharomyces cerevisiae*, 72 h antes da inoculação de *Cercospora coffeicola* e avaliadas 30 dias após a inoculação do patógeno. A, B, C e D: 0, 400, 800 e 1200 Eq µg de manose mL⁻¹, respectivamente.....47
- Figura 11 - Folhas de cafeeiro suscetível 'Mundo Novo' tratadas com polissacarídeos extraídos de *Saccharomyces cerevisiae*, 72 h antes da inoculação de *Cercospora coffeicola* e avaliadas 60 dias após a inoculação do patógeno. A, B, C e D: 0, 400, 800 e 1200 Eq µg de manose mL⁻¹, respectivamente.....49
- Figura 12 - Crescimento micelial de *Cercospora coffeicola* em BDA acrescido de polissacarídeos extraídos de *Saccharomyces cerevisiae*. A, B, C e D: 0, 400, 800 e 1200 Eq µg de manose mL⁻¹, respectivamente.....50
- Figura 13 - Índice de crescimento micelial (ICM) de *Cercospora coffeicola* sob diferentes concentrações de polissacarídeos extraídos de *Saccharomyces cerevisiae*. As concentrações de 400, 800 e 1200 Eq µg de manose mL⁻¹ foram incorporadas em meio BDA. ^{ns}- não significativo.....51
- Figura 14 - Folhas de cafeeiro suscetível 'Mundo Novo' tratadas com proteína harpina 72 h antes da inoculação de *Cercospora coffeicola* e avaliadas 30 dias após a inoculação do patógeno. A, B, C, D, E e F: 0; 7,5; 15; 30; 60 e 120 µg mL⁻¹ de proteína harpina, respectivamente.....53
- Figura 15 - Folhas de cafeeiro suscetível 'Mundo Novo' tratadas com proteína harpina 72 h antes da inoculação de *Cercospora coffeicola* e avaliadas 60 dias após a inoculação do patógeno. A, B, C, D, E e F: 0; 7,5; 15; 30; 60 e 120 µg mL⁻¹ de proteína harpina, respectivamente.....55
- Figura 16 - Crescimento micelial de *Cercospora coffeicola* em BDA, exposto a diferentes concentrações de harpina incorporadas no meio. A, B, C, D e E: 0; 7,5; 15; 30 e 60 µg mL⁻¹ de proteína harpina, respectivamente.....57
- Figura 17 - Crescimento micelial de *Cercospora coffeicola* em BDA, exposto a diferentes concentrações de harpina espalhadas sobre o meio. A, B, C, D, E e F: 0; 7,5; 15; 30; 60 e 120 µg mL⁻¹ de proteína harpina, respectivamente.....57
- Figura 18 - Índice de crescimento micelial (ICM) de *Cercospora coffeicola* sob diferentes concentrações de harpina. As concentrações 7,5; 15; 30; 60 e 120 µg mL⁻¹ de proteína harpina do produto comercial Messenger[®] foram espalhadas em meio BDA. *- significativo a 5%.....58

- Figura 19 - Índice de crescimento micelial (ICM) de *Cercospora coffeicola* sob diferentes concentrações de harpina. As concentrações 7,5; 15; 30 e 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína harpina do produto comercial Messenger[®] foram incorporadas em meio BDA. ^{ns} – não significativo.....58
- Figura 20 - Folhas de café suscetível 'Mundo Novo' tratadas com ASM, proteína harpina e polissacarídeos extraídos de *S. cerevisiae* 72 h e 30 dias após a inoculação de *C. coffeicola*. A: controle; aplicação 72 h antes da inoculação com o patógeno: B (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ASM), D (15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína harpina), F (400 Eq μg de manose mL^{-1} *S. cerevisiae*); aplicação 72 h antes e 30 dias após a inoculação do patógeno: C (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ASM), E (15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína harpina), G (400 Eq μg de manose mL^{-1}). Todos os tratamentos foram avaliados 70 dias após a inoculação do patógeno.....64
- Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose (0,8%), corado com brometo de etídeo, de RNAs extraídos de folhas de café 'Mundo Novo' aspergidas ou não com ASM e proteína harpina nas concentrações 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. **(M)** Marcador de peso molecular 1Kb; **(1)** Tratamento com água deionizada esterilizada; **(2)** plantas somente tratadas com ASM, sendo o RNA extraído após 72 h; **(3)** plantas somente tratadas com proteína harpina, sendo o RNA extraído após 72 h; **(4)** plantas tratadas com ASM e inoculadas após 72 h, sendo que, depois da inoculação as extrações foram feitas em 48 h; **(5)** 72 h; **(6)** 7 dias; **(7)** plantas tratadas com proteína harpina e inoculadas após 72 h, sendo que, depois da inoculação as extrações foram feitas em 48 h; **(8)** 72 h; **(9)** 7 dias; **(10)**, **(11)** e **(12)** plantas somente inoculadas, sendo o RNA extraído após 48 h, 72 h e 7 dias, respectivamente.....65
- Figura 22 - Análise do nível de expressão do gene codificador da proteína com domínios ricos em leucina (LRR). (1) Tratamento com água deionizada esterilizada; (2) plantas somente tratadas com ASM, sendo o RNA extraído após 72 h; (3) plantas tratadas com ASM e inoculadas após 72 h, sendo que, depois da inoculação as extrações foram feitas em 48 h; (4) 72 h; (5) 7 dias; (6) plantas somente tratadas com proteína harpina, sendo o RNA extraído após 72 h; (7) plantas tratadas com proteína harpina e inoculadas após 72 h, sendo que, depois da inoculação as extrações foram feitas em 48 h; (8) 72 h; (9) 7 dias; (10), (11) e (12) plantas somente inoculadas, sendo o RNA extraído após 48 h, 72 h e 7 dias, respectivamente.*Níveis normalizados da expressão do gene LRR.....67
- Figura 23 - Análise do nível de expressão do gene codificador de ACC oxidase. (1) Tratamento com água deionizada esterilizada; (2) plantas somente tratadas com ASM, sendo o RNA extraído após 72 h; (3) plantas tratadas com ASM e inoculadas após 72 h, sendo que, depois da inoculação as extrações foram feitas em 48 h; (4) 72 h; (5) 7 dias; (6) plantas somente tratadas com proteína harpina, sendo o RNA extraído após 72 h; (7) plantas tratadas com proteína harpina e inoculadas após 72 h, sendo que, depois da inoculação as extrações foram feitas em 48 h; (8) 72 h; (9) 7 dias; (10), (11) e (12) plantas somente inoculadas, sendo o RNA extraído após 48 h, 72 h e 7 dias,

respectivamente.*Níveis normalizados da expressão do gene de ACC oxidase.....68

Figura 24 - Análise do nível de expressão do gene codificador de β -1,3-glucanase. (1) Tratamento com água deionizada esterilizada; (2) plantas somente tratadas com ASM, sendo o RNA extraído após 72 h; (3) plantas tratadas com ASM e inoculadas após 72 h, sendo que, depois da inoculação as extrações foram feitas em 48 h; (4) 72 h; (5) 7 dias; (6) plantas somente tratadas com proteína harpina, sendo o RNA extraído após 72 h; (7) plantas tratadas com proteína harpina e inoculadas após 72 h, sendo que, depois da inoculação as extrações foram feitas em 48 h; (8) 72 h; (9) 7 dias; (10), (11) e (12) plantas somente inoculadas, sendo o RNA extraído após 48 h, 72 h e 7 dias, respectivamente te.*Níveis normalizados da expressão do gene de β -1,3-glucanase.....71

Figura 25 - Análise do nível de expressão do gene codificador de ascorbato peroxidase. (1) Tratamento com água deionizada esterilizada; (2) plantas somente tratadas com ASM, sendo o RNA extraído após 72 h; (3) plantas tratadas com ASM e inoculadas após 72 h, sendo que, depois da inoculação as extrações foram feitas em 48 h; (4) 72 h; (5) 7 dias; (6) plantas somente tratadas com proteína harpina, sendo o RNA extraído após 72 h; (7) plantas tratadas com proteína harpina e inoculadas após 72 h, sendo que, depois da inoculação as extrações foram feitas em 48 h; (8) 72 h; (9) 7 dias; (10), (11) e (12) plantas somente inoculadas, sendo o RNA extraído após 48 h, 72 h e 7 dias, respectivamente.*Níveis normalizados da expressão do gene de ascorbato peroxidase.....72

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Seqüências de *primers* de genes de cafeeiro para as análises de expressão gênica temporal por RT-PCR quantitativo.....29
- Tabela 2 - Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com acibenzolar S-metil (ASM), 72 h antes da inoculação com *Cercospora coffeicola*.....32
- Tabela 3 - Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com acibenzolar-S-metil (ASM), 72 h antes da inoculação com *Cercospora coffeicola*.....34
- Tabela 4 - Crescimento micelial de *Cercospora coffeicola* sob diferentes concentrações de acibenzolar-S-metil (ASM).....37
- Tabela 5 - Germinação *in vitro* de conídios de *Cercospora coffeicola* sob diferentes concentrações de acibenzolar-S-metil (ASM).....39
- Tabela 6 - Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com o produto comercial Dipel PM[®], 72 h antes da inoculação com *Cercospora coffeicola*.....40
- Tabela 7 - Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com o produto comercial Dipel PM[®], 72 h antes da inoculação com *Cercospora coffeicola*.....41
- Tabela 8 - Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com *Bacillus thuringiensis* isolado do produto comercial Dipel PM[®], 72 h antes da inoculação com *Cercospora coffeicola*.....42
- Tabela 9 - Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com *Bacillus thuringiensis* isolado do produto comercial Dipel PM[®], 72 h antes da inoculação com *Cercospora coffeicola*.....43
- Tabela 10 - Crescimento micelial de *Cercospora coffeicola* sob diferentes concentrações de *Bacillus thuringiensis*.....44
- Tabela 11 - Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com polissacarídeos extraídos de *Saccharomyces cerevisiae*, 72 h antes da inoculação com *Cercospora coffeicola*.....47

Tabela 12 - Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com polissacarídeos extraídos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 72 h antes da inoculação com <i>Cercospora coffeicola</i>	48
Tabela 13 - Crescimento micelial de <i>Cercospora coffeicola</i> sob diferentes concentrações de polissacarídeos extraídos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
Tabela 14 - Germinação <i>in vitro</i> de conídios de <i>Cercospora coffeicola</i> na presença de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51
Tabela 15 - Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com proteína harpina, 72 h antes da inoculação com <i>Cercospora coffeicola</i>	52
Tabela 16 - Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com proteína harpina, 72 h antes da inoculação com <i>Cercospora coffeicola</i>	54
Tabela 17 - Crescimento micelial de <i>Cercospora coffeicola</i> sob diferentes concentrações de harpina.....	56
Tabela 18 - Germinação <i>in vitro</i> de conídios de <i>Cercospora coffeicola</i> sob diferentes concentrações da proteína harpina.....	59
Tabela 19 - Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com ASM, proteína harpina e polissacarídeos extraídos de <i>S. cerevisiae</i> , 72 h antes e 30 dias após a inoculação com <i>Cercospora coffeicola</i>	62

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1 - Resultados da análise quantitativa da expressão do gene codificador da proteína LRR em cafeeiro 'Mundo Novo' por PCR em tempo real.....91
- Anexo 2 - Resultados da análise quantitativa da expressão do gene codificador de ACC oxidase em cafeeiro 'Mundo Novo' por PCR em tempo real.....92
- Anexo 3 - Resultados da análise quantitativa da expressão do gene codificador de β -1,3-glucanase em cafeeiro 'Mundo Novo' por PCR em tempo real.....93
- Anexo 4 - Resultados da análise quantitativa da expressão do gene codificador de ascorbato peroxidase em cafeeiro 'Mundo Novo' por PCR em tempo real.....94

ABREVIações E SIGLAS

2^{os} – segundos

3^{os} – terceiros

4^{os} – quartos

ACC oxidase - ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano oxidase

AS – Ácido salicílico

ASM – Acibenzolar-S-metil

BABA – Ácido β-aminobutírico

Bt – *Bacillus thuringiensis*

cDNA – Ácido Desoxirribonucléico

CONAB – Companhia Nacional do Abastecimento

dNTP – Desoxirribonuclotídeos

Eq – Equivalente

EDTA – Ácido Etileno-diamino-tetraacético

FAL – Fenilalanina Amônia Liase

HSS – Hibridização Subtrativa por Supressão

ICO – International Coffee Organization

ISR – ‘Induced Systemic Resistance’

LRR – Repetições Ricas em Leucina

Proteína-RP – Proteína relacionada à patogênese

qRT-PCR – quantitative Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction

RNA – Ácido Ribonucléico

SAR – ‘Systemic Acquired Resistance’

TAE – Tris-acético-EDTA

TMV – Tobacco mosaic virus

UFC – Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ANEXOS	xvi
ABREVIações E SIGLAS	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
3. REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1. Botânica e Origem.....	3
3.2. Importância econômica.....	3
3.3. Cercosporiose do cafeeiro.....	4
3.4. Indução de resistência.....	7
3.5. Mecanismos bioquímicos envolvidos na indução de resistência.....	9
3.6. Genes envolvidos na indução de resistência.....	11
3.7. Acibenzolar-S-metil (ASM).....	13
3.8. <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
3.9. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
3.10. Proteína harpina.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Material vegetal.....	17
4.2. Patógeno.....	18
4.3. Obtenção dos agentes bióticos e abiótico.....	18
4.3.1. Acibenzolar-S-metil (ASM).....	18
4.3.2. <i>Bacillus thuringiensis</i>	19
4.3.3. Extrato de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
4.3.4. Proteína harpina.....	20
4.4. Obtenção do inóculo.....	21
4.5. Avaliação do efeito dos agentes bióticos e abiótico na proteção de plantas de cafeeiro contra <i>C. coffeicola</i>	21
4.6. Avaliação do efeito dos agentes bióticos e abiótico quando re-aplicados em cafeeiro na proteção contra <i>C. coffeicola</i>	22

4.7. Avaliação do efeito dos agentes bióticos e abiótico sobre o crescimento micelial de <i>C. coffeicola</i>	23
4.8. Avaliação do efeito dos agentes bióticos e abiótico na germinação de conídios <i>C. coffeicola</i>	25
4.9. Estudos moleculares	25
4.9.1. Tratamento das plantas de café 'Mundo Novo' com acibenzolar-S-metil e proteína harpina e inoculação com <i>C. coffeicola</i> para a extração de RNA total.....	25
4.9.2. Extração de RNAs totais	26
4.9.3. Digestão com <i>Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (DNase I Amp Grade)</i> .	27
4.9.4. Síntese de DNA complementar (cDNA)	27
4.9.5. Síntese de <i>primers</i> de genes de cafeeiro	28
4.9.6. Amplificação com <i>primers</i> específicos dos genes de cafeeiro	29
4.9.7. Análise quantitativa (qRT-PCR) da expressão de genes de cafeeiro por PCR em tempo real	30
4.10. Análise dos resultados	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. Avaliação dos efeitos dos agentes bióticos e abiótico na proteção de cafeeiros a cercosporiose e no desenvolvimento de <i>C. coffeicola in vitro</i>	31
5.1.1. Avaliação do efeito do acibenzolar-S-metil <i>in vivo</i>	31
5.1.2. Avaliação do efeito <i>in vitro</i> do acibenzolar-S-metil sobre <i>C. coffeicola</i>	36
5.1.3. Avaliação do efeito do produto comercial Dipel PM [®] <i>in vivo</i>	39
5.1.4. Avaliação do efeito <i>in vivo</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> isolado do produto comercial Dipel PM [®]	41
5.1.5. Avaliação do efeito <i>in vitro</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> isolado do produto comercial Dipel PM [®]	43
5.1.6. Avaliação do efeito dos polissacarídeos extraídos de <i>Saccharomyces cerevisiae in vivo</i>	46
5.1.7. Avaliação do efeito dos polissacarídeos extraídos de <i>Saccharomyces cerevisiae in vitro</i>	49
5.1.8. Avaliação do efeito da proteína harpina <i>in vivo</i>	51
5.1.9. Avaliação do efeito da proteína harpina <i>in vitro</i>	55

5.1.10. Avaliação dos efeitos de ASM, proteína harpina e polissacarídeos extraídos de <i>S. cerevisiae</i> quando aplicados e re-aplicados em cafeeiro na proteção contra <i>C. coffeicola</i>	60
5.2. Estudos Moleculares	65
5.2.1. Eletroforese de RNAs de cafeeiro 'Mundo Novo' extraídos de plantas controle ou tratadas com ASM ou proteína harpina	65
5.2.2. Análise da expressão dos genes por qRT-PCR	66
5.2.2.1. Análise da expressão do gene codificador da proteína com domínios ricos em leucina (LRR)	66
5.2.2.2. Análise da expressão do gene codificador de ACC oxidase	67
5.2.2.3. Análise da expressão do gene codificador de β -1,3-glucanase	69
5.2.2.4. Análise da expressão do gene codificador de ascorbato peroxidase	72
6. CONCLUSÕES	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador e o segundo consumidor mundial de café, sendo que os maiores Estados produtores são Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Paraná (CONAB, 2009).

Para que o Brasil continue a liderar a produção e exportação do café é necessária a modernização da produção, tanto pelo uso de cultivares com boas características agronômicas, como pelo controle fitossanitário e cuidados na pós-colheita (PEREIRA, 2006), pois a deficiência nutricional, o manejo inadequado da lavoura, as pragas e as doenças são os principais responsáveis pela redução da qualidade e da produtividade do cafeeiro (JÚNIOR et al., 2003).

Dentre as doenças que atingem o cafeeiro, a cercosporiose é uma das mais antigas e importantes. Seu agente etiológico, *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke, disseminado por vento, água ou insetos, está presente de forma endêmica em quase todas as regiões que apresentam condições favoráveis ao seu desenvolvimento (MATIELLO, 2002). Os principais prejuízos ocasionados pela cercosporiose consistem na queda de folhas e raquitismo das mudas em condições de viveiro e, em lavouras novas, acarreta queda de folhas, de frutos e a seca de ramos produtivos, após as primeiras produções. Em lavouras adultas, causa amadurecimento precoce, queda prematura e chochamento dos frutos, depreciando a qualidade do café (CARVALHO; DA CUNHA; MOURA, 2008).

Essa doença vem sendo controlada pelo manejo e práticas culturais e/ou pela aplicação de fungicidas de contato e/ou sistêmicos, como os triazóis, estrobirulinas e outros. Porém, um dos maiores desafios para os pesquisadores tem sido desenvolver e estabelecer métodos eficientes de controle de pragas e doenças de baixo impacto ambiental. Nesse contexto, a indução de resistência em plantas constitui-se em uma importante ferramenta para o manejo fitossanitário sustentável e integrado, através da utilização de produtos bióticos ou abióticos, menos tóxicos ao homem e ao meio ambiente, que atuam como indutores dos mecanismos de defesa inerentes das plantas (STANGARLIN; PASCHOLATI, 1994; RYALS et al., 1996; GUZZO et al., 2001).

A resistência ativada em plantas normalmente suscetíveis a um determinado patógeno, em resposta à aplicação de diferentes produtos ou microrganismos, é conhecida como resistência sistêmica adquirida ou resistência induzida e vem sendo demonstrada em várias interações planta-patógeno, podendo resultar em uma proteção sistêmica a longo prazo contra uma ampla variedade de patógenos (MÉTRAUX, 2001; HAMMERSCHMIDT; MÉTRAUX; VAN LOON, 2001).

Diversos indutores de resistência abióticos vêm sendo utilizados nesses estudos,

como por exemplo, o composto éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7-carbotióico (acibenzolar-S-metil, ASM). A aplicação prévia de ASM em plantas resulta na ativação de diversos mecanismos de defesa, conferindo proteção sistêmica contra diferentes patógenos em várias culturas, como o feijoeiro, cacauzeiro e cafeeiro (GUZZO et al., 2001; RESENDE et al., 2002; IRITI; FAORO, 2003a; PATRÍCIO et al., 2007; NOJOSA et al., 2009). Diferentes agentes bióticos apresentam, também, efeitos significativos como ativadores de mecanismos de defesa de plantas protegendo-as contra o efeito de diversas doenças como, por exemplo, a proteína harpina isolada de *Erwinia amylovora*, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria anaeróbica facultativa *Bacillus thuringiensis* (ROVERATTI; TEIXEIRA; MORAES, 1989; CAPDEVILLE et al., 2003; BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005; PICCININ; DI PIERO; PASCHOLATI, 2005; CIA, 2005).

As bases bioquímicas e moleculares envolvidas na indução de resistência em plantas vêm sendo investigadas em diversas interações planta-patógeno, como também as vias sinalizadoras que resultam no aumento de resistência a pragas e doenças. Entretanto, há ainda uma insuficiência de estudos relacionados ao modo de ação de produtos que atuam como indutores de resistência e aos mecanismos moleculares envolvidos na ativação de respostas de defesa. Em cafeeiro, a elucidação desses aspectos contribuirá para o emprego de agentes bióticos e abióticos como indutores de resistência visando o manejo integrado de pragas e doenças, sem causar danos ao meio ambiente.

2. OBJETIVOS

Tendo em vista o exposto, este trabalho teve como objetivos:

- 1- Avaliar os efeitos dos agentes bióticos *Bacillus thuringiensis*, polissacarídeos de *Saccharomyces cerevisiae* e proteína harpina, e do indutor abiótico, acibenzolar-S-metil (ASM), na proteção de cafeeiro contra *Cercospora coffeicola*.
- 2- Avaliar os efeitos de *B. thuringiensis*, de polissacarídeos de *S. cerevisiae* e da proteína harpina, e do agente abiótico ASM, no crescimento micelial e germinação de conídios de *C. coffeicola*.
- 3- Avaliar a expressão temporal e quantitativa de genes envolvidos na resistência ativada em cafeeiro pelos indutores mais efetivos, em folhas de plantas induzidas à resistência e/ou inoculadas com o patógeno *C. coffeicola*, utilizando-se *primers* específicos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Botânica e Origem

O café pertence à família das *Rubiaceas*, gênero *Coffea* L. e este compreende 103 espécies. As espécies desse gênero podem ser agrupadas em dois subgêneros: *Baracoffea* (J.-F. Leroy) J.-F. Leroy (8 espécies) e *Coffea* (95 espécies), sendo esse a de maior importância econômica, pois abrange as espécies mais cultivadas para o consumo do café, *C. arabica* e *C. canephora* (DAVIS et al., 2006; MAURIN et al., 2007).

O porte das plantas de café é arbustivo ou arbóreo, de caule lenhoso, lignificado, reto e quase cilíndrico. Os ramos são dimórficos e podem ser classificados como ortotrópicos (crescem em sentido vertical formando hastes e troncos) ou plagiotrópicos (crescem na horizontal saindo das hastes). As folhas são opostas, coriáceas e persistentes, tendo a coloração verde escura e brilhante na região adaxial e na abaxial é mais clara e opaca. As flores são hermafroditas e de cor branca, podendo ser amareladas ou rosa claro; o fruto quando maduro é, normalmente, vermelho ou amarelo e é classificado como drupa contendo, normalmente, duas sementes (MATIELLO, 2002).

O café é uma planta nativa da Etiópia, país do leste da África, e apesar de existir aproximadamente há mil anos, o primeiro registro comprovado da existência do café é datado do século XV (SMITH, 1985) quando, casualmente, pastores de cabras perceberam que quando os animais comiam daquela pequena cereja (o fruto do café) tornavam-se mais espertos e resistentes (RELVAS, 1997).

A história do cultivo de café começou no Oriente Médio com a espécie *C. arabica* e chegou à Europa levado por navegantes e aventureiros holandeses, alemães e italianos (NEVES, 1974). Em 1718, devido ao intenso comércio marítimo holandês, o café chegou ao continente Americano (FERRÃO, 2004) e, Eccardi e Sandalj (2003) relataram que as primeiras sementes de café foram introduzidas no Brasil durante as primeiras décadas do século XVII, a partir das Guianas Francesas para o norte do país, seguindo então para as regiões localizadas no sul.

3.2. Importância econômica

O mercado mundial do café movimenta anualmente bilhões de dólares, situando esta cultura como uma das mais importantes do comércio mundial de produtos agropecuários e despertando cada vez mais o interesse dos agricultores em aumentar a produtividade e reduzir os custos de produção.

O café representa uma fonte significativa de renda para vários países da América Latina, África e Ásia (DA MATTA, 2004). O Brasil é o maior produtor e exportador mundial, com 36,2% da produção total, seguido do Vietnã, com 12,6%, da Colômbia, com 8,3%, e da Etiópia e Indonésia, com 4,8% e 4,6%, respectivamente (ICO, 2009).

A produção total de café (arábica e conilon) na safra 2009 indica que o Brasil colheu 47 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado, sendo que a produção de arábica representa 72,5% (28,3 milhões de sacas de café beneficiado) da produção do País, e tem como maior produtor o Estado de Minas Gerais, com 66% (18,97 milhões de sacas de café beneficiado). O café conilon (robusta) participa da produção nacional com 27,51% (10,75 milhões de sacas de café beneficiado) e o Estado do Espírito Santo se destaca como o maior produtor dessa variedade, com 70,3%, correspondendo a 7,55 milhões de sacas de café beneficiado (CONAB, 2009).

Nos últimos 16 anos o consumo de café praticamente dobrou no Brasil, tornando o brasileiro o segundo consumidor mundial (PEREIRA, 2006; FILHO, 2007). Considerando-se o período de apuração da Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC), que ocorreu de novembro a outubro, os brasileiros consumiram 17,7 milhões de sacas em 2008, representando um crescimento de 3,4% em relação ao ano de 2007, quando o consumo foi de 17,1 milhões de sacas (ABIC, 2009). Estes aspectos do mercado revelam um quadro com boas perspectivas para aqueles que estejam vinculados ao processo produtivo do café.

Para que o Brasil continue a liderar a produção e exportação do café é necessária a modernização da produção, tanto pelo uso de cultivares com boas características agrônomicas, como pelo controle fitossanitário e cuidados na pós-colheita (PEREIRA, 2006), pois a deficiência nutricional, o manejo inadequado da lavoura, as pragas e as doenças são os principais responsáveis pela redução de qualidade e da produtividade do cafeeiro (JÚNIOR et al., 2003).

3.3. Cercosporiose do cafeeiro

Os ataques severos de pragas e doenças, crescentes ao longo dos últimos anos devido aos desequilíbrios climáticos e outros, causam grandes perdas na produção e qualidade do café, exigindo despesas adicionais de 15% a 20% no manejo dos cafezais (MATIELLO et al., 2002). Entre as principais doenças que atingem o cafeeiro, pode-se citar a cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke.), a ferrugem do café (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome), a mancha areolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae* Young, Dye & Wilkie), a requeima (*Phoma costarricensis* Echandi) (PATRÍCIO et al., 2007), a rhizoctoniose (*Thanatephorus cucumeris*), o mal-dos-quatro anos (*Rosellinia* spp.), a antracnose (*Colletotrichum coffeanum*) (GALLI; CARVALHO, 1980; GODOY; BERGAMIN;

SALGADO, 1997), e o amarelinho (*Xylella fastidiosa*) (MATIELLO et al., 2002).

A cercosporiose, conhecida como mancha-de-olho-pardo, mancha-circular, olho-de-pomba ou olho-pardo, causada pelo fungo necrotrófico *C. coffeicola*, é uma das doenças mais antigas do cafeeiro. Atualmente, sua ocorrência é endêmica, estando presente em todas as regiões cafeeiras do Brasil e do Mundo (CARVALHO; CHALFOUN, 1998; JÚNIOR et al., 2003), ocasionando perdas na produtividade, além de afetar o tipo e a qualidade do café produzido (CARVALHO; DA CUNHA; MOURA, 2008).

Seu agente etiológico pertence à classe dos Hyphomycetes, ordem Moniliales, família Dematiaceae. Crous e Braun (2003) mencionam a existência de fase sexual do patógeno, a qual corresponderia a *Mycosphaerella coffeicola*. No entanto, segundo Martins (2007), não há trabalhos que confirmem a relação entre as duas espécies. As estruturas reprodutivas de *C. coffeicola*, conidióforos e conídios, formam-se no centro das lesões em ambas as faces das folhas (ZAMBOLIM et al., 1997; MARTINS, 2007). Os conidióforos são cilíndricos, septados e de coloração pálida a marrom, agrupados em fascículos e conformação de esporodóquios. Na extremidade dos conidióforos formam-se os conídios hialinos e multisseptados, de extremidade afilada, com 100-270 µm de comprimento e 3-4 µm de diâmetro (CHUPP, 1953).

Em meio de cultura as colônias apresentam coloração micelial distinta dependendo das condições de luminosidade. Quando são mantidas no escuro as colônias variam de preto-esverdeado, no início do desenvolvimento, a branco leitoso até pardo no final; porém, na presença de luz pode haver produção do pigmento cercosporina, de cor vermelha, e, conseqüentemente, a cor do micélio varia de vermelho claro a intenso, dependendo do isolado em questão (DAUB; HERRERO; CHUNG, 2005; MARTINS, 2007).

A cercosporina, toxina produzida por fungos do gênero *Cercospora*, é incluída no grupo químico das *perylenequinonas*, o qual inclui compostos sintéticos e naturais de moléculas fotossensibilizadoras (DAUB; EHRENSHAFT, 2000) e a principal característica do grupo é a capacidade de absorver energia luminosa. Na presença de luz, a cercosporina torna-se excitada e capaz de reagir com outras moléculas sendo o principal alvo de reação o oxigênio. Esse, ao reagir com a cercosporina, é convertido em espécies de oxigênio reativas, altamente tóxicas por poderem interagir e degradar macromoléculas como DNA e proteínas (DAUB, 1982), além de danificarem as membranas celulares do hospedeiro. As células danificadas pela cercosporina mostram um acúmulo de produtos da peroxidação de lipídeos e um aumento acentuado na taxa de conversão de ácidos graxos saturados para insaturados. De fato, estudos sobre a infecção de plantas por espécies de *Cercospora* mostraram uma forte correlação entre a severidade da doença e alta intensidade de luz e duração do período diurno. Por exemplo, poucas lesões são produzidas por *C. coffeicola* em folhas de cafeeiro sombreadas. Echandi (1959), antes mesmo da descoberta da

cercosporina, já havia evidenciado a importância da luminosidade na ocorrência e desenvolvimento da cercosporiose em cafeeiro. A cercosporina pode ser isolada de lesões em plantas infectadas por espécies do gênero *Cercospora*, evidenciando sua produção durante o desenvolvimento da doença, sendo necessária para a expressão dos sintomas (DAUB; HERRERO; CHUNG, 2005). Embora seja claro que a cercosporina é necessária para o desenvolvimento normal da doença, a forma específica de atuação dessa toxina não é completamente conhecida. Daub; Herrero; Chung (2005) aventaram a hipótese de que a cercosporina mata as células do hospedeiro e permite acesso aos nutrientes através da peroxidação dos lipídeos da membrana celular, levando à liberação de nutrientes para os espaços intercelulares onde as hifas do fungo se desenvolvem.

Em cafeeiro, a esporulação do fungo pode ocorrer em toda a região abaxial do limbo foliar e nos frutos, formando esporodóquios e sendo disseminados por vento, água ou insetos (ECHANDI, 1959; GODOY; BERGAMIN; SALGADO, 1997). Custódio (2008) relata que os conídios de *C. coffeicola* podem sobreviver por mais de sete semanas em folhas destacadas e permanecer viáveis por quase nove meses na superfície foliar, aguardando condições favoráveis para poder invadir as células do hospedeiro.

O conídio emite tubo germinativo que penetra pelas aberturas estomatais (ZAMBOLIM et al., 1997) e coloniza os tecidos inter e intracelularmente por meio das hifas. As células, ao redor do ponto de penetração, são plasmolisadas até ficarem translúcidas e delimitadas unicamente pelas paredes celulares (FERNANDÉZ-BORRERO, 1982). Os sintomas da doença nas folhas manifestam-se como manchas de configuração circular, com 0,5 a 1,5 cm de diâmetro, de coloração pardo-clara ou marrom-escura, com centro branco-acinzentado, envolvidas por anel arroxeadado e apresentando um pequeno halo amarelado (GALLI; CARVALHO, 1980; GODOY; BERGAMIN; SALGADO, 1997). No centro das lesões, em estágio mais avançado, geralmente são observadas pequenas pontuações pretas, que constituem as estruturas de frutificação do fungo. As folhas atacadas caem rapidamente, ocorrendo desfolha e seca nos ramos (ECHANDI, 1959). Em condições de viveiro, causa desfolha intensa, provocando atraso no desenvolvimento e raquitismo das plantas, tornando-as impróprias para o plantio (POZZA et al., 2001; JÚNIOR et al., 2003; BOTELHO et al., 2005).

Nos frutos, as lesões começam a aparecer quando estes estão ainda pequenos, aumentando o ataque no início da granação. As lesões permanecem até o amadurecimento dos frutos e seu aparecimento ocorre principalmente nas partes expostas à insolação (ECHANDI, 1959). À medida que as manchas envelhecem, assumem um aspecto ressecado e escuro, fazendo com que a casca, nessa parte, fique aderente à semente, o que, em ataques mais severos, causa o seu chochamento (GODOY; BERGAMIN; SALGADO, 1997), mas em alguns casos, pode ocorrer queda prematura dos frutos

(ECHANDI, 1959; MATIELLO et al., 2002).

Os prejuízos com a doença ganharam maior importância econômica nos últimos anos, devido a 30% de perda no rendimento (JÚNIOR et al., 2003) culminando na depreciação do café, tornando-se, portanto, um problema sério para a economia.

As medidas de controle da doença de caráter preventivo incluem cuidados na formação das mudas, procurando-se evitar condições favoráveis à doença por meio de práticas culturais, como formação de viveiros em local bem drenado e arejado, utilização de substratos balanceados em nutrientes, com boas propriedades físicas, controle da irrigação e do excesso de insolação nas mudas (GODOY; BERGAMIN; SALGADO, 1997). O controle químico da doença é realizado através de aplicações de fungicidas protetores cúpricos alternados com fungicidas sistêmicos. São bastante utilizados os fungicidas dos grupos químicos triazóis e estrobirulinas, visando o controle simultâneo da cercosporiose e ferrugem alaranjada (MATIELLO et al., 2002; PEREIRA, 2006). Entretanto, pelo seu efeito na microbiota, eliminando inimigos naturais, pode levar ao agravamento de outras doenças e pragas do cafeeiro (MATIELLO et al., 2002; ZAMBOLIM et al., 2002).

Um dos maiores desafios para os pesquisadores tem sido determinar métodos eficientes de controle, porém de baixo impacto ambiental e uma das abordagens consiste na utilização de cultivares com resistência a patógenos, porém, até o momento, não existem cultivares de café resistentes a cercosporiose. Entretanto, há também a perspectiva promissora do controle de doenças pela ativação dos mecanismos de defesa inerentes das plantas, através da aplicação prévia de produtos bióticos (microorganismos viáveis ou inativados) (STANGARLIN; PASCHOLATI, 1994) ou abióticos, não tóxicos, que atuam como indutores de resistência (RYALS et al., 1996; GUZZO et al., 2001; MARTINATI et al., 2007), compondo dessa forma um manejo adequado, focalizando a redução de custos e perdas ocasionadas pela presença de patógenos (CAVALCANTI; RESENDE, 2004).

3.4. Indução de resistência

Os primeiros relatos de indução de resistência foram descritos por Beauverie (1901) e Ray (1901) que observaram o fenômeno em begônias pelo uso de isolados atenuados de *Botrytis cinerea* e relacionaram a indução com as condições ambientais de cultivo. No Brasil, os primeiros estudos de indução de resistência foram desenvolvidos pela Dr^a. Walkyria B. C. Moraes ao usar uredíniosporos inativados de *H. vastatrix* em plantas de cafeeiro contra a ferrugem alaranjada (MORAES et al, 1976; BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005).

