



LUIZ HENRIQUE MONTEIRO FERNANDES

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM CAFEEIRO E
PROTEÇÃO CONTRA A CERCOSPORIORE
POR INDUTOR DE RESISTÊNCIA E
FUNGICIDAS**

LAVRAS - MG

2014

LUIZ HENRIQUE MONTEIRO FERNANDES

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM CAFEIEIRO E PROTEÇÃO
CONTRA CERCOSPORIOSE POR INDUTOR DE RESISTÊNCIA E
FUNGICIDAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Fernandes, Luiz Henrique Monteiro.

Atividade antioxidante em cafeeiro e proteção contra a cercosporiose por indutor de resistência e fungicidas / Luiz Henrique Monteiro Fernandes. – Lavras : UFLA, 2014.

78 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende.

Bibliografia.

1. Indução de resistência. 2. Sistema antioxidante. 3. Fosfito. 4. Fungicida. 5. *Cercospora coffeicola*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.739952

LUIZ HENRIQUE MONTEIRO FERNANDES

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM CAFEIEIRO E PROTEÇÃO
CONTRA CERCOSPORIOSE POR INDUTOR DE RESISTÊNCIA E
FUNGICIDAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2014.

Dr. José Donizeti Alves	UFLA
Dr. Edson Ampélio Pozza	UFLA
Dr. Mário Sobral de Abreu	UFLA
Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza	EPAMIG

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

LAVRAS - MG

2014

Aos meus avós, queridos mesmo sem tê-los conhecido, Nilo Monteiro (in memorian) e Maria Lina de Paula (in memorian), sem os quais não teria hoje a oportunidade de completar mais essa realização pessoal em minha jornada.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo: a Ele todo louvor, toda honra e toda glória!

À Universidade Federal de Lavras, a casa que me amparou e me formou Engenheiro, Mestre e hoje, Doutor.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, que me suportou, financeiramente, enquanto foi preciso, para cumprir com minhas obrigações como aluno.

Ao Departamento de Fitopatologia, que me deu a oportunidade de me formar como profissional e cidadão ao longo destes 10 anos como discente.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Fitopatologia que, ao longo de todo esse tempo, oferecem-me hoje a condição de chamá-los de amigos.

A todos os colegas do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, em especial ao Bruno, Pedro, Deila, Moisés, Manoel, Dario e Vítor pela disposição em me ajudar naquilo que foi necessário.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal, Helbert e Camila, que hoje me dão a oportunidade de serem meus amigos, quando, em muitas vezes, abriram mão de seu tempo para dedicá-lo a me ajudar, incondicionalmente, ao longo desta caminhada.

Ao professor, orientador e amigo, Mário Lúcio, que um dia me deu uma oportunidade ímpar e ajudou-me a abrir portas em minha vida sem as quais não poderia almejar o que tenho alcançado hoje.

Ao professor e coorientador José Donizeti Alves, pelo suporte acadêmico e, muitas vezes emocional, necessários ao longo desta caminhada, além da participação em minha banca.

Aos demais professores que participaram de minha banca de defesa, Dr. Edson Pozza, Dr. Mário Sobral e Dra. Sára Chalfoun pelas correções e orientações necessárias.

À Syngenta Proteção de Cultivos, empresa que me dá a oportunidade de exercer minha profissão, em nome de meu gestor Fernando Resende, que me possibilitou a condição de poder terminar com esta empreitada.

A Universidade Federal do Espírito Santo que abriu as portas para mim e, em especial, ao Prof. Fábio Ramos, que me deu condição de cumprir com os créditos acadêmicos necessários.

Aos meus pais, Luiz Fernandes e Ariete, motivo pelo qual existo que me deram carinho, amor, orientação, foram meu suporte, pilar e hoje, dão-me condição de retribuir um pouco de tudo que são para mim.

Ao meu irmão Luciano, meu exemplo de dedicação, respeito e temor a Deus.

A todos aqueles que, de alguma maneira, ajudaram-me e foram importantes para que mais esta etapa fosse cumprida em minha vida, muito obrigado!

RESUMO GERAL

O presente trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar os efeitos da aplicação do fosfito de potássio em formulação com subprodutos da indústria cítrica e fungicida, associados ou não, na proteção de mudas de café contra ataque de *Cercospora coffeicola* e, também, investigar os efeitos destes tratamentos nas trocas gasosas e no sistema antioxidante enzimático como mecanismos de resistência pós-formados durante a indução de resistência. Para tanto, realizaram-se dois trabalhos em casa de vegetação, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, utilizando-se como material vegetativo a cultivar Mundo Novo. Em ambos foram feitas as pulverizações, com os produtos Fortaleza (fosfito de potássio formulado com subprodutos da indústria cítrica), fungicida sistêmico Priori Xtra (ciproconazol e azoxystrobim) e as associações entre os produtos e, 7 dias após, inoculou-se com o patógeno *Cercospora coffeicola*. No ensaio para avaliar a proteção promovida pelos produtos contra progresso da cercosporiose, verificou-se que os tratamentos com Priori Xtra, sozinho ou associado com Fortaleza, foram os que promoveram o melhor controle e, conseqüentemente, menos área abaixo da curva de progresso, tanto da incidência quanto da severidade da cercosporiose, sendo, estatisticamente, diferente do tratamento com o fertilizante foliar Fortaleza, este último, por sua vez, com controle estatisticamente superior à testemunha, mostrando um controle parcial da doença. Avaliando-se as trocas gasosas, ficou nítido que os tratamentos, onde se associou o produto Fortaleza, mantiveram a taxa de fotossíntese das plantas inoculadas constante e similares das plantas que não receberam o inóculo, ao longo dos períodos de avaliação. O tratamento com Priori Xtra inoculado, foi estatisticamente semelhante à testemunha e inferior aos com Fortaleza no que tange à taxa fotossintética das plantas aos 14 e 18 dias após pulverização. O trabalho permite associar tal comportamento às atividades enzimáticas da catalase, peroxidase do ascorbato e dismutase do superóxido, onde se destacaram nas plantas que receberam os tratamentos com o produto Fortaleza, sendo estatisticamente diferente dos demais, constatando-se maior atividade destas enzimas do sistema antioxidante e que, por sua vez, foram responsáveis por eliminar excessos de radicais livres provenientes da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's), em virtude da indução de resistência contra o elicitor biótico, mantendo, assim, suas atividades ecofisiológicas estáveis. Pode-se, também, associar tais resultados ao ácido ascórbico, presente no produto Fortaleza, conforme análise feita em Laboratório, sendo este um importante substrato para ação da enzima peroxidase do ascorbato, crucial na eliminação do peróxido de hidrogênio, sendo este último uma importante ERO.

Palavras-chave: Indução de resistência. Sistema antioxidante. Fosfito. Fungicida. *Cercospora coffeicola*.

GENERAL ABSTRACT

This study was conducted with the objective of evaluating the effects of applying potassium phosphite in formulation with citrus and fungicide industry byproducts, associated or not, in the protection of coffee plants against *Cercospora coffeicola*, as well as investigating the effects of these treatments on gas exchange and on the enzymatic antioxidant systems as resistance mechanisms post-formed during the resistance induction. Thus, two studies were performed in a greenhouse, in the Department of Plant Pathology of the Universidade Federal de Lavras, using the Mundo Novo cv. as plant material. In both studies the plants were pulverized with the Fortaleza products (potassium phosphite formulated with citrus industry byproducts), Priori Xtra systemic fungicide (cyproconazol and azoxystrobim) and associations between the products. Seven days later, the *Cercospora coffeicola* pathogen was inoculated. In the trial to evaluate the protection promoted by the products against the progress of cercosporiose, it was verified that treatments with Priori Xtra, alone or associated with Fortaleza, promoted the best control and, consequently, less area below the progress curve, in the cercosporiose incidence as well as in severity, being statistically different from the treatment with the Fortaleza foliar fertilizer, the last with control statistically superior to the witness, showing a partial control of the disease. Evaluating the gas exchange, it was clear that the treatments with the association of the Fortaleza product maintained a constant photosynthetic rate of the inoculated plants, similar to that of the plants not inoculated, over the evaluation periods. The treatment with the Priori Xtra inoculate was statistically similar to the witness and inferior to those with Fortaleza regarding the photosynthetic rate of the plants at 14 and 18 days after pulverization. The work allows the association of such behavior with the catalase, ascorbate peroxidase and superoxide dismutase enzymatic activities, highlighted in the plants which received treatment with the Fortaleza product, being statistically different from the others, occurring higher activity of these enzymes of the antioxidant system and that were responsible for eliminating the excesses of free radicals derived from the production of oxygen reactive species (ORSs), due to the resistance induction against the biotic elicitor, thus maintaining stable its eco-physiological activities. Such results may also be associated to the ascorbic acid present in the Fortaleza product, according to analysis performed in laboratory, the last being an important substrate for the ascorbate peroxidase enzyme, crucial in the elimination of the hydrogen peroxide, the last an important ORS.

Keywords: Resistance induction. Antioxidant system. Phosphite. Fungicide. *Cercospora coffeicola*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 Comparação entre a molécula de fosfito (ácido fosforoso) e de fosfato (ácido fosfórico) 21
- Figura 2 Formação do fosfito de potássio pela reação do ácido fosforoso com o hidróxido de potássio..... 23
- Figura 3 Formação de ERO pela redução univalente do oxigênio molecular (reproduzido de SCANDALIOS, 2002) “Overall reaction”, do inglês, significa (“reação geral”) 27
- Figura 4 A eliminação enzimática de ERO via ciclo do ascorbato-glutationa. APx – Ascorbato peroxidase; CAT – Catalase; DHA – Desidroascorbato; DHAR – Desidroascorbato redutase; MDHA – Monodesidroascorbato; MDHAR – Monodesidroascorbato-redutase; GR – Glutationa redutase; GSH – Glutationa reduzida; GSSG – Glutationa oxidada; SOD – Superoxido dismutase (reproduzido de TEIXEIRA, 2005)..... 29

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Curva de progresso da incidência (A) e severidade (B) da cercosporiose nas mudas de cafeeiro cultivada Mundo Novo em 4 tratamentos diferentes: Fortaleza, Piori Xtra, Fortaleza associado ao Piori Xtra e Testemunha 45

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Taxa fotossintética líquida (A), transpiração (E) e eficiência do uso da água (EUA) de mudas de café *Coffea arabica* L., a 1, 4, 7, 10, 14 e 21 dias após a pulverização (DAP), inoculadas e não inoculadas com *Cercospora coffeicola*, com formulações provenientes de resíduos da lavoura cítrica e fungicida, isolados ou em mistura. As letras comparam os tratamentos dentro de cada tempo e grupo de inoculação, de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade..... 61
- Figura 2 Curvas da atividade enzimática da peroxidase do ascorbato (APX) dos tratamentos Fortaleza (A), Priori Xtra (B) e Fortaleza associado ao Priori Xtra (C) comparados com a testemunha, inoculados ou não, ao longo dos períodos de coleta após pulverização 64
- Figura 3 Curvas da atividade enzimática da catalase (CAT) dos tratamentos Fortaleza (A), Priori Xtra (B) e Fortaleza associado ao Priori Xtra (C) comparados com a testemunha, inoculados ou não, ao longo dos períodos de coleta após pulverização 65
- Figura 4 Curvas da atividade enzimática da desmutase do superóxido (SOD) dos tratamentos Fortaleza (A), Priori Xtra (B) e Fortaleza associado ao Priori Xtra (C) comparados com a testemunha, inoculados ou não, ao longo dos períodos de coleta após pulverização 66

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Tratamentos à base de fosfito, avaliados no experimento, em casa de vegetação, com mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo.....	41
Tabela 2	Épocas de pulverização dos tratamentos no experimento em casa de vegetação com mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo....	41
Tabela 3	Média de área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPIC) e severidade (AACPSC) da cercosporiose em mudas de cafeeiro cv. Mundo Novo	46

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Tratamentos à base de fosfito avaliados no experimento em casa de vegetação com mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo.....	55
Tabela 2	Épocas de pulverização dos tratamentos no experimento em casa de vegetação com mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo....	55
Tabela 3	Tratamentos, época de avaliações ecofisiológicas e coletas de amostras.....	57
Tabela 4	Valores de área abaixo da curva para cada tratamento de acordo com atividade enzimática da APX, CAT e SOD.....	68
Tabela 5	Composição centesimal do produto Fortaleza. Laboratório de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal Lavras, 2014.....	70

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	Introdução geral	13
1	INTRODUÇÃO		13
2	REFERENCIAL TEÓRICO		15
2.1	Cercosporiose do cafeeiro		15
2.2	O fenômeno da indução de resistência		17
2.3	Fosfitos no controle de doenças de plantas		21
2.4	Espécies Reativas de Oxigênio		25
2.4.1	Mecanismos não-enzimáticos de eliminação de ERO's		27
2.4.2	Mecanismos enzimáticos de eliminação de ERRO		29
	REFERÊNCIAS		31
	CAPÍTULO 2	Fosfito de potássio em formulação com sub- produto da indústria cítrica e fungicida na proteção de mudas de cafeeiro contra <i>Cercospora coffeicola</i>	37
1	INTRODUÇÃO		39
2	MATERIAL E MÉTODOS		41
2.1	Obtenção dos produtos		41
2.2	Obtenção do fungo <i>C. coffeicola</i> e inoculação		42
2.3	Obtenção de mudas de cafeeiro		42
2.4	Instalação do experimento		43
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO		44
4	CONCLUSÃO		48
	REFERÊNCIAS		49
	CAPÍTULO 3	Indutor de resistência e seus reflexos na fotossíntese e na atividade do sistema antioxidante em mudas de café	50
1	INTRODUÇÃO		52
2	MATERIAL E MÉTODOS		55
2.1	Obtenção dos produtos		55
2.2	Obtenção do fungo <i>Cercospora coffeicola</i> e inoculação		56
2.3	Obtenção de mudas de cafeeiro		56
2.4	Instalação do experimento		57
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO		60
4	CONCLUSÃO		73
	REFERÊNCIAS		74
	CONSIDERAÇÕES FINAIS		78

CAPÍTULO 1 Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café. Pelo primeiro levantamento da safra 2014, estima-se que serão produzidas de 46,5 a 50,1 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2014). Assim, esta é uma das principais fontes de divisas para o país.

O estado de Minas Gerais se destaca como o maior produtor nacional, com produção de 26,6 milhões de sacas. As regiões Sul e Oeste Mineiro contribuem com pouco mais de 50% deste total, ou seja, 13,3 milhões de sacas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2014).

As doenças foliares do cafeeiro, causadas por *Hemileia vastatrix* e *Cercospora coffeicola*, estão entre os principais problemas da cafeicultura e são fontes de perdas na produção. A ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, é a principal doença do cafeeiro. Constatada no Brasil em janeiro de 1970, logo se disseminou para todas as regiões produtoras do país, sendo, atualmente, encontrada em todas as regiões produtoras de café do mundo.

