



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA – REDE BIONORTE



**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE ACESSOS DE *Coffea canephora*
Pierre ex A. Froehner NA INTERAÇÃO COM O FUNGO *Hemileia*
vastatrix Berk. & Br.**

ALINE SOUZA DA FONSECA

Porto Velho – RO

2022

ALINE SOUZA DA FONSECA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE ACESSOS DE *Coffea canephora*
Pierre ex A. Froehner NA INTERAÇÃO COM O FUNGO *Hemileia*
vastatrix Berk. & Br.**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Rondônia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cléberon de Freitas Fernandes

Coorientador: Dr. José Roberto Vieira Júnior

Porto Velho – RO

SETEMBRO/2022

Catalogação da Publicação na Fonte
Fundação Universidade Federal de Rondônia - UNIR

F676c Fonseca, Aline Souza da.

Caracterização bioquímica de acessos de *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner na interação com o fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br / Aline Souza da Fonseca. - Porto Velho, 2022.

63 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Cléberon de Freitas Fernandes.

Coorientador: Prof. Dr. José Roberto Vieira Junior.

Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (Bionorte). Fundação Universidade Federal de Rondônia.

1. Atividade enzimática. 2. Café. 3. Clones. 4. Melhoramento genético. I. Fernandes, Cléberon de Freitas. II. Vieira Junior, José Roberto. III. Título.

Biblioteca Central

CDU 663.93(043.2)


ALINE SOUZA DA FONSECA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE ACESSOS DE *Coffea canephora* Pierreex
A. Froehner NA INTERAÇÃO COM O FUNGO *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.**


Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Rondônia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Conservação.

Aprovada em 14/09/2022


Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 **CLEBERSON DE FREITAS FERNANDES**
Data: 20/04/2023 08:10:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. Cléberon de Freitas Fernandes (Orientador)
Embrapa Agroindústria Tropical

Documento assinado digitalmente
 **ALEXSANDRO LARA TEIXEIRA**
Data: 20/04/2023 11:24:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


**Prof. Dr. Alessandro Lara Teixeira Embrapa
Rondônia**

Documento assinado digitalmente
 **RENATO ABREU LIMA**
Data: 24/04/2023 10:20:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Dr. Renato Abreu Lima Universidade
Federal do Amazonas – UFAM**

Documento assinado digitalmente
 **RODRIGO BARROS ROCHA**
Data: 24/04/2023 09:53:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rodrigo Barros Rocha
Embrapa Rondônia

Documento assinado digitalmente
 **WANDERLEY RODRIGUES BASTOS**
Data: 20/04/2023 09:58:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Wanderley Rodrigues Bastos
Universidade Federal de Rondônia - UNIR

A Deus pelo dom da vida
À minha família e amigos pelo apoio
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda graça, bondade e proteção na minha vida.

Aos meus pais Zélia e Domingos por todo amor, educação e investimentos que fizeram na minha vida, sem vocês eu jamais conseguiria seguir tão longe.

Aos meus irmãos Adriely, Adriene, Magno, Eulálio e Fagner por todo companheirismo e apoio.

Aos meus sobrinhos Vinícius, Ana Clara, Levi, Lívia e Théó por todo amor.

A minha vizinha que amo muito e que sempre se preocupou comigo.

Ao meu namorado Gabriel pelo apoio e incentivo em concluir essa etapa,

Aos meus orientadores Cléber e José Roberto por todo ensinamento, dedicação, apoio e paciência que tiveram comigo ao longo desses anos.

Aos coordenadores e professores do programa de Pós-Graduação BIONORTE, em especial ao Rodrigo por sempre me incentivar e abrir as portas da sua sala e me ajudar.

Aos funcionários do campo de Porto Velho e Ouro Preto do Oeste pelo fornecimento das mudas para o experimento, aos terceirizados, assistentes e técnicos em especial ao Sr. Domingos (*in memoriam*) e ao Sr. Miranda por me acompanharem, ensinarem e me ajudarem nas mais diversas atividades.

As minhas amigas e colegas de laboratório Tamiris, Jéssica, Simone, Karen, Liliani, Rita e aos demais que estiveram comigo durante esse período por todo apoio, parceria e ajuda ao longo dos anos.

Aos amigos e colegas da turma de doutorado.

À Universidade Federal de Rondônia – UNIR e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA pela oportunidade de cursar o doutorado, por meio do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia na Amazônia-PPG BIONORTE.

Ao CNPq, CAPES, FAPERÓ, pela bolsa de estudos e pelo fomento na execução do projeto.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram para a concretização desse projeto.

“As pessoas se convencem, de que a
sorte me ajudou,
Mas plantei cada semente que o meu
coração desejou” – Roupas Nova

FONSECA, Aline Souza. **Caracterização bioquímica de acessos de *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner na interação com o fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.** 2022. 63 fl. (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal de Rondônia. Porto Velho, RO, 2022.

RESUMO

Em situações de estresse abiótico ou biótico as plantas tendem a se defender bioquimicamente. Essas respostas variam em função do tipo de estresse, da intensidade momentânea, do tempo decorrente e da própria genética da planta. Objetivou-se neste trabalho estudar a interação de clones de *Coffea canephora* x *Hemileia vastatrix*, identificar as respostas do hospedeiro na interação de incompatibilidade e de compatibilidade com o patógeno. Para tanto, mudas com 120 dias de idades dos clones da variedade BRS Ouro Preto C199 (resistente), C160 (medianamente resistente) e C125 (suscetível) foram inoculadas com o patógeno ($1,5 \times 10^4$ uredosp/mL) e as plantas foram levadas à câmara de inoculação à 25°C por até 168 horas. Nos intervalos de 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas, folhas das mudas foram coletadas e procedeu-se à produção de extratos totais. Estes foram utilizados para determinação dos teores de proteínas totais, bem como para avaliação das atividades de peroxidase, fenilalanina amônia liase e catalase. Plantas controle (4), sem inoculação, de cada clone, foram mantidas nas mesmas condições em salas separadas. O delineamento adotado foi o fatorial com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por teste de Tukey a 1% de significância. Após a quantificação das proteínas totais, é possível observar que, nos Clones 199 e 160 a primeira resposta de aumento de teor de proteínas ocorreu após seis horas, sendo o pico máximo de produção ocorrido 72 hai. E este dispersando-se levemente somente após 120 hai. No clone susceptível, o aumento só ocorreu após 48 hai, sendo este 20% inferior à variedade resistente e não houve um segundo pico de resposta de produção. A avaliação da atividade de peroxidase mostrou aumento no clone resistente 24 hai. Para as atividades de fenilalanina amônia liase e catalase, aumento foi detectado nas plantas inoculadas 12 hai em todos os clones. Entretanto, os valores de PAL foi menor no clone susceptível quando comparado com os resistentes. A atividade de CAT foi maior no clone 125, quando comparado com os clones resistentes. Os dados obtidos sugerem que as enzimas CAT e PAL podem estar envolvidas no mecanismo de controle de compostos envolvidos na defesa do cafeeiro, contribuindo no processo de restrição/redução da infecção por *H. vastatrix*. Deve-se agora identificar outros compostos envolvidos na resposta e como estas reagem às condições de estresse.

Palavras-chave: Atividade enzimática; Café; Clones; Melhoramento genético.

FONSECA, Aline Souza. **Biochemical characterization of *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner accessions in interaction with the fungus *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.** 2022. 63 f. Thesis (PhD in biodiversity and biotechnology) - Federal University of Rondônia, Porto Velho, 2022

ABSTRACT

In situations of abiotic or biotic stress, plants tend to defend themselves biochemically. These responses vary depending on the type of stress, the momentary intensity, the elapsed time and the plant's own genetics. The objective of this work was to study the interaction of clones of *Coffea canephora* x *Hemileia vastatrix*, to identify the host responses in the interaction of incompatibility and compatibility with the pathogen. For that, seedlings with 120 days of age of the clones of the variety BRS Ouro Preto C199 (resistant), C160 (medium resistant) and C125 (susceptible) were inoculated with the pathogen (1.5×10^4 uredosp/mL) and the plants were taken to the inoculation chamber at 25°C for up to 168 hours. At intervals of 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 hours, leaves of the seedlings were collected and crude extracts were produced. These were used to determine the levels of total proteins, as well as to evaluate the activities of peroxidase, phenylalanine ammonia lyase and catalase. Control plants (4), without inoculation, of each clone, were kept under the same conditions in separate rooms. The design adopted was the factorial with four replications. Data were submitted to analysis of variance and means were compared by Tukey's test at 1% of significance. After the quantification of total proteins, it is possible to observe that, in Clones 199 and 160, the first increase in protein content occurred after six hours, with the maximum production peak occurring after 72 hai. And this dispersing slightly only after 120 hai. In the susceptible clone, the increase only occurred after 48 hours, which was 20% lower than the resistant variety and there was no second peak of response or production. The evaluation of peroxidase activity showed an increase in the 24 hai resistant clone. For phenylalanine ammonia lyase and catalase activities, an increase was detected in plants inoculated at 12 hai in all clones. However, PAL values were lower in the susceptible clone when compared to the resistant ones. CAT activity was higher in clone 125 when compared to resistant clones. The data obtained suggest that CAT and PAL enzymes may be involved in the control mechanism of compounds involved in coffee defense, contributing to the process of restriction/reduction of infection by *H. vastatrix*. Further studies must now identify which compounds are involved in the response and how they react to stress conditions.