A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existente em plantas suscetíveis, ocorrendo naturalmente como resultado de uma infecção limitada do patógeno, particularmente quando a planta desenvolve uma reação de

hipersensibilidade (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998), ou em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos, sendo conhecida como resistência sistêmica adquirida (SAR – “Systemic acquired resistance”) ou indução de resistência sistêmica (ISR – “Induced systemic resistance”) (HAMMERSCHMIDT; MÉTRAUX; VAN LOON, 2001). A SAR tem sido demonstrada em várias interações hospedeiro-patógeno, conferindo proteção sistêmica de longa duração e amplo espectro, sendo efetiva contra doenças causadas por diferentes agentes bióticos, tais como, vírus, bactérias e fungos (ZHANG et al., 2003; DURRANT; DONG, 2004). O efeito protetor observado nas plantas depende das condições de luz, temperatura, das concentrações do indutor e do inóculo utilizadas e de um intervalo de tempo entre o tratamento inicial com os indutores de resistência e a inoculação subsequente com o patógeno (MADAMANCHI; KUĆ, 1991; KUĆ, 1995).

O fenômeno da SAR implica, também, na produção de um sinal liberado a partir do sítio inicial de penetração do patógeno ou do local de aplicação do indutor e sua posterior translocação para outras partes da planta, ativando reações de defesa e impedindo, à distância, uma posterior infecção do patógeno (MÉTRAUX, 2001). A resistência induzida é um fenômeno biológico complexo (DANTAS et al., 2004) que envolve a ativação de diferentes vias sinalizadoras de respostas de defesa mediadas especialmente por ácido salicílico (PIETERSE et al., 1998; CLARKE et al., 1998), ácido jasmônico e/ou etileno (RESENDE et al., 2007). A resistência sistêmica pode também ser induzida por rizobactérias (PIETERSE et al., 1998; PIETERSE et al., 2001; RESENDE et al., 2007), que normalmente ativam nas plantas uma cascata de sinalização de defesas mediada pelo ácido jasmônico e/ou etileno, tal como as linhagens de *Pseudomonas fluorescens* (PIETERSE et al., 2001).

Sabe-se que as vias de sinalização mediadas pelo ácido salicílico, etileno e ácido jasmônico interagem de diferentes formas entre si nas respostas de defesa (LORENZO; SOLANO, 2005). Por exemplo, Lorenzo et al. (2003) constataram em *Arabidopsis* que o fator de transcrição ERF-1 (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR-1*), relacionado com a expressão de genes de defesa, é induzido tanto em resposta ao ácido jasmônico como ao etileno. Apesar de ERF-1 ser ativado por qualquer uma das vias, mutações que bloqueiam uma delas limitam a expressão de *ERF-1*. Além disso, a indução simultânea destas vias potencializa a expressão de *ERF-1*, o que sugere que este fator de transcrição é um integrador das vias do etileno e do ácido jasmônico, fato este também observado por Berrocal-Lobo, Molina e Solano (2002) em plantas de *Arabidopsis* na resistência ativada contra patógenos necrotróficos como *Botrytis cinerea* e *Plectosphaerella cucumerina*.

Liu et al. (2008) observaram que em plantas de pepino tratadas com ácido salicílico houve resistência local ao patógeno *Colletotrichum orbiculare*, porém quando tratadas com ácido jasmônico as plantas apresentaram aumento de sintomas locais e sistêmicos da doença em relação ao controle tratado com água. Os mesmos autores confirmaram a

presença de quitinase, enzima relacionada à defesa de plantas, nas folhas tratadas com ácido salicílico, porém, a mesma enzima não foi detectada nas plantas tratadas com ácido jasmônico. Nikki et al. (1998) demonstraram que aplicações exógenas de ácido jasmônico em folhas de tabaco promoveram a supressão de genes regulados pelo ácido salicílico, do mesmo modo que a aplicação de ácido salicílico ou de seus análogos suprimiu a expressão de genes regulados pelo ácido jasmônico, o que demonstra uma ação antagônica entre as duas vias. Spoel et al. (2003) verificaram que parte deste antagonismo se deve ao fato de que o aumento nos níveis de ácido salicílico na célula reduz a expressão do gene *LOX2* que codifica a enzima lipoxigenase 2 (*LOX-2*), enzima chave na rota dos octadecanóides responsável pela produção de ácido jasmônico e afirmaram que a supressão de genes como *LOX2*, pelo aumento nos níveis de AS, pode estar relacionado à participação da proteína NPR1 envolvida na expressão de genes que codificam proteínas de defesa das plantas relacionadas à patogênese, como a PR-1 (CLARKE et al., 2000).

3.5. Mecanismos bioquímicos envolvidos na indução de resistência

A resistência de plantas contra doenças está associada a um conjunto de respostas ativadas no hospedeiro, após o contato com agentes bióticos, patogênicos ou não, ou abióticos. A ativação dessas respostas em plantas depende da eficiência do hospedeiro em reconhecer a presença desses agentes através de mecanismos de percepção e transdução de sinais, que envolvem alterações transitórias no fluxo de íons através da membrana plasmática e mudanças no estado de fosforilação de algumas proteínas (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

Estudos relacionados à resistência de plantas contra doenças detectaram o acúmulo de peróxido de hidrogênio, de fitoalexinas (LATUNDE-DADA; LUCAS, 2001; IRITI; FAORO, 2003a) e de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) como, por exemplo, β -1,3-glucanases e quitinases (GUZZO, 2004; QUERINO et al., 2005; SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007), que podem se constituir em excelentes marcadores moleculares de resposta de defesa (SHULAEV; LEON; RASKIN, 1995; RESENDE et al., 2007), e também um aumento na atividade de várias enzimas, tais como lipoxigenase, fenilalanina amônia-liase (FAL), chalcona isomerase, peroxidases, polifenol oxidases, arginina descarboxilase, aleno óxido sintase, ubiquitina ligases, ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano oxidase (KOHLENER; SCHWINDLING; CONRATH, 2002; RESENDE et al., 2002; MATHOOKO, 2004; LEQUEU et al., 2005; WALTERS; COWLEY; MITCHELL, 2002; PROST et al., 2005; VELLÓSILLO et al., 2007). Outros mecanismos de resistência ativados em plantas estão relacionados a alterações estruturais, levando ao fortalecimento da parede celular vegetal pelo depósito de calose e lignina ou pela formação de papila junto à parede celular no sítio

de penetração do patógeno. Outro mecanismo de resistência é a resposta de hipersensibilidade que resulta na morte localizada de células do hospedeiro no sítio de infecção (BENHAMOU; BELANGER, 1998).

As proteínas-RP são definidas como proteínas codificadas pela planta hospedeira e induzidas especificamente em um estado patológico ou em situações correlatas (VAN LOON et al., 1994; GUZZO; HARAKAVA; TSAI, 2004). Entende-se por situações correlatas a processos infecciosos, os estados induzidos em plantas por agentes químicos ou físicos que simulam o efeito de patógenos. De fato, o acúmulo de proteínas-RP em plantas tem sido observado não apenas após o ataque de patógenos ou parasitas como nematóides ou insetos fitófagos e herbívoros, como também em resposta ao tratamento com compostos químicos indutores de resistência (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999; AMARAL, 2005; SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007).

Entre as proteínas-RP mais pesquisadas estão as β -1,3-glucanases e as quitinases, pertencentes às famílias PR-2 e PR-3, respectivamente, que possuem atividade hidrolítica, quebrando polímeros estruturais presentes nas paredes dos patógenos (GUZZO; MARTINS, 1996; KIM; HWANG, 1997; SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007; PEREIRA et al., 2009a; PEREIRA et al., 2009b). O acúmulo e a síntese destas duas enzimas em tecidos vegetais foram detectados em plantas de tomate, soja, pepino e café, estando associadas à resistência induzida contra *Ralstonia solanacearum*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Hemileia vastatrix*, respectivamente (GUZZO; MARTINS, 1996; SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007; PEREIRA et al., 2009a; PEREIRA et al., 2009b).

Outra enzima utilizada como marcador molecular em estudos de ativação de mecanismos de defesa das plantas é a ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) oxidase, pois é responsável pela conversão do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) em etileno, este sendo um sinalizador para as respostas de defesa das plantas (WANG; LI; ECKER, 2002). Esta enzima foi detectada próxima dos estágios iniciais de desenvolvimento de lesões em folhas de tabaco em resposta a doenças causadas por TMV (*Tobacco mosaic virus*) (DE LAAT; VAN LOON, 1983) e *Phytophthora infestans* (SPANU; BOLLER, 1989). Recentemente, HUKKANEN et al. (2008) detectaram o aumento da ACC oxidase em plantas de amora ártica 'Mespi' tratadas com ASM e apontaram este aumento da atividade enzimática como sendo um fator importante na estratégia de controle da doença causada por *Peronospora sparsa*, já que não existem cultivares resistentes a este patógeno. Além disso, Yu et al. (2009) observaram que em tomates previamente tratados com metil jasmonato houve aumento da atividade da ACC oxidase quando inoculados com *Botrytis cinerea*, ativando a biossíntese do etileno como resposta de defesa ao patógeno.

Existem também proteínas com um domínio de ligação a nucleotídeos (NBS) na região N-terminal, e com uma região de repetições ricas em leucina (LRR) no C-terminal que

estão envolvidas em uma série de mecanismos de defesa nas plantas, como a ativação da explosão oxidativa, o fluxo de íons cálcio e as cascatas de proteínas quinases, associadas à indução de genes relacionados à patogênese e à resposta de hipersensibilidade (VAN DER BIEZEN; JONES, 1998; PEYYALA; FARMAN, 2006). Essas proteínas estão associadas aos mecanismos de reconhecimento nas interações planta-patógeno e conferem resistência a uma ampla gama de patógenos, incluindo bactérias, fungos, vírus e nematóides (WANG et al., 1999).

Além disso, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), é freqüentemente uma das primeiras respostas de defesa ativadas em plantas e pode ser responsável por desencadear o início da resposta de hipersensibilidade (GRANT; LOAKE, 2000). A produção de EROs pode resultar em um dano considerável não apenas para o patógeno, mas também para o hospedeiro, e requer que as células vegetais ativem um conjunto de mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo (BREUSEGEM et al., 2001; HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996). Após a produção de EROs pode ocorrer a transcrição de genes codificadores de enzimas antioxidantes nos tecidos adjacentes ao sítio de infecção, como a catalase, glutaciona-S-transferase (GST) e ascorbato peroxidase (SCANDALIOS, 2005).

Tanto a catalase como a ascorbato peroxidase protegem as células vegetais dos efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio, convertendo esse composto em água. Enquanto que a catalase elimina a maior parte ou porção livre de H_2O_2 , a ascorbato peroxidase remove esse composto dos tecidos vegetais nos locais inacessíveis à catalase, devido a sua alta afinidade por H_2O_2 e à sua presença em diferentes localizações sub-celulares (BREUSEGEM et al., 2001). Shetty et al. (2003) observaram em um cultivar resistente de trigo inoculado com *Septoria tritici*, um acúmulo de H_2O_2 , que foi correlacionado com a limitação do desenvolvimento desse patógeno nos tecidos vegetais. Além disso, através dos padrões de aumento na expressão de gene codificador de catalase e na atividade enzimática foi possível inferir que a catalase teve um papel regulador no acúmulo de H_2O_2 durante a resposta de resistência ativada nas plantas. Recentemente, Deepak et al. (2008) ao tratarem plantas de pepino com o indutor de resistência ASM e inocularem *Colletotrichum orbiculare* detectaram a presença de ascorbato peroxidase, indicando que a produção desta enzima ocorre quando as plantas são tratadas com o indutor.

3.6. Genes envolvidos na indução de resistência

A identificação de genes de hospedeiros envolvidos em respostas de defesa é importante para a elucidação dos mecanismos de resistência em plantas contra fitopatógenos.

Estudos realizados especialmente com *Arabidopsis* permitiram uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na indução de resistência. Foi demonstrado, em várias interações hospedeiro-patógeno, que a expressão de diferentes genes de defesa está associada com a indução de resistência sistêmica (HAMMERSCHMIDT; MÉTRAUX; VAN LOON, 2001). Alguns dos genes induzidos codificam proteínas LRR, e também proteínas envolvidas no metabolismo de compostos fenólicos e fitoalexinas, tais como FAL, chalcona sintase e peroxidases (KÖHLER, SCHWINDLING; CONRATH, 2002) ou proteínas com propriedades antimicrobianas, como as proteínas-RP, quitinases, β -1,3-glucanases e defensinas. Outros genes correspondem a proteínas relacionadas ao fortalecimento da parede celular, como glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e genes que codificam a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (ACC). Também foi observada a expressão de genes codificadores de proteínas envolvidas nas vias de transdução de sinal que levam à ativação do estado de resistência, como a proteína quinase da família MAP-quinase induzida em plantas de fumo por ácido salicílico (HAMMERSCHMIDT; MÉTRAUX; VAN LOON, 2001). Ainda, genes envolvidos na degradação controlada de proteínas têm sido associados à regulação da expressão da resistência induzida, como aqueles ativados em plantas de fumo após o tratamento com ácido salicílico ou elicitoras (ETIENNE et al., 2000; LEQUEU et al., 2005).

Por exemplo, o gene *L6* do linho, que confere resistência ao agente causal da ferrugem (*Melampsora lini*) nessa planta, especificamente às raças fisiológicas portadoras do gene de avirulência *AL6*, codifica uma proteína intracelular TIR-NBS-LRR (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000). Dabbas et al. (2006) detectaram em variedade resistente de cana-de-açúcar, a expressão de genes codificadores de proteínas LRR quando a planta foi inoculada com a bactéria patogênica *Xanthomonas albilineans*. Recentemente, Xu et al. (2009) isolaram dois genes codificadores de proteínas com domínio LRR em tabaco em resposta a presença do patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Guzzo, Harakava e Tsai (2009) isolaram cinco clones de cDNA em cafeeiro 'Híbrido de Timor', resistente a *H. vastatrix*, que apresentaram similaridade com genes isolados de outras plantas codificadores de proteínas de resistência, por exemplo, do tipo LRR de arroz, NBS-LRR de *Solanum acaule* ou com domínio TIR-NBS-LRR de linho. Esses genes isolados de 'Híbrido de Timor' foram ativados em resposta à presença do patógeno *H. vastatrix* e podem representar genes-*R*, envolvidos nos mecanismos específicos de reconhecimento, que conferem resistência em cafeeiro às raças fisiológicas de patógenos, portadoras de genes correspondentes à avirulência.

No mecanismo de indução de resistência pode ocorrer também a ativação de genes relacionados à regulação do nível de espécies reativas de oxigênio. Por exemplo, Huckelhoven, Dechert e Kogel (2001) analisaram o nível de expressão do gene codificador

de ascorbato peroxidase em cevada, após a inoculação com *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* e observaram o aumento da expressão deste gene na planta inoculada com o patógeno. Guzzo, Harakava e Tsai (2009) isolaram o gene codificador de ascorbato peroxidase em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com ASM e apontaram a ativação desta enzima como um mecanismo de proteção celular frente ao elicitador abiótico.

Outro gene importante para caracterizar a ativação de resistência em plantas é o gene codificador da enzima ACC oxidase, responsável pela conversão de ACC em etileno. Guzzo, Harakava e Tsai (2009) detectaram um clone de cDNA em cafeeiro 'Híbrido de Timor' inoculado com *H. vastatrix*, similar ao gene codificador de ACC oxidase isolado de plantas de tomate, demonstrando que a enzima ACC oxidase pode ter sido ativada no cultivar resistente em resposta ao patógeno. Iriti e Faoro (2003b) utilizaram a técnica molecular *Northern Blot*, para analisar a expressão temporal do gene de ACC oxidase em plantas de feijão tratadas com ASM, e constataram que o aumento de expressão do gene ocorre a partir das 6 h após o tratamento com o indutor, atingindo um pico máximo de expressão após 12 h e decaindo para níveis iguais às plantas tratadas com água destilada 72 h após o tratamento.

O fenômeno da resistência induzida também pode ser associado com a ativação de genes codificadores de proteínas-RP, por exemplo, a β -1,3-glucanase (PR-2). Cheong, Kim e Chun (2000) isolaram de soja um gene codificador de β -1,3-glucanase e a expressão deste gene pôde ser induzida por peróxido de hidrogênio, por um elicitador proveniente de *Phytophthora parasitica* var. *nicotiane*, e também, por inoculação com um isolado avirulento de *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* e ferimentos. Xu e Tian (2008) constataram o aumento da expressão do gene codificador de β -1,3-glucanase em frutos de cerejeira inoculados com *Penicillium expansum*, e previamente tratados com ácido salicílico exógeno. Guzzo, Harakava, Tsai (2009) utilizaram a técnica de RT-PCR quantitativo para avaliar a expressão temporal do gene codificador de β -1,3-glucanase em cafeeiros 'Mundo Novo' tratados com ASM e constataram que o aumento da expressão ocorre a partir das primeiras 12 h após o tratamento com o indutor de resistência e chega a um pico máximo de expressão após 72 h do tratamento, demonstrando a importância do ASM na ativação dos mecanismos de defesa, neste caso, envolvendo a ativação de gene associado às proteínas-RP.

3.7. Acibenzolar-S-metil (ASM)

O acibenzolar-S-metil (ASM) ou éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7 carbotióico, é um composto derivado do benzotiadiazole (BTH) e comercializado como Bion[®] (Syngenta, Basel, Suíça) e Actigard[®] (Syngenta, Carolina do Norte, EUA). Conhecido como

ativador químico de respostas de defesa em plantas, é o indutor de resistência abiótico mais bem estudado, apresentando amplo espectro de ação contra fungos, vírus e bactérias. A resistência ativada pelo ASM em monocotiledôneas tem longa duração, sendo um pouco mais breve em dicotiledôneas (RYALS et al., 1996; ROMEIRO, 2007).

O ASM ativa a expressão de genes associados à resistência sistêmica adquirida e ao acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese ativadas pelo ácido salicílico (AS), não é fitotóxico, não apresenta ação antimicrobiana e é sistêmico, sendo rapidamente absorvido e translocado nas plantas (OOSTENDORP et al., 2001; RUESS et al., 1996).

Lawton et al. (1996) verificaram que o ASM quando aplicado em *Arabidopsis thaliana*, 72 h antes da inoculação com patógenos, reduziu os sintomas das doenças causadas pelo fungo *Phytophthora parasitica*, pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e pelo *Turnip crinkle virus* (TCV). Pappu et al. (2000) observaram que o ASM reduziu os sintomas de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em cultivo de tabaco.

Terry e Joyce (2000) pulverizaram plantas de morangueiro com ASM na expectativa de induzir SAR, conseguindo retardar por dois dias o aparecimento do mofo cinzento no período de pós-colheita, o que representa aumento de 15 a 20% no período de conservação de frutos. O efeito do ASM na indução de resistência e no controle pós-colheita de antracnose em mamão foi verificado por Cia (2005). O indutor além de reduzir em mais de 50% a incidência e a severidade da doença, estimulou a atividade das enzimas peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase, e não alterou as características físico-químicas dos frutos.

Marchi, Borges e Resende (2002) verificaram a eficácia do ASM em cafeeiro Catuaí Vermelho, na redução de sintomas de ferrugem alaranjada. Guzzo et al. (2001) e Guzzo et al. (2004) constataram que o ASM, na concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, promoveu a indução de resistência local e sistêmica a *H. vastatrix* em tecidos foliares de cafeeiro cv. Mundo Novo. Patrício et al. (2007) observaram que na interação *Coffea arabica* – *C. coffeicola*, a SAR pôde ser ativada pelo tratamento prévio das plantas suscetíveis com o indutor ASM, acarretando na diminuição dos sintomas.

3.8. *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis é uma bactéria cosmopolita, sendo encontrada em diversos substratos como, por exemplo, solo, água, superfície de plantas, insetos mortos e grãos armazenados. As células desta bactéria têm forma de bastonete (HABIB; ANDRADE, 1998), é gram-positiva e aeróbica, podendo facultativamente crescer em anaerobiose entre 10 a 40 °C. Como característica peculiar, esse microrganismo sintetiza inclusões protéicas cristalinas quando em esporulação que são extremamente tóxicas a diversas ordens de insetos (MONNERAT; BRAVO, 2000).

Além de apresentar efeito inseticida, *B. thuringiensis* foi apontado como um potencial indutor de resistência por Roveratti, Teixeira e Moraes (1989), que observaram o efeito protetor do produto comercial Thuricide HD, à base de *B. thuringiensis*, reduzindo o tamanho das lesões da ferrugem alaranjada em cafeeiros suscetíveis a *H. vastatrix*. Posteriormente, Guzzo e Martins (1996) demonstraram que *B. thuringiensis* protegeu plantas de cafeeiro a *H. vastatrix* e constataram o aumento da atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase após a aplicação da bactéria na concentração de 50 mg mL⁻¹, sendo utilizado o produto comercial Thuricide HD. Recentemente, Jesus, Guzzo e Harakava (2008) observaram redução de 66,3% dos sintomas de ferrugem alaranjada, em cafeeiros tratados com *B. thuringiensis* isolado do inseticida biológico Dipel PM[®], e houve a ativação de genes codificadores de arginina descarboxilase, ascorbato peroxidase, aleno óxido sintase, proteína LRR, quitinase e β -1,3-glucanase, envolvidos na indução de resistência (JESUS, 2009).

3.9. *Saccharomyces cerevisiae*

Diversos são os trabalhos que mostram o potencial de *S. cerevisiae* em controlar doenças de plantas. *S. cerevisiae* apresenta a capacidade de sintetizar compostos antibióticos, habilidade de competição por espaço e nutrientes no filoplano de muitas espécies vegetais, além de possuir elicitores na parede celular (ROVERATTI; TEIXEIRA; MORAES, 1989; LOPEZ, 1991; STANGARLIN; PASCHOLATI, 1994; RONCATTO; PASCHOLATI, 1998; FIALHO, 2004; PICCININ; DI PIERO; PASCHOLATI, 2005; CIA, 2005; BORO, 2009). É um fungo unicelular ascomiceto que pode formar ascos sem a produção de ascocarpos e o crescimento da colônia ocorre por brotação das células, não havendo produção de micélio (AGRIOS, 2004). Seu habitat natural é a superfície de frutas, entretanto, tem sido utilizado pelo homem na produção de bebidas alcoólicas, etanol e na panificação (FIALHO, 2004).

Silva e Pascholati (1992) observaram que o filtrado de cultivo de leveduras inibiu a germinação de esporos e a formação de apressórios por *Colletotrichum graminicola* e protegeu plantas de milho contra o patógeno. Fialho (2004) verificou efeito direto de *S. cerevisiae* sobre o patógeno *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta dos citros, inibindo em 73% o crescimento micelial do fungo *in vitro*.

A aplicação de filtrados de cultivo de *S. cerevisiae* em folhas de cafeeiro, 72 h antes da inoculação com *H. vastatrix*, induziu resistência ao patógeno (MARTINS et al., 1985). Posteriormente, Roveratti (1989), utilizando o fermento biológico comercial Fleischmann[®], encontrou correlação entre a proteção das plantas de café e redução do número de uredíniosporos de *H. vastatrix* presentes na superfície foliar, além da inibição na germinação

dos que restaram nas folhas, sem evidenciar a indução de resistência. Segundo a mesma autora, a maior redução na severidade da ferrugem alaranjada foi obtida quando o tratamento com a levedura foi efetuado até duas semanas antes da inoculação com *H. vastatrix*, utilizando-se concentrações iguais ou maiores que 20 mg mL⁻¹ do produto comercial. Cia (2005), aplicando esta mesma concentração do produto comercial em mamão, 24 h antes da inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides*, observou redução na incidência da antracnose nos frutos, mas não constatou alterações das atividades de β -1,3-glucanases e quitinases.

3.10. Proteína harpina

A harpina pertence a uma classe de proteínas produzidas por algumas bactérias fitopatogênicas, como *Erwinia amylovora* (WEI et al., 1992) e espécies de *Pseudomonas*, *Ralstonia* e *Xanthomonas* (HE; HUANG; COLLMER, 1993). A primeira proteína harpina (HrpN) foi isolada de *E. amylovora*, agente causal da queima da macieira, é composta por 403 aminoácidos e tem massa molecular de 44 kD. É termoestável podendo suportar temperatura de 100 °C por 10 min, rica em glicina, solúvel em água, porém não possui atividade enzimática conhecida. Dong et al. (1999) e Clarke et al. (2005) demonstraram que a proteína harpina ativa a síntese de moléculas sinalizadoras, como o ácido salicílico, o ácido jasmônico e o etileno, e induz resistência sistêmica em plantas contra várias doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, bem como contra alguns insetos herbívoros (CAPDEVILLE et al., 2003; PENG et al., 2003).

Foi demonstrado que a harpina induz resposta de hipersensibilidade em plantas, sendo codificada por um grupo de genes denominados “hypersensitive response and pathogenicity” (*hrp*) (TERRY, JOYCE, 2004). Foi ainda observado que a proteína acelera o desenvolvimento vegetal (aumento da biomassa radicular e foliar, antecipação da maturação e aumento no número de frutos) e afeta processos fisiológicos básicos importantes para o desenvolvimento vegetal, incluindo o aumento da atividade fotossintética e absorção de nutrientes (EDEN BIOSCIENCE, 2002).

Em várias culturas examinadas, tais como, fumo, citros, algodão, batata e tomate foi identificada uma proteína receptora que se liga a harpina (HrBP1). Essa interação ativa múltiplas vias de transdução de sinais, que levam a ativação de genes de defesa (TERRY; JOYCE, 2004). Devido ao potencial no controle de doenças de plantas, a harpina de *E. amylovora* foi comercializada nos Estados Unidos com o nome Messenger® (EDEN Bioscience Corporation, 2008), porém em 2009, a proteína harpina passou a ser comercializada pela empresa Plant Health Care, Inc, com o nome ProAct™ (PLANT HEALTH CARE, 2009).

Danner et al. (2008) utilizaram produtos comerciais contendo proteína harpina na concentração de 80 mg L⁻¹ em pêssegos e após 12 h do tratamento, efetuaram a inoculação com *Monilinia fructicola*. Após 60 h da inoculação verificaram a redução dos sintomas nos frutos e o aumento da atividade da FAL.

Yang et al. (2005) observaram que a proteína harpina, aplicada na concentração de 90 mg L⁻¹ em cultivares de melão Hami inoculadas com *Trichothecium roseum*, reduziu o diâmetro das lesões nos frutos inoculados, não ocasionando fitotoxicidade e efeito fungicida ao patógeno *in vitro*.

Capdeville et al. (2002) verificaram redução dos sintomas de bolor azul, causado por *Penicillium expansum*, em frutos de macieira tratados com harpina nas concentrações de 10 a 80 µg mL⁻¹ e em três intervalos de tempo entre o tratamento e a inoculação do patógeno (24, 48 e 96 h). O melhor resultado obtido foi com a concentração de 80 µg mL⁻¹ aplicada 96 h antes da inoculação. Posteriormente, Capdeville et al. (2003) demonstraram que as concentrações 80 e 160 µg mL⁻¹ de proteína harpina, utilizadas nos intervalos de tempo 48 e 96 h entre tratamento e inoculação com o patógeno, foram significativas na redução da doença nos frutos. Recentemente, Capdeville et al. (2008) verificaram que em frutos de macieira tratados com harpina houve um atraso na germinação de esporos de *P. expansum* e na colonização dos tecidos vegetais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Foram utilizadas mudas de *Coffea arabica* L. cultivar Mundo Novo, linhagem IAC 388-17-1, obtidas a partir de sementes fornecidas pela Cooperativa Escola dos Alunos da ETE Dep. Paulo Ornellas Carvalho de Barros (Garça, SP). O plantio foi feito inicialmente em areia esterilizada ou substrato vegetal em sementeiras, sendo depois transferidas para uma mistura de terra vegetal e esterco de galinha (250 L/2,5 L), acrescida de 1.250 g de superfosfato simples, 250 g de calcário calcítico e 250 g de cloreto de potássio e mantidas em casa de vegetação do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, São Paulo, SP, à temperatura ambiente (24 a 29 °C), recebendo adubação mensal por irrigação com solução de sulfato de amônio, superfosfato simples e cloreto de potássio (25 g /50 g /10 g em 10 L de água, para 300 mudas). As plantas foram utilizadas quando atingiram seis a oito pares de folhas totalmente expandidas (cerca de oito meses de idade) (Figura 1).

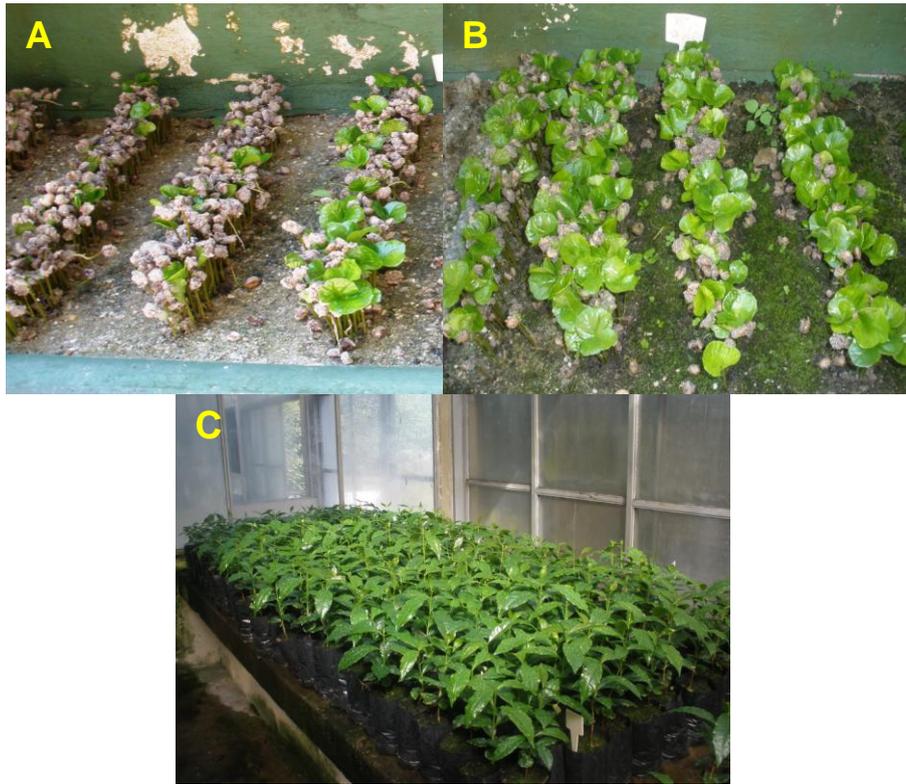


Figura 1. Estádios de desenvolvimento de cafeeiro 'Mundo Novo', do plantio das sementes até a formação de mudas. A: "Palito de fósforo"; B: "Orelha de onça"; C: Pares de folhas verdadeiras.

4.2. Patógeno

Foi utilizado nos experimentos, o isolado IBLF78 de *C. coffeicola* pertencente à coleção do Laboratório de Fitopatologia do Centro Experimental Central do Instituto Biológico, Campinas, SP, obtido de lesões foliares de cafeeiros na região de Franca, SP. O fungo foi mantido em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) (extrato de 200 g de batata, 20 g de dextrose, 20 g de ágar e água destilada, quantidade suficiente para 1.000 mL) em placas de Petri a 27 °C e preservado através do método de Castellani (DHINGRA; SINCLAIR, 1995).

4.3. Obtenção dos agentes bióticos e abiótico

4.3.1. Acibenzolar-S-metil (ASM)

Foram utilizadas nos ensaios suspensões aquosas preparadas a partir do produto comercial Bion[®]500WG (Syngenta, Basel, Suíça) em pó molhável contendo 50% de ingrediente ativo (i.a.) (éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7-carbotiólico,

acibenzolar-S-metil, ASM) nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 μg de i.a. mL^{-1} de água destilada esterilizada.

Para os ensaios *in vitro* as suspensões aquosas do produto foram filtradas em membrana Millipore[®] de 0,22 μm imediatamente antes do uso.

4.3.2. *Bacillus thuringiensis*

Nos ensaios *in vivo* foram utilizadas suspensões aquosas da formulação comercial Dipel PM[®], a base de *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki*, linhagem HD-1 (16.000 Unidades Internacionais de Potência (UI) mg^{-1} , 32 g i.a kg^{-1}) (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, EUA) nas concentrações de 5, 10 e 20 mg mL^{-1} preparadas com água destilada esterilizada.

Foi também utilizado nos experimentos o isolado de *B. thuringiensis* obtido a partir do produto comercial Dipel PM[®]. Primeiramente foi preparada uma suspensão do produto comercial Dipel PM[®] na concentração de 10 mg mL^{-1} em água deionizada esterilizada, sendo mantida em água aquecida a 80 °C por 20 min, para eliminar as células vegetativas e organismos contaminantes, uma vez que as bactérias do gênero *Bacillus* são resistentes a temperaturas elevadas. Após este período, alíquotas de 10 μL da suspensão foram depositadas e espalhadas com alça de Drigalsky sobre a superfície de placas de Petri contendo meio de cultura nutriente ágar (NA) (3 g de extrato de carne, 5 g de peptona, 15 g de agar e água destilada, quantidade suficiente para 1.000 mL), e essas foram incubadas em estufa a 30 °C por 24 h.

Após o crescimento das colônias de *B. thuringiensis*, foram preparadas as suspensões aquosas nas concentrações de $4,5 \times 10^8$ e $6,0 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia (UFC) mL^{-1} em água deionizada esterilizada, segundo a escala de McFarland, para que fossem utilizadas nos ensaios *in vivo* e *in vitro*.

4.3.3. Extrato de *Saccharomyces cerevisiae*

Foi utilizada nos experimentos a fração polissacarídica não-dialisável obtida de extrato solúvel em água de células autolisadas da levedura *S. cerevisiae* (Difco, EUA), empregada nas concentrações de 400, 800 e 1.200 equivalentes μg de manose mL^{-1} .

Para tanto, 25 g do extrato comercial de levedura foram dissolvidos, sob agitação, em 125 mL de água destilada esterilizada. Em seguida, acrescentou-se, aos poucos, 500 mL de etanol absoluto e o frasco com a suspensão foi mantido em gelo, sob agitação, para ocorrer a precipitação dos polissacarídeos. A suspensão, com uma concentração final de etanol 80% (v/v), foi mantida por 4 dias a 4 °C para a total sedimentação do precipitado.

Após este período, o sobrenadante foi descartado e o sedimento gomoso foi novamente suspenso em 125 mL de água destilada esterilizada. A solução foi novamente precipitada em etanol 80% (v/v) e o sedimento final foi dissolvido em 100 mL de água destilada esterilizada.

A solução foi submetida à diálise durante 7 dias em membranas Spectra/Por® (Spectrum Laboratories, Inc. CA, USA), com capacidade de excluir moléculas com massa molecular menor que 8.000 Daltons, e mantida sob agitação a 4 °C, efetuando-se trocas diárias da água destilada externa.

No final do processo, o extrato líquido foi retirado do interior das membranas de diálise, e o precipitado formado foi removido por filtração utilizando seqüencialmente membranas de 1,2; 0,8; 0,45 e 0,22 µm, resultando na obtenção do extrato de levedura bruto mantido a -20 °C.