Outra doença que desponta como problema na cafeicultura é a cercosporiose, conhecida, também, por mancha-de-olho-pardo ou olho – de - pomba, causada por *Cercospora coffeicola*. É uma das doenças mais antigas do cafeeiro, tanto na América do Sul como América Central e está disseminada por todas as regiões produtoras. Nas regiões altas do estado do Espírito Santo e em Minas Gerais, a partir de 1971, ocorreram ataques intensos do patógeno no campo, com perdas na produção de, aproximadamente, 30% (CARVALHO; CHALFOUN, 2001). Os prejuízos com a cercosporiose ganharam maior importância econômica com a implantação de lavouras nos cerrados ou em áreas

de baixa fertilidade natural, pois existe grande relação entre o ataque de *Cercospora* e a nutrição mineral das plantas (POZZA et al., 2000; TALAMINI et al., 2001).

Atualmente, em todo o mundo, onde se pratica uma agricultura econômica, utilizam-se pesticidas para o controle de doenças de plantas. O uso racional desses produtos tem efeito benéfico para os produtores em curto prazo, no entanto, em longo prazo, pode ocorrer seleção de novas raças resistentes dos patógenos, além de promover a contaminação do ambiente e prejudicar a saúde humana. Para contornar este problema, vários estudos são realizados no intuito de desenvolver e descobrir métodos alternativos de controle de doenças de plantas.

Como medida alternativa de controle de doenças, tem-se a indução de resistência em plantas, que envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas mesmas, representados por barreiras bioquímicas ou estruturais, que aumentam a resistência geral da planta em resposta a tratamentos com agentes bióticos e abióticos (UKNES et al., 1996). A utilização de produtos com nutrientes, como fosfitos, ganhou importância no controle de doenças de plantas nos últimos anos, pois eles podem atuar como indutores de resistência e diretamente sobre o patógeno.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cercosporiose do cafeeiro

A cercosporiose, também conhecida por mancha de olho pardo ou olho – de -pomba, é uma das principais doenças do cafeeiro. Seu agente etiológico é o fungo *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke, pertencente à família Dematiaceae, ordem Moniliales, classe dos fungos mitospóricos.

A doença manifesta-se por manchas circulares, de coloração castanho - claro a escuro, com centro branco-acinzentado, quase sempre envolvidas por halo amarelo, dando à lesão um aspecto de olho. No centro cinza das lesões, notam-se pontuações escuras que constituem as frutificações do fungo (esporodóquios). Podem ocorrer variações nos sintomas descritos, pela ausência do halo amarelado e, assim, a doença é chamada, em algumas regiões, de cercospora-negra. Os frutos, também, podem ser infectados por *C. coffeicola* e, neles, as lesões são mais frequentes quando estão próximos à maturação. A infecção nos frutos inicia-se, quatro meses após a floração, com lesões deprimidas de coloração castanho-claro, dispostas no sentido do pedúnculo-coroa do fruto. As manchas mais velhas são escuras e com aspecto ressecado, nas quais a polpa correspondente ao local da lesão fica aderente ao pergaminho. Os frutos, quando atacados no estágio ainda verde e verde-cana, amadurecem precocemente, com avermelhamento com base na lesão (CHALFOUN, 1997; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

Nas regiões altas do estado do Espírito Santo e em Minas Gerais, a partir de 1971, ocorreram ataques intensos deste patógeno no campo, com perdas, na produção, de 30% (CARVALHO; CHALFOUN, 2001). Os prejuízos com a cercosporiose ganharam maior importância econômica com a implantação de lavouras nos cerrados ou em áreas de baixa fertilidade natural, pois existe grande

relação entre o ataque de cercospora e a nutrição mineral das plantas (POZZA et al., 2000; TALAMINI et al., 2001). Assim, solos de baixa fertilidade ou com desequilíbrio nutricional, principalmente em cálcio, potássio e nitrogênio, predispõem à planta ao ataque mais intenso do patógeno.

O fato de a cercosporiose ser um problema desde as mudas no viveiro até os plantios novos no campo torna esta doença ainda mais importante na cafeicultura (CHALFOUN, 1997; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005). Nos viveiros, ela provoca desfolha e afeta o crescimento das mudas, tornando-as raquíticas e inadequadas para o plantio. Já em plantios novos, é comum ocorrer intensos ataques com desfolha acentuada e redução do crescimento das mudas, principalmente em lavouras implantadas em terrenos de baixa fertilidade e ou com adubações desequilibradas. Além disso, podem ocorrer ataques severos desse patógeno, com queda de folhas e frutos após as primeiras produções. Em lavouras adultas, além da queda de folhas, a doença provoca a queda prematura e o chochamento dos frutos atacados e, também, pode funcionar como porta de entrada para outros fungos que interferem na qualidade do café. Isso implica na redução da produção e do rendimento e na depreciação do tipo e da bebida do café (CHALFOUN, 1997).

Alta umidade relativa e temperaturas amenas são condições ideais para o desenvolvimento do fungo, pois ele se desenvolve a temperaturas entre 10°C e 25°C. Condições de alta luminosidade e alta carga pendente, também, contribuem para o progresso da doença. Quando a planta tem alta carga pendente, os frutos drenam grande parte dos nutrientes das folhas para completar seu desenvolvimento e, assim, a folha se torna desnutrida, com maior incidência dessa doença (ZAMBOLIM; VALE, 2003).

Como medidas de controle da doença, algumas práticas culturais podem ser adotadas, principalmente em condições de viveiro, como controle da irrigação, luminosidade, utilização de substratos equilibrados e com boas

propriedades físicas. O controle químico pode ser realizado por meio de aplicações de fungicidas cúpricos, alternados com fungicidas sistêmicos. Os triazóis e as estrobilurinas são bastante utilizados, pois, com as mesmas aplicações, realiza-se, também, o controle da ferrugem (ZAMBOLIM; VALE, 2003).

2.2 O fenômeno da indução de resistência

As plantas têm a capacidade de reconhecer a invasão de agentes patogênicos e de desenvolver diversos mecanismos de defesa elaborados contra a ameaça de ataque desses agentes (STASKAWICZ, 2001). Alguns desses mecanismos são expressos constitutivamente e constituem-se de barreiras físicas e químicas, enquanto outros são induzidos somente após o ataque do patógeno, desenvolvendo uma rede de transdução de sinal e a rápida ativação da expressão de genes que codificam para proteínas relacionadas à defesa de plantas (DIXON; LAMB, 1990). As defesas constitutivas são representadas por estruturas como ceras, cutícula, parede celular espessa, tricomas, adaptações em estômatos e fibras vasculares, bem como substâncias químicas pré-formadas, como fenóis, alcaloides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, fototoxinas, inibidores proteicos e enzimas hidrolíticas (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Por outro lado, os mecanismos induzidos são a formação de papila, halos, lignificação, camada de cortiça, formação de tiloses e deposição de goma, além da produção de compostos como fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (PR proteínas) e espécies reativas de oxigênio (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

A indução de resistência consiste no aumento da capacidade de defesa da planta contra amplo espectro de organismos fitopatogênicos, incluindo fungos, bactérias e vírus (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). A

resistência resultante é proporcionada por um agente indutor, biótico ou abiótico, que aciona mecanismos de defesa na planta, os quais se encontram na forma latente (HAMMERSCHMIDT; KÚC, 1982). Essa ativação pode ser obtida pelo tratamento com agentes bióticos, ou seja, formas avirulentas de patógenos, raças incompatíveis e, em determinadas circunstâncias, por formas virulentas de patógenos, extratos vegetais e extratos de fungos (STANGARLIN; PASCHOLATI, 1994) ou por ativadores químicos, como ácido aminobutírico (Cohen, 1996), ácido 2,6-dicloroisonicotínico e acibenzolar-S-metil (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998).

A resistência induzida (RI) ativa mecanismos de defesa representados por barreiras bioquímicas e ou estruturais, com aumento da resistência geral da planta (OLIVEIRA; PASCHOLATI; LEITE, 1997). A proteção obtida contra determinado patógeno pode ser local ou sistêmica e depende do intervalo de tempo entre o tratamento inicial (indutor) e a inoculação do patógeno (desafiador) (PASCHOLATI; LEITE, 1995). A sua duração pode ser de poucos dias a algumas semanas ou pode durar todo o ciclo de vida da planta (PASCHOLATI; LEITE, 1995), tornando-se, dessa maneira, um mecanismo de defesa constitutivo da mesma.

A RI é dividida em duas categorias, a resistência sistêmica adquirida (RSA) (Sticher et al., 1997) e a resistência sistêmica induzida (RSI) (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). Na primeira, a resistência se desenvolve sistêmica ou localizadamente em resposta a um patógeno que causa uma lesão necrótica (HR) ou por aplicação exógena de ácido salicílico ou compostos sintéticos, como o éster S-metil do ácido benzo [1,2,3] tiadiazol-7-carbotioico (ASM) e o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA). Nesta, a resistência expressa, geralmente, é efetiva contra amplo espectro de patógenos e está associada com a produção de PR proteínas. Muitas delas possuem atividade antimicrobiana e são excelentes marcadores moleculares para a resposta de resistência

(HAMMERSCHMIDT; SMITH-BECKER, 1999). Já na RSI, a molécula sinalizadora é mediada pelo ácido jasmônico e o etileno, sem envolver a expressão de PR proteínas (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998).

Dentre as PR proteínas, as quitinases (CHI; EC 3.2.1.14) são monômeros com massa molecular entre 25 e 35 kDa, com atividade de lisozima e podem hidrolisar ligações β -1,4 entre ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina no peptidoglicano bacteriano. Certas quitinases podem agir como quitosanases, além de existirem, também, quitosanases específicas induzidas em plantas, em resposta a fitopatógenos. Embora as quitinases hidrolisem eficientemente a quitina, que é o principal componente da parede celular de muitos fungos, estas enzimas, também, são encontradas em plantas de fumo, em resposta à inoculação com o *Tobacco mosaic virus* (TMV) (PONSTEIN et al., 1994). Outras PR proteínas importantes, as β -1,3-glucanases (GLU; EC 3.2.1.6), são enzimas que hidrolisam polímeros de β -1,3-glucana, compostos que, juntamente com a quitina, são os principais componentes que conferem resistência à parede celular dos fungos (CORNELISSEN; MELCHERS, 1993).

Na indução de resistência, quitinases e β -1,3-glucanases agem de forma conjunta. Uma pequena quantidade de β -1,3-glucanases é sintetizada e secretada para a lamela média (espaço intercelular) e, com o crescimento fúngico neste espaço, esta enzima começa a degradar a parede celular do fungo e os fragmentos liberados pela ação da enzima funcionam como eliciadores, com indução da síntese de grande quantidade de quitinases e β -1,3-glucanases que são acumuladas nos vacúolos. Considerando o momento em que o fungo consegue penetrar na célula, os vacúolos são rompidos e ocorre a liberação de grande quantidade dessas enzimas com repressão da ação do patógeno (MAUCH; STAEHELIN, 1989).

As peroxidases (POX; EC 1.11.1.7) não só oxidam os compostos fenólicos como também aumentam a sua velocidade de polimerização em substâncias similares à lignina, que se depositam na parede celular e interferem no posterior crescimento e desenvolvimento do patógeno (AGRIOS, 2005). Elas representam um conjunto de dezenas de isoenzimas capazes de catalisar a oxidação de vários substratos, como substâncias aromáticas, ácido ascórbico e compostos fenólicos, na presença de peróxido de hidrogênio, com formação de quinonas e água. Os produtos gerados pela ação das peroxidases estão envolvidos na formação da parede celular vegetal, na suberização e na lignificação. Em plantas infectadas por patógenos, ou em plantas induzidas, as respostas de defesa estão, também, ligadas à oxidação de compostos fenólicos, que são tóxicos a patógenos (SUTIC; SINCLAIR, 1991). Estas enzimas estão, também, envolvidas na geração de H_2O_2 que, por sua vez, podem gerar outros radicais ativos de oxigênio, além de apresentar atividade antimicrobiana direta (PENG; KÚC, 1992).

Outra importante molécula induzida é a lignina, substância orgânica mais abundante nas plantas, depois da celulose. É um polímero de grupos fenilpropanoides, altamente ramificado, que apresenta função primária e secundária. Além de proporcionar suporte mecânico, a lignina desempenha funções protetoras importantes nos vegetais. A lignificação bloqueia o desenvolvimento de patógenos e representa uma resposta frequente à infecção ou à lesão (TAIZ; ZEIGER, 2004). A lignina, juntamente com a celulose e outros polissacarídeos que ocorrem na parede celular das plantas superiores, funciona como barreira física à penetração fúngica (VANCE; KIRK; SHERWOOD, 1980) A lignificação pode impedir o desenvolvimento do fungo nos tecidos vegetais de várias maneiras: estabelecimento de barreira mecânica ao avanço e desenvolvimento do patógeno; modificação da parede celular, tornando-a mais resistente ao ataque de enzimas hidrolíticas; aumento da

resistência das paredes à difusão de toxinas produzidas pelos patógenos, que impedem que os nutrientes do hospedeiro sejam utilizados pelo invasor (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

2.3 Fosfitos no controle de doenças de plantas

O fósforo (P) é um mineral muito importante para os organismos vivos e faz parte de compostos de suma importância para a vida vegetal, como o ácido desoxirribonucleico (DNA), o ácido ribonucleico (RNA), o polímero de nucleotídeos e os ésteres, além do fósforo inorgânico (TAIZ; ZEIGER, 2004). O P elementar não ocorre na natureza, pois é muito reativo e combina rapidamente com outros elementos, como o oxigênio (O) e o hidrogênio (H). Quando plenamente oxidado, o P está ligado a quatro átomos de O, molécula conhecida como fosfato. No entanto, quando não é totalmente oxidado e o H ocupa o lugar de um átomo de O, a molécula resultante é chamada de fosfito (Figura 1). Esta mudança aparentemente simples na forma molecular provoca diferença significativa que influencia a sua solubilidade, a absorção e os efeitos no metabolismo e na fisiologia vegetal (LOVATT; MIKKELSEN, 2006).