Keywords: Enzymatic activity; Coffee; Clones; Genetical enhancement.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Período de favorabilidade das principais doenças do cafeeiro na Amazônia, em função da fase fenológica da cultura 15
- Figura 2** - Ciclo biológico da ferrugem do cafeeiro *Hemileia vastatrix* destacando os diferentes processos de infecção e colonização dos tecidos..... 17
- Figura 3** - Sintoma da ferrugem (*Hemileia vastatrix*.) em folhas de cafeeiro no campo..... 18
- Figura 4** - Teores de proteínas no clone 125, na presença e ausência de esporos de *H. vastatrix*, nos diferentes tempos experimentais (0 – 168 horas após a inoculação)..... 33
- Figura 5** - Teores de proteínas no clone 160, na presença e ausência de esporos de *H. vastatrix* nos diferentes tempos experimentais..... 33
- Figura 6** - Teores de proteínas no clone 199, na presença e ausência de esporos de *H. vastatrix*, nos diferentes tempos experimentais (0 – 168 horas após a inoculação)..... 34
- Figura 7** – Resposta do aumento da atividade peroxidásica no clone 125 no período de 0 a 168h após a inoculação com esporos de *H. vastatrix*..... 34
- Figura 8** – Resposta do aumento da atividade peroxidásica no clone 160 no período de 0 a 168h após a inoculação com esporos de *H. vastatrix*..... 35
- Figura 9** – Resposta do aumento da atividade peroxidásica no clone 199 no período de 0 a 168h após a inoculação com esporos de *H. vastatrix*..... 35
- Figura 10** – Resposta da atividade Fenilalanina Amônia Liase no clone 125 no período de 0 a 168 horas após a inoculação com esporos de *H. vastatrix*..... 36
- Figura 11** – Resposta da atividade Fenilalanina Amônia Liase no clone 160 no período de 0 a 168 horas após a inoculação com esporos de *H. vastatrix*..... 36
- Figura 12** – Resposta da atividade Fenilalanina Amônia Liase no clone 199 no período de 0 a 168 horas após a inoculação com esporos de *H. vastatrix*..... 37
- Figura 13** – Resposta da atividade de catalase no clone 125 no período de 0 a 144 horas após a inoculação com esporos de *H. vastatrix*..... 38
- Figura 14** – Resposta da atividade de catalase no clone 160 no período de 0 a 144 horas após a inoculação com esporos de *H. vastatrix*..... 38
- Figura 15** - Resposta da atividade de catalase no clone 199 no período de 0 a 144 horas após a inoculação com esporos de *H. vastatrix*..... 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativas do teste F da análise de variância dos efeitos de tempo e inóculo em três diferentes clones de <i>Coffea canephora</i> com diferentes graus de resistência à ferrugem <i>Hemileia vastatrix</i> Berk. & Br. (Clone 1-suscetível).....	25
Tabela 2 - Estimativas do teste F da análise de variância dos efeitos de tempo e inóculo em três diferentes clones de <i>Coffea canephora</i> com diferentes graus de resistência à ferrugem <i>H. vastatrix</i> Berk. & Br. (Clone 2- medianamente resistente).....	25
Tabela 3 - Estimativas do teste F da análise de variância dos efeitos de tempo e inóculo em três diferentes clones de <i>Coffea canephora</i> com diferentes graus de resistência à ferrugem <i>Hemileia vastatrix</i> Berk. & Br. (Clone 3- resistente).....	26
Tabela 4 – Teste de agrupamento de médias de Scott Knott a 5% de probabilidade comparando os efeitos de tempo (T) e de inoculação (I) no clone 1 suscetível à ferrugem <i>Hemileia vastatrix</i> Berk. & Br.	27
Tabela 5 – Teste de agrupamento de médias de Scott Knott a 5% de probabilidade comparando os efeitos de tempo (T) e de inoculação (I) no clone 2 medianamente resistente à ferrugem <i>Hemileia vastatrix</i> Berk. & Br.....	28
Tabela 6 – Teste de agrupamento de médias de Scott Knott a 5% de probabilidade comparando os efeitos de tempo (T) e de inoculação (I) no clone 3 resistente à ferrugem <i>Hemileia vastatrix</i> Berk. & Br.....	29
Tabela 7 – Teste de agrupamento de médias de Scott Knott a 5% de probabilidade comparando os efeitos de tempo (T) e de clones não inoculados (C) com diferentes graus de resistência à ferrugem <i>Hemileia vastatrix</i> Berk. & Br.....	30
Tabela 8 – Teste de agrupamento de médias de Scott Knott a 5% de probabilidade comparando os efeitos de tempo (T) e de clones inoculados (C) com diferentes graus de resistência à ferrugem <i>Hemileia vastatrix</i> Berk. & Br.....	31
Tabela 9 – Estimativas do teste F da análise de variância dos efeitos de tempo e inóculo em três diferentes clones de <i>Coffea canephora</i> com diferentes graus de resistência à ferrugem <i>Hemileia vastatrix</i> (Clone 1-suscetível, Clone 2- medianamente resistente, Clone 3- resistente).....	31
Tabela 10 – Estimativas do teste F da análise de variância dos efeitos de tempo e inóculo em três diferentes clones de <i>Coffea canephora</i> com diferentes graus de resistência a ferrugem <i>Hemileia vastatrix</i> Berk. & Br. (Clone 1-suscetível, Clone 2- medianamente resistente, Clone 3- resistente).....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT – Catalase

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

C. canephora – Coffea Canephora

HAI – Horas após a inoculação

H. vastatrix – Hemileia vastatrix

H₂O – Água

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

PAL - Fenilalanina Amônia-liase

POX – Peroxidase

SA - Ácido salicílico

SOD - Dismutases de superóxido

TCA – Ácido tricloroacético

% - Porcentagem

UA/mgP - Unidade de Atividade/miligrama de proteínas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	OBJETIVO GERAL	12
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	A CAFEICULTURA	14
2.2	DOENÇAS DO CAFEEIRO	15
2.3	FERRUGEM DO CAFEEIRO	16
2.4	MECANISMOS DE DEFESA DAS PLANTAS	18
2.4.1	Catalase (EC 1.11.1.6)	20
2.4.2	As peroxidases (EC 1.11.1.7)	20
2.4.3	Fenilalanina amônia liase (EC 4.3.1.5)	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	INOCULAÇÃO	22
3.2	PREPARO DO EXTRATO VEGETAL	22
3.3	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE PROTEÍNAS.....	23
3.4	ENSAIO PARA DETECÇÃO DE ATIVIDADE DE PEROXIDASE (POX) (EC 1.11.1.7).....	23
3.5	ENSAIO PARA DETECÇÃO DE ATIVIDADE DE FENILALANINA AMÔNIA-LIASE (PAL) (EC 4.3.1.5).....	23
3.6	ENSAIO PARA DETECÇÃO DE ATIVIDADE DE CATALASE (CAT) (EC 1.11.1.6).....	24
3.7	DELINEAMENTO ESTATÍSTICO.....	24
4	RESULTADOS	25
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
	ANEXOS	50

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e o segundo maior consumidor. Dentre os produtos agrícolas brasileiros, o café se destaca como um dos mais importantes, estando entre os cinco principais setores exportadores do agronegócio. Em primeiro lugar temos o complexo soja, representando 24,1% de participação nas exportações totais, seguido das carnes com 18,2%, produtos florestais com 14,3%, cereais, farinhas e preparações com 10,6% e café com 8,2% (MAPA, 2022).

A produção nacional para a safra 2022 está estimada em 55,7 milhões de sacas de 60kg, das quais aproximadamente 38,7 milhões são de café da espécie arábica e 17 milhões de sacas de conilon (CONAB, 2022).

Nesse contexto, o Estado de Rondônia se destaca como o 5º maior produtor de café do país e o maior produtor da Região Norte, com estimativa de produção para 2022 de 2,49 milhões de sacas (CONAB, 2022). Em Rondônia os municípios com maior produção de café são: Cacoal, São Miguel do Guaporé, Alta Floresta D'Oeste, Nova Brasilândia D'Oeste, Machadinho D'Oeste, Alto Alegre dos Parecis e Buritis (CONAB, 2020).

O cafeeiro é uma cultura amplamente cultivada no país, apresenta alta produtividade, o que representa renda para os produtores em sua maioria agricultores familiares, além de receita para o país. É uma planta perene de habitat terrestre, que pode medir de 2 a 5 metros na fase adulta. Mesmo sendo amplamente cultivado em diversas áreas no país, diversas doenças ocorrem nessas regiões produtoras. Muitas dessas doenças têm potencial destrutivo suficiente para inviabilizar, ao menos economicamente, o cultivo do cafeeiro (VIEIRA JUNIOR e FERNANDES, 2015).

A ferrugem-alaranjada causada por *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome é um fungo biotrófico obrigatório que ataca especificamente o cafeeiro sendo a principal doença pelo nível de dano causado, acarretando o desfolhamento precoce em várias espécies do gênero *Coffea*, das quais *C. arabica* é a mais suscetível (TALHINHAS *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018).

O fungo causador da ferrugem ataca todas as variedades de café, porém, dentro do gênero *Coffea canephora*, algumas das cultivares apresentam resistência, enquanto a maioria das cultivares comerciais dentro da espécie *Coffea arabica* é suscetível. Os danos causados pela ferrugem são indiretos, pela indução de desfolha. A queda precoce das folhas resulta em uma menor intensidade da florada, e também seca dos ramos plagiotrópicos, comprometendo, em alguns casos em mais de 45%, a produção do cafeeiro (ZAMBOLIN, 2015).