Após a filtração, a concentração de carboidratos presente no extrato bruto foi determinada por meio do método de antrona segundo Dische (1962). Em tubos de ensaio foram adicionados 500 µL de solução de extrato bruto diluídas previamente e 1 mL de antrona 2% em ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi agitada rapidamente e, em seguida, aquecida em água fervente a 100 °C por 16 min. Após o resfriamento, foi determinada a absorvância a 625 nm, em espectrofotômetro Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 UV/VIS. Através da curva padrão preparada com manose comercial PA (Merck) com concentrações variando de 25 a 100 µg mL⁻¹, foi determinada a concentração de carboidratos no extrato de levedura, a qual foi expressa em equivalentes µg de manose por mL (Eq µg de manose mL⁻¹). O filtrado bruto foi diluído com água destilada esterilizada para as concentrações de 400, 800 e 1.200 Eq µg de manose mL⁻¹, utilizadas nos experimentos *in vivo* e *in vitro*.

4.3.4. Proteína harpina

Foram utilizadas, para os ensaios *in vivo* e *in vitro*, suspensões aquosas contendo o ingrediente ativo proteína harpina, preparadas em água deionizada esterilizada a partir do produto comercial Messenger® (3% de proteína harpina) (EDEN Bioscience Corporation, Bothell, EUA), nas concentrações de 7,5; 15; 30; 60 e 120 µg i.a. mL⁻¹. Para os ensaios *in vitro*, as suspensões aquosas do produto foram filtradas em membrana Millipore® de 0,22 µm imediatamente antes do uso.

4.4. Obtenção do inóculo

Para propiciar a esporulação adequada do fungo *in vitro*, quatro discos de 1 cm de diâmetro de micélio do fungo crescido em meio BDA foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura V8-ágar (100 ml de suco comercial de vegetais V-8, 3 g de carbonato de cálcio, 15 g de ágar e água destilada, quantidade suficiente para 1.000 mL). As placas foram mantidas por 10 dias em câmara B.O.D. a 25 °C sob regime de luz contínua (SOARES, 2003). Após este período, recortou-se com estilete a área total das colônias crescidas no meio, as quais foram transferidas para um almofariz de porcelana e maceradas, com o auxílio de um pistilo, em água destilada esterilizada. A suspensão obtida foi uniformemente distribuída sobre a superfície de meio de cultura V8-ágar, com o auxílio de uma alça de vidro. Em seguida, as placas foram mantidas em B.O.D. a 25 °C sob regime de luz contínua, durante 7 dias. Os conídios formados foram, então, removidos da superfície do meio de cultura com pincel de cerdas macias e água destilada esterilizada e a suspensão resultante foi filtrada em uma peneira plástica para remoção de fragmentos do meio de cultura. A concentração de conídios foi determinada em câmara de Neubauer e posteriormente ajustada para 2×10^4 conídios mL⁻¹ para a inoculação nas plantas.

4.5. Avaliação do efeito dos agentes bióticos e abiótico na proteção de plantas de cafeeiro contra *C. coffeicola*

Plantas de café cv. Mundo Novo foram previamente lavadas em água corrente e após a secagem, os 2^{os}, 3^{os} e 4^{os} pares de folhas (a partir do ápice das plantas), foram aspergidos, nas superfícies abaxiais e adaxiais, por meio de um atomizador de plástico, com as diferentes concentrações dos agentes bióticos e abióticos descritas no item 4.3. até o ponto de escorrimento. Todas as preparações foram submetidas à agitação por 10 min antes da aplicação nas plantas. As plantas controle foram aspergidas com água destilada esterilizada.

As plantas foram mantidas por 72 h em temperatura ambiente e após este período, os mesmos pares e superfícies foliares tratadas anteriormente foram inoculadas, por aspersão, com a suspensão de conídios de *C. coffeicola* preparada conforme descrito no item 4.4., acrescida de uma gota de Tween 20 para 100 mL de inóculo. Imediatamente após a inoculação, as plantas foram mantidas por 7 dias em câmara a ± 24 °C com umidade relativa de 100%, em fotoperíodo de 12 h e, em seguida, transferidas para casa de vegetação.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado utilizando-se grupos de 10 a 15 plantas por tratamento. Foram realizadas duas avaliações, nas folhas

tratadas e inoculadas, a partir do aparecimento dos primeiros sintomas na testemunha, em média 30 dias após a inoculação (d.a.i.) com um intervalo, aproximadamente, de 30 dias entre a 1º e a 2º avaliação.

A proteção foi quantificada como redução da severidade da doença (número médio de lesões por folha/planta) e expressa como porcentagem do controle de acordo com Moraes et al. (1976), obtida por meio da equação adaptada:

$$\%P = \frac{(SI \text{ em C} - SI \text{ em TI}) \times 100}{(SI \text{ em C})}$$

Em que:

%P= porcentagem de proteção, SI= severidade de infecção, C= folhas de cafeeiro apenas inoculadas, TI= folhas de cafeeiro tratadas e inoculadas.

4.6. Avaliação do efeito dos agentes bióticos e abiótico quando re-aplicados em cafeeiro na proteção contra *C. coffeicola*

Plantas de café cv. Mundo Novo foram previamente lavadas em água corrente e após a secagem, os 2^{os}, 3^{os} e 4^{os} pares de folhas (a partir do ápice das plantas), foram aspergidos, nas superfícies abaxiais e adaxiais, por meio de um atomizador de plástico, com as diferentes concentrações dos tratamentos (400 Eq µg de manose mL⁻¹ do extrato de *S. cerevisiae*, 200 µg mL⁻¹ de ASM e 15 ug mL⁻¹ de proteína harpina) até o ponto de escorrimento. Todas as preparações foram submetidas à agitação por 10 min antes da aplicação nas plantas. As plantas controle foram aspergidas com água destilada esterilizada. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado utilizando-se grupos de 20 plantas por tratamento.

As plantas foram mantidas por 72 h em temperatura ambiente e após este período, os mesmos pares e superfícies foliares tratadas anteriormente foram inoculadas, por aspersão, com a suspensão de conídios de *C. coffeicola* preparada conforme descrito no item 4.4., acrescida de uma gota de Tween 20 para 100 mL de inóculo. Imediatamente após a inoculação, as plantas foram mantidas por 7 dias em câmara a ± 24 °C com umidade relativa de 100%, em fotoperíodo de 12 h e, em seguida, transferidas para casa de vegetação.

Após 30 dias da inoculação com o patógeno, 10 plantas de cada parcela, previamente tratadas e inoculadas com o patógeno foram retratadas com as preparações utilizando-se as mesmas concentrações.

Foi realizada uma avaliação, nas folhas tratadas, retratadas e inoculadas, com 70

dias após a inoculação (d.a.i.).

A proteção foi quantificada como redução da severidade da doença (número médio de lesões por folha/planta) e expressa como porcentagem do controle de acordo com Moraes et al. (1976) descrita no item 4.5.

4.7. Avaliação do efeito dos agentes bióticos e abiótico sobre o crescimento micelial de *C. coffeicola*

Foram realizados ensaios *in vitro* com o objetivo de avaliar o efeito direto dos agentes bióticos e abiótico descritos no item 4.3 no crescimento micelial de *C. coffeicola* em meio de cultura BDA.

Incorporação e espalhamento em meio de cultura BDA

O extrato de levedura bruto, as suspensões aquosas de proteína harpina e ASM foram previamente filtradas em membranas de 0,45 e 0,22 μm e, em seguida, incorporadas em meio BDA para que estivessem nas mesmas concentrações descritas no item 4.3, com exceção da concentração 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de harpina. Após a incorporação dos agentes bióticos e abiótico em BDA, cada solução foi homogeneizada e vertida em cinco placas de Petri para cada tratamento. Como testemunha foi misturada ao meio BDA água deionizada esterilizada.

Para avaliar o efeito da concentração de 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de harpina sobre o crescimento micelial de *C. coffeicola*, foi realizado um ensaio adicional com todas as concentrações de harpina descritas no item 4.3.5 previamente filtradas em membranas 0,45 e 0,22 μm , utilizando-se por tratamento cinco placas contendo meio BDA. Em seguida, no centro de cada placa foram aplicadas alíquotas de 200 μL de cada concentração de harpina, espalhadas na superfície do meio com alça de Drigalsky. Como testemunha, água deionizada esterilizada foi espalhada sobre o meio BDA.

Em seguida, para todos os ensaios descritos, no centro de cada placa foi depositado um disco de meio de cultura de 1 cm de diâmetro contendo micélio de *C. coffeicola*, posicionado de forma que o fungo entrasse diretamente em contato com o meio. As placas foram mantidas em B.O.D. a 25 °C, em fotoperíodo de 12 h, por 20 dias.

Foi utilizado nos experimentos o delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa.

As avaliações foram efetuadas pela medida do diâmetro da colônia do fungo (cm), 10, 15 e 20 dias após a deposição dos discos de micélio sobre o meio BDA e, em seguida, foi calculado o índice de crescimento micelial (ICM) e o crescimento micelial, determinado pela adaptação da fórmula proposta por Maguire (1962):

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

sendo,

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

Aplicação de *B. thuringiensis* pela técnica de risca em meio de cultura

O efeito direto de *B. thuringiensis* no crescimento micelial de *C. coffeicola* foi avaliado em dois experimentos distintos. No primeiro ensaio, discos de micélio de 1 cm de diâmetro de *C. coffeicola* foram depositados na extremidade de placas de Petri (6,0 cm de diâmetro) sobre meio BDA e mantidas em câmara B.O.D. a 25 °C, fotoperíodo de 12 horas, por 5 dias. Em seguida, foram aplicados, a 1 cm de distância da borda do micélio, 20 µL de cada concentração de *B. thuringiensis* preparadas conforme o item 4.3.3, com o auxílio de alça de platina distribuindo-as de um lado a outro do meio de cultura em uma linha reta. A seguir, as placas foram incubadas em B.O.D. a 25 °C, em fotoperíodo de 12 h, durante 20 dias, utilizando-se como controle, água deionizada esterilizada ao invés da suspensão bacteriana. Foram realizadas três avaliações, 10, 15 e 20 dias após a incubação das placas na câmara B.O.D., determinando-se a medida do diâmetro da colônia do fungo (cm) e, em seguida, calculando-se o ICM.

Produção de metabólitos voláteis por *B. thuringiensis*

No segundo ensaio foi avaliado o efeito *in vitro* de compostos voláteis produzidos por *B. thuringiensis* no crescimento micelial de *C. coffeicola* em meio BDA. Para tanto, discos de micélio de 1 cm de diâmetro de *C. coffeicola* foram depositados no centro da superfície de placas de Petri contendo meio de cultivo e incubadas por 5 dias em câmara B.O.D. a 25 °C, em fotoperíodo de 12 h. Separadamente, 20 µL das suspensões aquosas de *B. thuringiensis* nas concentrações de 4,5 e 6,0 x 10⁸ UFC mL⁻¹ foram assepticamente depositadas sobre meio BDA e espalhadas uniformemente com alça de Drigalsky e as placas foram incubadas por 24 h, a 27 °C. Como controle, água deionizada esterilizada foi utilizada ao invés das suspensões bacterianas. As placas contendo o fungo e as colônias de *B. thuringiensis* foram justapostas e seladas com fita adesiva e, em seguida, incubadas em B.O.D., a 25 °C, em fotoperíodo de 12 h, por 20 dias. Foram realizadas três avaliações, 10, 15 e 20 dias após a incubação das placas na câmara B.O.D., determinando-se a medida do diâmetro da colônia do fungo (cm) e, em seguida, calculando-se o ICM.

4.8. Avaliação do efeito dos agentes bióticos e abiótico na germinação de conídios de *C. coffeicola*

Foi realizado ensaio *in vitro* com o objetivo de avaliar o efeito direto da proteína harpina, do extrato de *S. cerevisiae* e do ASM na germinação de conídios de *C. coffeicola*. Os tratamentos utilizados foram: 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ASM; 7,5; 15, 30 e 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína harpina e 400 Eq μg de manose mL^{-1} , além de água deionizada esterilizada como testemunha. Os ensaios foram realizados segundo metodologia descrita por Soares (2003).

Foram utilizadas placas de Petri estéreis, de 9 cm de diâmetro, às quais foram adicionados os tratamentos incorporados em meio de cultura V8-ágar e após a solidificação do meio, foram depositados três discos de meio BDA contendo micélio de *C. coffeicola*, com 1 cm de diâmetro, em cada placa por tratamento. Em seguida, as placas foram incubadas por 9 dias em B.O.D. a 25 °C, em fotoperíodo de 24 h.

Depois deste período, as áreas totais das colônias crescidas nas placas de cada um dos tratamentos foram retiradas, com o auxílio de um estilete, e transferidas para tubos Falcon (capacidade de 50 mL) contendo 10 mL de água deionizada esterilizada acrescida de uma gota de Tween 20. Os tubos foram submetidos à agitação vigorosa por 1 min em um agitador do tipo Vórtex. As suspensões obtidas foram filtradas em gaze dupla para a remoção dos fragmentos do meio de cultura e a concentração de conídios de *C. coffeicola* foi determinada em câmara de Neubauer e, por fim, ajustada para uma concentração final de $1,5 \times 10^4$ conídios mL^{-1} .

Alíquotas de 0,75 mL desta suspensão de conídios foram transferidas para placas de Petri esterilizadas de 9 cm de diâmetro contendo 12,5 mL de ágar-água 2%, e espalhadas sobre a superfície do meio com o auxílio da alça de Drigalsky. As placas foram mantidas em B.O.D. a 25 °C em fotoperíodo de 24 h e após este período, a germinação foi paralisada com azul de lactofenol. O número de esporos germinados foi aferido aleatoriamente numa amostra de 100 conídios por placa por tratamento, com o auxílio de um microscópio óptico, aumento de 100X. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado utilizando-se três repetições por tratamento.

4.9. Estudos moleculares

4.9.1. Tratamento das plantas de café 'Mundo Novo' com acibenzolar-S-metil e proteína harpina e inoculação com *C. coffeicola* para a extração de RNA total

Plantas de café 'Mundo Novo' foram tratadas com o ASM e a proteína harpina nas

concentrações de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ingrediente ativo, respectivamente. Os 2^{os}, 3^{os} e 4^{os} pares de folhas das plantas foram lavados previamente com água corrente, e em seguida, após a secagem natural das folhas, o agente biótico e o abiótico foram aspergidos nas superfícies abaxiais e adaxiais com o auxílio de um atomizador de plástico. As plantas controle foram aspergidas apenas com água deionizada esterilizada.

Para a inoculação das plantas tratadas com os agentes e plantas controle, foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 4.4.

Para a extração de RNAs totais foram realizados os seguintes tratamentos: plantas controle tratadas com água deionizada esterilizada, plantas somente tratadas por 72 h com ASM ou proteína harpina, plantas tratadas por 72 h e inoculadas, sendo que, depois da inoculação com o patógeno, as extrações foram feitas em 48 h, 72 h e 7 dias, e plantas somente inoculadas com *C. coffeicola*, sendo que as extrações foram feitas após 48 h, 72 h e 7 dias.

4.9.2. Extração de RNAs totais

As folhas tratadas conforme descrito no item 4.9.1. foram destacadas separadamente, sendo então, lavadas com água corrente, seguida de água deionizada esterilizada, e secas suavemente com algodão esterilizado. Amostras de folhas, 100 mg de massa fresca de cada tratamento, foram imediatamente trituradas com pistilo em almofariz gelado contendo nitrogênio líquido. O pó fino resultante da trituração foi homogeneizado em microtubos de 1,5 mL contendo 1 mL do reagente *TRIzol*[®] (Life Technologies, Grand Island, New York) para a extração de RNA total, seguindo-se o procedimento descrito no manual do fabricante.

Os microtubos contendo o homogeneizado permaneceram por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, o material insolúvel foi removido por centrifugação a 12.000 *g* durante 10 min a 4 °C e após a extração do sobrenadante com 200 μL de clorofórmio, o RNA presente na fase aquosa foi precipitado com 500 μL de álcool isopropílico. No final do procedimento, após a lavagem do sedimento com 1 mL de etanol 75%, seguida de secagem sob vácuo por 5 min, o RNA extraído foi dissolvido em 50 μL de água deionizada esterilizada por 10 min a 55 °C.

Determinou-se a concentração de RNA das amostras em espectrofotômetro a 260 nm e apenas as amostras que apresentaram uma relação de $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ foram utilizadas para a síntese de DNA complementar (cDNA).

A integridade e qualidade dos RNAs extraídos das diferentes amostras foram observadas em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio, em tampão TAE pH 8,3 (Tris-ácido acético-EDTA; Tris acetato 40 mM, EDTA 1 mM). O gel foi submetido à corrente

de 90 V por 30 min, tendo como marcador de peso molecular *DNA Ladder*[®] 1kb (Invitrogen[™]). Os produtos da reação foram visualizados por sistema de imagens computadorizada acoplada com uma câmara (Alphamager[™] 1220 Documentation & Analysis, Alpha Innotech Co., CA, EUA).

4.9.3. Digestão com *Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (DNase I Amp Grade)*

Previamente à síntese de cDNA, as amostras de RNA foram tratadas com a enzima *Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (DNase I, Amp Grade)* (Invitrogen[™], Carlsbad, CA, EUA) para a digestão de DNA contaminante.

Para a digestão de DNA foi preparada em microtubos de 0,5 mL, mantidos no gelo, a seguinte mistura de reação: 2 µg de RNA de cada amostra; 2 µL de *10X DNase I Reaction Buffer*, 1 µL de *DNase I Amp Grade* (1 U/µL), completando com água deionizada esterilizada para o volume de 20 µL, seguindo-se o protocolo descrito pelo fabricante. As amostras foram incubadas por 15 min em temperatura ambiente. A *DNase I Amp Grade* foi inativada com 2 µL de EDTA 25 mM pH 8,0, sendo os microtubos incubados por 10 min a 65 °C em termociclador PTC-100[™] (*Programmable Thermal Controller* - MJ Research Inc, Watertown, MA, EUA).

4.9.4. Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit *SuperScript III*[™] (Invitrogen[™]). Alíquotas de 22 µL de cada amostra tratada com *DNase I Amp Grade* conforme descrito no item 4.9.3., contendo 2 µg de RNA total obtido a partir das folhas de plantas tratadas e controles (item 4.9.2.), foram misturadas com 1 µL de oligo (dT)₂₀ (50 µM) e 1 µL de dNTPs 10 mM. Após a incubação a 65 °C por 5 min, em termociclador PTC-100[™], as amostras foram mantidas no gelo por 1 min e, em seguida, foram acrescentados a cada tubo, 6,375 µL de *5X First-Strand Buffer*, 1 µL de DTT 0,1 M e 0,5 µL da enzima *SuperScript*[™] III Reverse Transcriptase (200 U/µL). Em termociclador, as amostras foram submetidas ao seguinte programa: 25 °C por 5 min, seguido de 50 °C por 60 min e aquecimento a 70 °C por 15 min para inativar a enzima.

No final da reação as amostras contendo os cDNAs foram diluídas com água deionizada esterilizada para um volume de 200 µL e mantidas a -20 °C.

4.9.5. Síntese de *primers* de genes de cafeeiro

Baseados nas seqüências de genes, isolados de plantas de café Mundo Novo e Híbrido de Timor, através da técnica de hibridização subtrativa por supressão, e depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/submit.html) (GUZZO; HARAKAVA; TSAI, 2009), foram desenhados *primers* para a amplificação dos seguintes genes relacionados à resistência: ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano oxidase (ACC oxidase) (HT-ACCoxi-F e HT-ACCoxi-R); glucanase (MN-GLU-F e MN-GLU-R), proteína com repetições ricas em leucina (MN-LRR-F e MN-LRR-R) e ascorbato peroxidase (MN-AscPe-F e MN-AscPe-R) (Tabela 1).

Os *primers* foram desenhados utilizando o programa DNA calculator da Sigma-Genosys (www.sigma-genosys.com), que permitiu determinar as temperaturas de anelamento e determinar a presença de estruturas secundárias indesejáveis.

Os *primers* específicos (*forward-F* e *reverse-R*) foram sintetizados pela empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT, Coralville, Iowa, EUA). Os *primers* foram previamente testados usando como molde DNA genômico extraído de folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo.

Tabela 1. Seqüências de *primers* de genes de cafeeiro para as análises de expressão gênica temporal por RT-PCR quantitativo.

Gene ^a	GenBank ^b	Designação dos <i>primers</i>	Seqüências de <i>Primers</i> (5'-3')	Tamanho (bp) ^c	Tm (°C)
HT-SSH1-B09	DQ123946	HT-ACCoxi-F	GGGACACAACACACAGACAC	215	61,65
		HT-ACCoxi-R	TCACCAACTCAAAGAAACCC		61,50
MN-SSH3-B11	DQ124021	MN-AscPe-F	TCCGCTAATAGTGGCTTGA	201	60,93
		MN-AscPe-R	ATTAGCATCAGGCAGTCTCC		60,80
<i>Coffea arabica</i>					
β -1,3-glucanase, acidic (bgl)	AY389812	MN-GLU-F	CTTCTTTGATGGGGCTGCTAA	255	65,12
		MN-GLU-R	ATATAACCAGGCCGAAGTGGG		65,69
MN-SSH3-C07	DQ124056	MN-LRR-F	AGTAGAGCTGTGGGATTGGG	203	62,98
		MN-LRR-R	GAACTTCTCCAACGACCCTT		62,01

^aClones de cDNA obtidos de RNAs extraídos de cafeeiro 'Mundo Novo' (MN) e 'Híbrido de Timor' (HT). *Coffea arabica* β -1,3-glucanase, acidic (bgl): seqüência completa de cDNA de gene de β -1,3-glucanase isolado de cafeeiro MN. ^bNúmeros de acesso de seqüências de cafeeiro no GenBank isoladas por hibridização subtrativa por supressão (SSH) ou pela técnica RACE ("Rapid Amplification of cDNA Ends") (AY389812). ^cTamanho dos produtos de amplificação dos genes de cafeeiro.

4.9.6. Amplificação com *primers* específicos dos genes de cafeeiro

Para verificar a ocorrência de amplificação dos cDNA, sintetizados conforme descrito no item 4.9.4., com os *primers* específicos dos genes de cafeeiro (Tabela 1), foram utilizados 3 μ L de cada amostra. Foram acrescentados à mistura de reação, 16 μ L de água deionizada esterilizada, 0,25 μ L de enzima *GoTaq*[®] *DNA polimerase* (5 U/ μ L) (Promega, Madison, WI, EUA), 0,25 μ L de dNTPs *mix* (10 mM), 5 μ L de *5X Green GoTaq*[®] *Reaction Buffer*, 0,25 μ L dos *primers* específicos (*forward-F* e *reverse-R*) (10 μ M).

A reação de amplificação foi realizada no termociclador PTC-100[™] utilizando-se o programa: um ciclo de 94 °C por 2 min, seguido de 42 ciclos de 94 °C por 10 s, anelamento de 55 a 62 °C, dependendo do gene a ser estudado (Tabela 1), seguido de 72 °C por 30 s e temperatura de extensão final a 72 °C durante 7 min.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio (1%), em tampão TAE pH 8,3. O gel foi submetido à corrente de 90 V por 30 min, tendo como marcador de peso molecular *DNA Ladder*[®] 100 pb (Invitrogen[™]). Os produtos da reação foram visualizados por sistema de imagens

computadorizada acoplada com uma câmara (Alphamager™ 1220 Documentation & Analysis).

4.9.7. Análise quantitativa (qRT-PCR) da expressão de genes de cafeeiro por PCR em tempo real

As análises por PCR quantitativo (qRT-PCR) foram realizadas no aparelho “*LightCycler® 480 Instrument*” (Idaho Technology Inc., Salt Lake City, UT, EUA).

Para as reações de qRT-PCR foram utilizados 3 µL de cDNA de cada amostra sintetizados conforme descrito no item 4.9.4. e *primers* específicos dos genes de cafeeiro (Tabela 1). Foram acrescentados à reação, 5,8 µL de água deionizada esterilizada, 10 µL de *FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (2x concentrated)* (Roche® Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha), 0,6 µL dos *primers* específicos (*forward-F* e *reverse-R*) (10 µM). O volume final da reação foi de 20 µL. As qRT-PCR foram realizadas utilizando o seguinte programa: 1 ciclo de 2 min a 50 °C, seguido de desnaturação a 95 °C por 10 min e em seguida, 45 ciclos a 95 °C por 15 s, anelamento a 56 °C até 60 °C por 30 s, dependendo do gene a ser estudado (Tabela 1), e extensão de 60 °C por 30 s. A especificidade de reação foi confirmada pela obtenção de curvas de dissociação para cada reação.

Como normalizador interno da reação foi utilizado o gene ubiquitina (*housekeeping gene*) amplificado utilizando os *primers* específicos de cafeeiro (*forward-F*: 5'-GTGGAGGAGAAAGAAGGAAT-3' e *reverse-R*: 5'-ACAAGAGCATATTCCCAAAG-3') desenhados a partir de uma seqüência de *C. arabica* presente no GenBank com o número de acesso AF297089.

Todas as reações de qRT-PCR foram realizadas com três repetições e o cálculo utilizado foi pelo método $\Delta\Delta CT$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), onde CT é definido como o número de ciclos necessários para alcançar o limiar de detecção de fluorescência. Os níveis de expressão *R* foram calculados da seguinte forma: $R = 2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta\Delta CT$ é igual a $(\Delta CT$ da amostra – ΔCT do calibrador) = $[(CT$ da amostra – CT do *housekeeping gene*) – (CT do calibrador – CT do *housekeeping gene*)]. As amostras controle que consistiram de plantas tratadas com água destilada esterelizada foram utilizadas como calibradores.

4.10. Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram analisados empregando-se software estatístico Assistat versão 7.5 Beta (2008) desenvolvido pelo Prof. Dr. Francisco de Assis, do Departamento de Engenharia Agrícola do Centro de Tecnologia e Recursos Naturais da Universidade Federal

de Campina Grande (UFCG). Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo que nos ensaios *in vitro* aplicou-se o teste de Tukey e *in vivo* o teste t, ambos com 5% de probabilidade ($P < 0,05$). Todos os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação dos efeitos dos agentes bióticos e abiótico na proteção de cafeeiros a cercosporiose e no desenvolvimento de *C. coffeicola* *in vitro*

5.1.1. Avaliação do efeito do acibenzolar-S-metil *in vivo*

Os testes de indução de resistência realizados em plantas de café cv. Mundo Novo tratadas previamente com o produto comercial Bion[®], nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do ingrediente ativo ASM, aplicadas 72 h antes da inoculação com *C. coffeicola*, e avaliadas 30 dias após a inoculação, evidenciaram redução dos sintomas da doença (Figura 2) e proteção significativa à cercosporiose de 49,3; 49,5; 69,4 e 80,5% (Tabela 2), respectivamente. Os dados obtidos corroboram com aqueles relatados por Patrício et al. (2007), que avaliaram o efeito do ASM nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ na proteção de cafeeiro 'Catuaí' e 'Obatã' a *C. coffeicola* e constataram proteção de 47, 74 e 25%, respectivamente, quando aplicadas nas plantas em um intervalo de 96 h entre tratamento e inoculação com o patógeno. Venâncio et al. (2000) também relataram a eficiência de ASM no controle de *C. coffeicola* em mudas de cafeeiro, onde o menor número de lesões foi observado em plantas tratadas com 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do ingrediente ativo. Amaral (2005) demonstrou que a concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do ingrediente ativo ASM aplicada 7 dias antes da inoculação com *C. coffeicola*, em cafeeiros 'Topázio', diminuiu em 47% os sintomas da cercosporiose em relação ao controle aspergido com água.

Tabela 2. Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com acibenzolar S-metil (ASM), 72 h antes da inoculação com *Cercospora coffeicola*¹.

ASM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ²	Número médio de lesões por folha ³	Proteção (%) ⁴
25	4,63 \pm 1,00 ^b	49,3
50	4,61 \pm 1,28 ^b	49,5
100	2,79 \pm 0,61 ^b	69,4
200	1,78 \pm 0,49 ^b	80,5
0	9,13 \pm 2,44 ^a	---
CV (%)	61,04	

¹Avaliação realizada 30 dias após a inoculação.

²Soluções aquosas do produto comercial Bion[®] nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ingrediente ativo (ASM); controle tratado com água.

³Médias \pm erro padrão seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste t ($P < 0,05$). Para a análise estatística os dados foram transformados pela função \sqrt{x} .

⁴Determinada em relação ao controle.

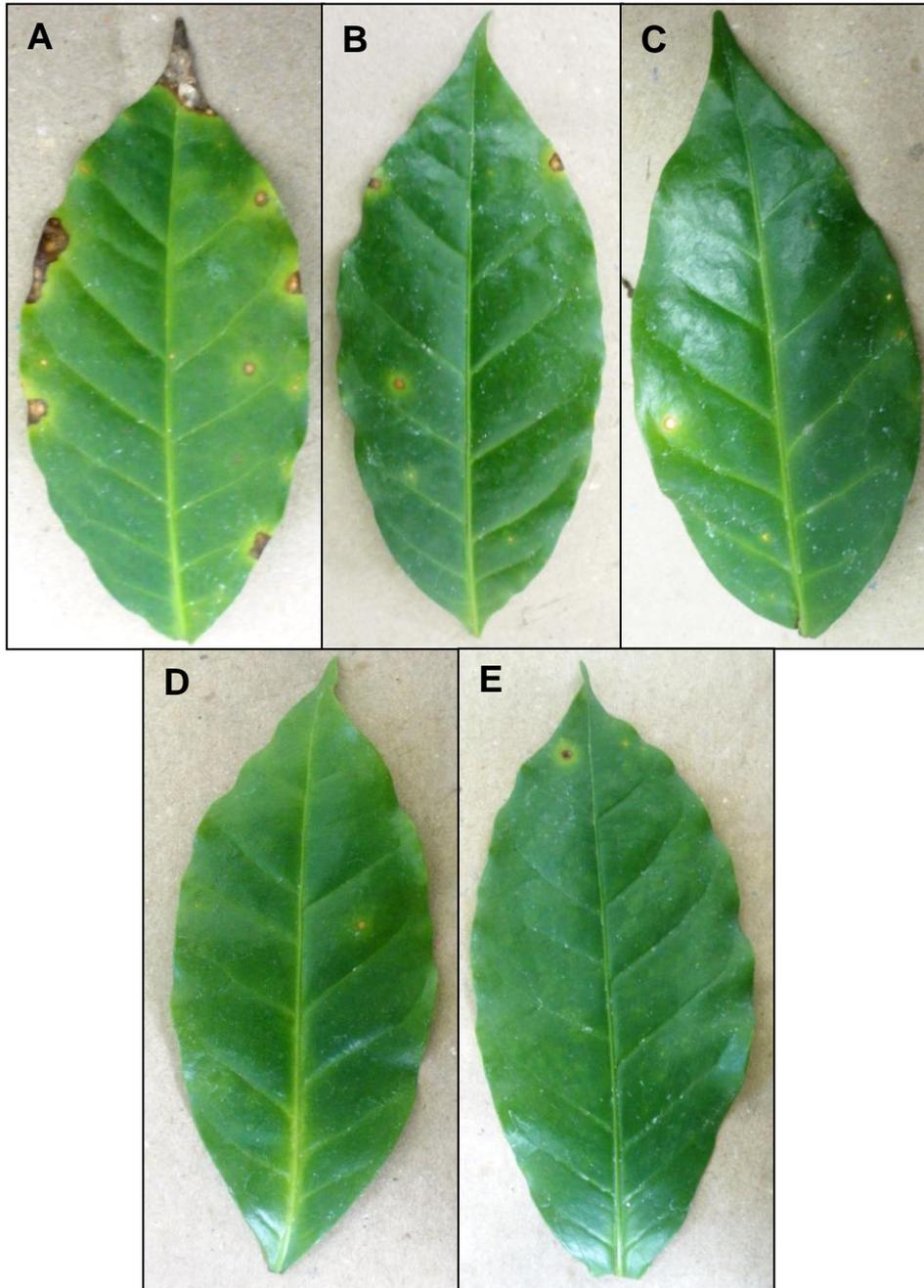


Figura 2. Folhas de cafeeiro suscetível 'Mundo Novo' tratadas com acibenzolar-S-metil (ASM), 72 h antes da inoculação de *C. coffeicola*, e avaliadas 30 dias após a inoculação do patógeno. A, B, C, D e E: 0, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ASM, respectivamente.

Guzzo et al. (2001), em trabalho com mudas de cafeeiro 'Mundo Novo' tratadas com ASM nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, aspergidas 72 h antes da inoculação com *H. vastatrix*, demonstraram que a partir da concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do ingrediente ativo, a redução de sintomas foi acima de 86%, atingindo 97% na concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Nojosa et al. (2009) demonstraram que a utilização de ASM na concentração de 0,1 g L^{-1} do produto comercial reduziu a severidade da doença conhecida como mancha de

Phoma, causada pelo patógeno *Phoma costarricensis*, em mudas de cafeeiro. Esses estudos evidenciam a ação significativa do indutor de resistência abiótico ASM na proteção de cafeeiro contra doenças causadas por diferentes fungos fitopatogênicos. Diversos relatos da literatura indicam o caráter inespecífico da indução de resistência, evidenciando que a ativação de respostas de defesa em diferentes culturas a uma ampla gama de patógenos, pode ser induzida após o tratamento com um mesmo agente indutor. ASM conferiu proteção em plantas de fumo (70 a 97%, na concentração de 1200 μM) contra o vírus TMV, os fungos *Cercospora nicotianae*, *Peronospora tabacina*, *Phytophthora parasitica* e as bactérias *Erwinia carotovora* e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Friedrich et al., 1996), enquanto que em *Arabidopsis thaliana*, promoveu redução nos sintomas das doenças causadas pelo fungo *P. parasitica*, pela bactéria *P. syringae* pv. *tomato* e pelo vírus TCV (*Turnip Crinkle virus*) (Lawton et al., 1996).

No presente estudo, as plantas tratadas com 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ASM apresentaram 59,8% de proteção quando avaliadas 60 dias após a inoculação com *C. coffeicola*, porém as concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g i.a. mL}^{-1}$ apresentaram de 30,7 a 46,6% de proteção e estatisticamente não diferiram do controle (Tabela 3 e Figura 3). Gurgel et al. (2005) verificaram que mudas de tomateiro tratadas com ASM, nas concentrações de 25 e 50 mg L^{-1} do produto comercial e avaliadas 43 dias após a inoculação de *Fusarium oxysporum* não diferenciaram significativamente do controle quanto à severidade da doença, demonstrando que o efeito do ASM na indução de resistência depende do patossistema em estudo.

Tabela 3. Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com acibenzolar-S-metil (ASM), 72 h antes da inoculação com *Cercospora coffeicola*¹.

ASM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ²	Número médio de lesões por folha ³	Proteção (%) ⁴
25	12,39 \pm 2,58 ^{ab}	46,6
50	16,08 \pm 3,33 ^{ab}	30,7
100	13,78 \pm 2,78 ^{ab}	40,6
200	9,34 \pm 2,27 ^b	59,8
0	23,21 \pm 4,80 ^a	---
CV (%)	52,91	

¹Avaliação realizada 60 dias após a inoculação.

²Soluções aquosas do produto comercial Bion[®] nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ingrediente ativo (ASM); controle tratado com água.

³Médias \pm erro padrão seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste t ($P < 0,05$). Para a análise estatística os dados foram transformados pela função \sqrt{x} .

⁴Determinada em relação ao controle.