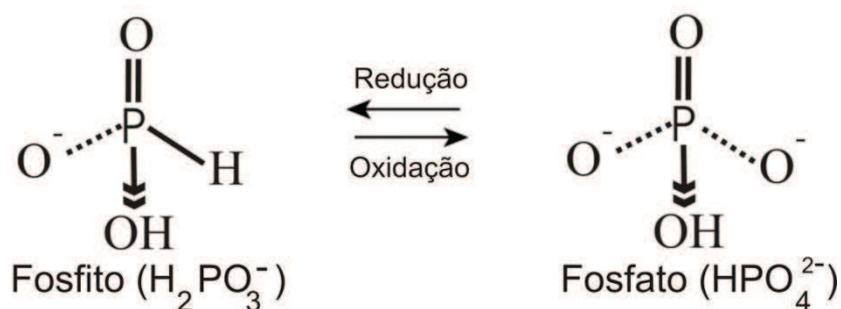


Figura 1 Comparação entre a molécula de fosfito (ácido fosforoso) e de fosfato (ácido fosfórico)

Não existem evidências concretas de que as plantas utilizam fosfitos como fonte direta de P. Por isso, os mesmos não são aplicados como fonte de P e, sim, como um “ativador” de defesas das plantas. Os fosfatos são fontes exclusivas de P na nutrição de plantas (MARSCHNER, 1995). Segundo Carswell et al. (1996), quando os fosfitos são aplicados em plantas que apresentam baixo nível nutricional de P, eles podem influenciar, negativamente, o desenvolvimento da mesma, pois eles são inibidores competitivos ao fosfato, pelo fato de sua molécula ser mais facilmente absorvida pelas plantas.

Como exemplo benéfico da utilização do fosfito em plantas, em única aplicação foliar, no pré-florescimento, em laranjeiras da cultivar Valência, Albrigo (1999) observou maior número de flores, rendimento de frutos e aumento de sólidos solúveis totais, em comparação com plantas não tratadas. Segundo Lovatt (1999), duas aplicações foliares de fosfito, uma em maio e outra em julho, também em laranjeira, proporcionaram frutos com maior valor comercial, sem reduzir a produção total. As respostas fisiológicas proporcionadas pelo fosfito podem estar relacionadas ao metabolismo do açúcar, à estimulação da rota do ácido shiquímico ou a alterações hormonais e químicas nas plantas (LOVATT; MIKKELSEN, 2006).

O fosfito é comercializado, há algum tempo, na forma de etil fosfonato (Fosetyl-Al) e, mais recentemente, como sal de potássio, manganês, cobre, zinco, etc., recomendado no controle dos fungos do gênero *Phytophthora* e dos fungos de podridões do colo, raiz, tronco e frutos. Na forma de sal, como o de potássio (Figura 2), parece ter o mesmo efeito que o Fosetyl-Al, fungicida recomendado para o controle de oomicetos como *Pythium* spp e *Phytophthora* spp.

O Fosetyl-Al é constituído por três moléculas de etil fosfonato ligadas ao alumínio que neutralizam suas cargas negativas. O fosfito é liberado pela hidrólise do etil fosfonato e favorece a proteção à planta contra fungos

patogênicos, com translocação de forma descendente na planta, via floema, das folhas para as raízes (MCDONALD; GRANT; PLAXTON, 2001). Processo análogo parece ocorrer para os fosfitos (FENN; COFFEY, 1989; NIERE; DEANGELIS; GRANT, 1994), que causam acúmulo de P nas formas de polifosfato e pirofosfato em *Phytophthora*, estando a redução da doença em questão relacionada ao metabolismo do pirofosfato, o qual interfere em várias vias metabólicas essenciais ao crescimento fúngico (NIERE; DEANGELIS; GRANT, 1994).

O efeito direto do fosfito no metabolismo de oomicetos é importante, contudo, este não deve ser o único mecanismo de ação do produto no controle de patógenos que, na realidade, resultaria de uma ação mista com envolvimento, também, da ativação do sistema de defesa natural da planta (SMILLIE; GRANT; GUEST, 1989). Os fosfitos têm a propriedade de estimular a formação de substâncias naturais de autodefesa da planta, como as fitoalexinas, protegendo-a do ataque de fungos e, também, apresentam efeito fungicida, atuando diretamente sobre o fungo (FENN; COFFEY, 1984).

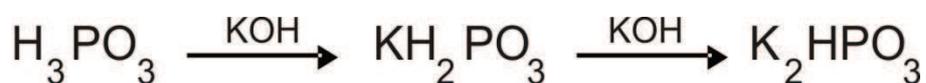


Figura 2 Formação do fosfito de potássio pela reação do ácido fosforoso com o hidróxido de potássio

O uso de produtos à base de fosfito tem proporcionado resultados expressivos no controle de doenças de plantas (NOJOSA; RESENDE; RESENDE, 2005). A aplicação conferiu alto nível de proteção contra oídio em crucíferas, de maneira dependente da dose utilizada. A proteção restringiu-se apenas aos tecidos tratados, sem resposta sistêmica, embora os autores sugiram a atuação sinérgica dos modos de ação direto sobre o patógeno e indireto, com ativação das defesas dessas hortaliças (BÉCOT et al., 2000).

Segundo Pajot, Corre e Silué (2001), fosfito de potássio, na concentração de 40,6 ppm, proporcionou completa proteção ao míldio da alface. Esta mesma concentração inibiu totalmente a germinação dos conídios, com efeito fungitóxico, sem indução do acúmulo de PR proteínas. Em pomar comercial de macieira, Reuveni, Sheglov e Cohen (2003) demonstraram que três aplicações foliares de fosfito de potássio, com base no início da floração até as pétalas caírem, reduziram o número de frutos com podridão causada por *Alternaria alternata* em 60%, em relação a plantas não tratadas. A aplicação de fosfito ($1,5 \text{ mL L}^{-1}$) nos frutos de maçã em pós-colheita foi eficiente no controle do mofo-azul (*Penicillium expansum*) (BLUM et al., 2007). Também em pós-colheita, frutos de maçã tratados com fosfito de potássio (250 mL L^{-1}) e cloreto de cálcio apresentaram menor incidência de podridões pós-colheita e menores diâmetros de lesões. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos com a aplicação do fungicida padrão iprodione (BRACKMANN et al., 2004).

Em cafeeiro, aplicações do fosetyl-Al controlaram a mancha de Phoma com redução do percentual de folhas e de ramos atacados, diferindo, significativamente, da testemunha (MANSK; MATIELLO, 1983). Também em cafeeiro, o fosfito de potássio aplicado em folhas destacadas reduziu a área abaixo da curva de progresso da severidade da mancha de Phoma, sem diferenças em relação ao tebuconazole e fosetyl-Al, e, em mudas, proporcionou diminuição da severidade da ferrugem (NOJOSA, 2003). No campo, fosfitos apresentaram efeito protetor em cafeeiro, diminuindo a intensidade da mancha de Phoma (BARGUIL, 2004). Entretanto, para cafeeiro, poucos trabalhos com fosfitos foram publicados com relatos do seu efeito na ativação de mecanismos de defesa da RSA.

Existem vários relatos da utilização de fosfitos no controle de doenças de plantas, entretanto, esta atuação como indutores de resistência é questionada, não se encontrando em muitos destes trabalhos, evidências concretas de

respostas de defesa ativadas pelos sais de fosfito. Assim, são necessários estudos mais detalhados da ação dessa molécula nas plantas.

2.4 Espécies Reativas de Oxigênio

O acúmulo de oxigênio na atmosfera mudou profundamente as condições necessárias para a vida na Terra. Usando a água como fonte redutora e liberando oxigênio no ambiente, a fotossíntese mudou a atmosfera da terra de um ambiente redutor para um oxidado, alterando a direção da evolução. O acúmulo do di-oxigênio (O_2) na atmosfera da Terra proporcionou a evolução de uma grande variedade de organismos aeróbicos que usam oxigênio como acceptor de elétrons, fornecendo, deste modo, um alto rendimento de energia, quando comparado com a fermentação e a respiração anaeróbica (SCANDALIOS, 2002; SCANDALIOS, 2005).

O metabolismo aeróbico é um processo oxidativo onde os compostos orgânicos são oxidados e metabólitos intermediários como, por exemplo, a nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NAD^+) e a flavina-adenina dinucleotídeo (FAD), atuam como receptores de elétrons e estes, por sua vez, são re-oxidados nas mitocôndrias para a produção de adenosina trifosfatada (ATP). Na cadeia transportadora de elétrons, a energia é liberada e controlada pela transferência de elétrons entre os diferentes carreadores até o receptor final, o oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Uma limitação química da molécula de O_2 faz com que a adição de elétrons ocorra por meio de reações sequenciais de redução univalente, o que leva à formação de intermediários parcialmente reduzidos conhecidos como Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; SCANDALIOS, 2002). A expressão “radical livre”, também, é empregada para designar as ERO e, quimicamente, um radical livre é definido como um átomo, íon ou molécula química capaz de

existir de forma independente e que possui um ou mais elétrons livres não-pareados. Essas partículas, formadas por elétrons livres ou não-pareados, têm uma instabilidade elétrica muito grande e, por esta razão, mesmo tendo meia-vida muito curta, apresentam alta capacidade reativa. Sendo assim, são consideradas ERO o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^-) e o oxigênio singlete (O_2) (BOLWELL; WOJTASZEK, 1997; SCANDALIOS, 2002; SHARMA; DUBEY, 2004). O peróxido de hidrogênio, que é a forma protonada do íon peróxido, não possui qualquer elétron não-pareado e, portanto, não é considerado um radical livre (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

No entanto, o peróxido de hidrogênio tem uma grande importância nos sistemas biológicos por sua capacidade de gerar o radical hidroxila na presença de metais divalentes. Sendo assim, o peróxido de hidrogênio é considerado uma ERO. O peróxido de hidrogênio é um oxidante relativamente estável e ausente de carga, o que pode facilitar a sua passagem por meio da camada bilipídica da membrana celular. Essa capacidade de se difundir rapidamente pela membrana celular favorece a rápida indução da resposta vegetal. O superóxido pode ser produzido, por meio de vários mecanismos, incluindo a ativação de NADPH-oxidases/sintases ligadas à membrana, peroxidases da parede celular e lipoxigenases como resultado imediato da transferência de elétrons nas mitocôndrias ou nos cloroplastos. Como consequência, o peróxido de hidrogênio pode oxidar várias moléculas orgânicas como o ascorbato (ASC) (RESENDE; SALGADO; CHAVEA, 2003). Os radicais hidroxilas, embora tenham meia-vida curta, são ERO's potencialmente fortes e com alta afinidade por biomoléculas no seu sítio de produção (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999), o que dificulta o estudo dos mesmos.

Em comum, os diferentes tipos de ERO's possuem a capacidade de causar danos às proteínas, ao DNA e aos lipídeos, podendo levar à morte celular. Várias evidências indicam que as ERO's, também, funcionam como moléculas

sinalizadoras em plantas e que possuem um papel importante na ativação de fatores de transcrição, ativando (ou reprimindo) a expressão de genes relacionados com a resposta de defesa a patógenos e durante o desenvolvimento da planta (SCANDALIOS, 2002; APEL; HIRT, 2004). Estudos recentes, realizados por diferentes grupos, utilizando diversos organismos, indicam que o estresse oxidativo é um denominador comum fundamental em muitas doenças e estresses ambientais, os quais podem levar à morte celular em todos os organismos aeróbicos. Este fato demonstra que os estresses abióticos e bióticos causam seus efeitos deletérios direta ou indiretamente, via geração de ERO's (SCANDALIOS, 2005).

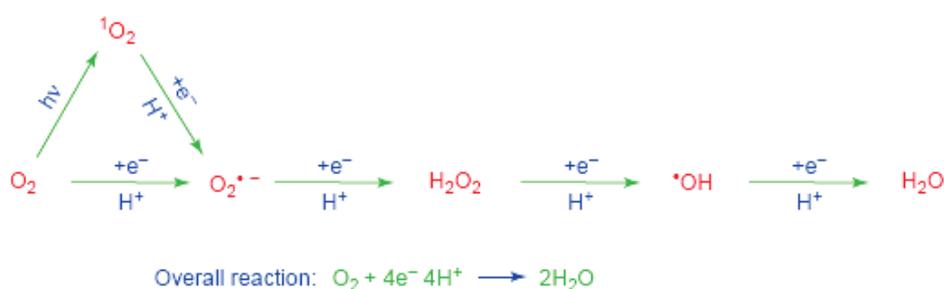


Figura 3 Formação de ERO pela redução univalente do oxigênio molecular (reproduzido de SCANDALIOS, 2002) “Overall reaction”, do inglês, significa (“reação geral”)

2.4.1 Mecanismos não-enzimáticos de eliminação de ERO's

Antioxidantes não-enzimáticos são encontrados em todos os compartimentos celulares. Halliwell e Gutteridge (1999) definiram os compostos antioxidantes como substâncias que em concentrações relativamente baixas competem com outros substratos oxidáveis e, portanto, diminuem ou inibem a oxidação destes substratos. Sob esta definição encontram-se os componentes com propriedades intrínsecas como o α -tocoferol (vitamina E), β - caroteno, ascorbato (vitamina C) e glutationa (GSH). Adicionalmente, incluem-se nesta

classe flavonoides, alcaloides e carotenoides (APEL; HIRT, 2004; SCANDALIOS, 2005). Estes podem atuar diretamente na detoxificação de ERO e radicais derivados ou, então, atuar como substratos redutores para as enzimas antioxidantes (MITTLER, 2002).

A GSH, por exemplo, é oxidada por ERO formando glutatona oxidada (GSSG), a qual está presente em todos os compartimentos celulares. Ela é também a principal forma de armazenamento do enxofre e atua como detoxificadora de xenobióticos pela conjugação GSH. Junto com sua forma oxidada GSSG, a GSH mantém o balanço redox nos compartimentos celulares. Vários estudos indicam que a mesma está envolvida na regulação da expressão de genes e, também, no ciclo celular em virtude das propriedades do par GSH: GSSH (MITTLER, 2002).

Nas plantas, o ASC é encontrado nas organelas da maioria dos tipos celulares e, também, no apoplasto. A capacidade de doar elétrons em reações enzimáticas e não enzimáticas faz do ASC o principal componente detoxificador das ERO na fase aquosa. O ASC pode eliminar diretamente o superóxido, os radicais hidroxila e o oxigênio singlete e, assim, reduzir o peróxido de hidrogênio à água via reação da ascorbato peroxidase (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003). Segundo os mesmos autores, o ASC está envolvido na regulação da divisão celular, na progressão da fase G1 para S do ciclo celular e na alongação celular.

Com relação aos componentes fenólicos, flavonoides e carotenoides, pouco é conhecido sobre a atividade de detoxificação de ERO por esses compostos em plantas. O α -tocoferol (vitamina E) é o maior detoxificador de radicais peroxila (ROO-) em bicamadas lipídicas. O α -tocoferol presente na membrana dos cloroplastos protege a mesma contra danos foto-oxidativos. Em relação às várias funções não antioxidantes da vitamina E na membrana, acredita-se que a mesma estabiliza a estrutura da membrana e modula a fluidez

de uma maneira similar ao colesterol e, também, a permeabilidade da membrana para pequenos íons e moléculas (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003).