Os primeiros sintomas da doença são pequenas manchas cloróticas translúcidas, com diâmetro de 0,1 a 0,3 cm que se apresentam na face abaxial da folha. Sobre a mancha forma-se

uma massa pulverulenta de cor alaranjada. No estágio mais avançado, algumas partes do tecido foliar são destruídas e necrosadas. Em Rondônia os sintomas surgem geralmente de setembro a novembro e tem seu pico entre março a julho (VIEIRA JÚNIOR *et al.*, 2008; SANTOS, 2012).

A ocorrência da doença é favorecida por fatores ligados aos hospedeiros (cafeeiro), ao patógeno (fungo) e relacionados com o ambiente, bem como o estado nutricional da planta, o nível de resistência genética, espaçamento e sistema de cultivo adotado entre outros fatores (VIEIRA JÚNIOR *et al.*, 2008).

Dentre as principais medidas no controle da ferrugem a mais eficiente é a resistência genética, embora o uso de fungicidas seja uma das medidas de controle imediato preferidas, o uso contínuo desse tipo de produto aumenta os custos de produção, causa danos ao meio ambiente e pode causar a resistência dos fitopatógenos (PAULO *et al.*, 2013). Com isso o uso de cultivares resistentes é considerado a estratégia de controle de doenças mais eficaz e durável.

A resistência da planta é o resultado da interação entre planta e o patógeno que poderá ser específica (genética, gene a gene) e ou complexa (ativação de reações bioquímicas em cascatas, acúmulo de proteínas de defesa e mudanças citológicas e morfológicas na planta). A resposta ao ataque se dá por mecanismos efetivos de resistência, que são acionados no momento do reconhecimento da agressão, e que, conforme o grau de resistência da planta pode variar em tempo para se manifestar (YANG *et al.*, 2017).

Com isso, o propósito neste estudo foi verificar o acúmulo e o aumento da atividade de enzimas relacionadas à resistência em plantas de cafeeiro, exibindo características de resistência sistêmica, bem como entender os mecanismos bioquímicos envolvidos no processo de resistência ao fungo.

1.1 OBJETIVO GERAL

Gerar dados a partir do estudo da interação *Coffea canephora* x *Hemileia vastatrix*, em relações de compatibilidade e incompatibilidade.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a participação de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo no sistema *H. vastatrix* x café conilon;

Avaliar os níveis de atividade de Proteínas Relacionadas à Patogênese (PR-Proteínas) no sistema *H. vastatrix* x café conilon;

Correlacionar níveis de resposta biológica de resistência com respostas bioquímicas de atividades enzimáticas;

Identificar respostas do hospedeiro que condicionem as bases biológicas dos mecanismos de defesa do cafeeiro ao ataque do patógeno.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CAFEICULTURA

O gênero *Coffea* sp. originou-se na África, sendo que a espécie *Coffea arabica* teve sua origem na Etiópia e a espécie *Coffea canephora* de uma ampla região, que se estende da Guiné ao Congo, da costa oeste à região Central do continente (FERRÃO *et al.*, 2016). O cafeeiro é uma planta perene de clima tropical. Pertence à família das Rubiaceas e ao gênero *Coffea* que reúne diversas espécies. *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (robusta/conilon) são as espécies de maior interesse econômico, constituindo respectivamente, 70% e 30% da produção mundial (SANTOS, 2006; CONAB, 2016).

O Brasil é o maior produtor e exportador das espécies *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner ocupa a segunda posição como consumidor mundial de café, sendo os maiores Estados produtores, Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Paraná (CONAB, 2017). O café conilon (*Coffea canephora*) Pierre ex Froehner é a principal espécie cultivada na Amazônia Ocidental e apresenta papel fundamental na economia dessa região (VENEZIANO e FAZUOLI, 2000; MARCOLAN *et al.*, 2009). Essa espécie se caracteriza por apresentar plantas de duas variedades botânicas distintas, denominadas Conilon e Robusta (ROCHA *et al.*, 2013).

Apesar de menos valorizado no mercado que o café arábica, o café conilon tem grande aceitação no mercado norte-americano e europeu. Isso se deve principalmente ao fato de ser utilizado na fabricação de café solúvel, por possuir um teor de cafeína duas vezes maior que o café arábica (RIBEIRO *et al.*, 2014).

Em relação ao estado de Rondônia, o café é a segunda cultura de maior rendimento econômico do Estado, sendo considerado o quinto maior produtor de café do Brasil e o segundo maior produtor da variedade Robusta. Esta cadeia conta com participação de aproximadamente 23 mil produtores, a maioria de base familiar, que se situam na região central do Estado, nos municípios de Cacoal, Ministro Andreazza, São Miguel do Guaporé, Nova Brasilândia D'Oeste, Alta Floresta D'Oeste, Alto Alegre dos Parecis e na região centro-norte em Machadinho D'Oeste e Buritis (CONAB, 2020).

As condições ambientais e climáticas são favoráveis ao sucesso da cafeicultura no Brasil, porém essa cultura enfrenta diversos problemas fitossanitários que podem comprometer o estabelecimento e rentabilidade das lavouras.

2.2 DOENÇAS DO CAFEIEIRO

O cafeeiro é uma cultura amplamente cultivada no país que gera grande produtividade e rentabilidade, porém junto a essa abrangência de cultivo, está a ocorrência de diversas doenças de alto potencial destrutivo, chegando a inviabilizar, ao menos economicamente, a exploração comercial deste setor (VIEIRA JUNIOR e FERNANDES, 2015).

O cafeeiro durante todo o seu ciclo vegetativo e produtivo é afetado por doenças tendo nos fungos os principais agentes fitopatogênicos. Em Rondônia, as doenças que causam maiores danos são: ferrugem-do-cafeeiro, mancha-manteigosa, antracnose, koleroga, roseliniose, rizoctoniose, fusariose e cercosporiose, dentro do grupo dos fungos, algumas dessas doenças são apresentadas na figura 1. A ocorrência dessas doenças está fortemente correlacionada com o clima e ao estágio fenológico que se encontram as plantas (MARCOLAN *et al.*, 2009).

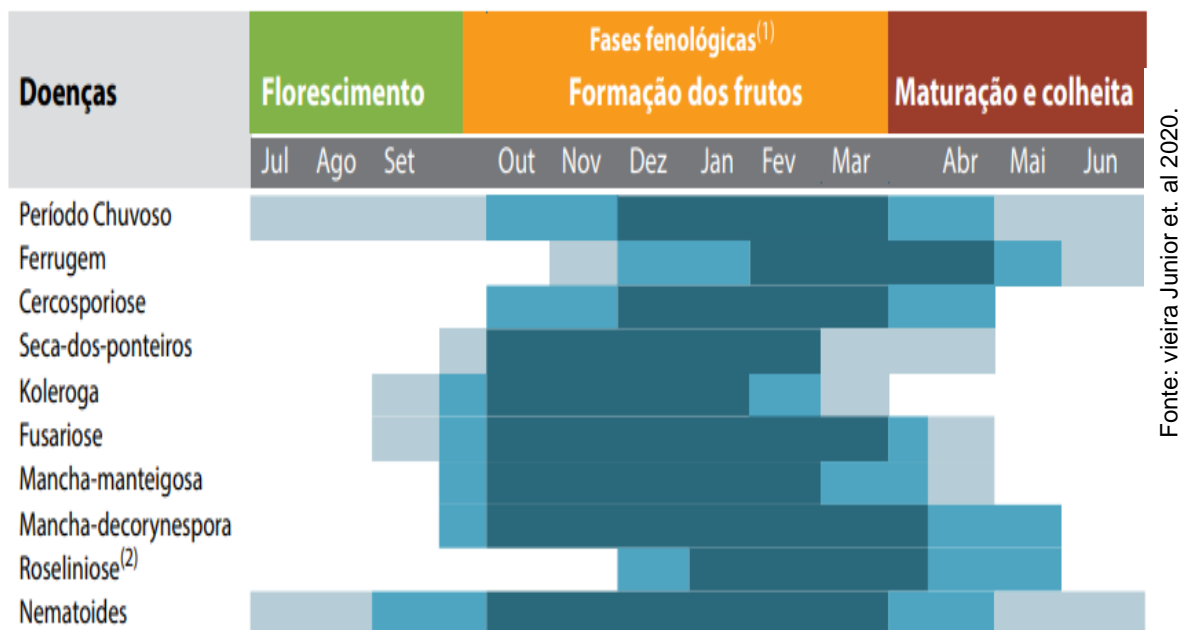


Figura 1. Período de favorabilidade das principais doenças do cafeeiro na Amazônia, em função da fase fenológica da cultura.