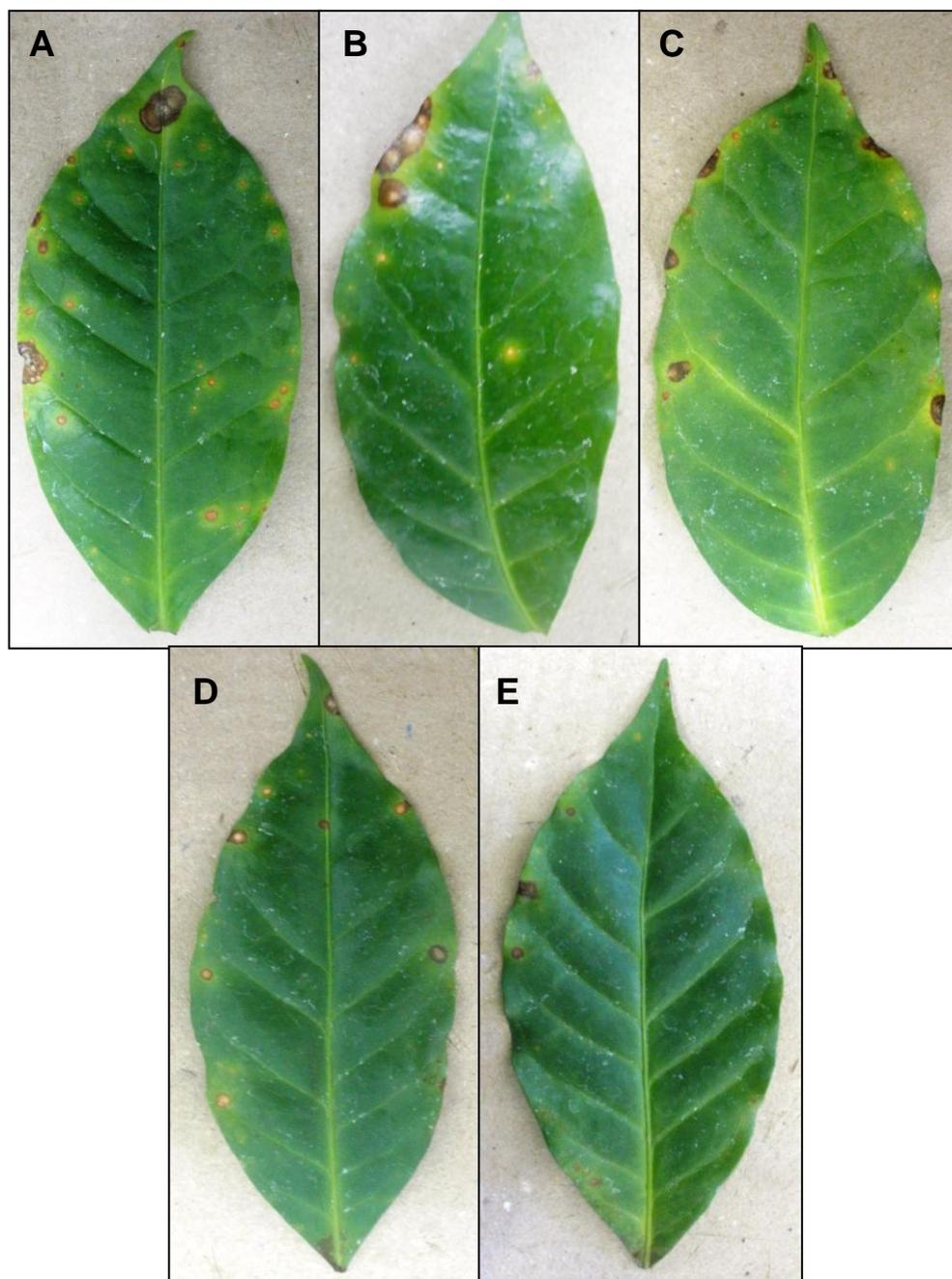


Figura 3. Folhas de cafeeiro suscetível 'Mundo Novo' tratadas com acibenzolar-S-metil (ASM), 72 h antes da inoculação de *C. coffeicola*, e avaliadas 60 dias após a inoculação do patógeno. A, B, C, D e E: 0, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ASM, respectivamente.

De acordo com os resultados apresentados nas tabelas 2 e 3, a maior concentração de ASM, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foi a que proporcionou maior proteção mais duradoura de cafeeiro contra cercosporiose. Entretanto, o efeito da indução de resistência não amplia com o aumento das doses do indutor e sim, de acordo com Sticher et al. (1997) e Loon et al. (1998), se o indutor é biótico, há necessidade de uma quantidade mínima de células em

contato com a planta para haver indução, mas, uma vez expressa a resistência, aumentos da quantidade de células do indutor não correspondem a aumentos na resistência. No caso de indutores abióticos o mesmo se aplica. Por exemplo, Rodrigues et al. (2000) trabalhando com o ASM e indução de resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em feijoeiro também confirmaram a validade deste critério. Barilli, Sillero e Rubiales (2009) constataram que a indução da SAR em ervilha a *Uromyces pisi*, agente causal da ferrugem, observada em resposta à aplicação exógena dos indutores abióticos, ácido salicílico (5, 7, 8,5 e 10mM), ASM (1, 5 e 10mM) e ácido β -aminobutírico (BABA) (5, 10, 20 e 50 mM), foi similar com todas as concentrações utilizadas. Entretanto, Capdeville et al. (2002) verificaram que tratamentos de maçãs com soluções aquosas de harpina nas concentrações de 10, 20, 40 e 80 $\mu\text{g ml}^{-1}$ resultaram em uma resposta de indução de resistência a *Penicillium expansum* concentração-dependente. Embora todas as concentrações utilizadas tenham sido eficazes em reduzir a severidade da doença, o efeito mais acentuado foi observado com a concentração de 80 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Latunde-Dada e Lucas (2001) também observaram que plântulas de feijão caupi, *Vigna unguiculata*, foram protegidas contra *Colletotrichum destructivum*, quando as sementes foram tratadas com Bion[®] (ASM) nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 ppm, sendo que o efeito de indução de resistência ocorreu de forma dose-dependente. Similarmente, nessa interação, a concentração mais elevada de Bion[®] (20 ppm) foi a mais efetiva.

5.1.2. Avaliação do efeito *in vitro* do acibenzolar-S-metil sobre *C. coffeicola*

As concentrações de ASM de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não inibiram o crescimento micelial (Tabela 4 e Figura 4) de *C. coffeicola in vitro*, quando avaliadas 20 dias após a deposição do disco de BDA contendo o micélio do fungo. Além disso, não houve diferenças significativas dos índices de crescimento micelial do patógeno na presença de ASM em relação ao controle (Figura 5). Estes dados corroboram com os resultados observados por Pereira et al. (2008) ao verificarem que o ASM não afetou o crescimento micelial *in vitro* de *C. coffeicola* em meio de cultura contendo 0,1 g i.a. L^{-1} do produto comercial e não alterou o desenvolvimento do patógeno na superfície de folhas de cafeeiro.

Tabela 4. Crescimento micelial de *Cercospora coffeicola* sob diferentes concentrações de acibenzolar-S-metil (ASM)¹.

ASM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ²	Crescimento micelial (cm) ³	Inibição (%) ⁴
25	4,32 \pm 0,09 ^{ab}	---
50	4,34 \pm 0,12 ^{ab}	---
100	4,75 \pm 0,09 ^a	---
200	4,57 \pm 0,12 ^{ab}	---
0	4,24 \pm 0,10 ^b	---
CV (%)	5,30	

¹Avaliação realizada 20 dias após a deposição de discos de BDA contendo o micélio do fungo.

²Soluções aquosas do produto comercial Bion[®] nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ingrediente ativo (ASM) incorporado em meio de cultura BDA; controle: água deionizada esterilizada incorporada ao meio BDA.

³Medida do diâmetro micelial. Médias \pm erro padrão seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

⁴Determinada em relação ao controle.

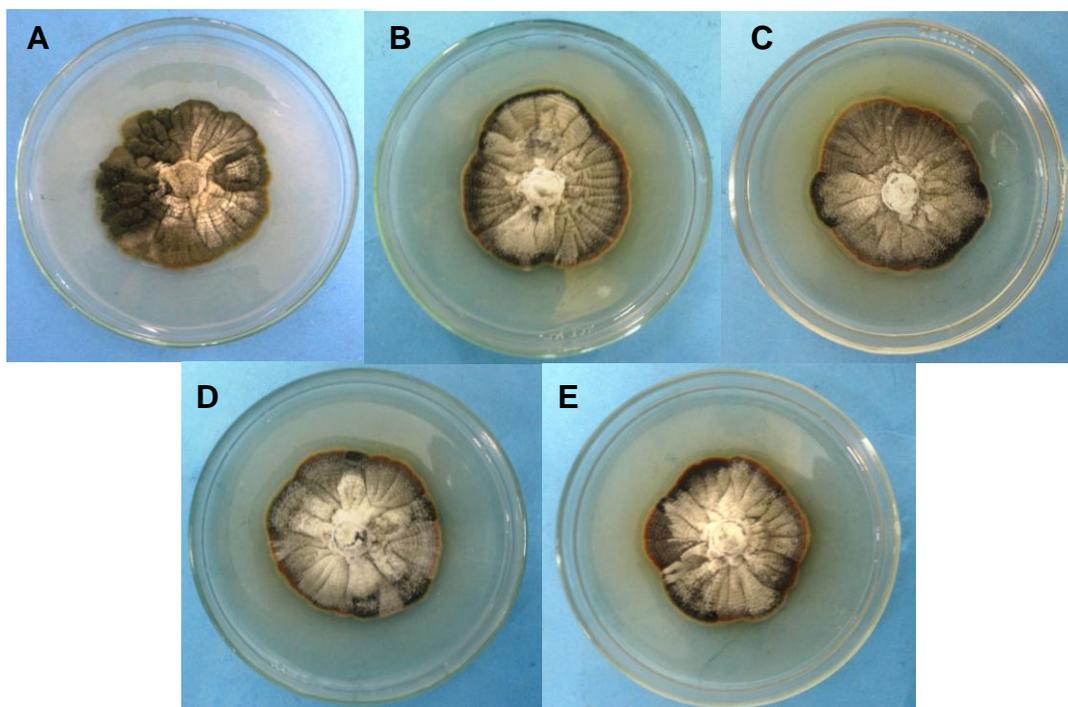


Figura 4. Crescimento micelial de *Cercospora coffeicola* em BDA acrescido de acibenzolar-S-metil (ASM). A, B, C, D e E: 0, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ASM, respectivamente.

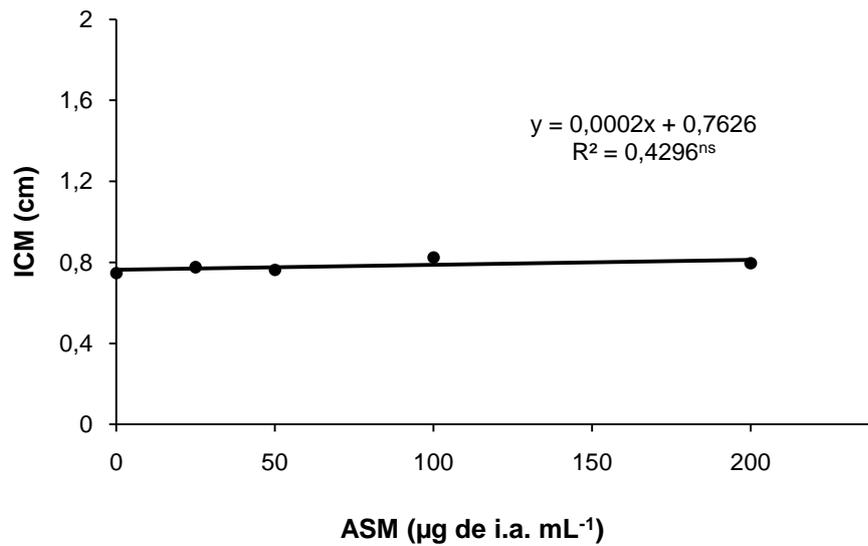


Figura 5. Índice de crescimento micelial (ICM) de *Cercospora coffeicola* sob diferentes concentrações de acibenzolar-S-metil (ASM). As concentrações de 25, 50, 100 e 200 µg de ingrediente ativo (i.a.) mL⁻¹ foram incorporadas em meio BDA. ^{ns}- não significativo.

As concentrações de ASM também não afetaram a germinação, *in vitro*, dos conídios de *C. coffeicola*, com exceção da concentração de 50 µg mL⁻¹ de ingrediente ativo, que estimulou significativamente a germinação dos conídios em 15,6% em comparação ao controle (Tabela 5). Patrício et al. (2007) demonstraram que as concentrações de 25, 50 e 100 µg mL⁻¹ de ASM não apresentaram efeito direto sobre a germinação dos conídios de *C. coffeicola* obtendo de 64 a 69% de conídios germinados nos tratamentos e 79% no controle. Pereira et al. (2008) também constataram que o ASM não apresentou qualquer alteração na germinação de *C. coffeicola* na superfície de folhas de cafeeiro. Nojosa et al. (2009) demonstraram que as concentrações 0,025 e 0,05 g L⁻¹ de ASM não inibiram a germinação dos conídios de *P. costarricensis in vitro*. Querino et al. (2005) constataram que as concentrações 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,25 mg mL⁻¹ de ASM não inibiram a germinação dos conídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubensis in vitro*, porém a concentração 0,50 mg mL⁻¹ de ASM inibiu a germinação dos mesmos quando comparado com a testemunha.

Tabela 5. Germinação *in vitro* de conídios de *Cercospora coffeicola* sob diferentes concentrações de acibenzolar-S-metil (ASM).

ASM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ¹	Número total de conídios germinados ²	Germinação de conídios (% do controle) ³	Estímulo na germinação de conídios (% do controle) ⁴
25	72,0 \pm 1,5 ^{ab}	102,7	2,7
50	81,1 \pm 2,4 ^a	115,7	15,7
100	72,7 \pm 2,4 ^{ab}	103,7	3,7
200	75,7 \pm 2,7 ^{ab}	108,0	8,0
0	70,1 \pm 1,6 ^b	---	---
CV (%)	5,08		

¹Soluções aquosas do produto comercial Bion[®] nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ingrediente ativo (ASM) incorporado em meio de cultura V8; controle: água deionizada esterilizada incorporada ao meio V8.

²Médias \pm erro padrão do número de conídios germinados nos tratamentos e no controle observados em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água 2%. Médias \pm erro padrão seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

³Porcentagem de germinação de conídios de *C. coffeicola* em contato com o ASM, calculada em relação ao controle.

⁴Determinada em relação ao controle.

É conhecido que os agentes indutores de resistência não apresentam ação antimicrobiana direta sobre patógenos, mas induzem a expressão de genes de defesa das plantas, ativando, nas mesmas, a produção de compostos que impedem ou dificultam o estabelecimento e/ou desenvolvimento de patógenos. Assim, no presente trabalho, o ASM aplicado 72 h antes da inoculação com o patógeno, pode ter ativado genes codificadores de compostos de defesa resultando na proteção parcial das plantas à cercosporiose, uma vez que não foi observada qualquer ação direta do ASM sobre *C. coffeicola*.

Os resultados obtidos mostram-se promissores, pois o ASM além de ser eficiente no controle de *H. vastatrix* e *P. costarricensis*, também protegeu plantas de café contra *C. coffeicola*, sendo uma alternativa importante no manejo destas doenças (RUESS et al., 1996; MOLINA; HUNT; RYALS, 1998; PATRICIO et al., 2007, NOJOSA et al., 2009).

5.1.3. Avaliação do efeito do produto comercial Dipel PM[®] *in vivo*

As plantas tratadas com a formulação comercial à base de *B. thuringiensis*, Dipel PM[®], nas concentrações de 5, 10 e 20 mg mL^{-1} e avaliadas 30 dias após a inoculação com *C. coffeicola*, demonstraram proteção de 73,3; 77,6 e 79,4%, respectivamente, em relação

ao controle (Tabela 6). Estes resultados corroboram com os obtidos por Roveratti, Teixeira e Moraes (1989), que verificaram proteção de 69,1 a 96,4% em plantas de cafeeiro 'Mundo Novo' suscetíveis à ferrugem alaranjada, previamente tratadas com o produto comercial Thuricide HD à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, nas concentrações de 5, 10 e 20 mg mL⁻¹. Jesus (2009) também constatou que o produto comercial Dipel PM[®], na concentração de 20 mg mL⁻¹, reduziu a severidade da ferrugem alaranjada de 79 a 90% em cafeeiro suscetível a doença, além de ter ativado genes codificadores de arginina descarboxilase, ascorbato peroxidase, aleno óxido sintase e proteína LRR, e das proteínas relacionadas à patogênese, quitinase e β -1,3-glucanase, envolvidas nos mecanismos de indução de resistência neste patossistema (GUZZO; MARTINS, 1996).

Tabela 6. Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com o produto comercial Dipel PM[®], 72 h antes da inoculação com *Cercospora coffeicola*¹.

Dipel PM [®] (mg mL ⁻¹) ²	Número médio de lesões por folha ³	Proteção (%) ⁴
5	0,44 ± 0,09 ^b	73,3
10	0,37 ± 0,09 ^b	77,6
20	0,34 ± 0,10 ^b	79,4
0	1,65 ± 0,61 ^a	---
CV (%)	62,50	

¹Avaliação realizada 30 dias após a inoculação.

²Suspensões aquosas do produto comercial Dipel PM[®] nas concentrações de 5, 10 e 20 mg mL⁻¹; controle tratado com água.

³Médias ± erro padrão seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste t (P < 0,05). Para a análise estatística os dados foram transformados pela função \sqrt{x} .

⁴Determinada em relação ao controle.

Entretanto, as mesmas plantas tratadas com Dipel PM[®] nas concentrações de 5, 10 e 20 mg mL⁻¹, quando avaliadas 60 dias após a inoculação com *C. coffeicola*, apresentaram de 8,9 a 28,4% de proteção, não diferindo significativamente do controle (Tabela 7). Estes resultados demonstram que o efeito protetor do Dipel PM[®] à cercosporiose não perdurou nas plantas tratadas e que, provavelmente, os conídios de *C. coffeicola* presentes nas folhas germinaram e colonizaram os tecidos foliares ocasionando um maior número de lesões nos cafeeiros no decorrer do tempo.

Uma explicação para esse fato pode estar relacionada à capacidade de sobrevivência dos conídios de *C. coffeicola*, os quais podem permanecer viáveis por quase nove meses na superfície foliar, aguardando condições favoráveis para poder invadir as células do hospedeiro (CUSTÓDIO, 2008). Essa característica do patógeno pode também

ter interferido na proteção à cercosporiose ativada por ASM em cafeeiro, pois quando as plantas foram tratadas com esse indutor e avaliadas 60 dias após a inoculação, apenas a concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mostrou-se eficaz.

Tabela 7. Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com o produto comercial Dipel PM[®], 72 h antes da inoculação com *Cercospora coffeicola*¹.

Dipel PM [®] (mg mL^{-1}) ²	Número médio de lesões por folha ³	Proteção (%) ⁴
5	10,92 \pm 2,75 ^a	8,9
10	8,59 \pm 2,01 ^a	28,4
20	10,98 \pm 2,17 ^a	8,4
0	11,99 \pm 2,59 ^a	---
CV (%)	34,85	

¹Avaliação realizada 60 dias após a inoculação.

²Suspensões aquosas do produto comercial Dipel PM[®] nas concentrações de 5, 10 e 20 mg mL^{-1} ; Controle: plantas tratadas com água.

³Médias \pm erro padrão seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste t ($P < 0,05$). Para a análise estatística os dados foram transformados pela função \sqrt{x} .

⁴Determinada em relação ao controle.

5.1.4. Avaliação do efeito *in vivo* de *Bacillus thuringiensis* isolado do produto comercial Dipel PM[®]

Nas plantas tratadas com diferentes concentrações do isolado de *B. thuringiensis*, proveniente do produto comercial Dipel PM[®], foi observada proteção de 52,9% à cercosporiose apenas para a concentração de 4,5 x 10⁸ UFC mL^{-1} , porém, não diferiu significativamente do controle quando a severidade foi avaliada 30 dias após a inoculação com o patógeno (Tabela 8 e Figura 6). Quando as plantas foram avaliadas 60 dias após a inoculação com o patógeno observou-se um aumento no número de lesões nas folhas dos cafeeiros tratados com *B. thuringiensis* e no controle, não havendo proteção significativa à cercosporiose (Tabela 9).

Tabela 8. Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com *Bacillus thuringiensis* isolado do produto comercial Dipel PM[®], 72 h antes da inoculação com *Cercospora coffeicola*¹.

<i>B. thuringiensis</i> (x10 ⁸ UFC mL ⁻¹) ²	Número médio de lesões por folha ³	Proteção (%) ⁴
4,5	6,38 ± 2,12 ^b	52,9
6,0	17,91 ± 4,55 ^a	---
0	13,54 ± 3,43 ^{ab}	---
CV (%)	48,31	

¹Avaliação realizada 30 dias após a inoculação.

²Suspensões aquosas nas concentrações de 4,5 e 6,0 x 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC) mL⁻¹ de *B. thuringiensis* isolado do produto comercial Dipel PM[®]; controle: plantas tratadas com água.

³Médias ± erro padrão seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste t (P < 0,05). Para a análise estatística os dados foram transformados pela função \sqrt{x} .

⁴Determinada em relação ao controle.

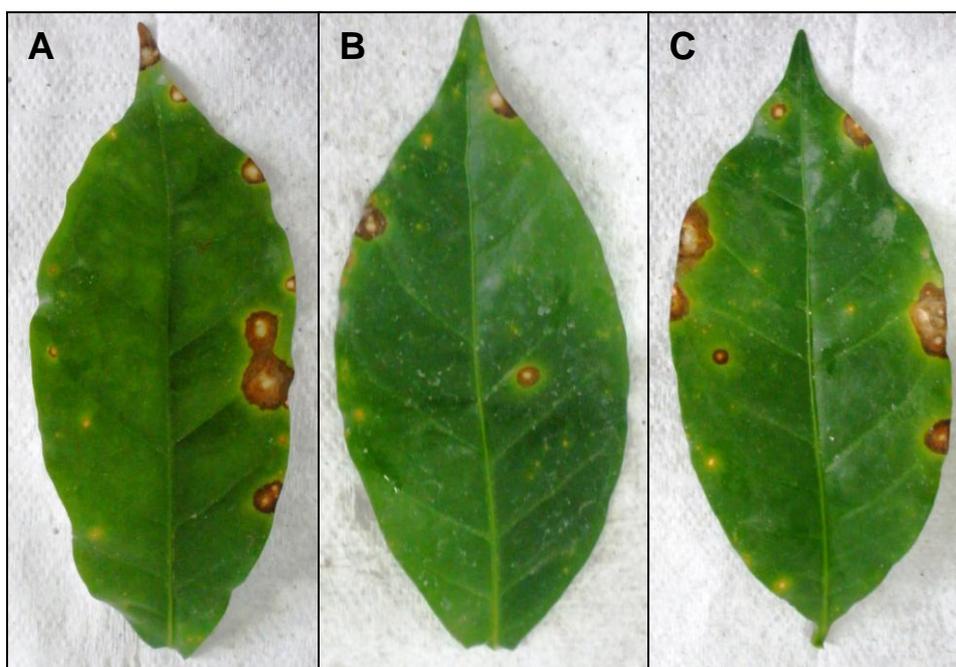


Figura 6. Folhas de cafeeiro suscetível 'Mundo Novo' tratadas com *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), 72 h antes da inoculação de *Cercospora coffeicola* e avaliadas 30 dias após a inoculação do patógeno. A, B e C: 0, 4,5 e 6,0 x 10⁸ unidades formadoras de colônia mL⁻¹, respectivamente, de *Bt* isolado do produto comercial Dipel PM[®].

Tabela 9. Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com *Bacillus thuringiensis* isolado do produto comercial Dipel PM[®], 72 h antes da inoculação com *Cercospora coffeicola*¹.

<i>B. thuringiensis</i> (x10 ⁸ UFC mL ⁻¹) ²	Número médio de lesões por folha ³	Proteção (%) ⁴
4,5	40,39 ± 5,13 ^a	13,7
6,0	47,28 ± 6,03 ^a	---
0	46,79 ± 5,75 ^a	---
CV (%)	20,94	

¹Avaliação realizada 60 dias após a inoculação.

²Suspensões aquosas nas concentrações de 4,5 e 6,0 x 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC) mL⁻¹ de *B. thuringiensis* isolado do produto comercial Dipel PM[®]; controle: plantas tratadas com água.

³Médias ± erro padrão seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste t (P < 0,05). Para a análise estatística os dados foram transformados pela função \sqrt{x} .

⁴Determinada em relação ao controle.

Estes dados diferem dos apresentados por Jesus (2009) na interação cafeeiro - *H. vastatrix*, na qual as mesmas concentrações de *B. thuringiensis*, 4,5 e 6,0 x 10⁸ UFC mL⁻¹, conferiram proteção de 80% e 78%, respectivamente, à ferrugem alaranjada. Cia (2005) evidenciou também o potencial desse microrganismo no controle da antracnose do mamoeiro.

A ausência de proteção à cercosporiose evidenciada pelos resultados obtidos no presente trabalho pode estar relacionada com a substância tóxica cercosporina, produzida por espécies de *Cercospora* contra vários microrganismos (ROMEIRO, 2007). O oxigênio ao reagir com a cercosporina, excitada pela presença de energia luminosa, é convertido em espécies reativas de oxigênio, altamente tóxicas para microrganismos (DAUB; CHUNG, 2007), podendo estar agindo diretamente sobre *B. thuringiensis*. Embora tenham sido observados efeitos positivos com o Dipel PM[®], inertes presentes na formulação do produto podem ter interferido na ação da cercosporina sobre o *Bt* ou contribuído para o efeito protetor observado. Entretanto, no presente trabalho, não foram realizados experimentos para comprovar essas hipóteses.

5.1.5. Avaliação do efeito *in vitro* de *Bacillus thuringiensis* isolado do produto comercial Dipel PM[®]

Nos testes *in vitro* realizados para avaliar o efeito de compostos voláteis e difusíveis produzidos por *B. thuringiensis*, isolado do produto comercial Dipel PM[®], sobre o crescimento micelial de *C. coffeicola*, não foi observada redução no desenvolvimento do

micélio do patógeno, em contato com os compostos voláteis produzidos pela bactéria (Tabela 10; Figuras 7 e 9). Porém, houve uma inibição parcial significativa do crescimento micelial do fungo em contato com os compostos produzidos pela bactéria, nas concentrações de 4,5 e 6,0 x 10⁸ UFC mL⁻¹, difundidos no meio de cultura (Tabela 10 e Figura 8). Além disso, o ICM foi significativo, demonstrando que existe uma relação entre a concentração bacteriana e o diâmetro micelial do patógeno (Figura 9).

Tabela 10. Crescimento micelial de *Cercospora coffeicola* sob diferentes concentrações de *Bacillus thuringiensis*¹.

<i>B. thuringiensis</i> (x10 ⁸ UFC mL ⁻¹) ²	Efeito de compostos difusíveis		Efeito de compostos voláteis	
	Crescimento micelial (cm) ³	Inibição (%) ⁴	Crescimento micelial (cm) ³	Inibição (%) ⁴
4,5	4,32 ± 0,21 ^b	25,1	5,56 ± 0,06 ^a	---
6,0	4,82 ± 0,16 ^b	16,5	5,44 ± 0,08 ^a	---
0	5,77 ± 0,17 ^a	---	5,45 ± 0,02 ^a	---
CV (%)	9,07		2,64	

¹Avaliação realizada 25 dias após a deposição de discos de micélio em meio BDA.

²Suspensões aquosas nas concentrações de 4,5 e 6,0 x 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC) mL⁻¹ de *B. thuringiensis* (*Bt*) isolado do produto comercial Dipel PM[®]. As suspensões bacterianas foram espalhadas ou riscadas em meio BDA, para o estudo do efeito de compostos voláteis ou difusíveis produzidos por *Bt*, respectivamente; controle: meio BDA sem a presença da bactéria.

³Medida do diâmetro micelial. Médias ± erro padrão seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si a 5%, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

⁴Determinada em relação ao controle.

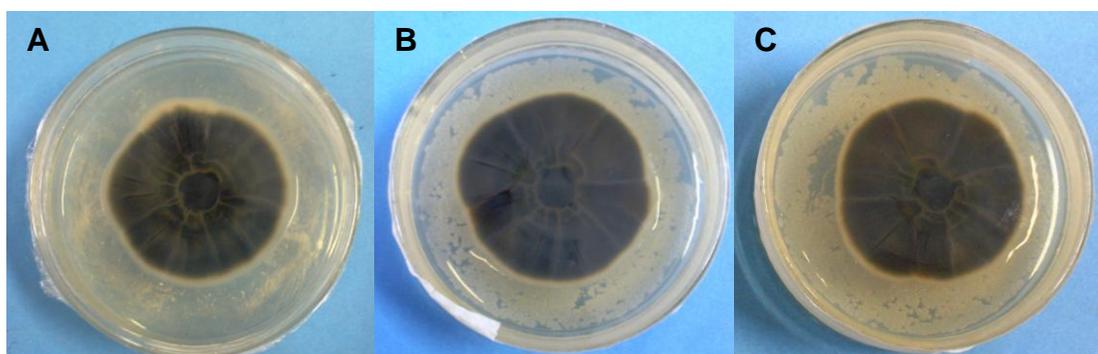


Figura 7. Crescimento micelial de *Cercospora coffeicola*, em BDA, exposto a compostos voláteis produzidos por *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), isolado de produto comercial Dipel PM[®]. A: Controle; B e C: 4,5 e 6,0 x 10⁸ UFC de *Bt* mL⁻¹, respectivamente.

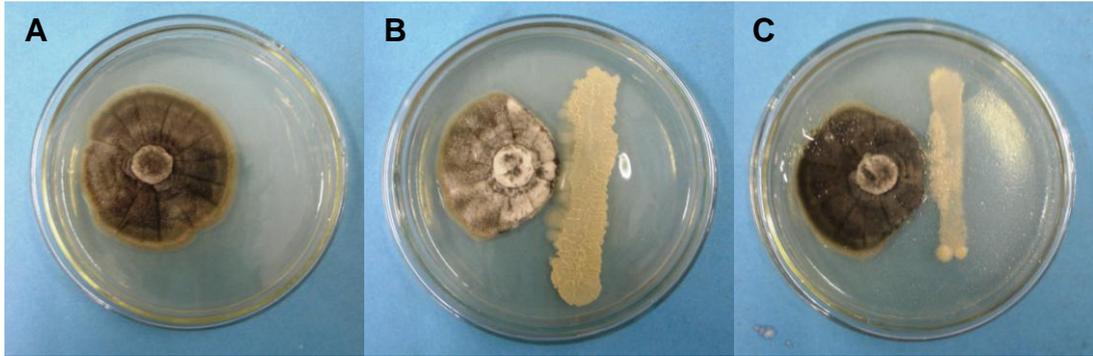


Figura 8. Crescimento micelial de *Cercospora coffeicola*, em BDA, exposto a compostos difusíveis produzidos por *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), isolado de produto comercial Dipel PM[®]. A: Controle; B e C: 4,5 e 6,0 x 10⁸ UFC de *Bt* mL⁻¹, respectivamente.

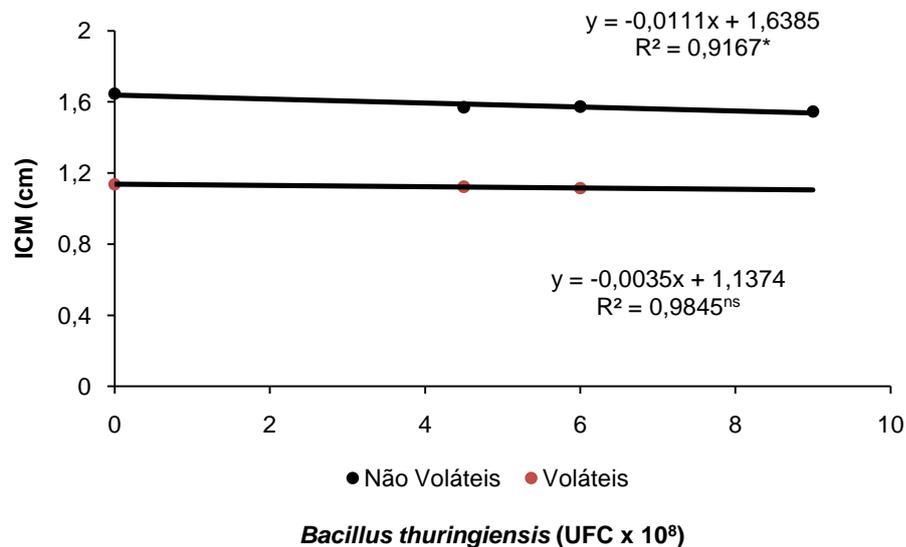


Figura 9. Índice de crescimento micelial (ICM) de *Cercospora coffeicola* sob compostos difusíveis e voláteis produzidos por *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), isolado de produto comercial Dipel PM[®], utilizado nas concentrações 4,5, 6,0 e 9,0 x 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC) mL⁻¹. *- significativo a 5%; ^{ns}- não significativo.

Vieira, Romeiro e Mizubuti (2004) observaram inibição *in vitro* de crescimento de fungos e fitobactérias patogênicos ao tomateiro pelo agente de biocontrole *Bacillus cereus*. Porém, Cia (2005) evidenciou que o produto comercial à base de *B. thuringiensis*, DimyPel[®], na concentração de 7,5 mg mL⁻¹, não inibiu o desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*.

Possivelmente, o isolado de *B. thuringiensis*, nas concentrações de 4,5 e 6 x 10⁸ UFC mL⁻¹, atuou no controle de *C. coffeicola* *in vitro* por meio da antibiose, competição por espaço e/ou nutrientes na avaliação do efeito dos compostos difusíveis no meio. Entretanto,

quando as mesmas concentrações de *Bt* foram aplicadas em cafeeiro não foi observado efeito protetor à cercosporiose.

5.1.6. Avaliação do efeito dos polissacarídeos extraídos de *Saccharomyces cerevisiae* in vivo

Os testes realizados em plantas de café 'Mundo Novo' tratados previamente com os polissacarídeos de *S. cerevisiae*, nas concentrações de 400, 800 e 1200 Eq μg de manose mL^{-1} , aplicadas 72 h antes da inoculação com *C. coffeicola*, e avaliadas 30 dias após a inoculação, evidenciaram redução parcial dos sintomas da doença (Figura 10) de 86,4; 39,3 e 40,9%, respectivamente. Porém, apenas a concentração de 400 Eq μg de manose mL^{-1} foi significativa na proteção à cercosporiose em relação ao controle (Tabela 11).

Os dados obtidos corroboram com os de Martins (1988) que ao utilizar *S. cerevisiae* obteve proteção em plantas de cafeeiro a *H. vastatrix*. Bonaldo (2005) e Piccinin, Di Piero e Pascholati (2005) relataram que a levedura reduziu significativamente a antracnose em sorgo e melhorou a produtividade da cultura. Cia (2005) observou que *S. cerevisiae*, na concentração de 20 mg mL^{-1} , protegeu os frutos de mamoeiro contra a antracnose, quando aplicado 24 h antes da inoculação do patógeno. Boro (2009) relatou que o extrato bruto da levedura, na concentração de 200 Eq μg de manose mL^{-1} , protegeu localmente folhas de maracujazeiro amarelo contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Zanardo, Pascholati e Fialho (2009) demonstraram que suspensões dos extratos brutos autoclavados de *S. cerevisiae* reduziram a severidade de antracnose em plântulas de pepineiro entre 82 a 86% e as frações resultantes da precipitação etanólica em 98%. Fernandes, Santos e Ventura (2005) observaram que o extrato bruto da levedura autoclavado apresentou atividade elicitora, sendo capaz de induzir respostas associadas à defesa em mudas de mamoeiro do grupo 'Solo', 'Golden' e 'Sunrise Solo', havendo maior concentração de compostos fenólicos e aumento significativo da atividade de peroxidases nas plantas tratadas.