2.4.2 Mecanismos enzimáticos de eliminação de ERO

As enzimas antioxidantes envolvidas na eliminação de ERO em plantas incluem a superóxido dismutase (SOD), a ascorbato peroxidase (APX), a glutathiona peroxidase (GPX), a catalase (CAT), a glutathiona S-transferase, peroxidases (não-específicas), a monohidroascorbato redutase (MDHAR) e a dehidroascorbato redutase (DHAR) (APEL; HIRT, 2004; SACANDALIOS, 2005). As SODs atuam na primeira linha de defesa contra as ERO, dismutando o superóxido a peróxido de hidrogênio. As enzimas APX, GPX e CAT subsequentemente detoxificam o peróxido de hidrogênio. Ao contrário da CAT, a APX requer um sistema de regeneração do ascorbato e GSH, o ciclo do ascorbato-glutathiona (Figura 4).

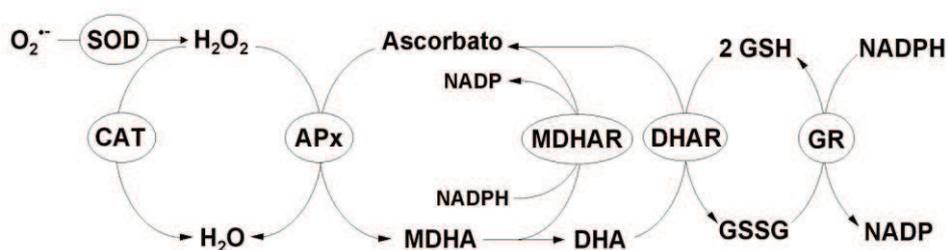


Figura 4 A eliminação enzimática de ERO via ciclo do ascorbato-glutathiona. APx – Ascorbato peroxidase; CAT – Catalase; DHA – Desidroascorbato; DHAR – Desidroascorbato redutase; MDHA – Monodesidroascorbato; MDHAR – Monodesidroascorbato-redutase; GR – Glutathiona redutase; GSH – Glutathiona reduzida; GSSG – Glutathiona oxidada; SOD – Superóxido dismutase (reproduzido de TEIXEIRA, 2005).

Ao contrário de muitos organismos, as plantas possuem múltiplos genes codificando SOD e APX. Diferentes isoformas são específicas dos cloroplastos, das mitocôndrias e dos peroxissomos, bem como do citosol. A abrangência do estresse oxidativo numa célula é determinada pela quantidade de superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. Desta maneira, o balanço da atividade de SOD, APX e CAT parece ser crucial para reduzir o nível tóxico de ERO em uma célula e mudanças no balanço dessas parecem induzir mecanismos compensatórios (APEL; HIRT, 2004; SCANDALIOS, 2002; SCANDALIOS, 2005).

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. New York: Academic Press, 2005.
- ALBRIGO, L. G. Effects of foliar applications of urea or Nutriphite on flowering and yields of Valencia orange trees. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Wronter Haven, v. 112, p. 1-4, 1999.
- APEL, K.; HIRT, H. Reative oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review Plant of Biotechnology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.
- BARGUIL, M. B. **Indução de resistência e reação de cultivares de *Coffea arabica* L. a *Phoma costarricensis* ECHANDI**. 2004. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- BÉCOT, S. et al. Phytogard (K₂HPO₃) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. **Crop Protection**, Surrey, v. 19, n. 6, p. 417-425, July 2000.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, London, v. 91, n. 2, p. 179-194, 2003.
- BLUM, L. E. B. et al. Fosfitos aplicados em pós-colheita reduzem o mofo-azul em maçãs 'Fuji' e 'Gala'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 265-268, ago. 2007.
- BOLWELL, G. P.; WOJTASZEK, P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence a broad perspective. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 51, n. 6, p. 347-366, Dec. 1997.
- BRACKMAN, A. et al. Fosfitos para o controle de podridões pós-colheita em maçãs 'Fuji' durante o armazenamento refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1039-1042, jul./ago. 2004.
- CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. **Cercospora: doença do cafeeiro também chamada de "olho pardo" ou "olho de pomba**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2001. (Informe Tecnológico, n. 26).

CARSWELL, C. et al. The fungicide phosphonate disrupts the phosphate starvation response in *Brassica nigra* seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 110, n. 1, p. 105-110, Jan. 1996.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 81-124.

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

COHEN, Y. Induced resistance against fungal diseases by aminobutyric acids. In: LYR, H.; RUSSEL, P. E.; SISLER, H. D. (Ed.). **Modern fungicides and antifungal compounds**. Andover: Intercept, 1996. p. 461-466.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira Café Safra 2014, primeira estimativa, janeiro/2014**. Brasília: Conab, 2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/1_levantamento_2014.pdf> Acesso em: 28 jan. 2014.

CORNELISSEN, B. J. C.; MELCHERS, L. S. Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 3, p. 709-712, Mar. 1993.

DIXON, R. A.; LAMB, C. J. Molecular communication in interactions between plant and microbial pathogens. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 339-367, June 1990.

FENN, M. E.; COFFEY, M. D. Quantification of phosphonate and ethyl phosphate in tobacco and tomato tissues and significance for the mode of action of two phosphonate fungicides. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, n. 1, p. 76-82, Jan. 1989.

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 1999.

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

HAMMERSCHMIDT, R.; SMITH-BECKER, J. A. The role of salicylic acid in disease resistance. In: AGRAWAL, A. A.; TUZUN, S.; BENT, E. (Ed.).

Induced plant defenses against pathogens and herbivores - biochemistry, ecology and agriculture. Saint Paul: APS, 1999. p. 37-53.

LOVATT, C. J. Timing citrus and avocado foliar nutrient applications to increase fruit set and size. **Hort Technology**, Alexandria, v. 9, n. 4, p. 607-612, Oct./Dec. 1999.

LOVATT, C. J.; MIKKELSEN, R. L. Phosphite fertilizers: What are they? Can you use them? What can they do? **Better Crops**, New York, v. 90, n. 4, p. 11-13, Apr. 2006.

MANSK, Z.; MATIELLO, J. B. Estudo de doses de fungicidas sistêmicos e orgânicos no controle à *Phoma* spp. em cafeeiros (*Coffea arabica* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 10., 1983, Poços de Caldas. **Anais...** Rio de Janeiro: IBC/GERBA, 1983. p. 392-393.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants.** 2. ed. London: Academic Press, 1995.

MAUCH, F.; STAEHELIN, L. A. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. **Plant Cell**, Baltimore, v. 1, n. 4, p. 447-457, Apr. 1989.

MCDONALD, A. E.; GRANT, B. R.; PLAXTON, W. C. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, 10, p. 1505-1519, Oct. 2001.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002

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

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

NIERE, J. O.; DEANGELIS, G.; GRANT, B. R. The effect of phosphonate on acid-soluble phosphorus components in the genus *Phytophthora*. **Microbiology**, New York, v. 140, n. 7, p. 1661-1670, July 1994.

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

PAJOT, E.; CORRE, D. L.; SILUÉ, D. Phytogard[®] and DL- β -amino butyric (BABA) induce resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa* L.). **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 9, p. 861-869, Nov. 2001.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos: volume 1**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. Cap. 22, p. 417-454.

PENG, M.; KUC, J. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, n. 6, p. 696-698, June 1992.

PONSTEIN, A. S. et al. A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 104, n. 1, p. 109-118, Jan. 1994.

POZZA, A. A. A. et al. Intensidade da mancha de olho pardo em mudas de cafeeiro em função de doses de N e K em solução nutritiva. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 29-33, jan./mar, 2000.

REUVENI, M.; SHEGLOV, D.; COHEN, Y. Control of moldy-core decay in apple fruits by β -aminobutyric acids and potassium phosphites. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 8, p. 933-936, Aug. 2003.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, mar./abr. 2003.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 38, n. 7, p. 995-1014, July 2005.

- SCANDALIOS, J. G. The rise of ROS. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 27, n. 9, p. 483- 486, Sept. 2002.
- SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Ascorbato peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. **Plant Science**, Limerick, v. 167, p. 541-550, 2004.
- SMILLIE, R.; GRANT, B. R.; GUEST, D. The mode of action of phosphite: evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp in plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, n. 9, p. 921-926, Sept. 1989.
- STASKAWICZ, B. Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, n. 1, p. 73-76, Jan. 2001.
- STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 20, n. 1, p. 16-21, jan./mar. 1994.
- STICHER, L.; MAUCH MANI, B.; METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235-270, 1997.
- SUTIC, D. D.; SINCLAIR, J. B. **Anatomy and physiology of diseased plants**. Boston: CRC, 1991.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- TALAMINI, V. et al. Progresso da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em diferentes lâminas de irrigação e diferentes parcelamentos de adubação. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 55-62, jan./mar. 2001.
- TEIXEIRA, F. K. **Identificacao e caracterizacao dos genes que codificam as isoformas de ascorbato peroxidase em arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2005. 184 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.
- UKNES, S. et al. Reduction of risk for growers: methods for the development of disease-resistant crops. **New Phytologist**, Cambridge, v. 133, n. 1, p.3-10, May 1996.

VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Plant Pathology**, Palo Alto, v. 18, p. 259-288, 1980.

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

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. Estratégias múltiplas no manejo integrado de doenças do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 137-153, ago. 2003. (Resumo).

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

CAPÍTULO 2 Fosfito de potássio em formulação com sub-produto da indústria cítrica e fungicida na proteção de mudas de cafeeiro contra *Cercospora Coffeicola*

RESUMO

O trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da aplicação do fertilizante foliar Fortaleza (fosfito de potássio + subproduto da indústria cítrica), fungicida Piori Xtra e a associação entre ambos na proteção de mudas de cafeeiro contra *C. coffeicola*. As doses utilizadas dos produtos foram: 7,5 mL/L de Fortaleza e 1,0 mL/L de Piori Xtra. Os tratamentos foram aplicados 7 dias antes da inoculação com *Cercospora coffeicola*. O produto Fortaleza (fosfito de potássio associado com subprodutos da indústria cítrica), conferiu controle de 59% para incidência e 55% para severidade às mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo contra *Cercospora coffeicola*, porém estatisticamente superior à testemunha. O fungicida sistêmico Piori Xtra aplicado sozinho e em mistura com o Fortaleza conferiu controle superior da doença, tanto para incidência (94,8 e 96%) quanto para severidade (87,5 e 89%), comparado ao indutor de resistência aplicado sozinho e estatisticamente superior a todos os tratamentos.

Palavras-chave: Fosfito de potássio. Fungicida. *Cercospora coffeicola*.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of applying the Fortaleza leaf fertilizer (potassium phosphite + citric industry byproduct), Priori Xtra fungicide and the associations of both in the protection of coffee seedlings against *C. coffeicola*. The doses used were: 7.5 mL/L of Fortaleza and 1.0 mL/L of Priori Xtra. The treatments were applied seven days before *Cercospora coffeicola* inoculation. The Fortaleza product (potassium phosphite + citric industry byproduct) conferred the control of 59% for incidence and 55% for severity to Mundo Novo coffee cv. seedlings against *Cercospora coffeicola*, and was statistically superior to the witness. The Priori Xtra systemic fungicide applied alone or with the Fortaleza conferred superior control of the disease whither for incidence (94.8 and 96%) or severity (87.5 and 89%) when compared to the resistance inductor applied alone, as was statistically superior to all treatments.

Key-words: Potassium phosphite. Fungicide. *Cercospora coffeicola*.

1 INTRODUÇÃO

A cercosporiose, causada por *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke, é uma das principais doenças da fase de viveiro da cultura do café (*Coffea arabica* L.). Nos viveiros, a incidência do fungo é favorecida por excesso de irrigação ou por deficiência hídrica, desequilíbrio nutricional e insolação. Assim, as plantas apresentam desfolha intensa, tornam-se raquíticas e impróprias ao plantio (FERNANDEZ-BORRERO; MESTRE; DEUQUE, 1966).

Com a expansão da cafeicultura e o aumento do uso de fungicidas sistêmicos para o controle da ferrugem do cafeeiro, ocorreu conseqüente diminuição do uso dos fungicidas protetores. Como os fungicidas protetores eram os principais meios de controle da cercosporiose, esta se tornou um sério problema fitossanitário para a cafeicultura, podendo reduzir em 30% a produtividade no campo (CARVALHO; CHALFOUN, 1999).

Atualmente, no agronegócio, utilizam-se pesticidas para o controle de doenças de plantas (KIMATI et al., 1997). O uso racional desses produtos tem efeito benéfico para os produtores em curto prazo, no entanto, em longo prazo pode ocorrer seleção de novas raças resistentes de patógenos, promovendo a contaminação do ambiente e danos à saúde humana. Para contornar este problema, vários estudos estão sendo realizados visando desenvolver métodos alternativos de controle de doenças de plantas (RESENDE et al., 2002).

Dentre estes métodos destaca-se a indução de resistência (IR) em plantas, a qual pode ser ativada por compostos como ácido salicílico, acibenzolar-S-metil (ASM), fragmentos e peptídios da parede celular de patógenos, dentre outros (PEREZ et al., 1995). Jackson et al. (2000) relatam que os fosfitos (fosfonato ou ácido fosforoso), além de atuar diretamente sobre os patógenos (ação tóxica direta), também atuam, indiretamente, induzindo respostas de defesa na planta.

Portanto, neste trabalho, avaliaram-se os efeitos da aplicação de fosfito de potássio em formulação com resíduos da indústria cítrica e fungicida, associados ou não, na proteção de mudas de cafeeiro contra *Cercospora coffeicola*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos produtos

Foram utilizados produto comercial à base de fosfito e um fungicida padrão, sozinhos e em mistura, descritos na Tabela 1 e pulverizados conforme Tabela 2.

Tabela 1 Tratamentos à base de fosfito, avaliados no experimento, em casa de vegetação, com mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo.

Tratamentos	Composição	Empresa
Fortaleza	Fosfito de potássio (P_2O_5 e K_2O) + Formulação à base de subproduto da indústria de citros – “A”	Agrichem
Priori Xtra	Ciproconazol + Azoxystrobin – “B”	Syngenta
Fortaleza + Priori Xtra	A + B	Agrichem e Syngenta
Testemunha	-----	-----

Tabela 2 Épocas de pulverização dos tratamentos no experimento em casa de vegetação com mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo

Tratamentos	Pulverização	
	Épocas	Dose
Fortaleza	7 dias antes da inoculação	7,5 mL/L
Priori Xtra	7 dias antes da inoculação	1,0 mL/L
Fortaleza + Priori Xtra	7 dias antes da inoculação	7,5 + 1,0 mL/L
Testemunha	-----	-----

2.2 Obtenção do fungo *C. coffeicola* e inoculação

O patógeno foi obtido de folhas naturalmente infectadas, coletadas em lavoura de café localizadas no campus da UFLA. As folhas foram lavadas superficialmente em água corrente e, em seguida, transferidas para uma bandeja plástica forrada internamente com papel umedecido com água destilada. Posteriormente, a bandeja foi inserida em um saco plástico transparente, para a formação de uma câmara úmida, incubada, sob temperatura ambiente, por três dias. Após esse período, os conídios produzidos foram retirados da superfície foliar com pincel de ponta macia. A concentração da suspensão de conídios para as inoculações foi ajustada, em hemocítômetro, para $15.000 \text{ conídios mL}^{-1}$. A suspensão de conídios foi pulverizada, até o ponto de escorrimento, em mudas de cafeeiro nos diferentes tratamentos. Logo após a pulverização, as plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida, proporcionada por um saco plástico transparente, por 24 horas.