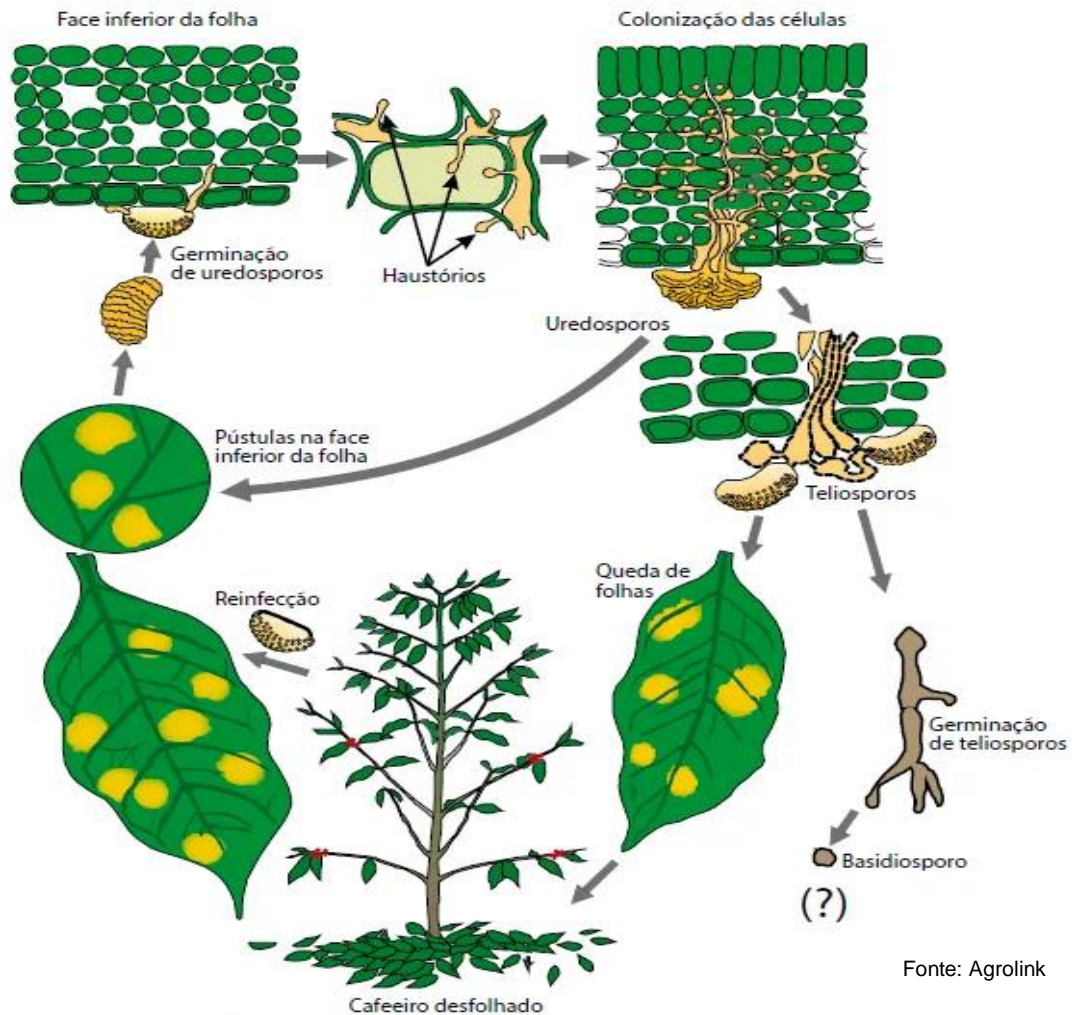
As pesquisas no Brasil, referentes à redução das perdas causadas pelas doenças do cafeeiro, quase sempre foram direcionadas ao controle químico, estudando-se doses e épocas de aplicação de diversos fungicidas protetores e sistêmicos. Poucos estudos foram desenvolvidos para verificar a indução de resistência dos cafeeiros às doenças, envolvendo compostos do metabolismo das plantas, alteração da nutrição, entre outras formas alternativas de controle (CARVALHO *et al.*, 2012).

2.3 FERRUGEM DO CAFEIEIRO

Dentre as doenças que ocorrem no cafeeiro, a ferrugem causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. é uma das mais importantes para a cultura do café afetando a produção do café em todas as regiões do mundo, pois dependendo da agressividade do patógeno, das condições meteorológicas locais, carga pendente (produção), estado nutricional e resistência das plantas, além da densidade de plantio e resistência ou susceptibilidade dos clones e cultivares utilizadas podem causar prejuízos de 35 a 50%. No Brasil, a doença foi constatada pela primeira vez na Bahia em 1970, espalhando-se rapidamente para a América Central em 1976 e em pouco menos de uma década, já havia sido relatada em toda a América Latina (CARVALHO *et al.*, 1989; ZAMBOLIM, 2016; VENTURA *et al.*, 2017).

Hemileia vastatrix é um fungo parasita obrigatório pertencente a Classe Basidiomycotina, subclasse *Hemibasidio mycetidae*, pertencente à ordem Uredinales e família Pucciniaceae, que se desenvolve na superfície inferior da área foliar após a germinação dos uredíniosporos na presença de água e temperatura entre 20°C e 24°C, emitindo tubos germinativos que quando atingem a célula-guarda do estômato forma uma estrutura denominada apressório, da qual saem as hifas primárias e destas, as hifas de penetração.

Após a ramificação das hifas pelos espaços intercelulares, forma-se na face de contato entre o micélio do fungo e a célula do hospedeiro, o haustório, estrutura responsável pela absorção de nutrientes pelo patógeno, dentro das células do hospedeiro, a ação da ferrugem provoca queda precoce das folhas e a secagem dos ramos, que, em consequência disso, não produzirão frutos no ano seguinte (Figura 2) (ZAMBOLIM, 2002; ZAMBOLIM *et al.*, 2009).



Fonte: Agrolink

Figura 2 - Ciclo biológico da ferrugem do caféiro *Hemileia vastatrix* destacando os diferentes processos de infecção e colonização dos tecidos

O sintoma característico da doença é o aparecimento de manchas cloróticas translúcidas com 0,1 a 0,3 cm de diâmetro na face abaxial foliar que em poucos dias evoluem atingindo 1 a 2 cm de diâmetro (figura 3). Na face inferior desenvolvem-se massas de aspecto pulverulento de coloração amarelo alaranjada formada por uredósporos do patógeno. Os danos causados pela ferrugem são, principalmente, indiretos, pela indução de desfolha por ocasião da colheita. A queda precoce das folhas reduz a área fotossintética da planta, interferindo no desenvolvimento dos botões florais, menor vingamento dos chumbinhos e seca dos ramos plagiotrópicos e consequentemente perdas significativas na produção de caféiros (MATIELLO *et al.*, 2002; PARTELLI e MORAES, 2018).



Figura 3. Sintoma da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) em folhas de cafeeiro no campo.

Em relação as raças de *H. vastatrix*, mais de 50 já foram identificadas no mundo e 16 dessas raças já foram identificadas no Brasil (VÁRZEA e MARQUES, 200; TALHINHAS *et al.*, 2017), (ZAMBOLIM, 2016), (CAIXETA, 2018) sendo que a raça II presente em 32 países é a de maior frequência representando 58% de todos os isolados testados para virulência (ZAMBOLIM *et al.*, 2005). Com isso, a ocorrência de raças virulentas, e a alta diversidade genética das populações do patógeno representam um grande desafio aos melhoristas na busca por cultivares resistentes.

Um dos grandes desafios para produtores e pesquisadores é o manejo sustentável da ferrugem do cafeeiro, o qual é realizado com uso de variedades resistentes sendo esta a principal medida de controle, pois é econômico, eficiente e não causa danos ao meio ambiente. No entanto, o método mais utilizado ainda é com a aplicação de fungicidas protetores e sistêmicos, determinados com base no monitoramento para tomada de decisão (BELAN *et al.*, 2015) ou aplicados conforme datas preestabelecidas (ZAMBOLIM, 2016).

Todavia, o uso de fungicidas para o controle da ferrugem gera um grande custo de produção, além disso, a aplicação de fungicidas também pode aumentar a probabilidade de intoxicação em quem aplica, a contaminação do meio ambiente pela deriva e a lixiviação dos excessos de produtos pulverizados no solo, interferência nos organismos vivos aquáticos (CAPUCHO, 2011; VIEIRA *et al.*, 2016)

2.4 MECANISMOS DE DEFESA DAS PLANTAS

As plantas passam constantemente por diversas situações de estresses, devido à grande exposição a fatores do meio ambiente, como radiação, temperatura e umidade e a agentes

biológicos, como as bactérias, vírus, fungos, nematoides, insetos e herbívoros, com isso, os vegetais precisam de alguma forma reagir a esses tipos de estresses (SOARES e MACHADO, 2007; FERNANDES *et al.* 2009, REIS, *et al.*, 2011).

No campo, as plantas geralmente se expõem a uma ou mais de uma dessas condições ao mesmo tempo. Dependendo da espécie ou variedade, as plantas têm a capacidade de adquirir resistência ao estresse dentro do seu ciclo de vida (aclimatação). Tais processos incluem endurecimento causado pelo frio, ajuste de crescimento a diferentes intensidades de luz e resistência a certos patógenos. As plantas expostas a um tipo de condição de estresse também podem adquirir certa resistência a outras condições de estresse (tolerância cruzada). Inversamente específico ao estresse mecanismos também podem comprometer as respostas a outros estresses. (MHAMDI *et al.*, 2010).

Dessa forma, as plantas desenvolvem estratégias de defesa como a imunidade inata sendo esta fundamental para a sua sobrevivência, na qual protegem as células individuais de infecções causadas por patógenos (CUI TSUDA e PARKER, 2015), além de utilizarem dois tipos de resposta de defesa para reconhecer e responder às agressões dos patógenos, sendo uma primária com origem extracelular, e outro, com origem intracelular, com reconhecimento muito específico do agente patogénico (FAULKNER, 2016).