As células e preparações de *S. cerevisiae* contêm elicitores, os quais ativam os mecanismos de defesa da planta, contribuindo para o controle de doenças (HAHN; ALBERSHEIM, 1978; WULLF; PASCHOLATI, 1999). Lopez (1991) demonstrou que plantas de sorgo pré-tratadas com o extrato de leveduras apresentaram aumento no acúmulo de compostos fenólicos em resposta à inoculação com *Colletotrichum sublineolum*, sugerindo que a levedura pode modificar o metabolismo da planta no sentido de induzir resistência contra o patógeno.

Tabela 11. Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com polissacarídeos extraídos de *Saccharomyces cerevisiae*, 72 h antes da inoculação com *Cercospora coffeicola*¹.

<i>S. cerevisiae</i> (Eq µg de manose mL ⁻¹) ²	Número médio de lesões por folha ³	Proteção (%) ⁴
400	2,19 ± 0,28 ^b	86,4
800	9,79 ± 3,63 ^{ab}	39,3
1200	9,53 ± 1,68 ^{ab}	40,9
0	16,13 ± 3,34 ^a	---
CV (%)	31,55	

¹Avaliação realizada 30 dias após a inoculação.

²Extrato bruto de *S. cerevisiae* nas concentrações de 400, 800 e 1200 Eq µg de manose mL⁻¹, controle tratado com água.

³Médias ± erro padrão seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste t (P < 0,05). Para a análise estatística os dados foram transformados pela função \sqrt{x} .

⁴Determinada em relação ao controle.

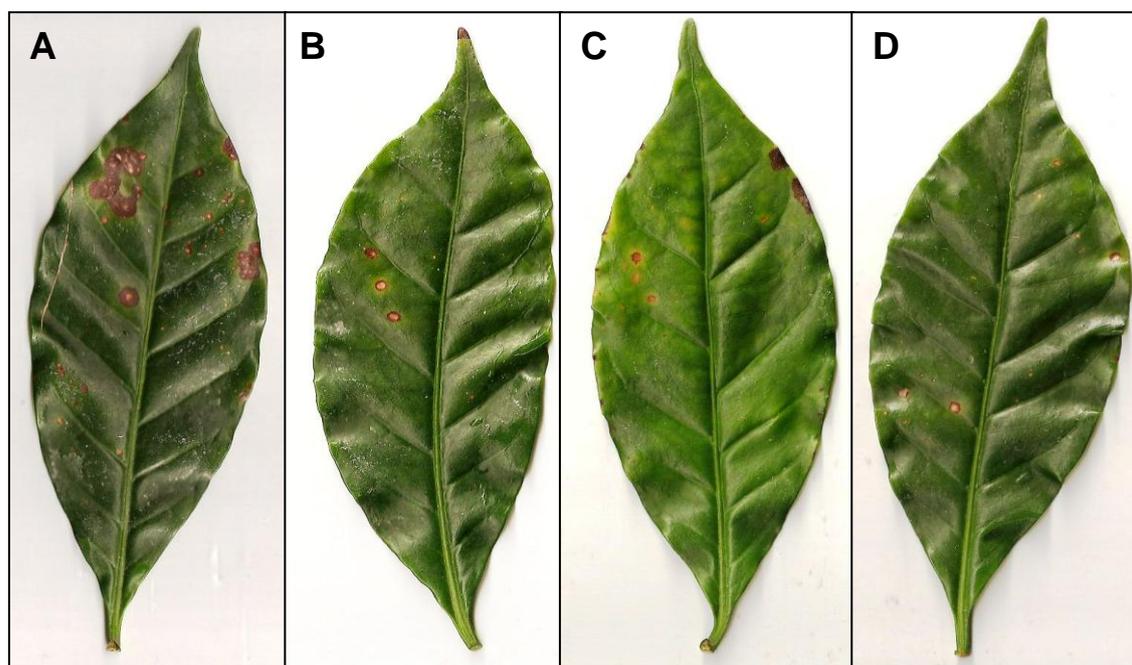


Figura 10. Folhas de cafeeiro suscetível 'Mundo Novo' tratadas com polissacarídeos extraídos de *Saccharomyces cerevisiae*, 72 h antes da inoculação de *Cercospora coffeicola* e avaliadas 30 dias após a inoculação do patógeno. A, B, C e D: 0, 400, 800 e 1200 Eq µg de manose mL⁻¹, respectivamente.

As mesmas plantas tratadas com os polissacarídeos extraídos de *S. cerevisiae* e avaliadas 60 dias após a inoculação com *C. coffeicola* não apresentaram proteção

significativa em relação ao controle; apenas a concentração de 400 Eq μg de manose mL^{-1} proporcionou redução de 45,7% nos sintomas de cercosporiose (Tabela 12), porém estatisticamente não diferiu do controle, tendo ocorrido um aumento significativo no número médio de lesões nas folhas dos cafeeiros (Figura 11), independentemente dos tratamentos. Estes resultados sugerem que a proteção contra cercosporiose nos cafeeiros tratados não perdurou por muito tempo havendo, possivelmente, a necessidade de re-aplicação do extrato, pois a planta estaria retornando ao seu metabolismo normal não desviando sua energia para a ativação de respostas de defesa (LOPEZ, 1991).

Tabela 12. Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com polissacarídeos extraídos de *Saccharomyces cerevisiae*, 72 h antes da inoculação com *Cercospora coffeicola*¹.

<i>S. cerevisiae</i> (Eq μg de manose mL^{-1}) ²	Número médio de lesões por folha ³	Proteção (%) ⁴
400	25,11 \pm 2,26 ^b	45,7
800	43,63 \pm 6,57 ^{ab}	5,6
1200	57,83 \pm 14,39 ^a	---
0	46,22 \pm 6,32 ^{ab}	---
CV (%)	18,01	

¹Avaliação realizada 60 dias após a inoculação.

²Extrato bruto de *S. cerevisiae* nas concentrações de 400, 800 e 1200 Eq μg de manose mL^{-1} , controle tratado com água.

³Médias \pm erro padrão seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste t ($P < 0,05$). Para a análise estatística os dados foram transformados pela função \sqrt{x} .

⁴Determinada em relação ao controle.

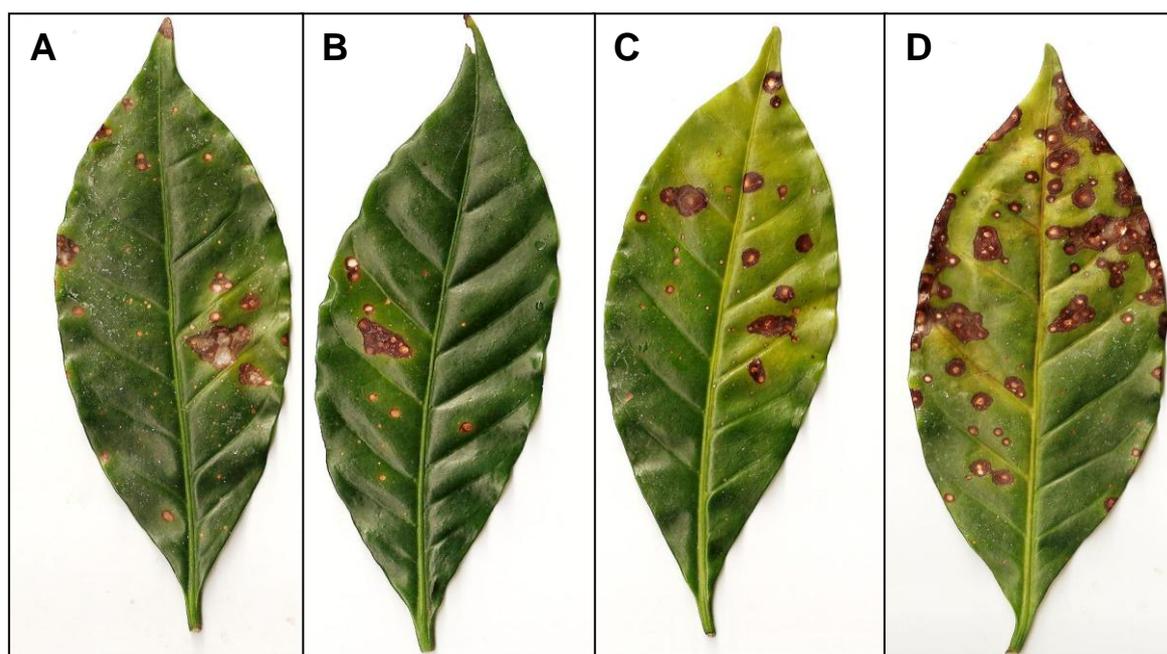


Figura 11. Folhas de cafeeiro suscetível 'Mundo Novo' tratadas com polissacarídeos extraídos de *Saccharomyces cerevisiae*, 72 h antes da inoculação de *Cercospora coffeicola* e avaliadas 60 dias após a inoculação do patógeno. A, B, C e D: 0, 400, 800 e 1200 Eq μg de manose mL^{-1} , respectivamente.

5.1.7. Avaliação do efeito dos polissacarídeos extraídos de *Saccharomyces cerevisiae* *in vitro*

Todas as concentrações de polissacarídeos extraídos de *S. cerevisiae* utilizados nos testes *in vitro* não demonstraram efeito direto sobre o crescimento micelial de *C. coffeicola* avaliadas 20 dias após a deposição do disco de BDA contendo o micélio do fungo (Tabela 13 e Figura 12). Além disso, não houve diferenças significativas nos índices de crescimento micelial do patógeno nos tratamentos em relação ao controle (Figura 13) e também não houve efeito direto significativo na germinação dos conídios do patógeno em contato com a concentração de 400 Eq μg de manose mL^{-1} em relação ao controle (Tabela 14).

Estes resultados corroboram com os dados obtidos por Jesus (2009) e Boro (2009) em ensaios *in vitro*. As mesmas concentrações de polissacarídeos extraídos de *S. cerevisiae* não interferiram diretamente na germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix* e no crescimento de colônias de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, embora tenham reduzido significativamente as severidades da ferrugem alaranjada e bacteriose avaliadas em cafeeiro e maracujazeiro amarelo, respectivamente.

Tabela 13. Crescimento micelial de *Cercospora coffeicola* sob diferentes concentrações de polissacarídeos extraídos de *Saccharomyces cerevisiae*¹.

<i>S. cerevisiae</i> (Eq µg de manose mL ⁻¹) ²	Crescimento micelial (cm) ³	Inibição (%) ⁴
400	5,27 ± 0,72 ^a	---
800	5,75 ± 0,40 ^a	---
1200	5,22 ± 0,02 ^a	---
0	5,57 ± 0,12 ^a	---
CV (%)	9,88	

¹Avaliação realizada 20 dias após a deposição de discos de BDA contendo o micélio do fungo.

²Extrato bruto de *S. cerevisiae* nas concentrações de 400, 800 e 1200 Eq µg de manose mL⁻¹ incorporadas em meio BDA, controle: fungo crescido em meio BDA na ausência de levedura.

³Medida do diâmetro micelial. Médias ± erro padrão seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

⁴Determinada em relação ao controle.

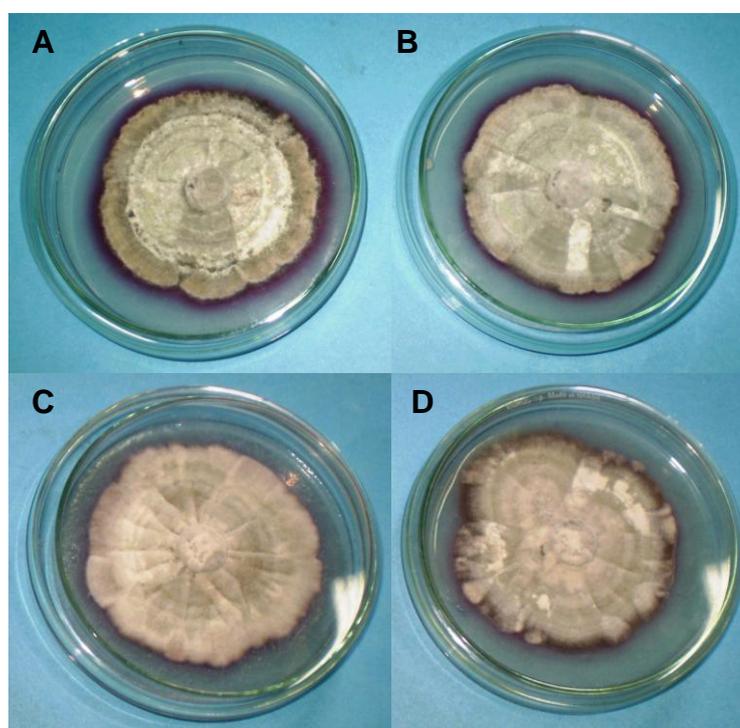


Figura 12. Crescimento micelial de *Cercospora coffeicola* em BDA acrescido de polissacarídeos extraídos de *Saccharomyces cerevisiae*. A, B, C e D: 0, 400, 800 e 1200 Eq µg de manose mL⁻¹, respectivamente.

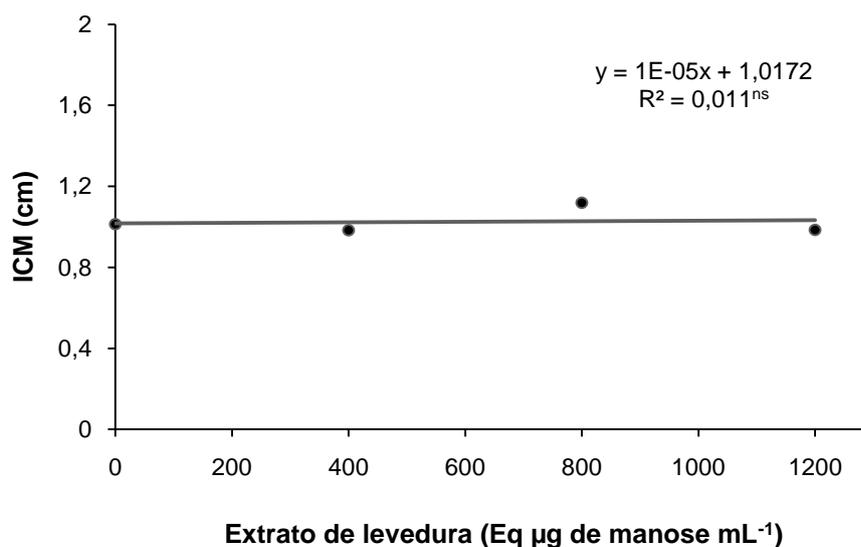


Figura 13. Índice de crescimento micelial (ICM) de *Cercospora coffeicola* sob diferentes concentrações de polissacarídeos extraídos de *Saccharomyces cerevisiae*. As concentrações de 400, 800 e 1200 Eq µg de manose mL⁻¹ foram incorporadas em meio BDA. ^{ns}- não significativo.

Tabela 14. Germinação *in vitro* de conídios de *Cercospora coffeicola* na presença de *Saccharomyces cerevisiae*.

<i>S. cerevisiae</i> (Eq µg de manose mL ⁻¹) ¹	Número total de conídios germinados ²	Germinação de conídios (% do controle) ³	Estímulo na germinação de conídios (% do controle) ⁴
400	74,33 ± 1,3 ^a	103,4	3,4
0	71,82 ± 1,4 ^a	---	---
CV (%)	3,94		

¹Solução aquosa de polissacarídeos extraídos de *S. cerevisiae* na concentração de 400 Eq µg mL⁻¹ incorporada em meio de cultura V8; controle: água deionizada esterilizada incorporada ao meio V8.

²Médias ± erro padrão do número de conídios germinados nos tratamentos e no controle observados em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água 2%. Médias ± erro padrão seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

³Porcentagem de germinação de conídios de *C. coffeicola* em contato com os polissacarídeos extraídos de *S. cerevisiae*, calculada em relação ao controle.

⁴Determinada em relação ao controle.

5.1.8. Avaliação do efeito da proteína harpina *in vivo*

Os testes realizados em plantas de café 'Mundo Novo' tratadas previamente com o produto comercial Messenger[®], nas concentrações de 7,5; 15; 30; 60 e 120 µg mL⁻¹ de proteína harpina, aplicadas 72 h antes da inoculação com *C. coffeicola*, e avaliadas 30 dias após a inoculação, evidenciaram redução dos sintomas da doença e proteção significativa à

cercosporiose de 66,0; 73,9 e 65,1% nas concentrações de 7,5; 15 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. A concentração de 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína harpina não diferiu significativamente do controle, enquanto a concentração de 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aumentou significativamente o número de lesões de cercosporiose nas folhas do cafeeiro (Figura 14 e Tabela 15).

Estes dados corroboram com Danner et al. (2008) que observaram redução de sintomas em pêssegos tratados em pós-colheita com 80 mg L^{-1} de proteína harpina, 12 h antes da inoculação com o patógeno *Monilinia fructicola*, e a ativação de mecanismos relacionados à resistência dos frutos, além de comprovarem que os teores de proteínas totais, açúcares totais, fenóis totais e a atividade da fenilalanina amônia-liase aumentaram nos frutos tratados. Yang et al. (2005) verificaram que melões tratados, após a colheita, com 90 mg L^{-1} de harpina apresentaram indução de resistência local e sistêmica contra *Trichothecium roseum* e associaram esta proteção com a ativação de peroxidase e quitinase. Capdeville et al. (2002) verificaram que maçãs tratadas com 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de harpina, 96 h antes da inoculação com *Penicillium expansum*, reduziram os sintomas de bolor azul.

Entretanto, Boro (2009) e Jesus (2009) relataram que a aplicação foliar de diferentes concentrações de harpina não protegeu o maracujazeiro amarelo e cafeeiro à mancha bacteriana e ferrugem alaranjada, respectivamente.

Tabela 15. Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com proteína harpina, 72 h antes da inoculação com *Cercospora coffeicola*¹.

Harpina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ²	Número médio de lesões por folha ³	Proteção (%) ⁴
7,5	4,85 \pm 1,88 ^c	66,0
15	3,72 \pm 1,17 ^c	73,9
30	4,98 \pm 1,24 ^c	65,1
60	11,62 \pm 2,60 ^b	18,5
120	32,66 \pm 6,16 ^a	---
0	14,26 \pm 2,81 ^b	---
CV (%)	42,70	

¹Avaliação realizada 30 dias após a inoculação.

²Soluções aquosas do produto Messenger[®] nas concentrações de 7,5; 15; 30; 60 e 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína harpina, controle tratado com água.

³Médias \pm erro padrão seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste t ($P \leq 0,05$). Para a análise estatística os dados foram transformados pela função \sqrt{x} .

⁴Determinada em relação ao controle.

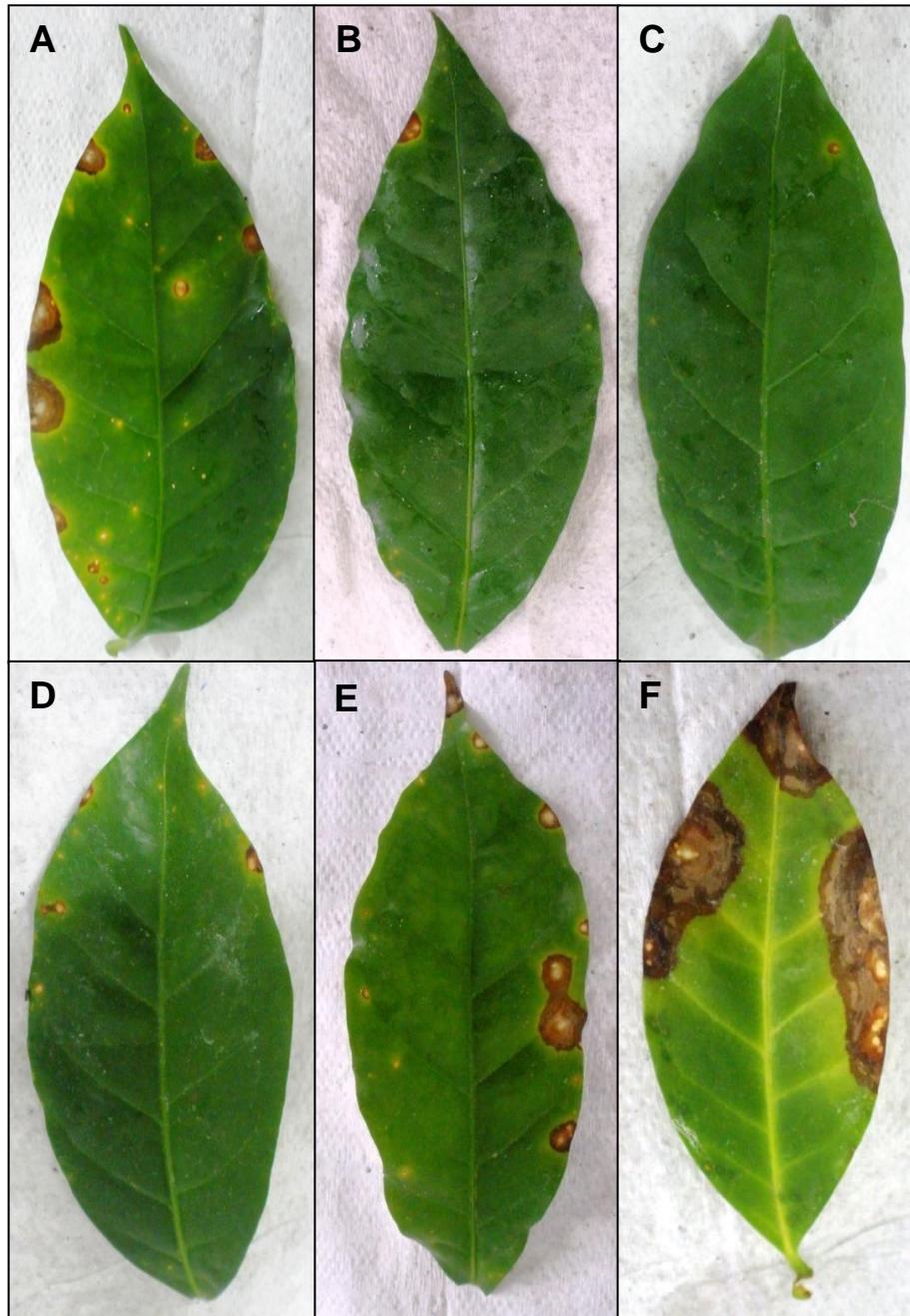


Figura 14. Folhas de cafeeiro suscetível 'Mundo Novo' tratadas com proteína harpina 72 h antes da inoculação de *Cercospora coffeicola* e avaliadas 30 dias após a inoculação do patógeno. A, B, C, D, E e F: 0; 7,5; 15; 30; 60 e 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína harpina, respectivamente.

Quando a avaliação das plantas de cafeeiro, tratadas com harpina e inoculadas com *C. coffeicola* após 72 h, foi feita 60 dias após a inoculação, a severidade em todos os tratamentos aumentou consideravelmente (Figura 15) e não apresentou diferença significativa em relação ao controle. A concentração de 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de harpina demonstrou a maior média de lesões de cercosporiose por folha (Tabela 16), como já havia sido

observado na avaliação feita 30 dias após a inoculação com o patógeno e aumentou significativamente a severidade da doença (68%) em relação ao controle. Estes resultados sugerem que o efeito protetor da proteína harpina em cafeeiro contra cercosporiose não persiste nas plantas tratadas após 60 dias, pois, possivelmente, estas podem estar retornando ao seu metabolismo normal (LOPEZ, 1991), havendo a possibilidade de que uma nova aplicação da proteína seja necessária para ativar novamente os mecanismos de defesa da planta.

Tabela 16. Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com proteína harpina, 72 h antes da inoculação com *Cercospora coffeicola*¹.

Harpina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ²	Número médio de lesões por folha ³	Proteção (%) ⁴
7,5	38,36 \pm 9,19 ^b	3,7
15	30,02 \pm 9,57 ^b	24,6
30	25,63 \pm 4,68 ^b	35,6
60	42,69 \pm 5,34 ^b	---
120	66,96 \pm 8,29 ^a	---
0	39,83 \pm 5,49 ^b	---
CV (%)	68,56	

¹Avaliação realizada 60 dias após a inoculação.

²Soluções aquosas do produto Messenger[®] nas concentrações de 7,5; 15; 30; 60 e 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína harpina, controle tratado com água.

³Médias \pm erro padrão seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste t ($P < 0,05$). Para a análise estatística os dados foram transformados pela função \sqrt{x} .

⁴Determinada em relação ao controle.

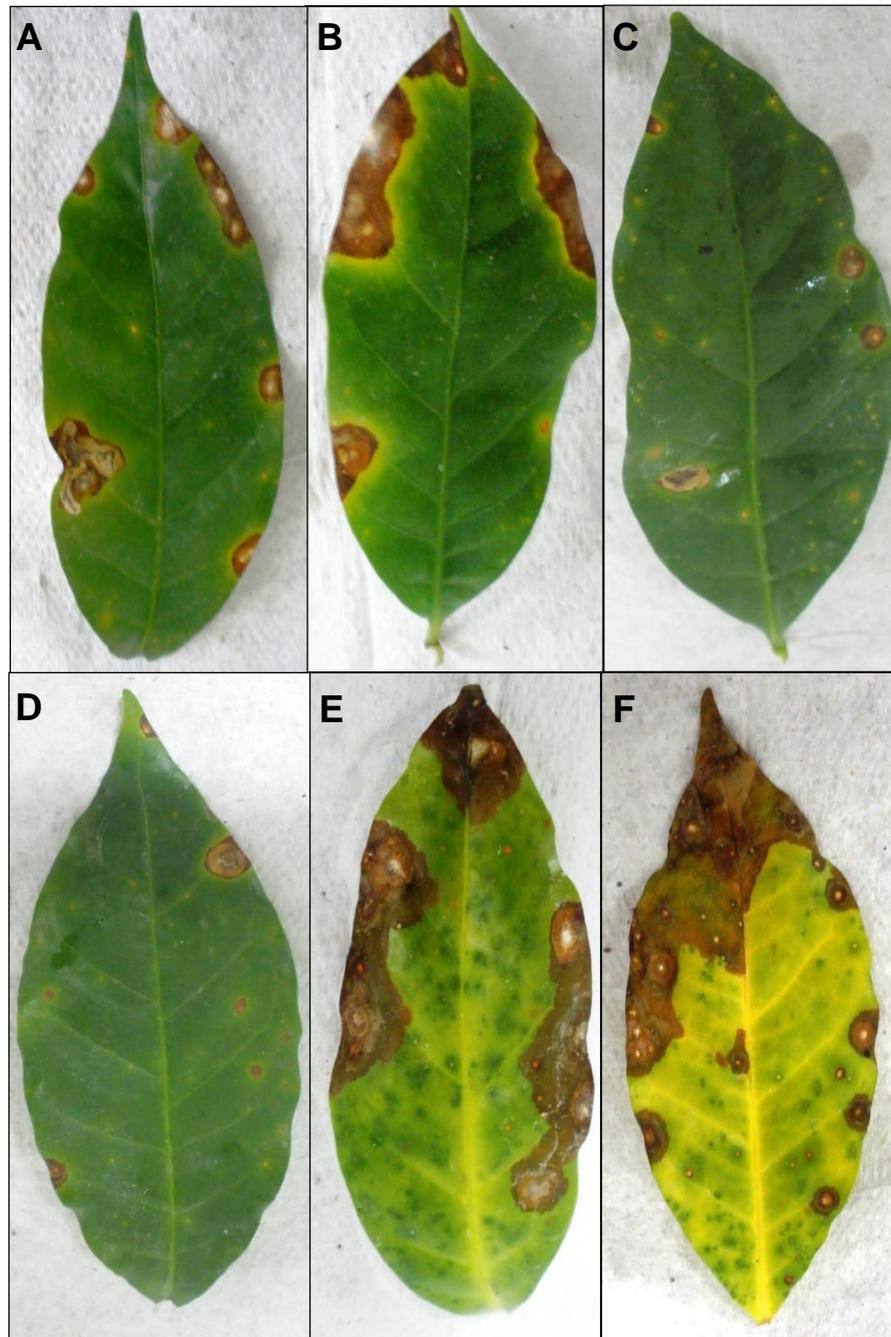


Figura 15. Folhas de cafeeiro suscetível 'Mundo Novo' tratadas com proteína harpina 72 h antes da inoculação de *Cercospora coffeicola* e avaliadas 60 dias após a inoculação do patógeno. A, B, C, D, E e F: 0; 7,5; 15; 30; 60 e 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína harpina, respectivamente.

5.1.9. Avaliação do efeito da proteína harpina *in vitro*

As concentrações de harpina utilizadas nos testes *in vitro*, espalhadas ou incorporadas em meio BDA, não demonstraram efeito direto sobre o crescimento micelial de

C. coffeicola avaliado 20 dias após a deposição do disco de BDA contendo o micélio do fungo (Tabela 17; Figuras 16 e 17). Estes resultados corroboraram com os dados obtidos por Yang et al. (2005) que não evidenciaram efeito direto da proteína harpina no desenvolvimento do fungo *Trichothecium roseum in vitro*.

Porém, houve diferenças significativas nos ICM do patógeno nas concentrações de harpina avaliadas. Quando as concentrações de harpina foram incorporadas no meio de cultura não houve efeito no ICM (Figura 19), porém, quando a proteína foi espalhada sobre o meio de cultura houve interação significativa da concentração da harpina com o crescimento micelial do patógeno ao longo do tempo (Figura 18) demonstrando que a medida que aumenta a concentração da proteína no meio de cultura aumenta o crescimento micelial. Nesse caso, o método por espalhamento pode ter propiciado maior contato do micélio do patógeno com a proteína harpina.

Em relação à germinação *in vitro* dos conídios de *C. coffeicola*, os resultados revelaram que as duas maiores concentrações de harpina avaliadas estimularam significativamente a germinação do patógeno em relação ao controle (Tabela 18). Estes dados corroboram com Boro (2009) e Jesus (2009) que verificaram que a concentração de $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ de harpina estimulou o desenvolvimento de colônias de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e a germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix in vitro*.

Tabela 17. Crescimento micelial de *Cercospora coffeicola* sob diferentes concentrações de harpina¹.

Harpina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ²	Espalhado sobre o meio de cultura		Incorporado em meio de cultura	
	Crescimento micelial (cm) ³	Inibição (%) ⁴	Crescimento micelial (cm) ³	Inibição (%) ⁴
7,5	5,32 ± 0,15 ^a	---	5,63 ± 0,21 ^a	---
15	5,11 ± 0,16 ^a	---	5,80 ± 0,05 ^a	---
30	5,43 ± 0,04 ^a	---	5,78 ± 0,21 ^a	---
60	5,45 ± 0,30 ^a	---	5,20 ± 0,20 ^a	---
120	5,55 ± 0,06 ^a	---	---	---
0	5,11 ± 0,09 ^a	---	5,55 ± 0,17 ^a	---
CV (%)	4,33		5,72	

¹Avaliação realizada 20 dias após a deposição de discos de BDA contendo o micélio do fungo.

²Soluções aquosas do produto Messenger[®] nas concentrações de 7,5; 15; 30; 60 e $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína harpina incorporadas ou espalhadas em meio de cultura BDA, controle: meio BDA.

³Medida do diâmetro micelial. Médias ± erro padrão seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

⁴Determinada em relação ao controle.

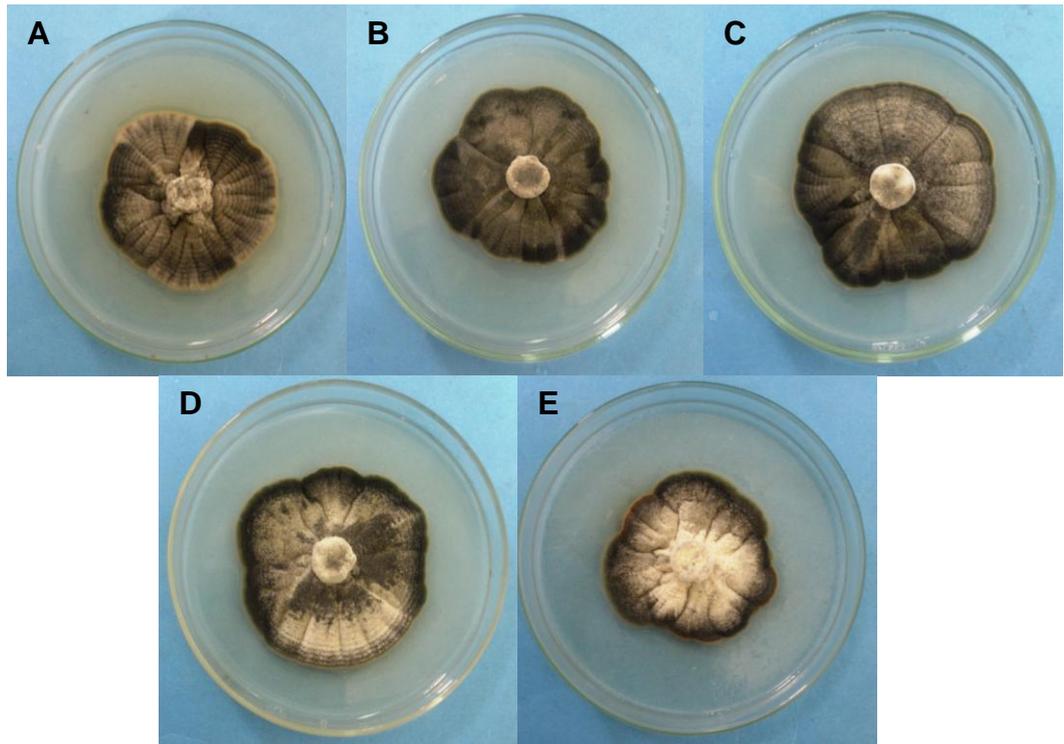


Figura 16. Crescimento micelial de *Cercospora coffeicola* em BDA, exposto a diferentes concentrações de harpina incorporadas no meio. A, B, C, D e E: 0; 7,5; 15; 30 e 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína harpina, respectivamente.

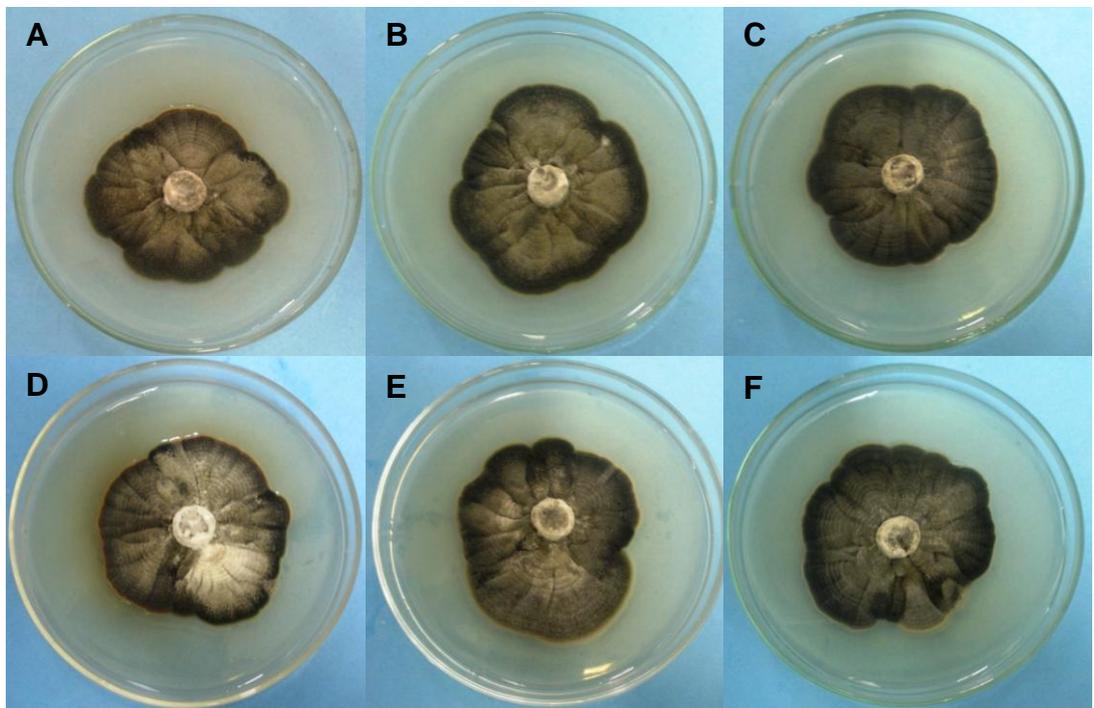


Figura 17. Crescimento micelial de *Cercospora coffeicola* em BDA, exposto a diferentes concentrações de harpina espalhadas sobre o meio. A, B, C, D, E e F: 0; 7,5; 15; 30; 60 e 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína harpina, respectivamente.