2.3 Obtenção de mudas de cafeeiro

As mudas de cafeeiro, cultivar Mundo Novo, foram produzidas em substrato comercial Plantmax-café, suplementadas com aplicações de Iogen[®] (Fertilizantes Mitsui S.A., Poços de Caldas, MG) e adubadas com 0,5 g de fertilizante de liberação lenta por muda (formulação 4-14-8 de NPK). As mudas foram mantidas em casa de vegetação, à temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade em torno de 60% para a realização do experimento.

2.4 Instalação do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia, UFLA, em delineamento de blocos casualizados (DBC), com 4 tratamentos (Tabela 1) e quatro repetições, sendo a parcela experimental constituída por 6 mudas, com seis meses de idade.

Os produtos foram pulverizados, sete dias antes da inoculação, com pulverizador manual, até o ponto de escorrimento e as mudas foram mantidas em casa de vegetação até o final do experimento. As avaliações de incidência e severidade da cercosporiose nas folhas foram realizadas semanalmente, totalizando seis avaliações, em aproximadamente 45 dias

A partir das avaliações, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) e da severidade (AACPS) da cercosporiose nas folhas para cada tratamento, de acordo com Shaner e Finney (1977), bem como a porcentagem de controle promovida por cada tratamento com relação à testemunha, utilizando-se a fórmula de Abbott (1925) onde a Eficiência (E%)= $t - p/t * 100$, sendo **t** a infestação nas testemunhas e **p** é a infestação na parcela tratada. Os dados foram analisados pelo programa estatístico Sisvar e Statistical Analysis System (SAS) ver. 8.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações iniciaram-se a partir do momento em que os primeiros sintomas da doença começaram a se manifestar, 17 dias após inoculação. De acordo com a Figura 1, percebe-se um comportamento análogo tanto para incidência quanto para severidade, no que tange ao progresso da doença nas mudas de cafeeiro. Todavia, a cercosporiose atacou um maior número de folhas de cafeeiro, mas gerando lesões pequenas, o que explica o motivo de maiores índices de incidência quando comparado com a severidade da doença.

Ao analisar a curva de progresso da doença para os tratamentos propostos (Fortaleza, Priori Xtra e Fortaleza associado com Priori Xtra), percebe-se que todos controlaram a doença, quando comparado com a testemunha, não necessariamente com a mesma eficiência, conforme pode ser analisado pela Tabela 3.

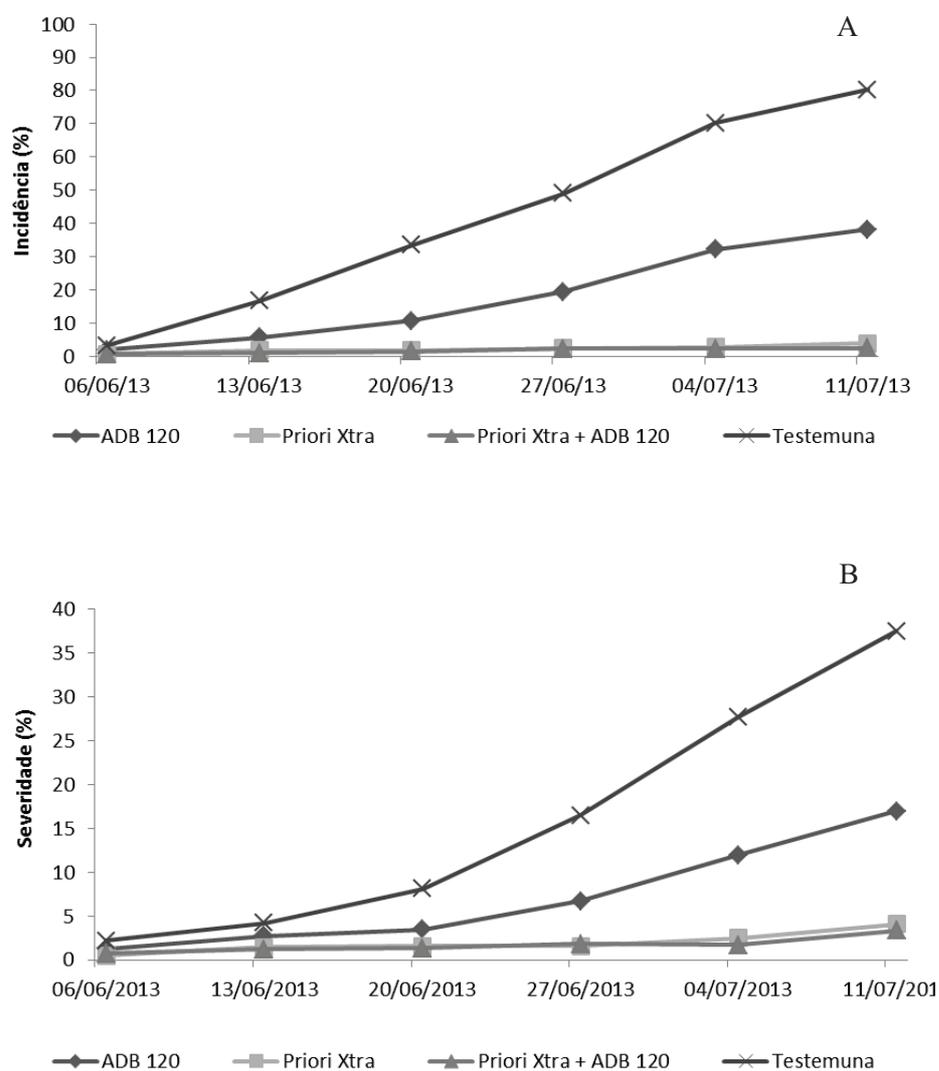


Figura 1 Curva de progresso da incidência (A) e severidade (B) da cercosporiose nas mudas de cafeeiro cultivado Mundo Novo em 4 tratamentos diferentes: Fortaleza, Piori Xtra, Fortaleza associado ao Piori Xtra e Testemunha

Ao analisarmos a área abaixo da curva do progresso da incidência (AACPI) e severidade (AACPS) da cercosporiose conforme Tabela 3, confere-se diferença estatística entre os tratamentos, sendo os melhores aqueles onde foi

utilizado fungicida (Priori Xtra e Fortaleza associado com Priori Xtra), gerando menores áreas abaixo da curva, seguido pelo tratamento Fortaleza aplicado sozinho, mas que mostrou, também, certo controle perante a testemunha, comprovado estatisticamente.

Tabela 3 Média de área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPIC) e severidade (AAPSC) da cercosporiose em mudas de cafeeiro cv. Mundo Novo

Tratamento	Médias		Controle (%)**	
	AACPIC	AAPSC	Incidência	Severidade
Fortaleza	618 b*	239 b	59	55
Priori Xtra	78 a	67 a	94,8	87,5
Fortaleza + Priori Xtra	60 a	58 a	96	89
Testemunha	1478 c	535 c	---	---

* Médias com mesma letra não diferem, pelo teste de Scott Knott ($P \leq 0,05$).

** Valores encontrados de acordo com Fórmula de Abott

Existem diversos trabalhos que comprovam a superior eficiência de fungicidas sistêmicos no controle das doenças do cafeeiro como a ferrugem e a cercosporiose, principalmente em razão de suas propriedades de absorção, translocação e modo de ação, culminando na diminuição do número de aplicações, aumento da eficiência e diminuição da interferência dos fatores climáticos na qualidade das pulverizações. Dessa forma, era de se esperar que os tratamentos onde fossem aplicados o produto Priori Xtra mantivessem as taxas de progresso da doença em níveis abaixo de 5%, seja de incidência ou severidade. Dessa forma, a associação entre um produto considerado um indutor de resistência, como o Fortaleza (Fosfite de Potássio + subprodutos da indústria cítrica) a um fungicida praticamente não traz qualquer tipo de incremento no controle das doenças do cafeeiro, como neste caso. Fernandes et al. (2013)

verificou a mesma situação ao associar um produto da classe dos indutores de resistência (Acibenzolar-S-Methyl) a um fungicida sistêmico (Priori Xtra) no controle da ferrugem e cercosporiose do cafeeiro em condições de campo, sem qualquer tipo de incremento.

Todavia, neste mesmo trabalho, Fernandes et al. (2013) comprovou que mesmo aplicado sozinho, o indutor de resistência Acibenzolar-S-Methyl (Bion) promoveu controle estatisticamente similar ao fungicida sistêmico no controle da cercosporiose em anos de baixa carga pendente. Já para os fosfitos, Toyota (2008) verificou que fosfito de cobre, em condição de campo, reduziu a severidade da ferrugem em cafeeiro da cultivar Rubi, com controle semelhante ao do fungicida epoxiconazol + piraclostrobina.

4 CONCLUSÃO

O produto Fortaleza (fosfito de potássio associado com subprodutos da indústria cítrica), pulverizados 7 dias antes da inoculação, conferiu proteção parcial às mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo contra *Cercospora coffeicola*, porém estatisticamente superior à testemunha;

O fungicida sistêmico Priori Xtra aplicado sozinho e em mistura com o Fortaleza conferiu controle superior da doença, tanto para incidência (94,8 e 96%) quanto para severidade (87,5 e 89%), comparado ao indutor de resistência aplicado sozinho e estatisticamente superior a todos os tratamentos.

REFERÊNCIAS

- CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. **Cercospora**: doença do cafeeiro também chamada de “olho pardo” ou “olho de pomba”. Belo Horizonte: EPAMIG, 1995. (Circular Técnica, 47).
- FERNANDES, L. H. M. et al. Acibenzolar-S-metil no controle da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro em condições de campo. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 24-32, jan./mar. 2013.
- FERNANDEZ-BORRERO, O.; MESTRE, A. M.; DUQUE, S. I. L. Efecto de la fertilizacion en la incidencia de la mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*) en frutos de café. **CENICAFE**, Chinchiná, v. 17, n. 1, p. 5-17, Enero/Mar. 1966.
- JACKSON, T. J. et al. Action of the fungicide phosphonate on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 49, n. 1, p. 147–54, Feb. 2000.
- KIMATI, H. et al. **Guia de fungicidas agrícolas: recomendações por cultura**: volume 1. 2. ed. Jaboticabal: Grupo Paulista de Fitopatologia, 1997.
- PEREZ, V. et al. Enhanced secretion of elicitors by *Phytophthora* fungi exposed to phosphonate. **Cryptogamie Mycologie**; Paris, v. 16, n. 3, p. 191–194, Sept. 1995.
- RESENDE, M. L. V. et al. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 621-628, Oct. 2002.
- SHANER, G.; FINNEY, R. F. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, Aug. 1977.
- TOYOTA. M. **Extratos vegetais e produtos comerciais no manejo da ferrugem e nos mecanismos de defesa do cafeeiro à cercosporiose**. 2008. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CAPÍTULO 3 Indutor de resistência e seus reflexos na fotossíntese e na atividade do sistema antioxidante em mudas de café

RESUMO

A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes, existentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos. A utilização de fertilizantes foliares, como os fosfitos, ganhou importância no controle de doenças de plantas nos últimos anos, uma vez que podem atuar diretamente sobre o patógeno e, também, ativar a defesa natural das plantas, atuando como indutores de resistência. Dessa forma, objetivou-se, neste trabalho, investigar os efeitos de formulação provenientes de subprodutos de resíduos da lavoura cítrica, fungicida, isolados ou em mistura, nas trocas gasosas e no sistema antioxidante enzimático como mecanismos de indução de resistência do cafeeiro contra ataque de patógeno (*Cercospora coffeicola*). Para a realização do experimento, mudas de *Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo foram submetidas a tratamentos constituídos por formulação proveniente de resíduos da lavoura cítrica (Fortaleza) e fungicida (Priori Xtra), isolados ou em mistura e após um período de sete dias foram inoculados com *Cercospora coffeicola*. Observou-se que a pulverização com Fortaleza (aplicado isoladamente ou associado com Priori Xtra) permitiu a manutenção da capacidade fotossintética e aumentou a atividade das enzimas antioxidantes das plantas. Os produtos contendo resíduo de polpa cítrica em sua formulação atuaram como indutores de resistência de plantas de café ao desafio de um elicitador biótico pela manutenção na taxa fotossintética e pela ativação das enzimas do sistema antioxidante, como a catalase, dismutase do superóxido e peroxidase do ascorbato.

Palavras-chave: *Coffea arábica*. *Cercospora coffeicola*. Resíduos da lavoura cítrica. Dismutase do superóxido. Peroxidase do ascorbato. Catalase.

ABSTRACT

Resistance induction involves the activation of the plants' latent defense mechanisms in response to treatment with biotic or abiotic agents. The use of foliar fertilizers such as phosphites has gained importance in controlling plant diseases in recent years, since they may act directly on the pathogen and also activate the plants' natural defense, acting as resistance inducers. Thus, the objective of this work was to investigate the effects of the formulation derived from citric and fungicide industry byproducts, isolated or associated, on gas exchange and on the enzymatic antioxidant system as resistance induction mechanisms of coffee plants against pathogen (*Cercospora coffeicola*). In order to perform this experiment, *Coffea arabica* L. seedlings, Mundo Novo cv., were submitted to treatments composed of formulation derived from citrus (Fortaleza) and fungicide (Priori Xtra) byproducts, isolated or associated, which, after seven days, were inoculated with *Cercospora coffeicola* isolates. Pulverization with Fortaleza (in isolation or combined with Priori Xtra) allowed the maintenance of photosynthetic capacity and increased the activity of antioxidant enzymes. The products containing citric pulp residue in its formation acted as resistance inducers for coffee plants when compared to a biotic elicitor for maintaining photosynthetic rate and activating the antioxidant system enzymes such as catalase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase.

Keywords: *Coffea arabica*. *Cercospora coffeicola*. Citric cultivation residue. Superoxide dismutase. Ascorbate peroxidase. Catalase.