A resistência natural das plantas ao ataque de patógenos é caracterizada pela capacidade que elas desenvolveram de impedir, restringir ou retardar a penetração destes organismos em seus tecidos, diminuindo os efeitos danosos potenciais (FERNANDES, 2005). Dentre as defesas utilizadas pelas plantas estão a resposta hipersensitiva (HR), resistência sistêmica adquirida (SAR), indução de proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas) e compostos sinalizadores, como por exemplo, ácido salicílico e peróxido de hidrogênio. (FERNANDES, 2009).

Outra estratégia utilizada é a produção espécies reativas de oxigênio com objetivo de conter os mecanismos de remoção, dessa forma levando ao estresse oxidativo que pode ser altamente citotóxico e reagir com várias biomoléculas, tais como lipídios, ácidos nucleicos e proteínas com objetivo de retomarem seu metabolismo normal, impedindo dessa forma a invasão de agentes fitopatogénicos (RODRIGUES-BRANDÃO *et al.* 2016).

Dessa forma, as plantas ao longo dos anos como estratégia de defesa desenvolveram mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, capazes de eliminar os efeitos citotóxicos das ROS. E atuando conjuntamente na eliminação das ROS estão as enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase do ascorbato (APX) (Deuner *et al.*, 2008; Barbosa *et al.*, 2014). Com isso, saber como as plantas se protegem é essencial para obter variedades agrícolas mais resistentes, o que pode aumentar a produção e a qualidade das culturas.

2.4.1 Catalase (EC 1.11.1.6)

A catalase encontra-se presente em diversas células de animais, plantas, fungos e bactérias. Sua atividade enzimática serve de proteção às plantas, resultando na ativação da resistência sistêmica adquirida, sendo enzimas indispensáveis para desintoxicação das células das plantas em condições de estresse (bióticos e/ou abióticos), responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio devido à sua capacidade de oxidação de proteínas e lipídios de membranas (NICHOLLS, 2010; MONTEIRO e LIMA, 2017)

A enzima proporciona aumento na tolerância ao estresse, passando a ajudar na regulação das respostas e na aclimatação aos estresses ambientais. A CAT classifica-se em três tipos: monofuncional, peroxidase e pseudocatalase, sendo mais comumente a monofuncional, encontrada em mamíferos, plantas e fungos (KAR e MISHRA, 1976; NICHOLLS *et al.* 2010).

Além disso essa enzima se apresenta de várias isoformas nas plantas, as quais estão presentes nos peroxissomas e glioxissomas. São as principais enzimas de detoxificação do H₂O₂ e podem dismutar diretamente o H₂O₂ ou oxidar substratos, tais como metanol, etanol, formaldeído e ácido fórmico, funcionando como canal de limpeza do H₂O₂ celular (BREUSEGEM *et al.*, 2001).

2.4.2 As peroxidases (EC 1.11.1.7)

As peroxidases (EC 1.11.1.7) são do grupo das oxidoreduases, elas catalisam e oxidam substratos orgânicos por meio da eliminação do peróxido de hidrogênio, dando origem a lignina que irá fortalecer a parede celular contra a ação de enzimas líticas produzidas pelos patógenos, levando ao aumento da resistência mecânica contra diversos patógenos (PASSARDI *et al.*, 2004).

Além disso, essas enzimas têm um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento de vegetais, da detoxificação celular e de mecanismos de defesa como lignificação, cicatrização de ferimentos e oxidação de compostos fenólicos (BAYSAL *et al.*, 2003; FREITAS, 2008).

O aumento nas atividades da POX e PAL em tecidos vegetais tem sido um importante fator na indução de resistência contra patógenos (SONG *et al.*, 2011). Com isso, o desenvolvimento de tecnologias e/ou metodologias para um manejo sustentável depende da expansão de pesquisas que viabilizem os métodos alternativos de controle. Portanto, são necessários estudos mais aprofundados sobre o modo de ação dos mecanismos de defesa das plantas envolvidos no processo de redução do agente fitopatológico *Hemileia vastatrix* no cafeeiro.

2.4.3 Fenilalanina amônia liase (EC 4.3.1.5)

A enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL) (EC 4.3.1.5) é uma enzima do metabolismo secundário mais intensivamente estudada em plantas para todas as vias de síntese de compostos fenólicos, os quais estão envolvidos com resistência a pragas e patógenos (ARDILA *et al.*, 2013). Esta enzima é a responsável pela primeira de uma série de reações metabólicas, que gera inúmeros produtos naturais baseados em fenilpropanos, incluindo a lignina, certos pigmentos e protetores contra luz ultravioleta. Sua síntese ocorre em células próximas ao local da infecção através de distintos estímulos ambientais, tais como mediadores de luz e crescimento, reguladores de crescimento durante a infecção na planta, contaminação via metais pesados e danos (RAHMAN e PUNJA, 2005)

A produção de tal enzima é regulada durante o crescimento vegetal, mas é também induzida em células vizinhas ao local de infecção por vários estímulos ambientais, como infecção, ferimentos, contaminação por metais pesados, luz e reguladores de crescimento. Uma invasão de patógenos é capaz de desencadear a transcrição do RNA mensageiro codificando a PAL, ocorrendo o aumento da quantidade desta enzima na planta e estimulando a síntese de compostos fenólicos (TAIZ e ZEIGER, 2004). (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2008).

A PAL é uma enzima chave da via metabólica a qual regula a rota de biossíntese dos fenilpropanóides e seus derivados, catalisando a transformação, por desaminação, do aminoácido L-fenilalanina, em ácido trans-cinâmico, além de fazer parte da classe de enzimas envolvidas na formação de lignina, cujo seu aumento se dá quando há estímulos por agente biótico ou abiótico (CHENG *et al.*, 2001; ZHAO *et al.*, 2005). Mediante suas diversas funcionalidades, a PAL é encontrada em ampla dimensão de espécies, atua desde o sítio da infecção na resistência local, como na resistência sistêmica adquirida nos locais afastados do sítio infeccioso, por meio do ácido salicílico como sinalizador da resposta de ativação (RYALS *et al.*, 1996).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Ensaio para a detecção do estado de indução de resistência em plantas de cafeeiro

O propósito deste ensaio foi verificar o acúmulo e o aumento da atividade de enzimas relacionadas à resistência em plantas de cafeeiro, exibindo características de resistência sistêmica bem como entender os mecanismos bioquímicos envolvidos no processo de resistência.

3.1 INOCULAÇÃO

As culturas do fitopatógeno *Hemileia vastatrix* foram preparadas 14 dias antes da inoculação das plantas.

Foram usadas as plantas da variedade BRS Ouro Preto (Clones 199, 160 e 125 sendo o primeiro resistente à ferrugem, o segundo com resistência mediana e o terceiro susceptível). Uma suspensão de propágulos dos patógenos ($1,5 \times 10^4$ esporos/mL) provenientes de folhas de cafeeiro suscetíveis foi pulverizada sobre as plantas de cafeeiro, de acordo com Dhingra e Sinclair (1995).

Nesse sentido tiveram 3 clones, sendo 10 plantas de cada clone com 4 repetições cada. As coletas de folhas se deram às 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas, sendo um total de 30 tratamentos e um fitopatógeno.

3.2 PREPARO DO EXTRATO VEGETAL

A detecção enzimática se deu via extrato foliar utilizando a metodologia adaptada de Azevedo *et al.* (1998). Para isso, folhas das plantas dos clones da BRS Ouro Preto utilizadas no ensaio foram coletadas, lavadas em água destilada, pesadas e trituradas em nitrogênio líquido, utilizando almofariz e pistilo. O pó obtido foi macerado por 5 minutos na presença da solução de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, adicionado de polivinilpirrolidona a 1% (p/v), na proporção de 1:5 (p/v), sob banho de gelo e posteriormente centrifugado a 20.000 g, 25 minutos, 4°C.

Os sobrenadantes foram utilizados para as determinações das atividades de dosagem de proteína total, e determinação das atividades enzimáticas (peroxidase, fenilalanina amônia-liase e catalase). As amostras foram acondicionadas em frascos tipo penicilina e mantidas em ultra freezer em temperatura de -24°C .

3.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE PROTEÍNAS

O teste de Bradford (1976) foi empregado para a quantificação do conteúdo total de proteínas nas amostras. Para tanto foram adicionadas alíquotas de 100 μ L dos extratos totais e 2,5 mL do reagente de Bradford e, após 10 minutos, a leitura das absorbâncias foram feitas a 595 nm em espectrofotômetro. O teor de proteínas solúveis foi calculado utilizando-se uma curva padrão construída a partir das concentrações conhecidas de BSA.

3.4 ENSAIO PARA DETECÇÃO DE ATIVIDADE DE PEROXIDASE (POX) (EC

1.11.1.7).

A atividade peroxidásica foi determinada seguindo a metodologia descrita por Urbanek e colaboradores (1991). Para quantificação da peroxidase foram utilizados tubos de ensaios devidamente identificados, nos tubos foram colocados os seguintes reagentes, nas seguintes proporções: Para o branco do reagente foi utilizado 2000 μ L de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2; 1000 μ L de Peróxido de hidrogênio 0,06 M e 1000 μ L guaiacol 0,02 M.

Para o branco do reagente foram utilizados 3.900 μ L de tampão acetado de sódio 50 mM pH 5,2 e 100 μ L do extrato bruto das folhas.

As amostras a serem quantificadas foram preparadas da seguinte forma: 1900 μ L de tampão acetado de sódio 50 mM pH 5,2; 1000 de peróxido de hidrogênio 0,06 M, 1000 μ L de guaiacol 0,02 M e 100 μ L de extrato bruto.