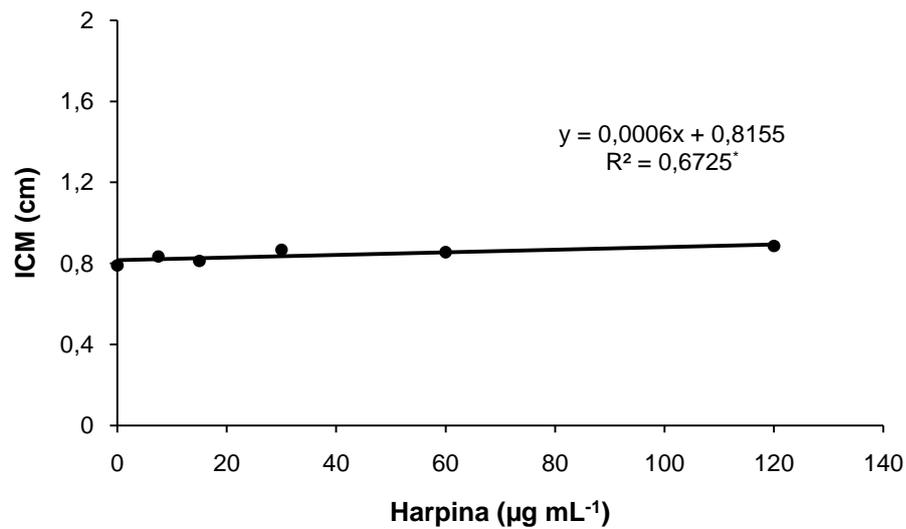


Figura 18. Índice de crescimento micelial (ICM) de *Cercospora coffeicola* sob diferentes concentrações de harpina. As concentrações 7,5; 15; 30; 60 e 120 µg mL⁻¹ de proteína harpina do produto comercial Messenger[®] foram espalhadas em meio BDA. * - significativo a 5%.

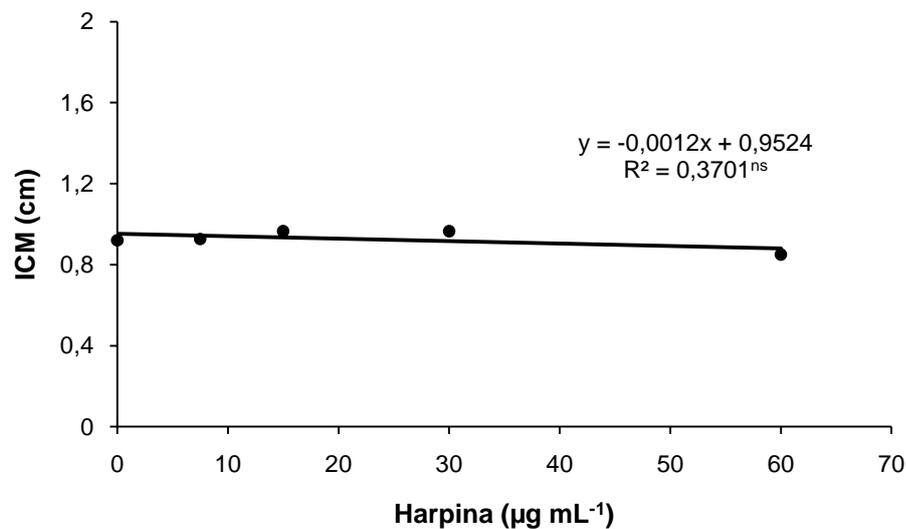


Figura 19. Índice de crescimento micelial (ICM) de *Cercospora coffeicola* sob diferentes concentrações de harpina. As concentrações 7,5; 15; 30 e 60 µg mL⁻¹ de proteína harpina do produto comercial Messenger[®] foram incorporadas em meio BDA. ^{ns} – não significativo.

Tabela 18. Germinação *in vitro* de conídios de *Cercospora coffeicola* sob diferentes concentrações da proteína harpina.

Harpina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ¹	Número total de conídios germinados ²	Germinação de conídios (% do controle) ³	Estímulo na germinação de conídios (% do controle) ⁴
7,5	73,67 \pm 0,7 ^b	102,6	2,6
15	73,36 \pm 0,3 ^b	102,1	2,1
30	86,73 \pm 1,0 ^a	120,8	20,8
120	85,60 \pm 1,1 ^a	119,2	19,2
0	71,82 \pm 1,4 ^b	---	---
CV (%)	2,80		

¹Soluções aquosas do produto comercial Messenger[®] nas concentrações de 7,5; 15; 30 e 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de harpina incorporada em meio de cultura V8; controle: água deionizada esterilizada incorporada ao meio V8.

²Médias \pm erro padrão do número de conídios germinados nos tratamentos e no controle observados em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água 2%. Médias \pm erro padrão seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

³Porcentagem de germinação de conídios de *C. coffeicola* em contato com a proteína harpina, calculada em relação ao controle.

⁴Determinada em relação ao controle.

O aumento no número de lesões de cercosporiose em cafeeiros previamente tratados com 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de harpina, em relação ao controle, pode estar associado com o estímulo na germinação dos conídios do patógeno na presença da proteína, e com a fitotoxicidade ocasionada nas folhas pelo tratamento, pois alguns indutores de resistência, dependendo da concentração, podem agir na planta reduzindo seu desenvolvimento ou aumentando a suscetibilidade a doenças. Romero, Neves e Leite (2001) relataram que a pulverização de plantas de berinjela com ASM, em campo, semanalmente, visando o controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, reduziu a produção de uma das seis cultivares testadas. Em contraposição, sintomas de fitotoxidez não foram observados por Zahid, Smith e Guest (2000) 14 semanas após pulverizarem mudas de essências florestais (*Pinus radiata*, *Banksia integrifolia* e *Isopogon cuneatus*) com ASM, nas concentrações de 1,0 e 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Cole (1999), trabalhando com fumo, encontrou eficiência do ASM contra bactérias e fungos patogênicos, mas o composto revelou-se moderadamente tóxico ao hospedeiro. Latunde-Dada e Lucas (2001) verificaram que o tratamento de sementes de feijão caupi com ASM, 7 dias antes da inoculação foliar com o patógeno, protegeu as plântulas contra antracnose causada por *C. destructivum*. Enquanto que nenhum efeito fitotóxico foi observado nas plântulas tratadas com concentrações de ASM até 20 ppm, o tratamento com concentrações maiores do composto resultou em atrofia das plântulas e

afetou adversamente o aumento foliar.

Lustosa, Romeiro e Maia (1999) expuseram sementes de tomateiro (imersão por 12 h) em soluções com diferentes concentrações de ASM, e sementes tratadas com água serviram como controle. Cinco a dez dias após o tratamento foi feita a avaliação observando-se melhor percentual de germinação das sementes não tratadas (94%), seguidas daquelas expostas às concentrações de 25, 50 e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que resultaram em porcentagens de germinação de, respectivamente, 82, 77 e 54%, enquanto que nas concentrações de 250 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, as porcentagens de germinação foram iguais ou inferiores a 5%. Entretanto, Yang et al. (2005) não verificaram qualquer efeito fitotóxico em melões quando a harpina foi aplicada nas concentrações de 30, 60, 90, 120 e 200 mg L^{-1} .

Maia, Romeiro e Lustosa (2000), também estudando a fitotoxidez de diferentes concentrações de ASM a tomateiro, observaram que ela aumentava diretamente com o aumento da concentração, sugerindo que 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ era uma concentração aceitável, por proporcionar 50% menos de lesões de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* em relação à testemunha e níveis aceitáveis de fitotoxidez. Segundo esses autores, aos 16 dias após a semeadura, plântulas foram pulverizadas com o ativador (0, 25, 50, 125, 250, 500, 1000 mg mL^{-1}) e, oito dias depois, foram avaliados parâmetros como altura, número de folhas, número de folhas com putativos sintomas de toxidez, peso da matéria fresca e da matéria seca da parte aérea. Os autores concluíram que a exposição de plantas a concentrações menores que 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não induz toxidez severa e que tentativas de controle pelo uso do ASM em pulverizações devem ser realizadas com concentrações do indutor de resistência dentro desses limites. Romeiro et al. (1999) avaliaram o efeito de ASM em plantas de feijoeiro, aplicando o produto em pulverizações, 15 dias após a germinação, em diferentes concentrações e observaram que o aumento da fitotoxidez nas plantas era devido às maiores concentrações de ASM utilizadas.

5.1.10. Avaliação dos efeitos de ASM, proteína harpina e polissacarídeos extraídos de *S. cerevisiae* quando re-aplicados em cafeeiro na proteção contra *C. coffeicola*

Os testes de indução de resistência realizados em plantas de café 'Mundo Novo' tratadas previamente com as soluções aquosas dos produtos comerciais Bion[®] (200 $\mu\text{g i.a. mL}^{-1}$) e Messenger[®] (15 $\mu\text{g de harpina mL}^{-1}$), além dos polissacarídeos extraídos de *S. cerevisiae* (400 Eq $\mu\text{g de manose mL}^{-1}$), aplicadas 72 h antes da inoculação com *C. coffeicola*, e avaliadas 70 dias após a inoculação, evidenciaram que apenas o ASM protegeu significativamente o cafeeiro contra a cercosporiose em 48,3% em relação ao controle.

Porém, quando os mesmos tratamentos foram aspergidos novamente nas folhas, 30

dias após a inoculação com o patógeno, pôde-se observar proteção significativa contra a doença de 50,2; 42,5 e 46,4% nas plantas tratadas com ASM, proteína harpina e polissacarídeos de *S. cerevisiae*, respectivamente (Tabela 19 e Figura 20). Pode-se observar na tabela 19 que os cafeeiros tratados com ASM, uma ou duas vezes, não diferiram significativamente entre si, mas demonstraram proteção significativa em relação ao controle. Estes dados demonstram que o ASM, na concentração 200 µg de i.a. mL⁻¹, provavelmente, deve ter algum efeito residual, aplicado uma vez, fazendo com que a defesa no cafeeiro continue sendo ativada, mesmo 70 dias após a inoculação, fato este que não ocorreu em relação aos tratamentos com a proteína harpina e os polissacarídeos extraídos de *S. cerevisiae* quando aplicados apenas uma vez.

Os resultados corroboraram com os estudos observados por Patrício et al. (2007), que tratou cafeeiros com o ASM quatro dias antes da inoculação com *C. coffeicola* e após 30 dias aplicou novamente o produto nas plantas obtendo a proteção de 25 a 74%. Mazaro (2007), ao aplicar ASM semanalmente em morango observou proteção significativa contra mancha-de-micosferela (*Mycosphaerella fragariae*), mancha-de-dendrofoma (*Dendrophoma obscurans*) e flor-preta (*Colletotrichum acutatum*). Além disso, demonstrou que o tratamento com ASM não interferiu sobre a massa média dos frutos e produtividade e induziu a produção de proteínas-RP. Isso demonstrou que o indutor, nas concentrações e frequência de aplicações avaliadas, não comprometeu a produtividade com perdas metabólicas, fato possível quando se faz uso de indutores de resistência, devido a desvios de rotas metabólicas para a síntese de compostos de defesa (HEIL; BOSTOCK, 2002).

Tabela 19. Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com ASM, proteína harpina e polissacarídeos extraídos de *S. cerevisiae*, 72 h antes e 30 dias após a inoculação com *Cercospora coffeicola*¹.

Tratamentos ²	Número de aplicações ³	Número médio de lesões por folha ⁴	Proteção (%) ⁵
200 µg mL ⁻¹ de ASM	1	2,76 ± 0,45 ^b	48,3
	2	2,66 ± 0,39 ^b	50,2
15 µg mL ⁻¹ de harpina	1	5,35 ± 0,98 ^a	---
	2	3,07 ± 0,38 ^b	42,5
400 Eq µg de manose mL ⁻¹ <i>S. cerevisiae</i>	1	7,33 ± 1,43 ^a	---
	2	2,86 ± 0,40 ^b	46,4
Controle	---	5,34 ± 0,62 ^a	---
CV (%)		28,31	

¹Avaliação realizada 70 dias após a inoculação.

²Soluções aquosas dos produtos Bion® e Messenger® nas concentrações de 200 e 15 µg mL⁻¹ de ASM e proteína harpina, respectivamente; e de polissacarídeos extraídos de *S. cerevisiae* na concentração de 400 Eq µg de manose mL⁻¹; controle tratado com água.

³Número de aplicações dos tratamentos: 1 –aplicação dos tratamentos 72 h antes da inoculação do patógeno; 2 –aplicação 72 h antes e 30 dias após a inoculação do patógeno.

⁴Médias ± erro padrão seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste t (P < 0,05). Para a análise estatística os dados foram transformados pela função \sqrt{x} .

⁵Determinada em relação ao controle.

Piccinin, Di Piero e Pascholati (2005) avaliaram o efeito de *S. cerevisiae*, aplicado semanalmente, na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares como antracnose e mancha foliar, causadas pelos fitopatógenos *Colletotrichum sublineolum* e *Exserohilum turcicum*, e observaram que houve redução na velocidade de progresso das duas doenças. Esse atraso na evolução dos sintomas de antracnose e mancha foliar pode ter contribuído para o aumento de produtividade verificado em plantas de sorgo tratadas semanalmente com a levedura.

Porém, uma desvantagem apontada para a indução de resistência é que a ativação

dos mecanismos de defesa desviaria parte da energia utilizada no metabolismo normal da planta, comprometendo a produtividade. Essa desvantagem é contestada por alguns autores que afirmam que o indutor leva a planta a um estado de alerta, e a energia para defesa é gasta apenas quando ocorre o reconhecimento do fitopatógeno pela planta induzida, sendo este mecanismo denominado de preparo ou sensibilização (*“priming”*), demonstrado em *Arabidopsis* (PIGA et al., 1997; KOHLER et al., 2002; CONRATH et al., 2006).

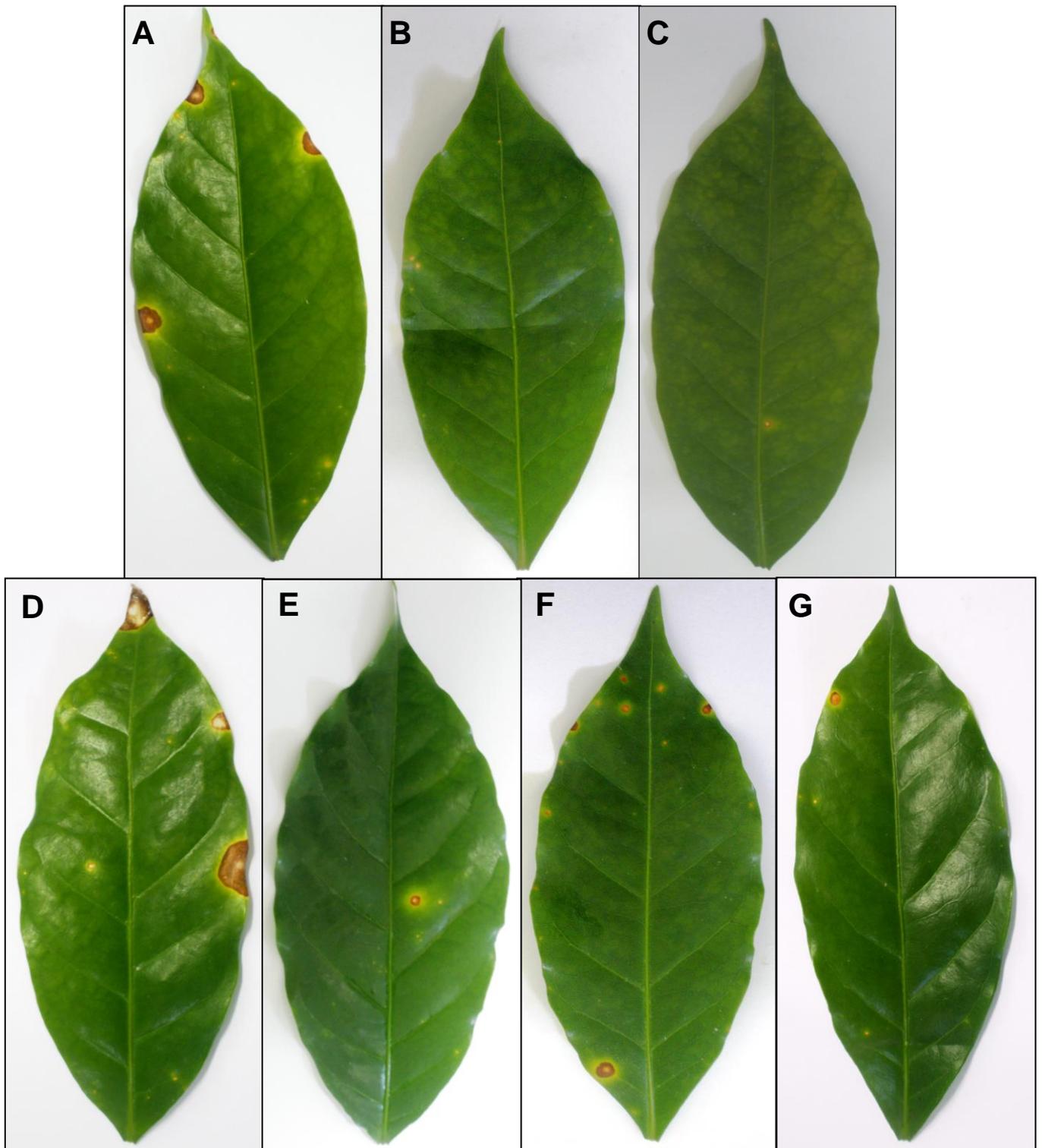


Figura 20. Folhas de cafeeiro suscetível 'Mundo Novo' tratadas com ASM, proteína harpina polissacarídeos extraídos de *S. cerevisiae* 72 h e 30 dias após a inoculação de *C. coffeicola*. A: controle; aplicação 72 h antes da inoculação com o patógeno: B ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ASM), D ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína harpina), F ($400 \text{ Eq } \mu\text{g}$ de manose mL^{-1} *S. cerevisiae*); aplicação 72 h antes e 30 dias após a inoculação do patógeno: C ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ASM), E ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína harpina), G ($400 \text{ Eq } \mu\text{g}$ de manose mL^{-1}). Todos os tratamentos foram avaliados 70 dias após a inoculação do patógeno.

5.2. Estudos Moleculares

5.2.1. Eletroforese de RNAs de cafeeiro 'Mundo Novo' extraídos de plantas controle ou tratadas com ASM ou proteína harpina

Os RNAs totais dos cafeeiros 'Mundo Novo' controle ou tratados com o ASM e a proteína harpina, nas concentrações $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, em água deionizada esterilizada, foram extraídos por meio da utilização do reagente *TRIzol*[®], como demonstra a eletroforese em gel de agarose 0,8% representada na Figura 21. Pode-se observar nesta figura duas bandas mais fortes que são características de RNAs ribossômicos de células vegetais, 25S e 17S.

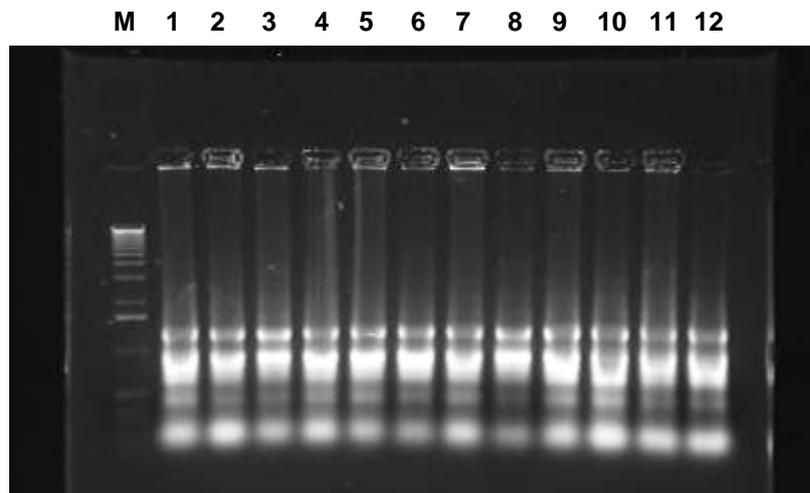


Figura 21. Eletroforese em gel de agarose (0,8%), corado com brometo de etídeo, de RNAs extraídos de folhas de cafeeiro 'Mundo Novo' aspergidas ou não com ASM e proteína harpina nas concentrações $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. **(M)** Marcador de peso molecular 1Kb; **(1)** Tratamento com água deionizada esterelizada; **(2)** plantas somente tratadas com ASM, sendo o RNA extraído após 72 h; **(3)** plantas somente tratadas com proteína harpina, sendo o RNA extraído após 72 h; **(4)** plantas tratadas com ASM e inoculadas após 72 h, sendo que, depois da inoculação as extrações foram feitas em 48 h; **(5)** 72 h; **(6)** 7 dias; **(7)** plantas tratadas com proteína harpina e inoculadas após 72 h, sendo que, depois da inoculação as extrações foram feitas em 48 h; **(8)** 72 h; **(9)** 7 dias; **(10)**, **(11)** e **(12)** plantas somente inoculadas, sendo o RNA extraído após 48 h, 72 h e 7 dias, respectivamente.

5.2.2. Análise da expressão de genes por qRT-PCR

5.2.2.1. Análise da expressão do gene codificador da proteína com domínios ricos em leucina (LRR)

De acordo com a Figura 22 pode-se observar que não houve aumento da expressão do gene codificador da proteína com domínios ricos em leucina (LRR) quando as plantas foram tratadas com o ASM e a proteína harpina, quando tratadas e inoculadas, ou somente inoculadas, porém ocorreu um pequeno aumento após 48 h nos cafeeiros apenas inoculados. Estes resultados contrastaram com os de Jesus (2009) que observou, por meio da técnica RT-PCR semi-quantitativo, um aumento de expressão do gene *LRR* em cafeeiro, especialmente 72 h após o tratamento com ASM e 72 h e 96 h após a inoculação com *H. vastatrix*, nas plantas previamente tratadas com o agente abiótico. Este resultado foi semelhante às plantas tratadas com o agente biótico *Bacillus thuringiensis*, isolado do produto comercial Dipel PM[®], diferenciando, apenas, na resposta de cafeeiro ao tratamento com o isolado bacteriano após 72 h. Portanto, enquanto o ASM estimulou a expressão do *gene-LRR* sem a presença do patógeno, a ativação do mesmo, na planta tratada com o *B. thuringiensis*, só foi constatada após a indução seguida da inoculação de *H. vastatrix*. A utilização deste agente biótico poderia ser uma estratégia vantajosa devido a um menor custo metabólico para a planta, já que a ativação das respostas de defesa só ocorreria na presença do patógeno e não apenas com o agente biótico.

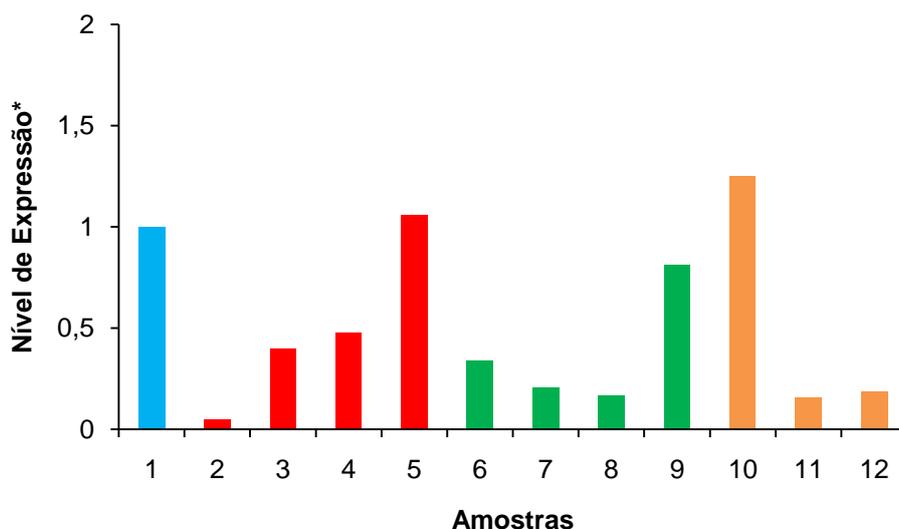


Figura 22. Análise do nível de expressão do gene codificador da proteína com domínios ricos em leucina (LRR). (1) Tratamento com água deionizada esterelizada; (2) plantas somente tratadas com ASM, sendo o RNA extraído após 72 h; (3) plantas tratadas com ASM e inoculadas após 72 h, sendo que, depois da inoculação as extrações foram feitas em 48 h; (4) 72 h; (5) 7 dias; (6) plantas somente tratadas com proteína harpina, sendo o RNA extraído após 72 h; (7) plantas tratadas com proteína harpina e inoculadas após 72 h, sendo que, depois da inoculação as extrações foram feitas em 48 h; (8) 72 h; (9) 7 dias; (10), (11) e (12) plantas somente inoculadas, sendo o RNA extraído após 48 h, 72 h e 7 dias, respectivamente.*Níveis normalizados da expressão do gene LRR.

De Nardi et al. (2006), ao utilizarem a técnica de *microarray*, não detectaram mudanças no perfil de expressão de 48 genes da família LRR de cafeeiro tratado com ASM. Porém, Guzzo, Tsai e Harakava (2009) constataram, por meio da técnica de qRT-PCR, o aumento significativo da expressão do gene LRR em plantas de cafeeiro 'Híbrido de Timor', resistente à ferrugem alaranjada do cafeeiro, 48 h após a inoculação do patógeno *H. vastatrix*.

Ninchuk et al. (2003) e Belkhadir, Subramaniam e Dangl (2004) propõem modelos que demonstraram que as proteínas codificadas pelos genes *R* podem atuar como receptores diretos ou indiretos de proteínas codificadas pelos patógenos, ou, ainda, como sensores, detectando alterações celulares provocadas por proteínas do patógeno. Somssich e Hahbroch (1998) afirmaram que com este reconhecimento, a ativação de vias de transdução de sinais relacionadas a diversos mecanismos de defesa levam à restrição do patógeno no sítio de infecção.

5.2.2.2. Análise da expressão do gene codificador de ACC oxidase

Em relação à expressão quantitativa do gene ACC oxidase, pode-se observar na

Figura 23 que houve aumento na expressão do gene de cafeeiro 72 h após a inoculação com *C. coffeicola* nas plantas previamente tratadas com ASM e um aumento de 3,4 vezes, em relação ao controle, em plantas 72 h após o tratamento com a proteína harpina. Os dados demonstraram que nas plantas tratadas com o ASM ocorre o aumento da expressão do gene da ACC oxidase após 72 h da inoculação do patógeno, e, neste caso pode estar ocorrendo o fenômeno denominado de “*priming*”, onde a planta tratada com algum elicitador, no caso o ASM, precisa da presença do patógeno para poder expressar o gene de defesa estudado (CONRATH et. al., 2002; GOELLNER; CONRATH, 2008). Além deste fato, pôde ser observado que as plantas apenas inoculadas com o patógeno não demonstraram aumento na expressão do gene ACC oxidase em qualquer intervalo de tempo estudado, isto é, apenas a presença de *C. coffeicola* na planta não é suficiente para ativar este gene. Estes dados demonstram que, provavelmente, está ocorrendo a ativação de mecanismos de defesa da planta mediados pela via do etileno, isto porque, ACC oxidase é uma enzima chave na produção do etileno. A expressão do gene ACC oxidase pode ser regulada também, por fatores ambientais, e durante processos fisiológicos associados ao desenvolvimento vegetal (Song et al., 2005).

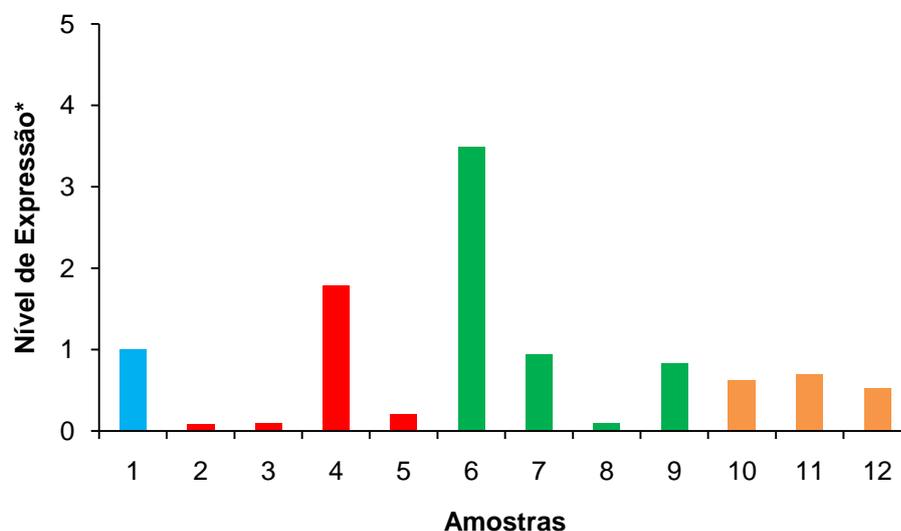


Figura 23. Análise do nível de expressão do gene codificador de ACC oxidase. (1) Tratamento com água deionizada esterilizada; (2) plantas somente tratadas com ASM, sendo o RNA extraído após 72 h; (3) plantas tratadas com ASM e inoculadas após 72 h, sendo que, depois da inoculação as extrações foram feitas em 48 h; (4) 72 h; (5) 7 dias; (6) plantas somente tratadas com proteína harpina, sendo o RNA extraído após 72 h; (7) plantas tratadas com proteína harpina e inoculadas após 72 h, sendo que, depois da inoculação as extrações foram feitas em 48 h; (8) 72 h; (9) 7 dias; (10), (11) e (12) plantas somente inoculadas, sendo o RNA extraído após 48 h, 72 h e 7 dias, respectivamente. *Níveis normalizados da expressão do gene de ACC oxidase.

Iriti e Faoro (2003b) observaram em plantas de feijoeiro tratadas com ASM, na concentração 0,3 mM, aumento na expressão do gene ACC oxidase entre 6 e 48 h após o tratamento com o indutor. Entretanto, 72 h após o tratamento, a expressão do gene diminuiu não diferindo das plantas controle tratadas com água. Herman, Restrepo e Smart (2007) demonstraram o efeito do ASM na expressão de genes de defesa em plantas de tomate, por meio da técnica qRT-PCR, e constataram que houve aumento na expressão do gene codificador da proteína básica PR-1, resposta mediada pela produção de etileno, 3 dias após as plantas serem tratadas com ASM, sendo que este efeito persistiu até 20 dias após a aplicação do indutor de resistência.

Porém, no presente estudo, as plantas tratadas com proteína harpina durante 72 h apresentaram um comportamento distinto das tratadas com ASM por 72 h, ocorrendo um aumento na expressão do gene ACC oxidase. Entretanto, nas plantas inoculadas com o patógeno, previamente tratadas com a proteína, não houve aumento na expressão do gene, demonstrando que para ocorrer ativação deste gene pelo tratamento com a proteína harpina, o cafeeiro não necessita da presença do patógeno. Esses resultados sugerem que em cafeeiro, a indução de resistência mediada por harpina e ASM ocorre através de vias sinalizadoras distintas. Dong et al. (2004) observaram em plantas de *Arabidopsis* tratadas com harpina, aumentos na expressão dos genes codificadores das proteínas EIN2 e EIN5, relacionadas à resistência a insetos e promoção de crescimento, respectivamente, e, ambos os genes tem sua ativação mediada pelo etileno. Assim, concluíram que a proteína harpina em *Arabidopsis* poderia estar atuando na ativação da via sinalizadora deste fitohormônio.

A harpina é conhecida por ativar uma MAP-quinase em folhas de tabaco (ADAM et al., 1997) e duas MAP-quinases em células de *Arabidopsis* (DESIKAN et al., 1999). Hahn e Harter (2009) propuseram um modelo da ativação da via do etileno, demonstrando que a partir de um estresse biótico ou abiótico, ocorreria a ativação de MAP-quinases que são capazes de fosforilar duas isoformas de ACC sintase e estas enzimas participam, junto com a ACC oxidase, na síntese de etileno.

5.2.2.3. Análise da expressão do gene codificador de β -1,3-glucanase

Dentre as proteínas-RP, as mais estudadas são as β -1,3-glucanases e quitinases, que possuem atividade hidrolítica sobre polímeros estruturais presentes nas paredes de fitopatógenos, tendo como consequência, o enfraquecimento das mesmas, podendo acarretar na morte desses microrganismos, e a atividade dessas proteínas-RP podem ser aumentadas quando as plantas são tratadas com agentes bióticos e abióticos considerados indutores de resistência (GUZZO; MARTINS, 1996; LABANCA, 2002).

Na avaliação feita da expressão do gene codificador de β -1,3-glucanase, pode-se

observar na Figura 24 que não ocorreu aumento na expressão do gene em plantas tratadas e tratadas e inoculadas com a proteína harpina e o patógeno, respectivamente. Todavia, ocorreu aumento na expressão deste gene, 48 e 72 h após a inoculação do patógeno, nas plantas previamente tratadas com ASM. No entanto, este aumento de expressão não foi detectado nas plantas apenas tratadas por 72 h com este indutor de resistência. Por outro lado, Guzzo, Harakava e Tsai (2009) observaram aumento significativo na expressão do gene codificador de β -1,3-glucanase em cafeeiros 'Mundo Novo', 72 h após o tratamento com ASM, na concentração de 950 μ M.

As plantas somente inoculadas com o patógeno, após 48 e 72 h, não demonstraram aumento da expressão, ocorrendo este aumento nas plantas, apenas 7 dias após a inoculação com *C. coffeicola*, fato este diferente do observado 7 dias após a inoculação em plantas previamente tratadas com ASM. Diante destes dados, pode ter ocorrido o efeito de "priming", sendo que as plantas apenas tratadas com o indutor de resistência não apresentaram aumento de expressão de genes de defesa, e sim, apenas quando foram posteriormente inoculadas com o patógeno. Além disso, houve a resposta de defesa mais rápida das plantas, previamente tratadas com ASM, associada ao aumento da expressão do gene da β -1,3-glucanase (48 e 72 h), em relação às plantas somente inoculadas com o patógeno, sendo que o aumento da expressão ocorreu apenas 7 dias após a inoculação com o patógeno.