1 INTRODUÇÃO

A cultura do café, embora esteja relacionada a altas produções, ainda sofre perdas consideráveis na produtividade e qualidade em função de fatores bióticos e abióticos, com destaque para altas temperaturas, deficiência de água e doenças, notadamente as fúngicas como ferrugem e a cercosporiose na ausência de medidas de controle (CAVATTE et al., 2012; ANDRACIOLI et al., 2012). Para aliviar problemas relativos ao calor e déficit hídrico, técnicas de manejo como arborização, adensamento e irrigação são as mais indicadas (REYNOL, 2009; GOMES; LIMA; CUSTODIO, 2007). No caso de doenças, o principal método de controle é o químico. Considerando que o número de grupos químicos empregados na cafeicultura é bastante restrito, que os patógenos estão em constante mutação e que a sociedade moderna exige produtos cada vez mais naturais e ambientalmente seguros, as indústrias têm procurado desenvolver tecnologias alternativas ao controle químico, dentre elas a indução de resistência em plantas (BARROS et al., 2010). Essa técnica tem se mostrado promissora no aumento da resistência geral da planta em resposta a agentes bióticos e abióticos (TORRES; JONES; DANGL, 2006; STANGARLIN et al., 2011) e menos agressiva ao ambiente, uma vez que envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes na própria planta que recebe o produto (BARROS et al., 2010).

Dentre os eliciadores, presentes no mercado, destacam-se os fosfitos que, quando aplicados via foliar, controlam doenças de plantas atuando diretamente sobre o patógeno ou ativando defesas naturais das plantas (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2006; NOJOSA et al., 2009; JACKSON et al., 2000). Outra opção que desperta o interesse dos especialistas da área é o uso de formulações à base de extratos vegetais contendo substâncias bioativas capazes de atuar como indutores de resistência (CARVALHO; CUNHA; SILVA, 2012).

Os vegetais, de maneira geral, apresentam um tipo de resposta comum aos estresses denominada de explosão oxidativa (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003; PITZSCHKE; FORZANI; HIRT, 2006), caracterizada pelo súbito aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) antes mesmo do aparecimento dos sintomas característicos dos estresses. Em um primeiro momento, esse aumento na concentração das EROs serve como sinalizador do estresse e ativa múltiplos mecanismos de defesas das plantas que as possuem (PITZSCHKE; FORZANI; HIRT, 2006). Na verdade, processos oxidativos em geral parecem ter papel crucial nos estágios iniciais da indução dessas respostas (BARROS et al., 2010). Ainda que níveis basais de EROs sejam uma característica desejável por induzir a expressão de genes de defesa e resposta adaptativa, aumentos desordenados em suas concentrações causam sérios danos celulares podendo até mesmo levar à morte das plantas (GECHEV et al., 2006). No entanto, existem plantas tolerantes ao estresse oxidativo que acionam mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de combate as EROs (CAVALCANTI et al., 2006), evitando, dessa forma, danos oxidativos a lipídios (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; VAIDYNATHAN et al., 2003), ácidos nucleicos e proteínas (FOYER; NOCTOR, 2003).

A fotossíntese, um processo fisiológico que apresenta um fluxo de elétrons sustentado, durante condições de estresse, pode desencadear uma produção excessiva de ERO's e, paradoxalmente, ser retroinibida por eles (BHATTACHARJEE, 2005). Essa retroinibição se dá pelo desemparelhamento do transporte de elétrons e pela inibição de enzimas do Ciclo de Calvin, gerando um excesso de poder redutor e fazendo com que os elétrons sejam utilizados para reduzir o oxigênio molecular com consequente formação de ERO's (SOARES; MACHADO, 2007).

Embora o oxigênio molecular, essencial ao metabolismo aeróbico, seja muito pouco reativo, é fonte potencial de espécies altamente reativas que causam

danos aos componentes celulares (STANGARLIN et al., 2011). Portanto, para um melhor entendimento dos mecanismos que envolvem a influência de fatores do ambiente sobre a fotossíntese, é necessário verificar se esses mesmos fatores desencadeiam estresse oxidativo secundário e suas defesas.

O processo de indução de resistência gera custos energéticos para a planta, uma vez que se estabelece uma competição entre os drenos de crescimento, armazenamento e defesas pelos carboidratos disponibilizados pela fotossíntese (GAYLER et al., 2004). Portanto, para que a indução à resistência se expresse em bom nível, é necessário que a planta mantenha as taxas fotossintéticas, mesmo em condições de estresse, em patamares próximos àqueles verificados sob condições normais. Essas condições atendem ao modelo proposto por Gayler et al. (2004) que propuseram o balanço energético de uma planta que produz biomassa estrutural, reservas e defesas constitutivas. Segundo este modelo, em plantas com boas reservas, os fotoassimilados são carreados para a defesa induzível, possibilitando que sejam mais tolerantes aos estresses.

Realizou-se o presente trabalho com o objetivo de investigar os efeitos de formulações provenientes de resíduos da indústria cítrica e fungicida, isolados ou em mistura, nas trocas gasosas e no sistema antioxidante enzimático como mecanismos de resistência pós-formados durante a indução de resistência do cafeeiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos produtos

Foram utilizados produto comercial à base de fosfito acrescido de substrato da indústria cítrica e um fungicida padrão, sozinhos e em mistura, descritos na Tabela 1 e pulverizados conforme época preconizada na Tabela 2:

Tabela 1 Tratamentos à base de fosfito avaliados no experimento em casa de vegetação com mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo

Tratamentos	Composição	Empresa
Fortaleza	Fosfito de potássio (P_2O_5 e K_2O) + Formulação à base de subproduto da indústria cítrica – “A”	Agrichem
Priori Xtra	Ciproconazol + Azoxystrobin – “B”	Syngenta
Fortaleza + Priori Xtra	A + B	Agrichem e Syngenta
Testemunha	-----	-----

Tabela 2 Épocas de pulverização dos tratamentos no experimento em casa de vegetação com mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo

Tratamentos	Pulverização	
	Épocas	Dose
Fortaleza	7 dias antes da inoculação	7,5 mL/L
Priori Xtra	7 dias antes da inoculação	1,0 mL/L
Fortaleza + Priori Xtra	7 dias antes da inoculação	7,5 + 1,0 mL/L
Testemunha	-----	-----

2.2 Obtenção do fungo *Cercospora coffeicola* e inoculação

O patógeno foi obtido de folhas naturalmente infectadas, coletadas em lavoura de café localizadas no campus da UFLA. As folhas foram lavadas superficialmente em água corrente e, em seguida, transferidas para uma bandeja plástica forrada internamente com papel umedecido com água destilada. Posteriormente, a bandeja foi inserida em um saco plástico transparente, para a formação de uma câmara úmida, incubada, sob temperatura ambiente, por três dias. Após esse período, os conídios produzidos foram retirados da superfície foliar com pincel de ponta macia. A concentração da suspensão de conídios para as inoculações foi ajustada, em hemocitômetro, para $15.000 \text{ conídios mL}^{-1}$. A suspensão de conídios foi pulverizada, até o ponto de escorrimento, em mudas de cafeeiro nos diferentes tratamentos. Logo após a pulverização, as plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida, proporcionada por um saco plástico transparente, por 24 horas.

2.3 Obtenção de mudas de cafeeiro

As mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo foram produzidas em substrato comercial Plantmax-café, suplementadas com aplicações de Iogen[®] (Fertilizantes Mitsui S.A., Poços de Caldas, MG) e adubadas com 0,5 g de fertilizante de liberação lenta por muda (formulação 4-14-8 de NPK). As mudas foram mantidas em casa de vegetação, à temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade em torno de 60% para a realização do experimento.

2.4 Instalação do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia, UFLA, em delineamento de blocos casualizados (DBC), com 8 tratamentos, sendo 4 inoculados e 4 que não receberam a inóculo ao longo das coletas, e três repetições, onde a parcela experimental constituiu-se por 6 mudas, com seis meses de idade, de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 Tratamentos, época de avaliações ecofisiológicas e coletas de amostras

Tratamentos	Avaliações Ecofisiológicas e Coleta de Amostras para Análises Bioquímicas					
	1 DAP*	4DAP	7DAP/1DAI**	10 DAP/4DAI	14 DAP/8DAI	18 DAP/12 DAI
Fortaleza	X	X	X	X	X	X
Priori Xtra	X	X	X	X	X	X
Fort + PXtra	X	X	X	X	X	X
Testemunha	X	X	X	X	X	X
Fortaleza + Inoc.			X	X	X	X
Priori Xtra + Inoc			X	X	X	X
Fort. + PXtra + Inoc			X	X	X	X
Testemunha + Inoc			X	X	X	X

* DAP: Dias Após Pulverização;

** DAI: Dias Após Inoculação

Os produtos foram pulverizados, sete dias antes da inoculação, com pulverizador manual, até o ponto de escorrimento e as mudas foram mantidas

em casa de vegetação até o final do experimento. As avaliações ecofisiológicas e coletas para análises bioquímicas foram feitas respeitando o período preconizado na Tabela 3.

As avaliações ecofisiológicas foram realizadas, utilizando-se o analisador de gás por infravermelho (LI-6400XT Portable Photosynthesis System, LI-COR, Lincoln, USA) em folhas completamente expandidas, no 3º ou 4º pares de folhas. As características avaliadas foram: taxa fotossintética líquida (A), concentração intercelular de CO₂ (Ci), concentração atmosférica de CO₂ (Ca), condutância estomática (gs) e transpiração (E). A eficiência de carboxilação (CE) e a eficiência instantânea do uso da água (EUA) foram obtidas pelas relações Ca/Ci e A/E, respectivamente. Todas as avaliações foram realizadas entre 9 e 10 horas (horário solar) com utilização de fonte artificial de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) em câmara fechada fixada em 1000 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Blue + Red LED LI-6400-02B, LI-COR, Lincoln, USA).

As avaliações bioquímicas foram realizadas em folhas completamente expandidas, no 3º ou 4º pares de folhas. Para a extração das enzimas antioxidantes, 200 mg de tecido foliar foram macerados em N₂ líquido e homogeneizados no seguinte tampão de extração: fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 1 mM. Os homogeneizados foram centrifugados a 13.000 g, por 20 minutos, a 4°C, coletando-se os sobrenadantes para as análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), em um meio de incubação composto por fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1 μM , NBT 75 μM e riboflavina 2 μM . Os tubos com o meio de reação e a amostra foram iluminados, por 7 minutos, em uma câmara fechada com lâmpada

fluorescente de 20W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado. O branco foi mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima feito com a seguinte equação: % de inibição = $(A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT nas condições do ensaio.

A CAT foi avaliada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, durante 3 minutos, em um tampão de incubação contendo fosfato de potássio 200 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM, incubado a 28°C, em que foi monitorado o consumo do peróxido de hidrogênio (HAVIR; MCHALE, 1987).

Já atividade da APX foi realizada, segundo Nakano e Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O tampão de incubação foi composto por fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, ácido ascórbico 0,5 mM e H₂O₂ 0,1 mM.

O delineamento adotado foi em blocos casualizados, constando de oito tratamentos, três repetições e seis épocas de avaliação. A parcela experimental constou de seis plantas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando o software Sisvar (FERREIRA, 2011) e as médias comparadas pelo teste de Scott e Knott (1974) a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisarmos os parâmetros ecofisiológicos avaliados, percebe-se pela Figura 1, que a fotossíntese líquida (A) praticamente não variou entre os tratamentos ao longo do tempo, sendo observada apenas uma queda geral acentuada no grupo de plantas que receberam os tratamentos e foram inoculadas com base no décimo quarto dia após a pulverização. Todavia, percebe-se que houve quedas mais acentuadas das taxas fotossintéticas somente no grupo de plantas que receberam o inóculo aos 14 e 18 dias, após a pulverização, sendo estatisticamente diferente dos demais tratamentos, onde em ambos os períodos analisados, tais quedas foram provenientes dos tratamentos com Priori Xtra e a Testemunha. Os tratamentos Fortaleza e Fortaleza associado com Priori Xtra mantiveram as taxas fotossintéticas constantes ao longo de todas as avaliações.

Comportamento bastante análogo ao da taxa fotossintética líquida observou-se para a transpiração das mudas de cafeeiro, que se manteve praticamente constante, ao longo de todas as avaliações, independente do tratamento e sem diferença estatística entre eles. Porém, para todos os tratamentos, sejam inoculados ou não, percebeu-se uma queda na taxa transpiratória na última avaliação (18DAP).

A razão entre taxa fotossintética líquida e transpiração nos fornece o resultado da eficiência do uso da água (EUA) e considerando-o podemos inferir sobre a assimilação de carbono que está sendo utilizado na fotossíntese bem como da perda de água pela transpiração. Assim sendo, quanto maior o resultado desta razão mais eficiente a planta está sendo no uso da água, produção de carboidratos e, conseqüentemente, na produção de O₂. A Figura 1 nos mostra que, estatisticamente, não houve diferença entre os tratamentos dentro dos períodos avaliados, seja no grupo de plantas inoculadas ou não, todavia, com

uma tendência de maior EUA para os tratamentos onde foi utilizado o produto Fortaleza.