As amostras reacionais foram preparadas sem a adição do extrato bruto, todos os tubos foram colocados em banho-maria a 30° por 10 minutos e após esse período foram retirados e postos à leitura em absorbância feita em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 480 nm, sendo a leitura iniciada pelo branco do reagente utilizado como branco para zerar o espectrofotômetro.

Foi também realizada a leitura em tempo zero, na qual o extrato bruto foi colocado na mistura reacional e logo em seguida se deu a leitura, sem ir ao banho-maria. Todas as amostras foram quantificadas em triplicatas, sendo cada bateria repetida.

3.5 ENSAIO PARA DETECÇÃO DE ATIVIDADE DE FENILALANINA AMÔNIA-LIASE (PAL) (EC 4.3.1.5)

A atividade de Fenilalanina Amônia Liase (PAL) foi determinada segundo o método descrito por Tanaka *et al.* (1974) e Mori *et al.* (2001), adaptado para as condições experimentais. A mistura reacional consistiu de 200 μ L do extrato total, 200 μ L de fenilalanina 40mM, 20 μ L de B-mercaptoetanol 50 mM e 480 μ L do tampão Tris-HCL 100mM, PH 8,8. A mistura

reacional foi incubada a 30°C por 1 hora. A reação foi parada pela adição de 100 uL de HCL 6N e a absorbância foi medida a 290 nm.

3.6 ENSAIO PARA DETECÇÃO DE ATIVIDADE DE CATALASE (CAT) (EC

1.11.1.6)

A atividade de catalase (CAT) presente nos extratos totais de folhas de cafeeiros foi determinada através da adição de 50 µL do extrato total a 950 µL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, contendo 12,5 mM de H₂O₂, a 30°C (Havir e McHale, 1987). A adição do peróxido de hidrogênio ao tampão fosfato de potássio foi feita imediatamente antes de seu uso. A atividade enzimática foi determinada através da medida do decréscimo da leitura de absorbância a 240 nm, no intervalo de tempo de 30 segundos, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹cm⁻¹ (ANDERSON *et al.*, 1995).

3.7 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em fatorial tipo 2 x 10 x 3 (tratamentos x tempo x cultivares), com 10 repetições, sendo cada uma composta por uma planta. A comparação entre as médias foi feita através do desvio padrão da média ao longo do tempo. Cada média foi resultado de determinações em triplicata para cada um dos parâmetros estudados. Análises estatísticas foram conduzidas usando o programa one-way ANOVA e Student's t-test do software SPSS para Windows (KINNEAR; GRAY, 2000).

4 RESULTADOS

Para avaliar a atividade das enzimas, peroxidase, fenilalanina amônia-liase e catalase dos clones 1 (125), 2 (160) e 3 (199), foi utilizado a análise de variância – ANOVA (Tabelas 1, 2 e 3).

Tabela 1. Estimativas do teste F da análise de variância dos efeitos de tempo e inóculo em três diferentes clones de *Coffea canephora* com diferentes graus de resistência à ferrugem *Hemileia vastatrix*. & Br. (Clone 1-suscetível).

FV	GL	Clone 1					
		Prot	Perox 0'	Perox 10'	Fenil	catal 0'	catal 10'
Tempo (T)	9	21.04**	0,61 ^{ns}	0.28 ^{ns}	9.24**	7.78**	5.93**
Inóculo (I)	1	0.04 ^{ns}	6.51*	2.66 ^{ns}	3.05 ^{ns}	2.08 ^{ns}	2.10 ^{ns}
T x I	9	2.39**	1.51 ^{ns}	2.30*	3.96**	1.67 ^{ns}	2.17*
Resíduo	60	-	-	-	-	-	-
Total	79	-	-	-	-	-	-
Média	-	1,18	0.13	0.13	2.32	2.06	2.10
CV(%)	-	6,33	25.30	33.10	1.03	7.81	7.90

FV: fonte de variação, GL: graus de liberdade, **: significativo a 1% de probabilidade, *: significativo a 5% de probabilidade, ns: não significativo, prot: teor de proteínas, perox 0': atividade de peroxidase no tempo zero, perox 10': atividade de peroxidase no tempo de dez minutos, fenil: atividade de fenilalanina, catal 0': atividade da catalase no tempo zero, catal 10': atividade da catalase no tempo de 10 minutos. CV: coeficiente de variação.

Como observa-se na tabela 1, na maioria das avaliações para o clone 1 (clone suscetível) o coeficiente de variação foi baixo e considerado de precisão. Segundo Pimentel (2000) valores de coeficientes de variação de até 10% podem ser considerados baixos e de alta precisão, valores entre 10 e 20% são de boa precisão.

Tabela 2. Estimativas do teste F da análise de variância dos efeitos de tempo e inóculo em três diferentes clones de *Coffea canephora* com diferentes graus de resistência à ferrugem *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. (Clone 2- medianamente resistente)

FV	GL	Clone 2					
		Prot	Perox 0'	Perox 10'	Fenil	catal 0'	catal 10'
Tempo (T)	9	6.69**	1.86 ^{ns}	1.53 ^{ns}	21.80**	9.28**	9.91**
Inóculo (I)	1	0.65 ^{ns}	1.06 ^{ns}	2.83 ^{ns}	2.31 ^{ns}	0.48 ^{ns}	0.24 ^{ns}
T x I	9	6.87**	1.58 ^{ns}	1.31 ^{ns}	0.57 ^{ns}	1.14 ^{ns}	1.37 ^{ns}
Resíduo	60	-	-	-	-	-	-
Total	79	-	-	-	-	-	-
Média	-	1.16	0.12	0.12	2.31	2.02	2.05
CV(%)	-	5.10	40.72	71.94	2.15	6.66	6.45

FV: fonte de variação, GL: graus de liberdade, **: significativo a 1% de probabilidade, *: significativo a 5% de probabilidade, ns: não significativo, prot: teor de proteínas, perox 0': atividade de peroxidase no tempo zero, perox 10': atividade de peroxidase no tempo de dez minutos, fenil: atividade de fenilalanina, catal 0': atividade da catalase no tempo zero, catal 10': atividade da catalase no tempo de 10 minutos. CV: coeficiente de variação.

Na maior parte das avaliações para o clone 2 (clone medianamente resistente) o coeficiente de variação foi baixo, exceto na enzima peroxidase que apresentou um coeficiente de variação mais elevado, de acordo com esses valores podemos observar que o coeficiente de variação baixo é considerado de alta precisão, visto que a classificação do Coeficiente de Variação é inversamente proporcional à classificação da precisão do experimento, dessa forma, quanto maior o Coeficiente de Variação menor a precisão experimental.

Tabela 3. Estimativas do teste F da análise de variância dos efeitos de tempo e inóculo em três diferentes clones de *Coffea canephora* com diferentes graus de resistência a ferrugem *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. (Clone 3- resistente).

FV	GL	Clone 3					
		Prot	Perox 0'	Perox 10'	Fenil	catal 0'	catal 10'
Tempo (T)	9	4.76*	1.46 ^{ns}	1.07 ^{ns}	7.30**	3.43*	3.75*
Inóculo (I)	1	0.34 ^{ns}	7.54*	2.36 ^{ns}	0.08 ^{ns}	2.31 ^{ns}	2.20 ^{ns}
T x I	9	6.68**	1.33 ^{ns}	2.44*	1.81 ^{ns}	5.14**	4.70**
Resíduo	60	-	-	-	-	-	-
Total	79	-	-	-	-	-	-
Média	-	1.17	0.11	0.10	2.32	2.08	2.10
CV(%)	-	10.18	30.06	42.70	1.89	7.43	7.48

FV: fonte de variação, GL: graus de liberdade, **: significativo a 1% de probabilidade, *: significativo a 5% de probabilidade, ns: não significativo, prot: teor de proteínas, perox 0': atividade de peroxidase no tempo zero, perox10': atividade de peroxidase no tempo de dez minutos, fenil: atividade de fenilalanina, catal 0': atividade da catalase no tempo zero, catal 10': atividade da catalase no tempo de 10 minutos. CV: coeficiente de variação.

Para o clone 3 (clone resistente), os resultados mostram que a maioria das avaliações o coeficiente de variação das proteínas totais e das enzimas avaliadas como a fenilalanina amônia liase e catalase nos tempos 0 e 10 minutos foi baixo, visto que os mesmos ficaram na média e abaixo de 10% de variação.

Para a realização dos testes de média foi utilizado o teste de Scott Knott a 5% de probabilidade (Tabelas 4, 5 e 6).

Tabela 4. Teste de agrupamento de médias de Scott Knott a 5% de probabilidade comparando os efeitos de tempo (T) e de inoculação (I) no clone 1 suscetível à ferrugem *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.