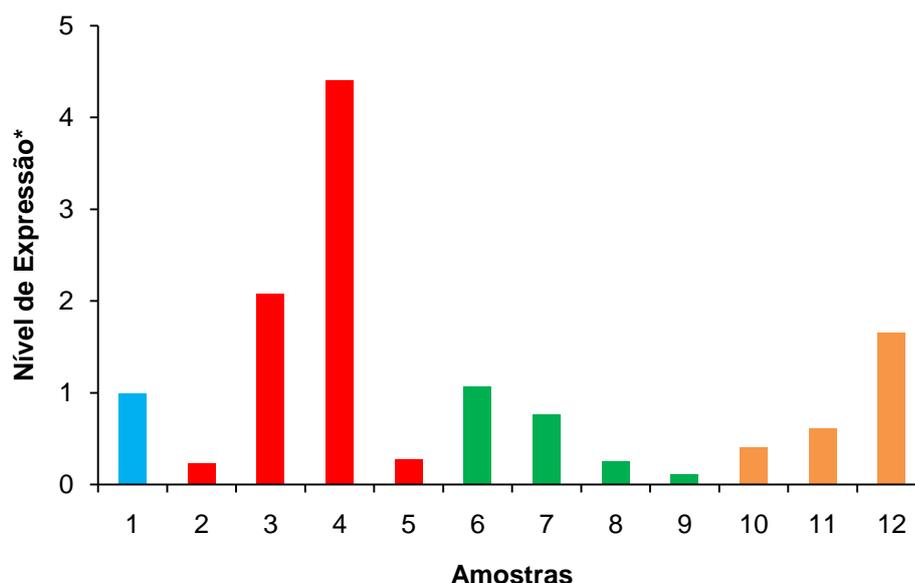


Figura 24. Análise do nível de expressão do gene codificador de β -1,3-glucanase. (1) Tratamento com água deionizada esterelizada; (2) plantas somente tratadas com ASM, sendo o RNA extraído após 72 h; (3) plantas tratadas com ASM e inoculadas após 72 h, sendo que, depois da inoculação as extrações foram feitas em 48 h; (4) 72 h; (5) 7 dias; (6) plantas somente tratadas com proteína harpina, sendo o RNA extraído após 72 h; (7) plantas tratadas com proteína harpina e inoculadas após 72 h, sendo que, depois da inoculação as extrações foram feitas em 48 h; (8) 72 h; (9) 7 dias; (10), (11) e (12) plantas somente inoculadas, sendo o RNA extraído após 48 h, 72 h e 7 dias, respectivamente.*Níveis normalizados da expressão do gene de β -1,3-glucanase.

Estes resultados corroboram com os dados observados por Conrath, Pieterse e Mauch-Mani (2002) em *Arabidopsis* e Hwang et al. (1997) em pimenta. Conrath et al. (2006), detectou em plantas de *Arabidopsis* inoculadas com *P. syringae* pv. *tomato*, previamente tratadas com o BABA, aumento da expressão do gene *PR-1* 6 h após a inoculação do patógeno, sendo que as plantas somente inoculadas com a bactéria demonstraram esse efeito apenas 24 h após a inoculação. Faize, Faize e Ishii (2009) demonstraram que o pré-tratamento de folhas de pêra japonesa com ASM reduziu significativamente a severidade da sarna causada pelo fungo patogênico *Venturia nashicola*. Embora este pré-tratamento das plantas tenha resultado na ativação de gene codificador de PR-1, esse efeito foi bastante acentuado quando as plantas foram tratadas com o indutor de resistência e inoculadas com o patógeno, indicando um possível efeito de “*priming*” na ativação de proteínas-RP. Recentemente, Jesus (2009) observou o mesmo fenômeno, por meio da técnica RT-PCR semi-quantitativo, sendo que em cafeeiros ‘Mundo Novo’ tratados com ASM e inoculados com *H. vastatrix* houve um aumento na expressão do gene codificador de β -1,3-glucanase após 72 h.

Segundo Heil e Baldwin (2002), plantas em um estado “ativado” por indutores de

resistência, nas quais as expressões de genes só ocorrem após a inoculação por patógenos, não seriam oneradas por custos metabólicos decorrentes de respostas de defesa constantemente ativadas na SAR.

5.2.2.4. Análise da expressão do gene codificador de ascorbato peroxidase

As ascorbato peroxidases exercem importantes funções na defesa antioxidante em plantas, removendo peróxidos, incluindo o peróxido de hidrogênio gerado pelas reações de oxidação-redução causadas por estresses ambientais como salinidade, frio, intoxicação por metais, seca, calor, ozônio, alta intensidade luminosa e ataque por fitopatógenos (YOSHIMURA et al., 2000).

De acordo com a figura 25 pode-se observar que não houve aumento da expressão do gene de ascorbato peroxidase quando as plantas são tratadas com o ASM e a proteína harpina, ou tratadas e inoculadas, ou somente inoculadas, porém, ocorre um pequeno aumento nos cafeeiros tratados com a proteína harpina e alta expressão do gene em plantas apenas inoculadas com o patógeno após 48 h.

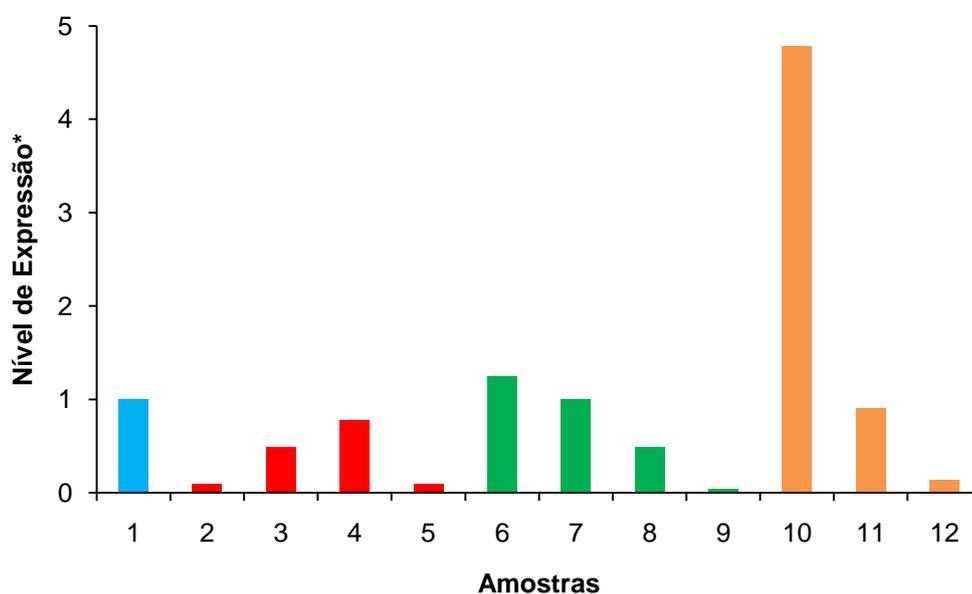


Figura 25. Análise do nível de expressão do gene codificador de ascorbato peroxidase. (1) Tratamento com água deionizada esterilizada; (2) plantas somente tratadas com ASM, sendo o RNA extraído após 72 h; (3) plantas tratadas com ASM e inoculadas após 72 h, sendo que, depois da inoculação as extrações foram feitas em 48 h; (4) 72 h; (5) 7 dias; (6) plantas somente tratadas com proteína harpina, sendo o RNA extraído após 72 h; (7) plantas tratadas com proteína harpina e inoculadas após 72 h, sendo que, depois da inoculação as extrações foram feitas em 48 h; (8) 72 h; (9) 7 dias; (10), (11) e (12) plantas somente inoculadas, sendo o RNA extraído após 48 h, 72 h e 7 dias, respectivamente. *Níveis normalizados da expressão do gene de ascorbato peroxidase.

Wendehenne et al. (1998) verificaram em plantas de tabaco tratadas com ASM, a diminuição da atividade da enzima ascorbato oxidase e apontam que componentes químicos do produto comercial utilizado, tendo o ASM como ingrediente ativo, podem agir, parcialmente, alterando características de óxido-redução na célula, acarretando aumento de peróxido de hidrogênio. Cao e Jiang (2006) demonstraram que a atividade da peroxidase em pêras foi temporariamente reduzida pelo ASM previamente aspergido nas plantas.

6. CONCLUSÕES

1. O ASM (25, 50, 100 ou 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$), o produto comercial Dipel PM[®] (5, 10 ou 20 mg mL^{-1}), os polissacarídeos extraídos de *Saccharomyces cerevisiae* (400 Eq μg de manose mL^{-1}) e a proteína harpina (7,5; 15 ou 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) protegem as plantas de cafeeiros 'Mundo Novo' contra cercosporiose, quando avaliadas 30 dias após a inoculação com *Cercospora coffeicola*. No entanto, somente o ASM, a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, protege plantas de cafeeiro contra *C. coffeicola* após 60 dias da inoculação do patógeno.
2. O ASM, os polissacarídeos extraídos de *S. cerevisiae* e a proteína harpina não inibem o desenvolvimento micelial de *C. coffeicola*.
3. Os metabólitos voláteis dos isolados de *B. thuringiensis* não interferem diretamente no desenvolvimento de *C. coffeicola*, porém os compostos da bactéria, difusíveis no meio, o inibem *in vitro*.
4. O ASM, a proteína harpina e os polissacarídeos extraídos de *S. cerevisiae* não inibem a germinação dos conídios de *C. coffeicola*, porém as concentrações 30 e 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína harpina estimulam significativamente a germinação.
5. A proteína harpina (15 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e os polissacarídeos extraídos de *S. cerevisiae* (400 Eq μg de manose mL^{-1}) quando re-aplicados, após 30 dias de um tratamento prévio com estes agentes, protegem cafeeiros contra cercosporiose. O ASM protege os cafeeiros contra cercosporiose com uma ou duas aplicações com o indutor de resistência.
6. A expressão do gene codificador de β -1,3-glucanase aumentou acentuadamente em cafeeiro 'Mundo Novo' tratado com ASM, 48 e 72 h após a inoculação com *C. coffeicola*.
7. O gene codificador de β -1,3-glucanase está envolvido na indução de resistência, associado ao efeito de "priming", em cafeeiro 'Mundo Novo' a *C. coffeicola* ativado por acibenzolar-S-metil quando na presença do patógeno.

8. A expressão do gene codificador de ACC oxidase, aumenta em cafeeiro 'Mundo Novo' quando tratado com a proteína harpina, sem a presença do patógeno. Em cafeeiro tratado com ASM, a expressão desse gene aumenta apenas 72 h após a inoculação com *C. coffeicola*.
9. Os genes codificadores de ascorbato peroxidase, LRR e β -1,3-glucanase em cafeeiro 'Mundo Novo' são ativados pela presença de *C. coffeicola*, 48 h e 7 dias após a inoculação, respectivamente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, A. L.; PIKE, S.; HOYOS, E. M.; STONE, J. M.; WALKER, J. C.; NOVCKY, A. Rapid and transient activation of a mycelin basic protein kinase in tobacco leaves treated with harpin from *Erwinia amylovora*. **Plant Physiology**. 115:835-861. 1997.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th ed. San Diego: Academic Press. 2004. 952p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA ÍNDUSTRIA DE CAFÉ (ABIC). Disponível em: <http://www.abic.com.br/estatisticas.html#tab3>. Acessado em 28-08-2009.

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

BARILLI, E.; SILLEROZ, J. C.; RUBIALES, D. Induction of Systemic Acquired Resistance in Pea against Rust (*Uromyces pisi*) by Exogenous Application of Biotic and Abiotic Inducers. **The Journal of Phytopathology**. 158(1):30-34. 2009.

BEAUVERIE, J. Le Botrytis cinerea et al maladie de la toile. **Les Comptes rendus de l'Académie des sciences Paris**. 128:846-1253, 1901.

BELKHADIR, Y.; SUBRAMANIAM, R.; DANGL, J. L. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. **Current Opinion in Plant Biology**. 7:391-399. 2004.

BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R. R. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum f. sp. Radicis-lycopersici* in tomato. **Plant Physiology**. 118:1203-1212. 1998.

BERROCAL-LOBO, M., MOLINA, A.; SOLANO, R. Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. **The Plant Journal**. 29:23–32. 2002.

BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Eds.). **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. p.11-28, 2005.

BORO, M. C. **Indução de resistência em maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae***. 2009. 87p. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio). Instituto Biológico, São Paulo.

BOTELHO, D. M. S.; POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A.; CARVALHO, J. G.; BOTELHO, C. E.; SOUZA, P. E. Intensidade de cercosporiose em mudas de cafeeiro em função de fontes e doses de silício. **Fitopatologia Brasileira**. 30(6):582-588. 2005.

BREUSEGEM, F. V.; VRANOVA, E.; DAT, J. F.; INZE, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**.161:405-414. 2001.

CAO, H.; BOWLING, S. A.; GORDON, A. S.; DONG, X. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. **Plant Cell**. 6:1583-1592. 1994.

CAO, J.; JIANG, W. Induction of resistance in Yali pear (*Pyrus bretscheneideri* Rehd.) fruit against postharvest diseases by acibenzolar-S-methyl sprays on trees during fruit growth. **Scientia Horticulturae**. 110:181-186. 2006.

CAPDEVILLE, G. DE; WILSON, C. L.; BEER S. V.; AIST, J. R. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'Red delicious' apple fruit. **Phytopathology**. 92:900-908. 2002.

CAPDEVILLE, G. DE; BEER, S. V.; WATKINS, C. B.; WILSON, C. L.; TEDESCHI, L. O.; AIST, J. R. Pre-and post-harvest Harpin treatments of apples induce resistance to blue mold. **Plant Disease**. 87(1):39-44. 2003.

CAPDEVILLE, G.; BEER, S. V.; WILSON, C. L.; AIST, W. J. Some cellular correlates of harpin-induced resistance to blue mold of apples. **Tropical Plant Pathology**. 33(2):103-113. 2008.

CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. Manejo integrado das principais doenças do cafeeiro. **Informe Agropecuário**. 19(193):27-35. 1998.

CARVALHO, V. L.; CUNHA, R. L.; MOURA, P. H. A. Manejo integrado da cercosporiose do cafeeiro. **Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG)**. 16:1-4. 2008.

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 cacauero. **Fitopatologia Brasileira**. 29:67-71. 2004.

CHEONG, Y. H.; KIM, C. Y.; CHUN, H. J. Molecular cloning of a soybean class III β -1,3-glucanase gene that is regulated both developmentally and in response to pathogen infection. **Plant Science**. 154:71-81. 2000.

CHUPP, C. A. Monograph of the Fungos Genus Cercospora. Ithaca, NY.: Publicado pelo autor. 1953.

CIA, P. **Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*)**. 2005. 109p. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CLARKE, A.; MUR, L. A. J.; DARBY, R. M.; KENTON, P. Harpin modulates the accumulation of salicylic acid by *Arabidopsis* cell via apoplastic alkalization. **Journal of Experimental Botany**. 56:3129-3136. 2005.

CLARKE, J. D.; VOLKO, S. M.; LEDFORD, H.; AUSUBEL, F. M.; DONG, X. Roles of Salicylic Acid, Jasmonic Acid, and Ethylene in *cpr*-Induced Resistance in Arabidopsis. **The Plant Cell**. 12:2175-2190. 2000.

CLARKE, J. D.; LIU, Y.; KLESSIG, D. F.; DONG, X. Uncoupling PR gene expression from NPR1 and bacterial resistance: characterization of the dominant Arabidopsis *cpr6-1* mutant. **The Plant Cell**. 10:557-569. 1998.

COLE, D. L. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. **Crop Protection**. 18:267-273. 1999.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: safra de 2008/2009: Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/Boletim.pdf>. Acessado em 25-8-2009.

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

CONRATH, U.; BECKERS, G. J. M.; FLORS, V.; GARCÍA-ANGUSTIN, P.; JAKAB, G.; MAUCH, F.; NEWMAN, M. A.; PIETERSE, C. M.; POINSSOT, B.; POZO, M. J.; PUGIN, A.; SCHAFFRATH, U.; TON, J.; WENDEHENNE, D.; ZIMMERLI, L.; MAUCHI-MANI, B. PRIMING: GETTING READY FOR BATTLE. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 19(10):1062-1071. 2006.

CROUS, P. W.; BRAUN, U. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in Cercospora and Passalora. **Centraalbureau voor Schimmelcultures**. 2003. 571p.

CUSTÓDIO, A. A. P. **Epidemiologia da ferrugem e cercosporiose em cafeeiro irrigado sob pivô central**. 2008. 71p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras.

DA MATTA, F. M. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. **Brazilian Journal Plant Physiology**. 16:1-6. 2004.

DABBAS, K. M.; FERRO, M. I. T.; BARROS, N. M.; LAIA, M. L.; ZINGARETTI, S. M.; GIACHETTO, P. F.; MORAES, V. A.; FERRO, J. A. Genes diferencialmente expressos em cana-de-açúcar inoculada com *Xanthomonas albilineans*, o agente causal da escaudadura da folha. **Summa Phytopathologica**. 32(4):328-338. 2006.

DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z.; MEDEIROS, J. G. S.; MARCHESE, J. A.; MAZARO, S. M. Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 43(7):793-799. 2008.

DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; NETO, E. B.; COELHO, R. S. B.; SILVA, R. L. X. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **Summa Phytopathologica**. 30(4):314-319, 2004.

DAUB, M. E. Peroxidation of tobacco membrane lipids by the photosensitizing toxin,

cercosporin. **Plant Physiology**. 69:1361–1364. 1982.

DAUB, M. E.; CHUNG, K. R. Cercosporin: a photoactivated toxin in plant disease. Disponível em: <http://www.apsnet.org/online/feature/Cercosporin/>. Acessado em 22-2-2010.

DAUB, M. E.; EHRENSHAFT, M. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology. **Annual Review Phytopathology**. 38:461-490. 2000.

DAUB, M. E.; HERRERO, S.; CHUNG, K. R. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. **FEMS Microbiology Letter**. 252:197-206. 2005.

DAVIS, A. P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D. M.; STOFFELEN, P. An annotated checklist of the genus *Coffea* L. (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**. 152: 465–512. 2006.

DE LAAT, A. M. M., VAN LOON, L. C. The relationship between stimulated ethylene production and symptom expression in virus-infected tobacco leaves. **Physiology Plant Pathology**. 22:261-273. 1983.

DE NARDI, B.; DREOS, R., R.; DEL TERRA, L.; MARTELLOSI, C.; ASQUINI, E.; TORNINCASA, P.; GASPERINI, D. PACCHION, B.; RATHINAVELU, R.; PALLAVICINI, A.; GRAZIOSI, G. Differential responses of *Coffea arabica* L. leaves and roots to chemically induced systemic acquired resistance. **Genome**. 49:1594-1605. 2006.

DEEPAK, S. A.; SHIBATO, J.; ISHII, H.; OGAWA, Y.; YOSHIDA, Y.; IWAHASHI, H.; MASUO, Y.; AGRAWAL, G. K.; RAKWAL, R. Proteomics Approach for Investigating the Disease Resistance Using Cucumber as Model Plant. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**. 4(3):231-238. 2008.

DESIKAN, R.; HANCOCK, J. T.; ICHIMURA, K.; SHINOZAKI, K.; NEILL, S. J. Harpin induces activation of the Arabidopsis mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. **Plant Physiology**. 126:1579–1587. 2001.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. 2 ed. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 1995. 442p.

DISCHE, Z. Color reactions of carbohydrates. In: WHISTLER, R.L.; WOLFRAM, M.L. (Eds.). **Methods in carbohydrates chemistry**. New York: Academic Press, 1962. v.1, p.477-512.

DONG, H. P.; PENG, J.; BAO, Z.; MENG, X.; BONASERA, J. M.; CHEN, G.; BEER, S. V.; DONG, H. Downstream Divergence of the Ethylene Signaling Pathway for Harpin-Stimulated Arabidopsis Growth and Insect Defense. **Plant Physiology**. 136(3):3628-3638. 2004.

DONG, H. P.; DELANEY, T. P.; BAUER, D. W.; BEER, S. V. Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the *NIM1* gene. **Plant Journal**. 20:207-215. 1999.

DURRANT, W. E.; DONG X. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**. 42:185-209. 2004.

ECCARDI, F.; SANDALJ, V. O café: Ambientes e Diversidade. Rio de Janeiro: Casa da Palavra, 2003, p.237.

ECHANDI, E. La chasparria de los cafetos causada por el hongo *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke. **Turrialba**. 9:54-67. 1959.

EDEN Bioscience Corporation. Disponível em: <http://www.edenbio.com>. Acessado em: 12-12-2008.

ETIENNE, P.; PETITOT, A. S.; HOUOT, V.; BLEIN, J. P.; SUTY, L. Induction of *tcl 7*, a gene encoding a β -subunit of proteasome, in tobacco plants treated with elicitors, salicylic acid or hydrogen peroxide. **FEBS Letters**. 466(2/3):213-218. 2000.

FAIZE, M.; FAIZE, L.; ISHII, H. Gene expression during acibenzolar-S-methyl-induced priming for potentiated responses to *Venturia naschicola* in japonese pear. **Journal of Phytopathology**. 157:137-144. 2009.

FERNANDES, P. M. B.; SANTOS, M. P.; VENTURA, J. A. Indução de resposta a estresse em mamoeiro após tratamento com levedura e óxido nítrico. **Papaya Brasil**. 231-234. 2005.

FERNANDÉZ-BORRERO, O.; GÓMEZ, G. C.; DUQUE, S. L.; DE SERNA, H. B.; BERNAL, L. G. A. La mancha de hierro Del cafeto (*Cercospora coffeicola* Berk y Cooke), *Biología, Epidemiología y Control*. **Cenicafé**. 541:551. 1982.

FERRÃO, R.G. Biometria aplicada ao melhoramento genético do café conilon. 2004. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FIALHO, M.B. **Efeito in vitro de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. 2004. 60p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FILHO, J. T. C. Novos paradigmas na fisiologia do cafeeiro (2007), <http://www2.ucg.br/flash/artigos/070904cafe2.html>. Acessado em 20-08-2009.

FRIEDRICH, L.; LAWTON, K.; RUESS, W.; MASNER, P.; SPECKER, N.; GUTRELLA, M.; MEIER, B.; DINCHER, S.; STAUB, T.; UKNES, S.; MÉTRAUX, J. P.; KESSMANN, H.; RYALS, J. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. **Plant Journal**. 10:61-70. 1996.

GALLI, F.; CARVALHO, P. C. T. Doenças do cafeeiro – *Coffea arabica* L. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres. Cap. 11, 2:128-140. 1980.

GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C. L. **Doenças do cafeeiro. Manual de**

Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres. Cap. 17, 2:184-200. 1997.

GOELLNER, K.; CONRATH, U. Priming: it's all the world to induced disease resistance. **Europe Journal Plant Pathology.** 121:233-242. 2008.

GURGEL, L. M. S.; OLIVEIRA, S. M. A.; COÊLHO, R. S. B.; SILVA, R. L. X. Proteção à murcha do tomateiro com acibenzolar-S-metil e ácido β -aminobutírico. **Fitopatologia Brasileira.** 30:655-657. 2005.

GRANT, J. J.; LOAKE, G. J. Role of active oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant Physiology.** 124:21-29. 2000.

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.** 157(10):625-638. 2009.

GUZZO, S.D.; HARAKAVA, R.; TSAI, S.M. Expressão de genes associados à resistência sistêmica adquirida. In: Resende, M.L.V. II Reunião Brasileira sobre indução de resistência em plantas e IV Simpósio de controle de doenças de plantas. Lavras: Universidade Federal de Lavras. pp. 59-69. 2004.

GUZZO, S.D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*.** 2004. 236p. Tese (Doutorado). Centro de Energia Nuclear, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

GUZZO, S. D.; HARAKAVA, R.; LUCON, C. M. M.; TSAI, S. M. Resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* e indução local e sistêmica de quitinases e β -1,3-glucanases por acibenzolar-S-metil. **Summa Phytopathologica.** 30(3):376-381. 2004.

GUZZO, S. D.; DE CASTRO, R. M.; KIDA, K.; MARTINS, E. M. F. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivos do Instituto Biológico.** 68:89-94. 2001.

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F. Local and systemic induction of β -1, 3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology.** 144(9/10):449-454. 1996.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos.** Piracicaba: Fealq, 1998. p.383-446.

HAHN, A.; HARTER, K. Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades and Ethylene: Signaling, Biosynthesis, or Both? **Plant Physiology.** 149:1207-1210. 2009.

HAHN, M. B.; ALBERSHEIM, P. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. **Plant Physiology.** 62:107-111.1978.

HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J. P.; VAN LOON, L. C. Inducing resistance: a

summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases. **European Journal of Plant Pathology**. 107:1-6. 2001.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Resistance Gene-dependent Plant Defense Responses. **The Plant Cell**. 8(10):1773-1791. 1996.

HE, S. Y.; HUANG, H. C.; COLLMER, A. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* HarpinPss: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. **Cell**. 73:1255-1266. 1993.

HEIL, M.; BALDWIN, I. T. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. **Trends in Plant Science**. 7:61-67. 2002.

HEIL, M.; BOSTOCK, M. R. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of Botany**. 89:503-512. 2002.

HERMAN, M. A. B.; RESTREPO, S.; SMART, C. D. Defense gene expression patterns of three SAR-induced tomato cultivars in the field. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 71:192-200. 2007.

HUCKELHOVEN, R.; DECHERT, C.; KOGEL, K.H. Non-host resistance of barley is associated with a hydrogen peroxide burst at sites of attempted penetration by wheat powdery mildew fungus. **Molecular Plant Pathology**. 2:199-205. 2001.

HUKKANEN, A.; KOKKO, H.; BUCHALA, A., HÄYRINEN, J.; KÄRENLAMPI, S. Benzothiadiazole affects the leaf proteome in arctic bramble (*Rubus arcticus*). **Molecular Plant Pathology**. 9(6):799-808. 2008.

HWANG, B. K.; SUNWOO, J. Y.; KIM, Y. J.; KIM, B. S. Accumulation β -1,3- glucanase and chitinase isoforms and salicylic acid in the DL- β -amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 51(5):305-322. 1997.

IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology**. 151(3):171-180. 2003a.

IRITI, M.; FAORO, F. Does Benzothiadiazole-induced resistance increase fitness cost in bean? **Journal of Plant Pathology**. 85(4):265-270. 2003b.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). Disponível em: <http://dev.ico.org/prices/po.htm>. Acessado em 20-08-2009.

JESUS, C. O. **Estudos de genes envolvidos na indução de resistência de cafeeiro a *Hemileia vastatrix***. 2009. 66p. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio). Instituto Biológico, São Paulo.

JESUS, C. O.; GUZZO, S. D.; HARAKAVA, R. Indução de resistência em cafeeiro a

Hemileia vastatrix por isolados de *Bacillus thuringiensis* e proteína harpina. **Summa Phytopathologica**. 34(suplemento):54. 2008.

JÚNIOR, D. G.; POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A.; SOUZA, P. E.; CARVALHO, J. G.; BALIEIRO, A. C. Incidência e severidade da cercosporiose do cafeeiro em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. **Fitopatologia Brasileira**. 28(3):286-291. 2003.

KIM, Y. J.; HWANG, B. K. Isolation of a basic 34 kiloDalton β -1,3-glucanase with inhibitory activity against *Phytophthora capsici* from pepper stems. **Physiology Molecular Plant Pathology**. 50:103-115. 1997.

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**. 128(3):1046-1056. 2002.

KUĆ, J. Systemic induced resistance. In: WALTERS, D. R.; SCHOLES, J. D.; BRYSON, R. J.; PAUL, N. D.; MCROBERTS, N. (Ed.) Aspects of applied biology: physiological responses of plants to pathogens. Dundee: Association of Applied Biologists. 42:235-242, 1995.

LABANCA, E. R. G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*).** 2002. 118p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

LATUNDE-DADA, A. O.; LUCAS, J. A. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 58:199-208. 2001.

LAWTON, K.; FRIEDRICH, L.; HUNT, M.; WEYMANN, K.; DELANEY, T.; KESSMANN, H.; STAUB, T.; RYALS, J. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. **Plant Journal**. 10:71-82. 1996.

LEQUEU, J.; SIMON-PLAS, F.; FROMENTIN, J.; ETIENNE, P.; PETITOT, A. S.; BLEIN, J. P.; SUTY, L. Proteasome comprising a β 1 inducible subunit acts as a negative regulator of NADPH oxidase during elicitation of plant defense reactions. **FEBS Letters**. 579(21):4879-4886. 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. **Methods**. 25(4):402-408. 2001.

LIU, C.; RUAN, Y.; KIN, Z.; WEI, R.; PENG, Q.; GUAN, C.; ISHII, H. Antagonism between acibenzolar-S-methyl-induced systemic acquired resistance and jasmonic acid-induced systemic acquired susceptibility to *Colletotrichum orbiculare* infection in cucumber. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 72:141-145. 2008.

LOON, L. C.; BAKKER, P.; PIETERSE, C. M. J.; DUFFY, B.; ROSENBERGER, U.;

DEFAGO, G. Induction and expression of PGPR-mediated induced resistance against pathogens. **Bulletin OILB/SROP**. 21:103-110. 1998.

LOPEZ, A. M. Q. **Controle alternativo da antracnose causada por *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. em sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench)**. 1991. 62p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Rio Claro.

LORENZO, O.; SOLANO, R. Molecular players regulating the jasmonate signalling network. **Current Opininion in Plant Biology**. 8:532–540. 2005.

LORENZO, O., PIQUERAS, R., SANCHEZ-SERRANO, J. J.; SOLANO, R. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **Plant Cell**. 15 165–178. 2003.

LUSTOSA, D. C.; ROMEIRO, R. S.; MAIA, C. B. Exposição de sementes de tomateiro a um derivado benzotiadiazólico e testagem das plântulas resultantes quanto a efeitos de toxidez e a indução de resistência a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**. 24:250. 1999.

MADAMANCHI, N. R.; KUĆ, J. Induced systemic resistance in plants. In: COLE, G. T.; HOCH, H. C. (Ed.) *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. New York: Plenum Press. 347-362. 1991.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid selection and avaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**. 2(2):176-177. 1962.

MAIA, C. B.; ROMEIRO, R. S.; LUSTOSA, D. C. Acibenzolar-S-Methyl – avaliação de fitotoxidez e de efetividade como indutor de resistência em tomateiro a *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. **Summa Phytopathologica**. 26:279. 2000.

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**. 26(5):1103-1106. 2002.

MARTINATI, J. C.; LACAVAL, P. T.; MIYASAWA, S. K. S.; GUZZO, S. D.; AZEVEDO, J. L.; TSAI, S. M. Redução dos sintomas causados pela *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* por meio de aplicação de benzotiadiazole e silício. **Pesquisa. Agropecuária. Brasileira**. 42(8):1083-1089. 2007.

MARTINS, E.M.F. Sequência de eventos primários do desenvolvimento de *Hemileia vastatrix* em folhas de cafeeiro com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. Dissertação (Mestrado). Piracicaba. Universidade de São Paulo. 1988.

MARTINS, E. M. F.; BERETTA, M. J. G.; ROVERATTI, D. S.; MORAES, W. B. C. Comparative induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants by non-specific inducers from different fungal and bacterial origins. **Fitopatologia Brasileira**. 10:521-529. 1985.

MARTINS, R. B. Variabilidade de *Cercospora coffeicola* em Minas Gerais com base em compatibilidade vegetativa e produção de cercosporina. 2007. 86p. Tese (Doutorado em

Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MATHOOKO, F. M.; TSUNASHIMA, Y.; KUBO, Y.; INABA, A. Expression of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene in peach (*Prunus persica* L.) fruit in response to treatment with carbon dioxide and 1-methylcyclopropene: possible role of ethylene. **African Journal of Biotechnology**. 3(10):497-502. 2004.

MATIELLO, J. B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A.W.R.; ALMEIDA, S.R.; FERNANDES, D.R. Cultura de café no Brasil. In: MATIELLO, J.B. (Ed.). **Novo Manual de Recomendação**, Rio de Janeiro: MAPA/PROCAFÉ, 2002, p. 387.

MAURIN, O.; DAVIS, A. P.; CHESTER, M.; MVUNGI, E. F.; JAUFEEERALLY-FAKIM, Y.; FAY, M. F. Towards a Phylogeny for Coffea (Rubiaceae): Identifying Well-supported Lineages Based on Nuclear and Plastid DNA Sequences. **Annals of Botany**. 1–19. 2007.

MAZARO, S. M. **Indução de resistência à doenças em morangueiro pelo uso de elicitores**. 2007. 87p. Tese (Doutor em Agronomia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**. 107:13-18. 2001.

MOLINA, A.; HUNT, M. D.; RYALS, J. A. Impaired fungicide activity in plants blocked in disease signal transduction. **The Plant Cell**. 10(10):1903-1914. 1998.

MONNERAT, R. S.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle Biológico**. Embrapa Meio Ambiente. 3:163-200. 2000.

MORAES, W. B. C.; MARTINS, E. M. F.; MUSUMECI, M. R.; BERETTA, M. J. G. Induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants. **Summa Phytopathologica**. 2:39-43. 1976.

NEVES, C. A história do café. Instituto Brasileiro do Café, Rio de Janeiro, 1974. 52p.

NIKKI, T.; MITSUHARA, I.; SEO, S.; OHTSUBO, N.; OHASHI, Y. Antagonistic Effect of Salicylic Acid and Jasmonic Acid on the Expression of Pathogenesis-Related (PR) Protein Genes in Wounded Mature Tobacco Leaves. **The Plant Cell**. 39(5):500-507. 1998.

NIMCHUK, Z.; EULGEM, T.; HOLT III, B. F.; DANGL, J. L. Recognition and response in the plant immune system. **Annual Review of Genetics**. 37:579-609. 2003.

NOJOSA, G. B. N.; RESENDE, M. L. L.; BARGUIL, B. M.; MORAES, S. R. G.; BOAS, C. H. V. Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de Phoma. **Summa Phytopathologica**. 35(1):60-62. 2009.

OOSTENDORP, M.; KUNZ, W.; DIETRICH, B.; STAUB, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**. 107:19-28. 2001.

PATRÍCIO, F. R. A.; ALMEIDA, I. M. G.; BARROS, B. C.; SANTOS, A. S.; FRARE, P. M. 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**. 152(1):29-39. 2007.

PAPPU, H. R.; CSINOS, A. S.; McPHERSON, R. M.; JONES, D. C.; STEPHENON, M. G. Effect of acibenzolar-S-metil and imidacloprid on suppression of tomato spotted wilt *Tospovirus* in flue-cured tobacco. **Crop Protection**. 19:349-354. 2000.

PENG, J. L.; DONG, H. S.; DONG, H. P.; DELANEY, T. P.; BONASERA, J. M.; BEER, S. V. Harpin-elicited hypersensitive cell death and pathogen resistance require the *NDR1* and *EDS1* genes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 62(6):317-326. 2003.

PEREIRA, R. B. **Extrato de casca de café e óleo de tomilho no controle de *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke em cafeeiro**. 2006. 96p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PEREIRA, R. B.; ALVES, E.; JÚNIOR, P. M. R.; RESENDE, M. L. V.; LUCAS, G. C.; FERREIRA, J. B. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 43(10):1287-1296. 2008.

PEREIRA, S. C.; RODRIGUES, F. A.; CARRÉ-MISSIO, V; OLIVEIRA, M. G. A.; ZAMBOLIM, L. Aplicação foliar de silício na resistência de soja à ferrugem e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology**. 34(3):164-170. 2009a.

PEREIRA, S. C.; RODRIGUES, F. A.; CARRÉ-MISSIO, V; OLIVEIRA, M. G. A.; ZAMBOLIM, L. Efeito da aplicação foliar de silício na resistência à ferrugem e na potencialização da atividade de enzimas de defesa em cafeeiro. **Tropical Plant Pathology**. 34(3):223-230. 2009b.

PEYYALA, R.; FARMAN, M. L. Magnaporthe oryzae isolates causing gray leaf spot of perennial ryegrass possess a functional copy of the AVR1-CO39 avirulence gene. **Plant Molecular Pathology**. 7:157-165. 2006.

PICCININ, E.; DI PIERO, R. M. PASCHOLATI, S. F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia Brasileira**. 30:5-9. 2005.

PIETERSE, C. M. J.; WEES, S.C.M.; PELT, J.A.; KNOESTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, H; WEISBEEK, P.J.; LOON, L.C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. **The Plant Cell**. 10:1571-1580. 1998.