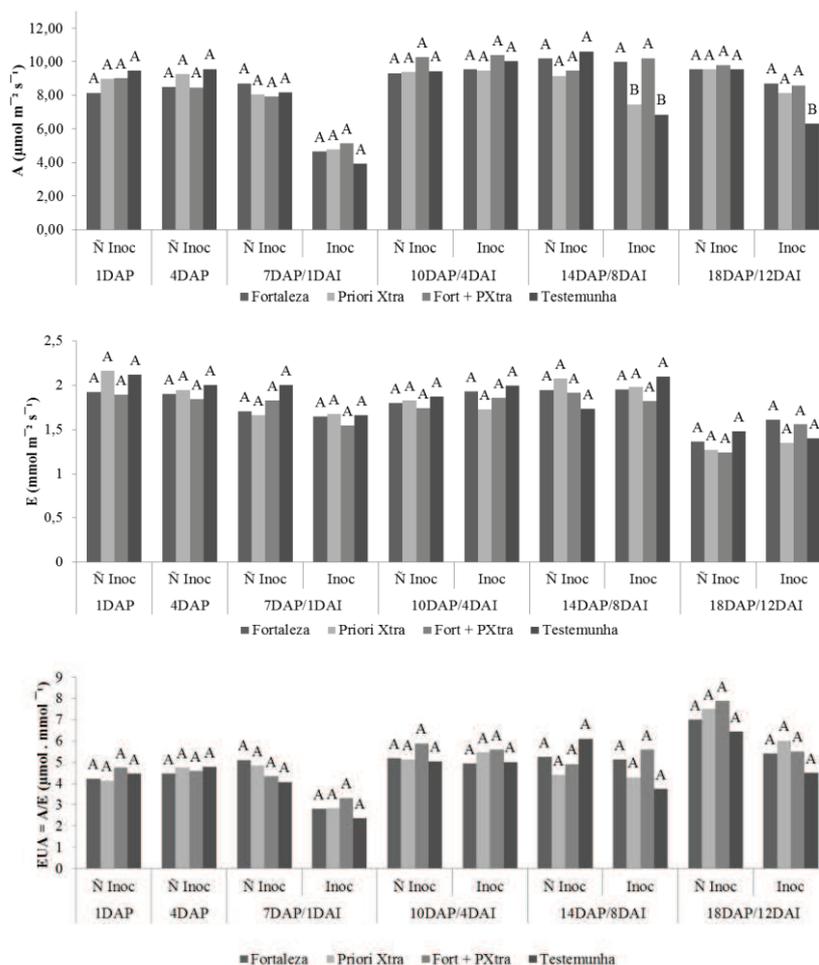


Figura 1 Taxa fotossintética líquida (A), transpiração (E) e eficiência do uso da água (EUA) de mudas de café *Coffea arabica* L., a 1, 4, 7, 10, 14 e 21 dias após a pulverização (DAP), inoculadas e não inoculadas com *Cercospora coffeicola*, com formulações provenientes de resíduos da lavoura cítrica e fungicida, isolados ou em mistura. As letras comparam os tratamentos dentro de cada tempo e grupo de inoculação, de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Com relação às atividades enzimáticas, ao analisarmos a figuras 2, percebe-se que todos os tratamentos mantiveram a taxa da peroxidase do ascorbato (APX) acima da testemunha, seja inoculado ou não, ao longo do período avaliado. Porém, os patamares de atividade apresentados pelos tratamentos com o produto Fortaleza, seja aplicado sozinho ou associado com o Piori Xtra, foram superiores ao do fungicida Piori Xtra. Em todos os tratamentos não inoculados, a atividade da enzima mostrou uma tendência de queda, ao longo do período de avaliação, baseada na aplicação até em torno do décimo ao décimo quarto dia, com aumento de sua atividade a partir daí. Em todos os tratamentos inoculados, a atividade da enzima foi superior aos tratamentos não inoculados e com tendência de crescimento.

Ao analisarmos a atividade da catalase (CAT) pela Figura 3, considera-se que, independente do tratamento, seu primeiro pico de atividade deu-se no quarto dia, após aplicação dos tratamentos, sendo os maiores e mais nítidos decorrentes da aplicação dos tratamentos com o produto Fortaleza, associado ou não com o fungicida. Fazendo-se um paralelo à atividade da peroxidase do ascorbato, fica nítido que a catalase mostra um padrão de atividade mais lento, uma vez que, após a aplicação dos tratamentos, percebe-se um comportamento de aumento da atividade logo após aplicação enquanto que a APX já evidencia um comportamento de declínio na primeira avaliação, 1 dia após pulverização (DAP) para os tratamentos não inoculados. Após o primeiro pico da atividade (4 DAP), a mesma decresce até o décimo dia após pulverização e, a partir daí, retoma o incremento da atividade até última avaliação feita (18 DAP). Tal qual para a primeira enzima, todos os tratamentos mostraram uma tendência de atividade da catalase em patamares superiores ao da testemunha. Analisando apenas os tratamentos inoculados, verifica-se que, no oitavo dia após inoculação (DAI) ou 14 DAP, que a atividade da enzima decresce para todos os tratamentos

testemunha enquanto que a atividade mantém-se em crescimento para os tratamentos com Fortaleza, Priori Xtra ou associação entre ambos.

Para dismutase do superóxido (SOD), é nítido pela Figura 4 que foi a enzima que mostrou o comportamento mais acelerado entre as demais analisadas, com picos de atividade máxima já apresentada 1 DAP e mostrando decréscimo na atividade a partir de então. Tal qual comportamento apresentado pelas enzimas supracitadas, percebe-se, também, que tanto o tratamento Fortaleza, quanto o Priori Xtra, associados ou não, entregam um padrão de atividade superior à testemunha, sejam estes inoculados ou não. Além disso, para analisar-se apenas o comportamento da enzima para os tratamentos inoculados, percebe-se que, além de mostrar-se em um patamar superior de atividade enzimática comparada à testemunha, o tratamento Fortaleza mostra um padrão de atividade constante ao longo das avaliações.

Assim sendo, fica nítido que, independente da enzima analisada (APX, CAT ou SOD), todos os tratamentos mostraram incremento na atividade da enzima ao longo do período analisado, quando comparado com a testemunha, sejam estes inoculados ou não. Todavia, destaca-se aqui a atividade da peróxido do ascorbato para o tratamento onde foi administrado o produto Fortaleza, com patamares superiores de atividade, bem como para a atividade da dismutase do superóxido do tratamento inoculado, mantendo a atividade da enzima superior e constante ao longo do período.

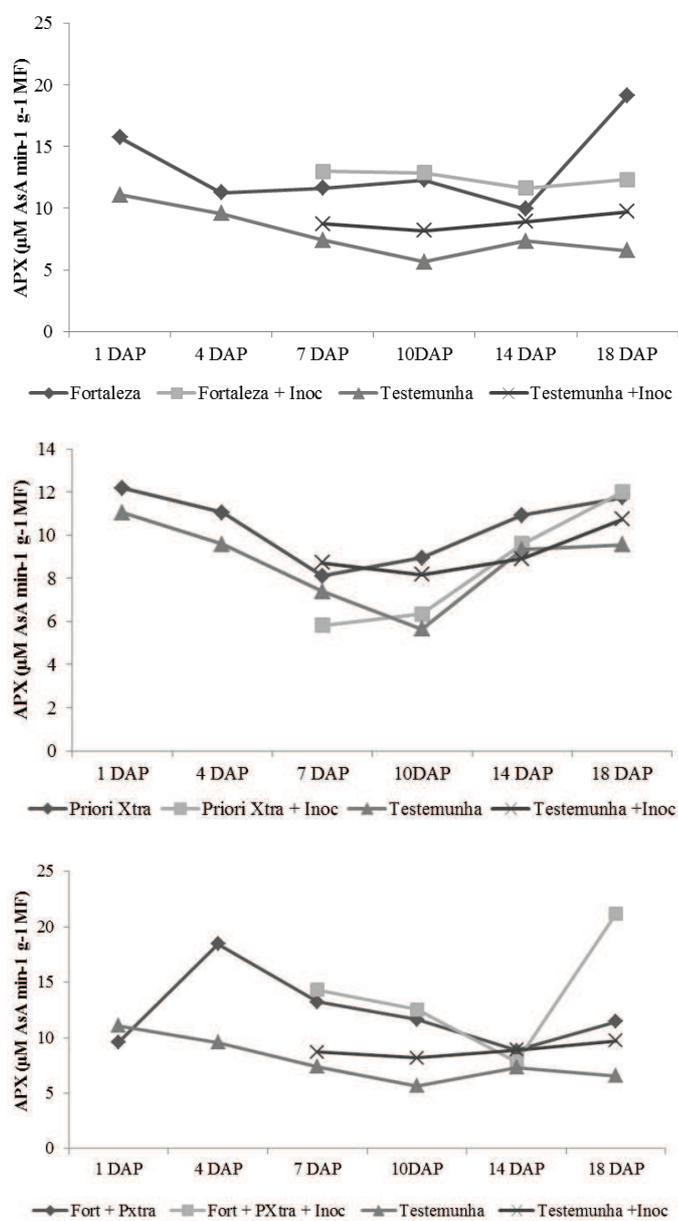


Figura 2 Curvas da atividade enzimática da peroxidase do ascorbato (APX) dos tratamentos Fortaleza (A), Piori Xtra (B) e Fortaleza associado ao Piori Xtra (C) comparados com a testemunha, inoculados ou não, ao longo dos períodos de coleta após pulverização

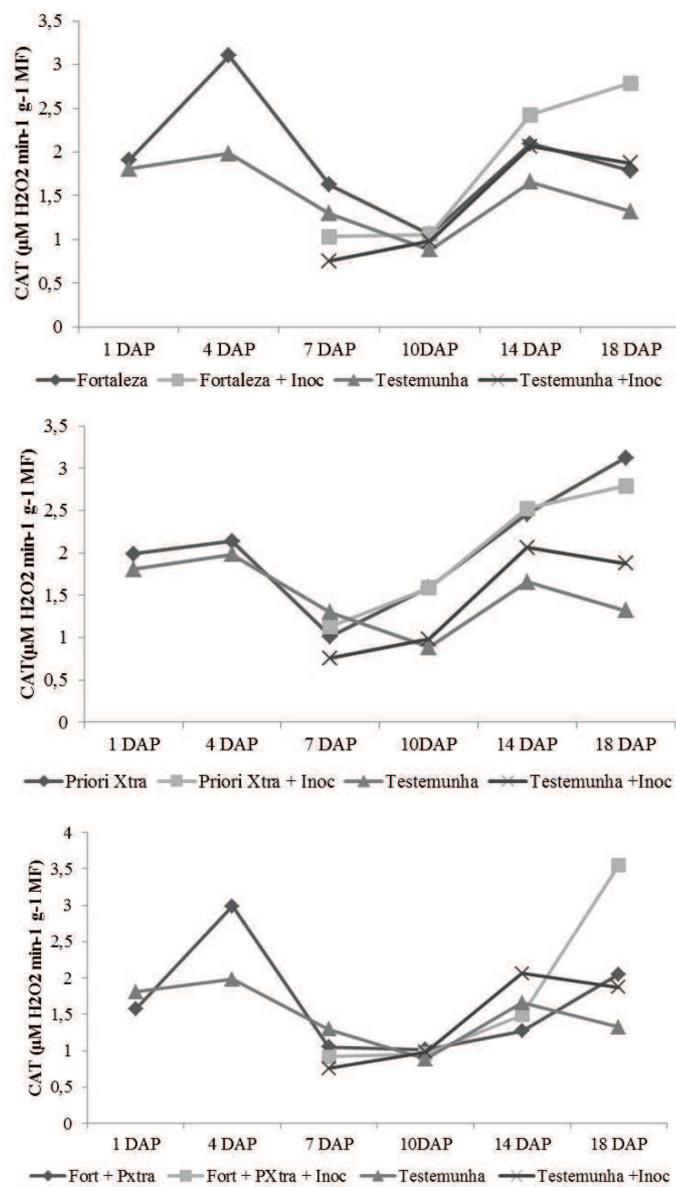


Figura 3 Curvas da atividade enzimática da catalase (CAT) dos tratamentos Fortaleza (A), Piori Xtra (B) e Fortaleza associado ao Piori Xtra (C) comparados com a testemunha, inoculados ou não, ao longo dos períodos de coleta após pulverização

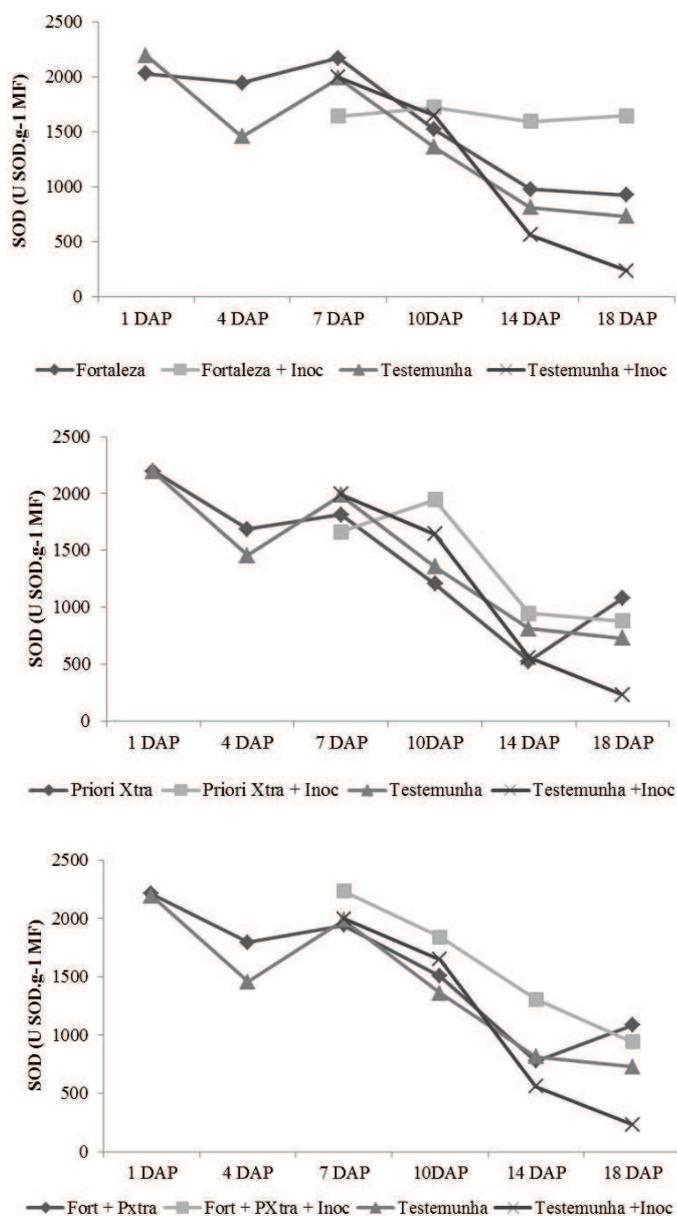


Figura 4 Curvas da atividade enzimática da desmutase do superóxido (SOD) dos tratamentos Fortaleza (A), Piori Xtra (B) e Fortaleza associado ao Piori Xtra (C) comparados com a testemunha, inoculados ou não, ao longo dos períodos de coleta após pulverização

Analisando-se a Tabela 4 onde se mostram os resultados estatísticos do teste empregado referente ao dado de área abaixo da curva de progresso fornecido de cada uma das enzimas analisadas, percebe-se que houve diferença estatística entre as mesmas. Para APX, os tratamentos Fortaleza e Priori Xtra, em associação com Fortaleza, não mostraram diferença estatística entre ambas, porém foram estatisticamente superiores ao tratamento Priori Xtra, sendo este último superior ao tratamento testemunha. Ao comparar o mesmo tratamento, porém, em plantas inoculadas com *Cercospora coffeicola*, percebe-se, também, que ambos os tratamentos onde se empregou o produto Fortaleza, foram estatisticamente iguais, porém superiores aos demais tratamentos (Priori Xtra e Testemunha), que, por sua vez, mostraram o mesmo padrão estatístico.

Com relação à Catalase (CAT), vê-se que houve diferença estatística entre os tratamentos analisados e manteve-se o mesmo padrão de atividade da enzima tanto para os tratamentos inoculados como para os tratamentos não inoculados. Os tratamentos Fortaleza e Priori Xtra entregaram maiores valores de área abaixo da curva de progresso da atividade enzimática e foram estatisticamente similares, que, por sua vez, foram superiores e estatisticamente diferentes do tratamento Fortaleza em mistura com Priori Xtra, sendo este último, também, superior à testemunha.