		Prot		Perox 0'				Perox 10'			
		Inoculado		Inoculado		Inoculado		Inoculado		Inoculado	
Não inoculado		Inoculado		Não inoculado		Inoculado		Não inoculado		Inoculado	
0,97	Ac	0,98	Ad	0,12	Aa	0,13	Aa	0,13	Aa	0,13	Aa
0,95	Ac	0,93	Ad	0,12	Aa	0,10	Aa	0,13	Aa	0,12	Aa
1,04	Ac	0,90	Bd	0,12	Ba	0,18	Aa	0,11	Aa	0,13	Aa
1,06	Ac	1,07	Ac	0,11	Aa	0,14	Aa	0,09	Ba	0,18	Aa
1,27	Ab	1,15	Bc	0,13	Aa	0,15	Aa	0,14	Aa	0,13	Aa
1,24	Ab	1,28	Ab	0,13	Aa	0,16	Aa	0,13	Aa	0,17	Aa
1,35	Aa	1,38	Ab	0,14	Aa	0,15	Aa	0,13	Aa	0,13	Aa
1,21	Ab	1,17	Ac	0,14	Aa	0,13	Aa	0,18	Aa	0,13	Aa
1,34	Aa	1,36	Ab	0,12	Aa	0,14	Aa	0,13	Aa	0,16	Aa
1,41	Ba	1,55	Aa	0,10	Ba	0,18	Aa	0,06	Ba	0,18	Aa

		Fenil		catal 0'				catal 10'			
		Inoculado		Inoculado		Inoculado		Inoculado		Inoculado	
Não inoculado		Inoculado		Não inoculado		Inoculado		Não inoculado		Inoculado	
2,33	Ab	2,34	Ab	2,26	Aa	2,18	Ab	2,30	Aa	2,21	Ab
2,33	Ab	2,34	Ab	2,31	Aa	2,24	Ab	2,33	Aa	2,27	Ab
2,31	Ab	2,33	Ab	2,10	Ab	2,16	Ab	2,14	Ab	2,19	Ab
2,24	Bd	2,29	Ac	2,07	Ab	2,11	Ab	2,09	Ab	2,13	Ab
2,23	Ad	2,22	Ad	1,99	Ab	2,12	Ab	2,01	Ab	2,16	Ab
2,29	Ac	2,30	Ac	2,08	Ab	2,13	Ab	2,10	Ab	2,15	Ab
2,39	Aa	2,39	Aa	1,90	Ac	1,84	Ac	1,91	Ac	1,86	Ac
2,38	Aa	2,37	Aa	1,85	Ac	1,81	Ac	1,86	Ac	1,83	Ac
2,30	Bc	2,40	Aa	1,59	Bd	1,87	Ac	1,61	Bd	1,96	Ac
2,36	Aa	2,38	Aa	2,21	Ba	2,57	Aa	2,25	Ba	2,65	Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na HORIZONTAL não diferem entre si. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem entre si. prot: teor de proteínas, perox 0': atividade de peroxidase no tempo zero, perox 10': atividade de peroxidase no tempo de dez minutos, fenil: atividade de fenilalanina, catal 0': atividade da catalase no tempo zero, catal 10': atividade da catalase no tempo de 10 minutos.

Dentre as proteínas totais e as enzimas analisadas do clone 1 (um) inoculado, observa-se que houve um aumento entre os tempos zero e 10 quando as enzima peroxidase, fenilalanina e catalase foram avaliadas.

Tabela 5. Teste de agrupamento de médias de Scott Knott a 5% de probabilidade comparando os efeitos de tempo (T) e de inoculação (I) no clone 2 medianamente resistente à ferrugem *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.

Não inoculado		Prot		Inoculado		Perox 0'		Perox 10'			
Não inoculado		Inoculado		Não inoculado		Inoculado		Não inoculado		Inoculado	
0,92	Ad	9,95	Ad	0,09	Bb	0,16	Aa	0,09	Ba	0,28	Aa
1,02	Ad	0,95	Ad	0,19	Aa	0,16	Aa	0,15	Aa	0,17	Aa
1,16	Ac	1,17	Ab	0,10	Ab	0,11	Ab	0,10	Aa	0,10	Ab
0,98	Ad	1,05	Ac	0,10	Ab	0,12	Ab	0,15	Aa	0,22	Aa
1,33	Ab	1,35	Aa	0,17	Aa	0,15	Aa	0,10	Aa	0,12	Ab
1,27	Ab	1,29	Aa	0,09	Ab	0,11	Ab	0,09	Aa	0,09	Ab
1,27	Ab	1,30	Aa	0,09	Ab	0,10	Ab	0,09	Aa	0,16	Aa
1,25	Ab	1,12	Bb	0,11	Ab	0,08	Ab	0,14	Aa	0,07	Ab
1,13	Ac	1,14	Ab	0,09	Ab	0,09	Ab	0,06	Aa	0,11	Ab
1,43	Aa	1,14	Bb	0,09	Bb	0,20	Aa	0,06	Aa	0,06	Ab

Fenil		catal 0'		catal 10'							
Não inoculado		Inoculado		Não inoculado		Inoculado					
2,34	Aa	2,33	Aa	2,26	Aa	2,11	Aa	2,28	Aa	2,13	Ab
2,34	Aa	2,35	Aa	2,20	Aa	2,27	Aa	2,26	Aa	2,35	Aa
2,35	Aa	2,41	Aa	2,08	Aa	2,04	Aa	2,12	Aa	2,05	Ab
2,21	Ab	2,23	Ab	2,05	Ab	2,13	Aa	2,21	Aa	2,16	Ab
2,21	Ab	2,23	Ab	1,91	Ab	2,06	Aa	1,94	Ab	2,09	Ab
2,30	Aa	2,28	Ab	1,88	Aa	2,04	Aa	1,90	Ab	2,06	Ab
2,35	Aa	2,38	Aa	1,85	Aa	1,87	Ab	1,87	Ab	1,88	Ac
2,38	Aa	2,38	Aa	1,78	Aa	1,84	Ab	1,80	Ab	1,85	Ac
2,25	Ab	2,28	Ab	1,89	Ab	1,78	Ab	1,91	Ab	1,80	Ac
2,35	Aa	2,33	Aa	2,19	Aa	2,18	Aa	2,21	Aa	2,28	Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na HORIZONTAL não diferem entre si. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem entre si. prot: teor de proteínas, perox 0': atividade de peroxidase no tempo zero, perox 10': atividade de peroxidase no tempo de dez minutos, fenil: atividade de fenilalanina, catal 0': atividade da catalase no tempo zero, catal 10': atividade da catalase no tempo de 10 minutos.

Tabela 6. Teste de agrupamento de médias de Scott Knott a 5% de probabilidade comparando os efeitos de tempo (T) e de inoculação (I) no clone 3 resistente à ferrugem *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.

Prot		Perox 0'		Perox 10'	
Não inoculado	Inoculado	Não inoculado	Inoculado	Não inoculado	Inoculado
0,90 Ad	1,04 Ac	0,10 Ba	0,17 Aa	0,08 Ba	0,21 Aa
0,86 Ad	0,85 Ad	0,11 Ba	0,17 Aa	0,11 Aa	0,11 Ab
1,11 Ac	1,15 Ac	0,11 Aa	0,10 Ab	0,07 Aa	0,08 Ab
1,07 Ac	0,47 Be	0,11 Ba	0,16 Aa	0,12 Aa	0,11 Ab
1,24 Ab	1,25 Ab	0,12 Aa	0,14 Aa	0,11 Ba	0,18 Aa
1,31 Bb	1,53 Aa	0,09 Aa	0,11 Ab	0,08 Aa	0,10 Ab
1,32 Ab	1,29 Ab	0,10 Aa	0,09 Ab	0,11 Aa	0,08 Ab
1,30 Ab	1,27 Ab	0,10 Aa	0,11 Ab	0,12 Aa	0,09 Ab
1,34 Ab	1,26 Ab	0,11 Aa	0,11 Ab	0,06 Ba	0,13 Ab
1,50 Aa	1,43 Aa	0,09 Aa	0,12 Ab	0,06 Aa	0,08 Ab

Fenil		catal 0'		catal 10'	
Não inoculado	Inoculado	Não inoculado	Inoculado	Não inoculado	Inoculado
2,32 Ab	2,33 Ab	2,14 Ac	2,14 Aa	2,17 Ab	2,17 Aa
2,33 Ab	2,34 Ab	2,20 Ac	2,21 Aa	2,22 Ab	2,27 Aa
2,32 Bb	2,40 Aa	2,09 Ac	2,06 Aa	2,12 Ab	2,09 Aa
2,20 Ad	2,23 Ac	2,03 Ac	2,11 Aa	2,05 Ab	2,13 Aa
2,28 Ac	2,24 Ac	2,14 Ac	2,00 Ab	2,17 Ab	2,03 Ab
2,42 Aa	2,40 Aa	1,83 Ad	1,94 Ab	1,84 Ac	1,95 Ab
2,36 Ab	2,35 Ab	1,86 Ad	1,74 Ab	1,87 Ac	1,74 Ac
2,38 Aa	2,37 Aa	1,82 Ad	1,81 Ab	1,85 Ac	1,83 Ac
2,31 Ab	2,25 Bc	2,38 Ab	1,97 Bb	2,40 Ab	1,99 Bb
2,35 Ab	2,31 Ab	2,93 Aa	2,25 Ba	2,94 Aa	2,28 Ba

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na HORIZONTAL não diferem entre si. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem entre si. prot: teor de proteínas, perox 0': atividade de peroxidase no tempo zero, perox 10': atividade de peroxidase no tempo de dez minutos, fenil: atividade de fenilalanina, catal 0': atividade da catalase no tempo zero, catal 10': atividade da catalase no tempo de 10 minutos.

Nas tabelas 5 e 6, pode-se observar que tanto no clone medianamente resistente, quanto no clone resistente as plantas apresentaram resposta de defesa contra o patógeno inoculado, tendo em vista que a enzima peroxidase e catalase apresentaram um aumento considerável se compararmos os tempos 0 e 10 minutos entre as plantas não inoculadas e inoculadas, sendo a detoxificação das células, cicatrização de ferimentos e defesa contra patógenos, tipos de uma resposta de defesa que essas enzimas apresentam.