PIETERSE, C. M. J.; VAN PELT, J. A.; VAN WEES, S. C. M.; TON J.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K. M.; KEURENTJES, J. J. B.; VERHAGEN, B. W. M.; KNOESTER M.; VAN DER SLUIS, I.; BAKKER, P. A. H. M.; VAN LOON, L. C. Rizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering signaling and expression. **European Journal of Plant Pathology**. 107:51-61. 2001.

PIGA, P. M.; BÉLANGER, R. R.; PAULITZ, T. C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum f. sp. radicleslycopersi* in tomato plants treated with endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 50:301-320. 1997.

PLANT HEALTH CARE, INC. Disponível em: <http://www.planthealthcare.com/Ag/Harpin>. Acessado em: 18-08-2009.

POZZA, A. A. A.; MARTINEZ, H. E. P.; CAIXETA, S. L.; CARDOSO, A. A.; ZAMBOLIM, L.; POZZA E. A. Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-olho pardo em mudas de cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 36(1):53-60. 2001.

PROST, S. D.; ROTHE, D.; VICENTE, J.; RODRIGUEZ, M. J.; KIFT, N.; CARBONNE, F.; GRIFFITHS, G.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M-T.; ROSAHL, S.; CASTRESANA, C.; HAMBERG, M.; FOURNIER, J. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. **Plant Physiology**. 139:1902-1913. 2005.

QUERINO, C. M. B.; LARANJEIRA, D.; COELHO, R. S. B.; MATOS, A. P. Efeito de dois indutores de resistência sobre a severidade do mal-do-Panamá. **Fitopatologia Brasileira**. 30(3):239-243. 2005.

RAY, J. Lês maladies cryptogamiques des végétaux. **Review Genetic Botanic**. 13:145-151. 1901.

RELVAS, E. Arte e segredos do bo café: café básico. Brasília: Ed. Sebrae: Rio de Janeiro: ABIC, 1997.

RESENDE, M. L. V.; COSTA, J. C. B.; CAVALCANTI, F. R.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; CAMILO, F.R. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacauero contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira** 32(3):213-221. 2007.

RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; CAVALCANTI, L. S.; AGUILAR, M. A. G.; SILVA, L. H. C. P.; PEREZ, J. O.; ANDRADE, G. C. G.; CARVALHO, G. A.; CASTRO, R. M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**. 51(5):621-628. 2002.

RODRIGUES, F. A.; JESUS JÚNIOR, W. C.; ROMEIRO, R. S. Um derivado benzotiodiazólico como ativador químico de mecanismo de defesa do feijoeiro à ferrugem. **Summa Phytopathologica**. 26:113. 2000.

ROMEIRO, R. S. Controle Biológico de Doenças de Plantas: Fundamentos/ Reginaldo da Silva Romeiro. Viçosa: Ed. UFV. 2007. 269p.

ROMEIRO, R. S.; NEVES, L. M. S.; LEITE, R. S. V. A benzothiadiazole derivate promotes experimental control of bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by activating constitutive host defenses. **Revista Ceres**. 48:389-394. 2001.

ROMEIRO, R. S.; RODRIGUES, F. A.; JESUS JÚNIOR, W. C.; PEREIRA, J. L. A.

Fitotoxidez e ativação de mecanismos de defesa de feijoeiro contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* de um derivado benzotiodiazólico. **Fitopatologia Brasileira**. 24:255. 1999.

RONCATTO, M. C.; PASCHOLATI, S. F. Alterações na atividade e no perfil eletroforético da peroxidase em folhas de milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) tratadas com levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). **Scientia Agricola**. 55(3):395-402. 1998.

ROVERATTI, D. S. **Proteção de plantas de café (*Coffea arabica* L.) contra *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. por *Saccharomyces cerevisiae***. 1989. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

ROVERATTI, D. S.; TEIXEIRA, A. R. R.; MORAES, W. B. C. *Bacillus thuringiensis* – a new perspective for an induced protection to coffee leaf rust. **Journal of Phytopathology**. 126: 149-159. 1989.

RUESS, W.; MULLER, K.; KNAUF-BEITER, G.; KUNZ, W.; STAUB, T. Plant activator CGA 245704: an innovative approach for disease control in cereals and tobacco. In: BRINGTON CROP PROTECTION CONFERENCE-PEST AND DISEASES. Brighton, p.9-17 (Ciba's Contribution), 1996.

RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H. Y.; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**. 8:1809-1819. 1996.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**. 38:995-1014. 2005.

SHETTY, N. P.; KRISTENSEN, B.K.; NEWMAN, M-A.; MOLLER, K.; GREGERSEN, P.L.; JORGENSEN, H. J. L. Association of hydrogen peroxide with restriction of *Septoria tritici* in resistant wheat. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 62:333-346. 2003.

SHULAEV, V.; LEON, J.; RASKIN, I. Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in Tobacco? **The Plant Cell**. 7:1691-1701. 1995.

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F. *Saccharomyces cerevisiae* protects maize plants, under greenhouse conditions, against *Colletotrichum graminicola*. **Journal of Plant Disease and Protection**. 99:159-167. 1992.

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**. 32(3)189-196. 2007.

SMITH, R. F. A history of Coffee. Coffee: botany, biochemistry, and productions of beans and beverage. In: Clifford, M.N. and Wilson, K.C. (Eds). New York, p. 01-12. 1985.

SOARES, D.J. **Esporulação e germinação *in vitro* de conídios de *Cercospora coffeicola***. 2003. 31p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SOMSSICH, I. E.; HAHLBROCK, K. Pathogen defence in plants a paradigm of biological complexity. **Trends in Plant Science**. 3:86-90. 2007.

SONG, D. J.; KIM, J. H.; LEE, D. H.; RHEW, T. H.; CHO, S. H.; LEE, C. H. Developmental regulation of the expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase and ACC oxidase genes in hypocotyls of etiolated mung bean seedlings. **Plant Science**. 168:1149-1155. 2005.

SPANU, P.; BOLLER, T. Ethylene biosynthesis in tomato plants infected by *Phytophthora infestans*. **Journal Plant Physiology**. 134:533-537. 1989.

SPOEL, S. H.; KOORNNEEF, A.; CLAESSENS, S. M. C.; KORZELIUS, J. P.; VAN PELT, J. A.; MUELLER, M. J.; BUCHALA, A. J.; MÉTRAUX, J.-P.; BROWN, R.; KAZAN, K.; VAN LOON, L. C.; DONG, X. N.; PIETERSE, C. M. J. NPR1 modulates cross-talk between salicylate and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. **The Plant Cell**. 15:760-70. 2003.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**. 20(suplemento):16-21. 1994.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**. 35:235-270. 1997.

TERRY, L. A.; JOYCE, D. C. Suppression of gray mold on strawberry fruit with the chemical plant activator acibenzolar. **Pest Management Science**. 56:989-992. 2000.

TERRY, L. A.; JOYCE, D. C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest. **Horticultural Technology**. 12:195-202. 2004.

VAN DER BIEZEN, E. A.; JONES, J. G. D. The NBARC domain: A novel signaling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. **Current Biology**. 8(7):226-228. 1998.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 55:85-97. 1999.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**. 36:453-483. 1998.

VAN LOON, L. C.; PIERPOINT, W. S.; BOLLER, T.; CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**. 42(3):245-264. 1994.

VAN WEES, S. C. M.; DE SWART, E. A. M.; VAN PELT, J. A.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. J. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation

of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 97:8711-8716. 2000.

VELLOSILLO, T.; MARTÍNEZ, M.; LÓPEZ, M. A.; VICENTE, T.; CASCÓN, T.; DOLAN, L.; HAMBERG, M.; CASTRESANA, C. Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense response through a specific signaling cascade. **Plant Cell**. 19:831-846. 2007.

VENÂNCIO, W. S.; ZAGONEL, J.; FURTADO, E. L.; SOUZA, N. L. Novos fungicidas. II - Famoxadone e indutores de resistência. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. 8:59-92. 2000.

VIEIRA, B. A. H.; ROMEIRO, R. S.; MIZUBUTI, E. S. G. Métodos de isolamento de bactérias de filoplano de tomateiro visando populações epifíticas e implicações como agentes de biocontrole. **Fitopatologia Brasileira**. 29:638-643. 2004.

XU, X. B.; TIAN, S. P. Reducing oxidative stress in sweet cherry fruit by *Pichia membranaefaciens*: a possible mode of action against *Penicillium expansum*. **Journal of Applied Microbiology**. 105:1170-1177. 2008.

XU, Z.-S.; XIONG, T.-F.; NI, Z.-Y.; CHEN, X.-P.; CHEN, M.; LI, L.-C.; GAO, D.-Y.; YU, X.-D.; LIU, P.; MA, Y.-Z. Isolation and identification of two genes encoding leucine-rich repeat (LRR) proteins differentially responsive to pathogen attack and salt stress in tobacco. **Plant Science**. 176:38-45. 2009.

WALTERS, D.; COWLEY, T.; MITCHELL, A. Methyl jasmonate alters polyamine metabolism and induces systemic protection against powdery mildew infection in barley seedlings. **Journal of Experimental Botany**. 53:747-756. 2002.

WANG, K. L.-C.; LI, H.; ECKER, J. R. Ethylene biosynthesis and signalling networks. **Plant Cell**. 14:131-151. 2002.

WANG, Z. X.; YANO, M.; YAMANOUCHI, U.; IWAMOTO, M.; MONNA, L. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. **Plant Journal**. 19:55-64. 1999.

WEI, Z. M.; LABY, R. J.; ZUMOFF, C. H.; BAUER, D. W.; HE, S. Y.; COLLMER, A.; BEER, S. V. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. **Science**. 257:85-88. 1992.

WENDEHENNE, D.; DURNER, J.; CHEN, Z.; KLESSIG, D. F. BENZOTHIADIAZOLE, AN INDUCER OF PLANT DEFENSES, INHIBITS CATALASE AND ASCORBATE PEROXIDASE. **Phytochemistry**. 47(4):651-657. 1997.

WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Partial characterization of sorghum phytoalexin elicitors isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. **Fitopatologia Brasileira**. 24:428-435. 1999.

YANG, B.; SHIPING, T.; JIE, Z.; YONHHONG, G. Harpin induces local and systemic resistance against *Trichothecium roseum* in harvested Hami melons. **Postharvest Biology**

and Technology. 38:183-187. 2005.

YOSHIMURA, K.; YABUTA, Y.; ISHIKAWA, T.; SHIGEOKA, S. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stress. **Plant Physiology**. 123:223-233. 2000.

YU, M.; SHENA, L.; FAN, B.; ZHAO, D.; ZHENG, Y.; SHENG, J. The effect of MeJA on ethylene biosynthesis and induced disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. **Postharvest Biology and Technology**. 54:153-158. 2009.

ZAHID, A.; SMITH, I.; GUEST, D. I. Combinations of potassium phosphonate and Bion (acibenzolar-S-methyl) reduce root infection and dieback of *Pinus radiata*, *Banksia integrifolia* and *Isopogon cuneatus* caused by *Phytophthora cinnamomi*. **Australasian Plant Pathology**. 29:59-63. 2000.

ZAMBOLIM, L.; DO VALE, F. X. R.; COSTA, H.; PEREIRA, A. A.; CHAVES, G.M. Epidemiologia e controle integrado da ferrugem-do-cafeeiro. In: ZAMBOLIM L (Ed), **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa, MG, Brasil, UFV, 2002, p. 369-450.

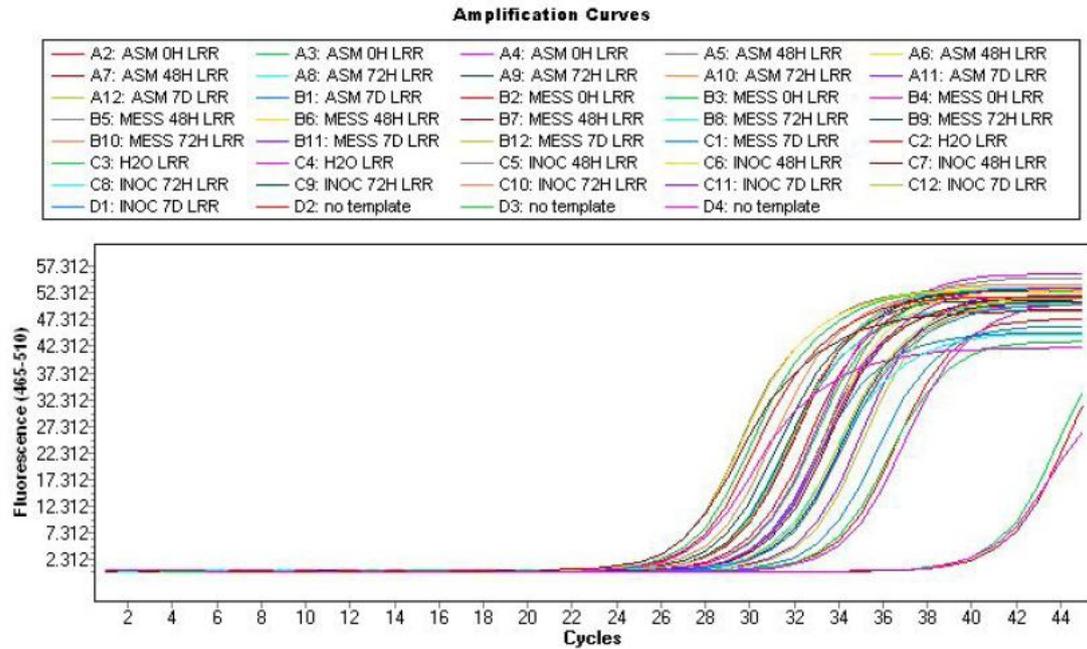
ZAMBOLIM, L.; RIBEIRO DO VALE, F. X.; PEREIRA, A. A.; CHAVES, G. M. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças. In: RIBEIRO DO VALE, F. X.; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: Departamento de Fitopatologia. 1:83-180. 1997.

ZANARDO, N. M. T.; PASCHOLATI, S. F.; FIALHO, M. B. Resistência de plântulas de pepineiro a *Colletotrichum lagenarium* induzida por frações de extrato de *Saccharomyces cerevisiae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 44(11):1499-1503. 2009.

ZHANG, Y.; TESSARO, M. J.; LASSNER, M.; LI, X. Knockout analysis of Arabidopsis transcription factors *TGA2*, *TGA5* and *TGA6* reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. **The Plant Cell**. 15:2647-2653. 2003.

Anexo 1

RESULTADOS DA ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA LRR EM CAFEEIRO 'MUNDO NOVO' POR PCR EM TEMPO REAL



Results

Cp

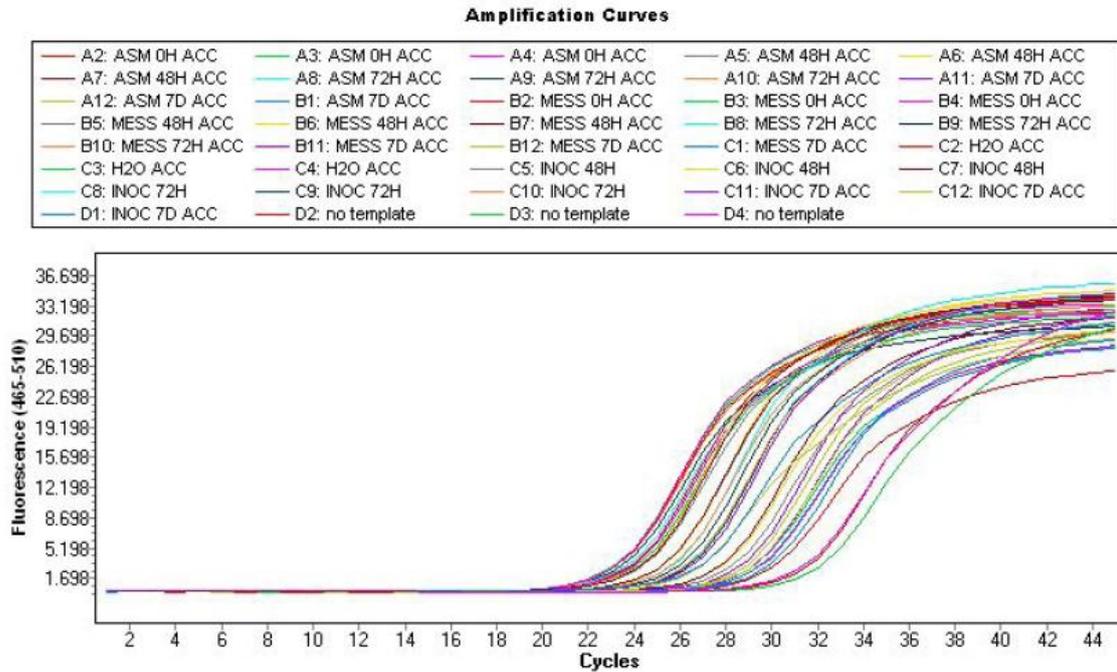
Bar Chart	Pairing	Sample Name	Target Name		Target Cp	Reference Cp
			Targets	References	Mean	Mean
<input checked="" type="checkbox"/>		H2O LRR	LRR	UBIQ	23.33	21.67
<input checked="" type="checkbox"/>	A2/E2	ASM 0H LRR	LRR	UBIQ	29.78	23.71
<input checked="" type="checkbox"/>	A5/E5	ASM 48H LRR	LRR	UBIQ	24.84	21.85
<input checked="" type="checkbox"/>	A8/E8	ASM 72H LRR	LRR	UBIQ	24.31	21.59
<input checked="" type="checkbox"/>	A11/E11	ASM 7D LRR	LRR	UBIQ	26.46	24.88
<input checked="" type="checkbox"/>	B2/F2	MESS 0H LRR	LRR	UBIQ	25.72	22.51
<input checked="" type="checkbox"/>	B5/F5	MESS 48H LRR	LRR	UBIQ	26.41	22.46
<input checked="" type="checkbox"/>	B8/F8	MESS 72H LRR	LRR	UBIQ	24.83	20.59
<input checked="" type="checkbox"/>	B11/F11	MESS 7D LRR	LRR	UBIQ	28.53	26.58
<input checked="" type="checkbox"/>	C5/G5	INOC 48H LRR	LRR	UBIQ	22.39	21.06
<input checked="" type="checkbox"/>	C8/G8	INOC 72H LRR	LRR	UBIQ	27.02	22.71
<input checked="" type="checkbox"/>	C11/G11	INOC 7D LRR	LRR	UBIQ	27.00	22.91

Ratio

	Pairing	Sample Name	Target Name		Ratios				Corr/Multi Factor	Status
			Targets	References	Tgt/Ref.	Error	Norm	Error		
		H2O LRR	LRR	UBIQ	0.3180	1.57E-2	1.000		1/1	
	A2/E2	ASM 0H LRR	LRR	UBIQ	1.49E-2	2.35E-3	4.68E-2	7.14E-3	1/1	
	A5/E5	ASM 48H LRR	LRR	UBIQ	0.1259	8.02E-3	0.3959	3.67E-2	1/1	
	A8/E8	ASM 72H LRR	LRR	UBIQ	0.1518	3.76E-2	0.4773	0.1250	1/1	
	A11/E11	ASM 7D LRR	LRR	UBIQ	0.3357	0.1340	1.056	0.3666	1/1	
	B2/F2	MESS 0H LRR	LRR	UBIQ	0.1077	1.94E-2	0.3385	4.57E-2	1/1	
	B5/F5	MESS 48H LRR	LRR	UBIQ	6.48E-2	5.25E-3	0.2039	1.30E-2	1/1	
	B8/F8	MESS 72H LRR	LRR	UBIQ	5.28E-2	6.90E-3	0.1660	1.65E-2	1/1	
	B11/F11	MESS 7D LRR	LRR	UBIQ	0.2580	8.55E-2	0.8114	0.2228	1/1	
	C5/G5	INOC 48H LRR	LRR	UBIQ	0.3973		1.249		1/1	
	C8/G8	INOC 72H LRR	LRR	UBIQ	5.01E-2	9.09E-3	0.1575	2.26E-2	1/1	
	C11/G11	INOC 7D LRR	LRR	UBIQ	5.89E-2	2.66E-2	0.1851	7.07E-2	1/1	

Anexo 2

RESULTADOS DA ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DO GENE CODIFICADOR DE ACC OXIDASE EM CAFFEEIRO 'MUNDO NOVO' POR PCR EM TEMPO REAL



Results

Cp

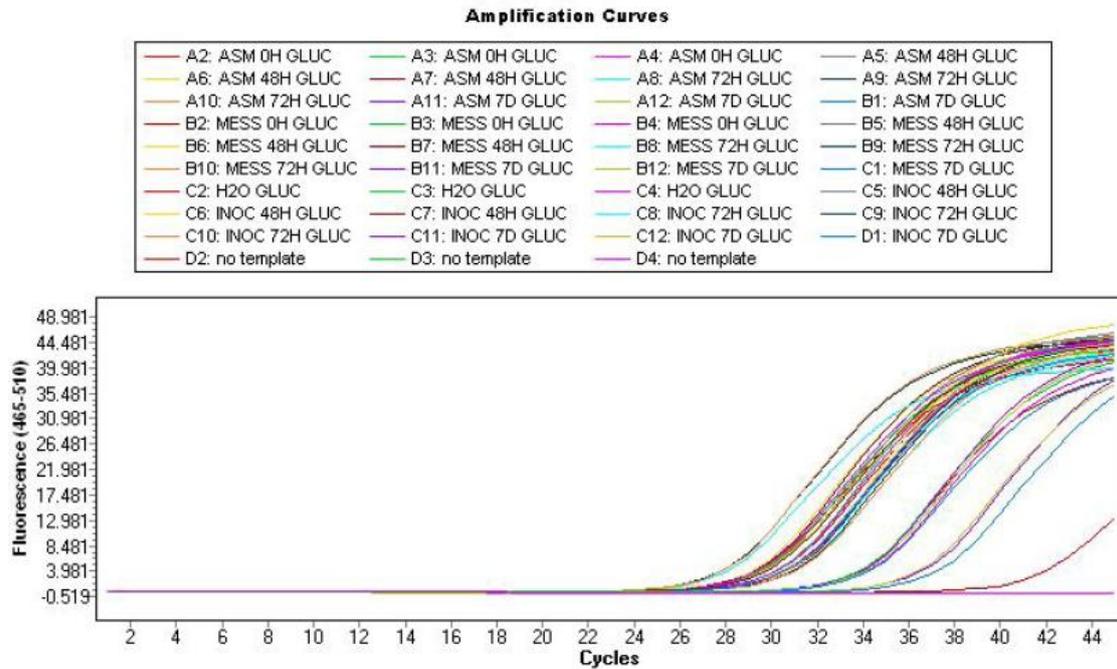
Bar Chart	Pairing	Sample Name	Target Name		Target Cp	Reference Cp
			Targets	References	Mean	Mean
<input checked="" type="checkbox"/>		H2O ACC	ACC	UBIQ	20.90	21.35
<input checked="" type="checkbox"/>	A2/E2	ASM 0H ACC	ACC	UBIQ	26.69	23.54
<input checked="" type="checkbox"/>	A5/E5	ASM 48H ACC	ACC	UBIQ	24.92	21.95
<input checked="" type="checkbox"/>	A8/E8	ASM 72H ACC	ACC	UBIQ	20.33	21.61
<input checked="" type="checkbox"/>	A11/E11	ASM 7D ACC	ACC	UBIQ	26.25	24.39
<input checked="" type="checkbox"/>	B2/F2	MESS 0H ACC	ACC	UBIQ	20.05	22.29
<input checked="" type="checkbox"/>	B5/F5	MESS 48H ACC	ACC	UBIQ	22.22	22.57
<input checked="" type="checkbox"/>	B8/F8	MESS 72H ACC	ACC	UBIQ	23.30	20.40
<input checked="" type="checkbox"/>	B11/F11	MESS 7D ACC	ACC	UBIQ	26.17	26.34
<input checked="" type="checkbox"/>	C5/G5	INOC 48H	ACC	UBIQ	21.14	20.90
<input checked="" type="checkbox"/>	C8/G8	INOC 72H	ACC	UBIQ	22.59	22.52
<input checked="" type="checkbox"/>	C11/G11	INOC 7D ACC	ACC	UBIQ	23.36	22.87

Ratio

	Pairing	Sample Name	Target Name		Ratios				Corr/Multi Factor	Status
			Targets	References	Tgt/Ref.	Error	Norm	Error		
		H2O ACC	ACC	UBIQ	1.366	0.3809	1.000		1/1	
	A2/E2	ASM 0H ACC	ACC	UBIQ	0.1132	4.12E-2	8.29E-2	3.79E-2	1/1	
	A5/E5	ASM 48H ACC	ACC	UBIQ	0.1273		9.32E-2		1/1	
	A8/E8	ASM 72H ACC	ACC	UBIQ	2.429	0.3178	1.778	0.4768	1/1	
	A11/E11	ASM 7D ACC	ACC	UBIQ	0.2758	3.44E-2	0.2019	3.76E-2	1/1	
	B2/F2	MESS 0H ACC	ACC	UBIQ	4.754	0.7221	3.480	0.8326	1/1	
	B5/F5	MESS 48H ACC	ACC	UBIQ	1.274	0.2123	0.9323	0.2184	1/1	
	B8/F8	MESS 72H ACC	ACC	UBIQ	0.1338	1.72E-2	9.79E-2	2.15E-2	1/1	
	B11/F11	MESS 7D ACC	ACC	UBIQ	1.130	0.6212	0.8269	0.2572	1/1	
	C5/G5	INOC 48H	ACC	UBIQ	0.8453	7.13E-2	0.6187	0.1521	1/1	
	C8/G8	INOC 72H	ACC	UBIQ	0.9529	6.13E-2	0.6975	0.1585	1/1	
	C11/G11	INOC 7D ACC	ACC	UBIQ	0.7124	0.1105	0.5214	0.1138	1/1	

Anexo 3

RESULTADOS DA ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DO GENE CODIFICADOR DE β-1,3- GLUCANASE EM CAFEIEIRO 'MUNDO NOVO' POR PCR EM TEMPO REAL



Results

Cp

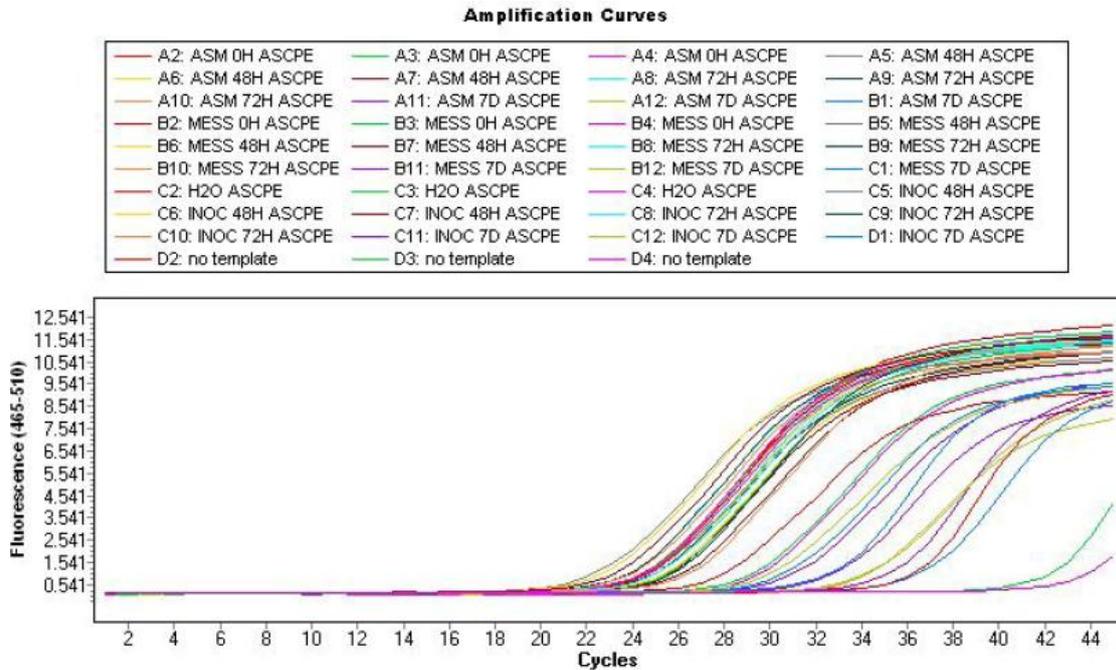
Bar Chart	Pairing	Sample Name	Target Name		Target Cp		Reference Cp	
			Targets	References	Mean	Error	Mean	Error
<input checked="" type="checkbox"/>		H2O GLUC	GLUC	UBIQ	25.24	0.26	24.50	0.42
<input checked="" type="checkbox"/>	A2/E2	ASM 0H GLUC	GLUC	UBIQ	29.97	0.20	27.13	0.31
<input checked="" type="checkbox"/>	A5/E5	ASM 48H GLUC	GLUC	UBIQ	25.27	0.39	25.59	0.30
<input checked="" type="checkbox"/>	A8/E8	ASM 72H GLUC	GLUC	UBIQ	23.71	0.07	25.11	0.35
<input checked="" type="checkbox"/>	A11/E11	ASM 7D GLUC	GLUC	UBIQ	30.04	0.23	27.46	0.41
<input checked="" type="checkbox"/>	B2/F2	MESS 0H GLUC	GLUC	UBIQ	26.10	0.17	25.45	0.18
<input checked="" type="checkbox"/>	B5/F5	MESS 48H GLUC	GLUC	UBIQ	26.59	0.12	25.46	0.08
<input checked="" type="checkbox"/>	B8/F8	MESS 72H GLUC	GLUC	UBIQ	26.64	0.08	23.91	0.77
<input checked="" type="checkbox"/>	B11/F11	MESS 7D GLUC	GLUC	UBIQ	32.93	0.42	28.98	
<input checked="" type="checkbox"/>	C5/G5	INOC 48H GLUC	GLUC	UBIQ	25.62	0.13	23.59	0.21
<input checked="" type="checkbox"/>	C8/G8	INOC 72H GLUC	GLUC	UBIQ	26.89	0.10	25.45	0.24
<input checked="" type="checkbox"/>	C11/G11	INOC 7D GLUC	GLUC	UBIQ	26.44	0.20	26.43	0.58

Ratio

	Pairing	Sample Name	Target Name		Ratios				Corr/Multi Factor	Status
			Targets	References	Tgt/Ref.	Error	Norm	Error		
		H2O GLUC	GLUC	UBIQ	0.5985	0.2630	1.000		1/1	
	A2/E2	ASM 0H GLUC	GLUC	UBIQ	0.1390	3.79E-2	0.2322	6.43E-2	1/1	
	A5/E5	ASM 48H GLUC	GLUC	UBIQ	1.246		2.082		1/1	
	A8/E8	ASM 72H GLUC	GLUC	UBIQ	2.635	0.4996	4.402	1.327	1/1	
	A11/E11	ASM 7D GLUC	GLUC	UBIQ	0.1665	5.42E-2	0.2781	8.86E-2	1/1	
	B2/F2	MESS 0H GLUC	GLUC	UBIQ	0.6369	6.73E-2	1.064	0.2880	1/1	
	B5/F5	MESS 48H GLUC	GLUC	UBIQ	0.4573	4.03E-2	0.7640	0.1719	1/1	
	B8/F8	MESS 72H GLUC	GLUC	UBIQ	0.1514	9.11E-2	0.2529	0.1302	1/1	
	B11/F11	MESS 7D GLUC	GLUC	UBIQ	6.49E-2		0.1084		1/1	
	C5/G5	INOC 48H GLUC	GLUC	UBIQ	0.2447	3.73E-2	0.4088	0.1255	1/1	
	C8/G8	INOC 72H GLUC	GLUC	UBIQ	0.3690	6.51E-2	0.6164	0.1593	1/1	
	C11/G11	INOC 7D GLUC	GLUC	UBIQ	0.9934	0.3588	1.660	0.5736	1/1	

Anexo 4

RESULTADOS DA ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DO GENE CODIFICADOR DE ASCORBATO PEROXIDASE EM CAFEEIRO 'MUNDO NOVO' POR PCR EM TEMPO REAL



Results

Cp

Bar Chart	Pairing	Sample Name	Target Name		Target Cp		Reference Cp	
			Targets	References	Mean	Error	Mean	Error
<input checked="" type="checkbox"/>		H2O ASCPE;H2O UBIQ	ASCPE	UBIQ	20.64	0.21	22.47	0.17
<input checked="" type="checkbox"/>	A2/E2	ASM 0H ASCPE	ASCPE	UBIQ	26.22	0.78	24.56	0.08
<input checked="" type="checkbox"/>	A5/E5	ASM 48H ASCPE	ASCPE	UBIQ	21.74	0.08	22.55	0.19
<input checked="" type="checkbox"/>	A8/E8	ASM 72H ASCPE	ASCPE	UBIQ	20.83	0.22	22.29	0.39
<input checked="" type="checkbox"/>	A11/E11	ASM 7D ASCPE	ASCPE	UBIQ	26.27	0.87	24.72	0.19
<input checked="" type="checkbox"/>	B2/F2	MESS 0H ASCPE	ASCPE	UBIQ	21.46	0.77	23.60	0.26
<input checked="" type="checkbox"/>	B5/F5	MESS 48H ASCPE	ASCPE	UBIQ	20.88	0.34	22.71	0.27
<input checked="" type="checkbox"/>	B8/F8	MESS 72H ASCPE	ASCPE	UBIQ	19.83	0.20	20.62	0.09
<input checked="" type="checkbox"/>	B11/F11	MESS 7D ASCPE	ASCPE	UBIQ	30.03	1.13	27.08	0.54
<input checked="" type="checkbox"/>	C5/G5	INOC 48H ASCPE	ASCPE	UBIQ	17.44	0.46	21.52	0.09
<input checked="" type="checkbox"/>	C8/G8	INOC 72H ASCPE	ASCPE	UBIQ	21.51	0.45	23.19	0.63
<input checked="" type="checkbox"/>	C11/G11	INOC 7D ASCPE	ASCPE	UBIQ	29.82	1.21	28.72	0.06

Ratio

	Pairing	Sample Name	Target Name		Ratios				Corr/Multi Factor	Status
			Targets	References	Tgt/Ref.	Error	Norm	Error		
		H2O ASCPE;H2O UBIQ	ASCPE	UBIQ	3.561	0.6475	1.000		1/1	
	A2/E2	ASM 0H ASCPE	ASCPE	UBIQ	0.3173		8.91E-2		1/1	
	A5/E5	ASM 48H ASCPE	ASCPE	UBIQ	1.746		0.4903		1/1	
	A8/E8	ASM 72H ASCPE	ASCPE	UBIQ	2.762	0.9592	0.7757	0.4282	1/1	
	A11/E11	ASM 7D ASCPE	ASCPE	UBIQ	0.3414		9.59E-2		1/1	
	B2/F2	MESS 0H ASCPE	ASCPE	UBIQ	4.434		1.245		1/1	
	B5/F5	MESS 48H ASCPE	ASCPE	UBIQ	3.551		0.9972		1/1	
	B8/F8	MESS 72H ASCPE	ASCPE	UBIQ	1.732	0.1219	0.4863	8.92E-2	1/1	
	B11/F11	MESS 7D ASCPE	ASCPE	UBIQ	0.1298		3.64E-2		1/1	
	C5/G5	INOC 48H ASCPE	ASCPE	UBIQ	17.00		4.776		1/1	
	C8/G8	INOC 72H ASCPE	ASCPE	UBIQ	3.222		0.9049		1/1	
	C11/G11	INOC 7D ASCPE	ASCPE	UBIQ	0.4658		0.1308		1/1	



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE
SÃO PAULO
TRABALHANDO POR VOCÊ

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)