Para dismutase do superóxido (SOD) e analisando os tratamentos não inoculados, constata-se que o tratamento Fortaleza entregou maior área abaixo da curva de progresso da atividade da enzima sendo, estatisticamente, diferente dos demais, seguido pelo tratamento Fortaleza associado ao fungicida Priori Xtra sendo este último superior e estatisticamente diferente dos tratamentos Priori Xtra e Testemunha, que, por sua vez, não diferiram entre si. Com relação aos tratamentos inoculados, constatou-se, praticamente, o mesmo padrão de atividade e, estatisticamente, diferentes, sendo os maiores observados para

Fortaleza, seguidos de Fortaleza em associação com fungicida, Piori Xtra e, por último, o tratamento testemunha.

Tabela 4 Valores de área abaixo da curva para cada tratamento de acordo com atividade enzimática da APX, CAT e SOD

Tratamentos	Valores de Área Abaixo da Curva de Progresso (AACP)		
	Não Inoculados		
	APX	CAT	SOD
Fortaleza	213,59 c*	32,88 c	26337,50 c
Piori Xtra	173,70 b	33,96 c	22533,17 a
Fort + Pextra	210,38 c	27,79 b	25049,75 b
Testemunha	129,04 a	23,09 a	23006,00 a

Tratamentos	Inoculados		
	APX	CAT	SOD
Fortaleza	153,88 b	21,00 c	18141,67 d
Piori Xtra	108,08 a	22,43 c	14814,50 b
Fort + Pextra	159,07 b	18,18 b	17459,50 c
Testemunha	107,50 a	15,59 a	11608,67 a

* As letras comparam estatisticamente os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O cafeeiro é uma planta muito sensível às variações do ambiente, principalmente temperatura elevada e baixa disponibilidade de água, fatores que alteram o padrão de suas respostas fisiológicas. Tais respostas estão relacionadas a reduções nas trocas gasosas, acarretando decréscimos no desenvolvimento da planta e na produção (DAMATTA, 2004). Essa queda no rendimento da cultura é agravada quando da ocorrência de doenças como ferrugem e cercosporiose, dentre outras (CARVALHO; CUNHA; SILVA, 2012).

Para tentar minimizar os danos causados por fatores abióticos e bióticos, muitos cafeicultores aplicam nas plantas produtos indutores de resistência a esses fatores limitantes (FERNANDES et al., 2013). Nesse caso, a resistência é

dita induzida, ou seja, as plantas percebem as agressões, e sua alta capacidade de adaptação permite que sobrevivam, mesmo tendo, muitas vezes, seu desenvolvimento prejudicado (BARROS et al., 2010).

Visando verificar a ação dos indutores de resistência sobre a tolerância de mudas de café ao serem desafiadas pelo patógeno *Cercóspora coffeicola*, neste estudo foram aplicados diferentes tratamentos à base de fosfito e fungicida, avaliando-se os efeitos nas trocas gasosas e no metabolismo antioxidante. De acordo com a Figura 1, as diferenças entre os tratamentos inoculados apresentados aos 10 e 14 DAP, formados pelo tratamento Fortaleza e pela adição de Fortaleza combinado com Piori Xtra, sugere-se que foram mais eficazes na manutenção da atividade fotossintética ao longo do tempo. Esses resultados mostram que o desafio do patógeno afetou, negativamente, a fotossíntese das plantas pulverizadas apenas com fungicida e testemunha, sem trazer nenhum prejuízo às plantas que receberam o produto Fortaleza, mostrando ser eficiente em manter a taxa fotossintética constante durante e após um período de ataque do patógeno. Mediante estudos verifica-se que o ataque de patógenos deprecia, significativamente, a taxa fotossintética, tal qual Gonzalez et al. (2013) conferiram analisando clones de seringueira atacados por oídio.

De acordo com o fabricante, o produto Fortaleza possui subprodutos da indústria cítrica em sua constituição. Tal informação pôde ser comprovada, de acordo com a Tabela 5, onde se mostra a composição centesimal do produto analisado no laboratório de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, atestando a presença de Vitamina C na amostra.

Tabela 5 Composição centesimal do produto Fortaleza. Laboratório de Ciência dos Alimentos da Universidade de Lavras, 2014

	UMIDADE (%)	MATÉRIA SECA (%)	FENÓLICOS TOTAIS (mg/100g)	CELULOSE (%)	FIBRA BRUTA* (%)	AÇÚCARES TOTAIS (g/mL)	SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS (°BRIX)
FORTALEZA	36,11	63,89	42,091	0,81	49,06	0,1455	5,64
FORTALEZA	36,74	63,26	54,408	1,00	49,24	0,1514	5,63
FORTALEZA	36,43	63,575	52,093	1,40	68,19	0,1583	5,63
MÉDIA	36,43	63,58	49,53			0,15	5,63
DP	0,32	0,32	6,55			0,01	0,01
CV%	0,86	0,50	13,22			4,22	0,10

* Obs: para os fenólicos totais, a amostra foi liofilizada, estando por isso em gramas e não em mililitro como nos demais.

Verificando-se que a polpa cítrica contém altos níveis de ascorbato, que faz parte do sistema de defesa antioxidante das plantas, estudou-se, então, a relação entre esses tratamentos e as respostas antioxidantes das folhas de cafeeiros e sua relação com a fotossíntese. Pelos dados ressalta-se que o estímulo às defesas do sistema antioxidante enzimático das folhas de cafeeiro ocorreu, predominantemente, nas plantas pulverizadas com Fortaleza quando aplicado isoladamente ou em mistura com os outros produtos com o fungicida Piori Xtra. Observa-se, nessas plantas, que as plantas tratadas com o fertilizante foliar, seja sozinho ou associado com fungicida, intensificou a ativação da SOD (Figura 4), estatisticamente superior aos demais tratamentos (Tabela 4), que conferiu a proteção das células pela dismutação do superóxido ($O_2^{\cdot-}$), gerando H_2O_2 e O_2 . A elevação da atividade da SOD indica não apenas aumento na produção do radical superóxido e, conseqüentemente, o estabelecimento de estresse oxidativo, mas também o envolvimento imediato dessa enzima no processo de desintoxicação deste tipo de EROs, sobretudo em plantas inoculadas que receberam as aplicações do produto Fortaleza.

Em plantas que operam eficientemente o sistema antioxidante, seja ele natural ou induzido por agentes externos, o produto tóxico formado deve ser rapidamente degradado por outras enzimas antioxidativas. No caso deste trabalho, em um primeiro passo, o H_2O_2 produzido na reação catalisada pela SOD foi metabolizado pela CAT ou APX em um sistema co-regulado. A CAT decompõe o H_2O_2 em O_2 e H_2O , enquanto que a APX utiliza o ácido ascórbico como substrato redutor, doando elétrons para a eliminação de H_2O_2 . Comparativamente à CAT, as peroxidases, especialmente a APX, são mais efetivas na via de captura do H_2O_2 formados por agentes estressantes, evitando assim, a peroxidação dos lipídeos, que é um importante indicador da ocorrência de danos oxidativos (TORRES; JONES; DANGL, 2006).

A ação coordenada entre as três enzimas, operando com maior eficiência nas plantas pulverizadas com Fortaleza, é fundamental para a manutenção da homeostase celular por atenuar os danos celulares provocados pelas EROs. Portanto, a capacidade de ativação desses mecanismos enzimáticos pode ser elemento chave para explicar a capacidade elicitora desse produto o que viria a elucidar, pelo menos em parte, o sucesso do mesmo na indução de resistência a fatores estressantes.

Além das atividades de enzimas antioxidativas, as plantas podem utilizar outros metabólitos antioxidativos, como o ascorbato, que atua na remoção dos oxi-radicais citotóxicos, conferindo estabilidade das membranas celulares à ação peroxidativa das EROs (DEUNER et al., 2009). No caso específico dessa pesquisa, o produto Fortaleza funcionaria como uma fonte exógena desse antioxidante, o que explicaria, por si só, seu efeito positivo, seja ele por sua proteção direta ou servindo como substrato para a APX. O monodehidroascorto (MDHA), produto formado pela ação da APX, pode regenerar o ascorbato pela ação das enzimas MDHAR e DHAR, que não foram avaliadas neste trabalho.

Com relação à manutenção das taxas fotossintéticas observadas nas plantas inoculadas com *Cercospora coffeicola*, que receberam a aplicação de Fortaleza, pode ser explicada pela atenuação dos efeitos desse estresse, em decorrência do acionamento do sistema antioxidante, composto pelas enzimas SOD, CAT e APX. Desse modo, a ação do Fortaleza estaria ligada ao papel na tolerância ao estresse oxidativo que se estabeleceu após o desafio do patógeno. Portanto, ao atuar como fonte de um dos mais importantes antioxidantes utilizados pelas plantas para a eliminação de EROs, o Fortaleza confere ao cafeeiro, tolerância secundária ao estresse pelo ataque de patógeno, bem como a indução de resistência que todo fosfíto é capaz de proporcionar às plantas.

4 CONCLUSÃO

A atividade das enzimas antioxidativas SOD, CAT e APX aumentou em folhas de mudas de café pulverizadas com Fortaleza aplicado isoladamente ou associado com Piori Xtra;

Mudas pulverizadas com Fortaleza, aplicado isoladamente ou associado com Piori Xtra, mantiveram sua capacidade fotossintética mesmo após inoculação com o patógeno *Cercospora coffeicola*;

A pulverização com produtos que contêm em sua formulação resíduo de polpa cítrica, como é o caso do Fortaleza, estimula o sistema antioxidante em folhas de mudas de café.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 18, n. 1, p. 265-267, 1925.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1331-341, May 2002.
- ANDROCIOLI, H. G. et al. Produtos alternativos no controle da *Hemileia vastarix* (Berkeley & Broome) e *Cercospora coffeicola* (Berkeley & Cooke) em cafeeiros. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, n. 2, p. 187-197, maio/ago. 2012.
- BARROS, F. C. et al. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 231-239, 2010.
- BHATTACHARJEE, S. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants. **Current Science**, Bangalore, v. 89 n.7 p. 1113-1121, Oct. 2005.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 2, p. 651-658, Feb. 1998.
- CARVALHO, V. L.; CUNHA, R. L.; SILVA, N. R. N. Alternativas de controle de doenças do cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 42-49, jan./abr. 2012.
- CAVALCANTI, F. R. et al. Activities of antioxidant enzymes and photosynthetic responses in tomato pre-treated by plant activators and inoculated by *Xanthomonas vesicatoria*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 68, n. 4-6, p. 198-208, Apr./June 2006.
- CAVATTE, P. C. et al. Could shading reduce the negative impacts of drought on coffee? A morphophysiological analysis. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 144, n. 2, p. 111-122, Feb. 2012.
- DAMATTA, F. M. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Londrina, v. 16, n. 1, p. 1-6, Apr. 2004.

- DEUNER, S. et al. Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 55, n. 2, p. 135-140, mar. 2009.
- FERNANDES, L. H. M. et al. Acibenzolar-s-metil no controle da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro em condições de campo. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 24-32, jan./mar. 2013.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 119, n. 3, p. 355–364, Nov. 2003.
- GAYLER, S. et al. Modelling the effect of environmental factors on the “trade off” between growth and defensive compounds in young apple trees. **Trees**, Berlin, v. 18, n. 3, p. 363-371, May 2004.
- GECHEV, T. S. et al. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **BioEssays**, Cambridge, v. 28, n. 11, p. 1091–1101, Nov. 2006.
- GOMES, N. M.; LIMA, L. A.; CUSTODIO, A. A. de P. Crescimento vegetativo e produtividade do cafeeiro irrigado no sul do Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 11, n. 6, p. 564-570, Dec. 2007.
- GONZALEZ, G. S. et al. Pigmentos fotossintéticos em clones de seringueira sob ataque de oídio. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 23, n. 3, p. 499-506, jul./set. 2013.
- HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.
- HERBETTE, S. et al. Transcripts of sunflower antioxidant scavengers of the SOD and GPX families accumulate differentially in response to downy mildew infection, phytohormones, reactive oxygen species, nitric oxide, protein kinase and phosphatase inhibitors. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 119, n. 3, p. 418–428, Nov. 2003.

JACKSON, T. J. et al. Action of the fungicide phosphonate on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 49, n. 1, p. 147-54, Feb. 2000.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 5, p. 867-880, Aug. 1981.

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

PITZSCHKE, A.; FORZANI, C.; HIRT, H. Reactive oxygen species signaling in plants. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v. 8 n. 9-10, p. 1757-1764, Sept./Oct. 2006.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, Apr. 2003.

REYNOL, F. As armas da ciência frente às mudanças climáticas na agricultura. **Conhecimento & Inovação**, Campinas, v. 5, n. 3, p. 44-45, 2009.

RIBEIRO JÚNIOR, P. M. et al. Fosfito de potássio na indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb., em mudas de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.). **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 30, n. 4, p. 629-636, Aug. 2006.

SCOTT A. J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Malden, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica**, Chapadinha, v. 1, n. 1, p. 9-19, 2007.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Paraná, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011.

TORRES, M. A.; JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, n. 2, p. 373-378, June 2006.

VAIDYANATHAN, H. et al. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.): differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. **Plant Science**, Limerick, v. 165, n. 6, p. 1411–1418, Dec. 2003.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de produtos alternativos para o controle de doenças como os Indutores de Resistência vem ganhando ano a ano uma importante lacuna não apenas comercial, mas também como uma opção eficaz no manejo de doenças de plantas. A questão da indução de resistência já está muito bem elucidada. Percebe-se que, além disso, tais produtos, também, têm a particularidade de promover mudanças positivas nos processos ecofisiológicos e enzimáticos do sistema antioxidante, como pôde ser visto neste trabalho.

É observado, também, que os fungicidas são de extrema importância para um controle eficaz das doenças. Certamente, sem o uso dos mesmos, não haveria possibilidade de alimentar uma população mundial que cresce ano após ano, uma vez que o ataque de doenças é responsável por grande perda na produtividade das lavouras. Todavia, faz-se necessário o seu uso racional a fim de que haja harmonia entre ambiente, ser humano e animal e que a sustentabilidade e qualidade de todo o sistema seja mantida para as gerações vindouras.

Assim sendo, certamente a associação dentro de um manejo racional entre indutores de resistência e fungicidas venha se desenhando como uma excelente alternativa no controle eficaz, econômico e seguro de doenças de plantas. Novos ensaios que venham a propor tal manejo seriam de suma importância para elucidar melhor o melhor posicionamento destes produtos a fim de constituir uma excelente alternativa, seja para cafeicultores como também agricultores em geral.