Tabela 7. Teste de agrupamento de médias de Scott Knott a 5% de probabilidade comparando os efeitos de tempo (T) e de clones não inoculados (C) com diferentes graus de resistência à ferrugem *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.

Prot						Perox 0'						Perox 10'					
Clone 1		Clone 2		Clone 3		Clone 1		Clone 2		Clone 3		Clone 1		Clone 2		Clone 3	
0,97	Ac	0,92	Ad	0,90	Ad	0,12	Aa	0,09	Bb	0,10	Ba	0,13	Aa	0,09	Ba	0,08	Ba
0,95	Ac	1,02	Ad	0,86	Bd	0,12	Aa	0,19	Aa	0,11	Ba	0,13	Aa	0,15	Aa	0,11	Aa
1,04	Ac	1,16	Ac	1,11	Ac	0,12	Ba	0,10	Ab	0,11	Aa	0,11	Aa	0,10	Aa	0,07	Aa
1,06	Ac	0,98	Ad	1,07	Ac	0,11	Aa	0,10	Ab	0,11	Ba	0,09	Ba	0,15	Aa	0,12	Aa
1,28	Ab	1,33	Ab	1,24	Ab	0,13	Aa	0,17	Aa	0,12	Aa	0,14	Aa	0,10	Aa	0,11	Ba
1,25	Ab	1,27	Ab	1,31	Ab	0,13	Aa	0,09	Ab	0,09	Aa	0,13	Aa	0,09	Aa	0,08	Aa
1,35	Aa	1,27	Ab	1,32	Ab	0,14	Aa	0,09	Ab	0,10	Aa	0,13	Aa	0,09	Aa	0,11	Aa
1,21	Ab	1,25	Ab	1,30	Ab	0,14	Aa	0,11	Ab	0,10	Aa	0,18	Aa	0,14	Aa	0,12	Aa
1,34	Aa	1,13	Bc	1,34	Ab	0,12	Aa	0,09	Ab	0,11	Aa	0,13	Aa	0,06	Aa	0,06	Ba
1,41	Aa	1,44	Aa	1,50	Aa	0,10	Ba	0,09	Bb	0,09	Aa	0,06	Ba	0,06	Aa	0,06	Aa

Fenil						catal 0'						catal 10'					
Clone 1		Clone 2		Clone 3		Clone 1		Clone 2		Clone 3		Clone 1		Clone 2		Clone 3	
2,33	Ab	2,34	Aa	2,32	Ab	2,26	Aa	2,26	Aa	2,14	Ac	2,30	Aa	2,28	Aa	2,17	Ab
2,33	Ab	2,34	Aa	2,33	Ab	2,31	Aa	2,20	Aa	2,20	Ac	2,33	Aa	2,26	Aa	2,22	Ab
2,31	Ab	2,35	Aa	2,32	Bb	2,10	Ab	2,08	Aa	2,09	Ac	2,14	Ab	2,12	Aa	2,12	Ab
2,24	Bd	2,21	Ab	2,20	Ad	2,07	Ab	2,05	Ab	2,03	Ac	2,09	Ab	2,21	Aa	2,05	Ab
2,23	Ad	2,21	Ab	2,28	Ac	1,99	Ab	1,91	Ab	2,14	Ac	2,01	Ab	1,94	Ab	2,17	Ab
2,29	Ac	2,30	Aa	2,42	Aa	2,08	Ab	1,88	Aa	1,83	Ad	2,10	Ab	1,90	Ab	1,84	Ac
2,39	Aa	2,35	Aa	2,36	Ab	1,90	Ac	1,85	Aa	1,86	Ad	1,91	Ac	1,87	Ab	1,87	Ac
2,38	Aa	2,38	Aa	2,38	Aa	1,85	Ac	1,78	Aa	1,82	Ad	1,86	Ac	1,80	Ab	1,85	Ac
2,30	Bc	2,25	Ab	2,31	Ab	1,59	Bd	1,89	Ab	2,38	Ab	1,61	Bd	1,91	Ab	2,40	Ab
2,36	Aa	2,35	Aa	2,35	Ab	2,21	Ba	2,19	Aa	2,93	Aa	2,25	Ba	2,21	Aa	2,94	Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na HORIZONTAL não diferem entre si. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem entre si. prot: teor de proteínas, perox 0': atividade de peroxidase no tempo zero, perox 10': atividade de peroxidase no tempo de dez minutos, fenil: atividade de fenilalanina, catal 0': atividade da catalase no tempo zero, catal 10': atividade da catalase no tempo de 10 minutos.

Tabela 8. Teste de agrupamento de médias de Scott Knott a 5% de probabilidade comparando os efeitos de tempo (T) e de clones inoculados (C) com diferentes graus de resistência à ferrugem *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.

Clone 1	Fenil		Clone 3	Clone 1	catal 0'		catal 10'										
	Clone 2	Clone 3			Clone 2	Clone 3	Clone 1	Clone 2	Clone 3								
2,34	Ab	2,33	Aa	2,33	Ab	2,18	Ab	2,11	Aa	2,14	Aa	2,21	Ab	2,13	Ab	2,17	Aa
2,34	Ab	2,35	Aa	2,34	Ab	2,24	Ab	2,27	Aa	2,21	Aa	2,27	Ab	2,35	Aa	2,27	Aa
2,33	Ab	2,41	Aa	2,40	Aa	2,16	Ab	2,04	Aa	2,06	Aa	2,19	Ab	2,05	Ab	2,09	Aa
2,29	Ac	2,23	Ab	2,23	Ac	2,11	Ab	2,13	Aa	2,11	Aa	2,13	Ab	2,16	Ab	2,13	Aa
2,22	Ad	2,23	Ab	2,24	Ac	2,12	Ab	2,06	Aa	2,00	Ab	2,16	Ab	2,09	Ab	2,03	Ab
2,30	Ac	2,28	Ab	2,40	Aa	2,13	Ab	2,04	Aa	1,94	Ab	2,15	Ab	2,06	Ab	1,95	Ab
2,39	Aa	2,38	Aa	2,35	Ab	1,84	Ac	1,87	Ab	1,74	Ab	1,86	Ac	1,88	Ac	1,74	Ac
2,37	Aa	2,38	Aa	2,37	Aa	1,81	Ac	1,84	Ab	1,81	Ab	1,83	Ac	1,85	Ac	1,83	Ac
2,40	Aa	2,28	Ab	2,25	Bc	1,87	Ac	1,78	Ab	1,97	Bb	1,96	Ac	1,80	Ac	1,99	Bb
2,38	Aa	2,33	Aa	2,31	Ab	2,57	Aa	2,18	Aa	2,25	Ba	2,65	Aa	2,28	Aa	2,28	Ba

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na HORIZONTAL não diferem entre si. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem entre si. prot: teor de proteínas, perox 0': atividade de peroxidase no tempo zero, perox 10': atividade de peroxidase no tempo de dez minutos, fenil: atividade de fenilalanina, catal 0': atividade da catalase no tempo zero, catal 10': atividade da catalase no tempo de 10 minutos.

As tabelas 7 e 8 visam comparar os efeitos do tempo em clones inoculados e não inoculados em relação as enzimas analisadas. Dentre elas as enzima que apresentaram um melhor tempo foi a peroxidase tendo reconhecido o patógeno com 24h após a inoculação no clone 125, 160 e 199. Já para a enzima fenilalanina a alteração na atividade se deu às 6 horas no clone resistente, e na enzima catalase o primeiro pico se deu às zero horas.

Tabela 9. Estimativas do teste F da análise de variância dos efeitos de tempo e inóculo em três diferentes clones de *Coffea canephora* com diferentes graus de resistência à ferrugem *Hemileia vastatrix* (Clone 1-suscetível, Clone 2- medianamente resistente, Clone 3- resistente)

FV	GL	Clones não inoculados (NI)					
		Prot	Perox 0'	Perox 10'	Fenil	catal 0'	catal 10'
Tempo (T)	9	21.58**	1.80 ^{ns}	3.78**	9.12**	3.01*	3.00*
Clones (C)	2	0.17 ^{ns}	2.26 ^{ns}	5.05*	0.95 ^{ns}	1.35 ^{ns}	1.01 ^{ns}
T x C	18	3.01**	1.11 ^{ns}	0.87 ^{ns}	4.67**	7.18**	7.11**
Resíduo	90	-	-	-	-	-	-
Total	119	-	-	-	-	-	-
Média	-	1,18	0,11	0,1	2,31	2,06	2,08
CV(%)	-	6,27	34,25	43,2	1,21	6,92	6,97

FV: fonte de variação, GL: graus de liberdade, **: significativo a 1% de probabilidade, *: significativo a 5% de probabilidade, ns: não significativo, prot: teor de proteínas, perox 0': atividade de peroxidase no tempo zero, perox 10': atividade de peroxidase no tempo de dez minutos, fenil: atividade de fenilalanina, catal 0': atividade da catalase no tempo zero, catal 10': atividade da catalase no tempo de 10 minutos. CV: coeficiente de variação.

Tabela 10. Estimativas do teste F da análise de variância dos efeitos de tempo e inóculo em três diferentes clones de *Coffea canephora* com diferentes graus de resistência a ferrugem *Hemileia vastatrix* (Clone 1-suscetível, Clone 2- medianamente resistente, Clone 3- resistente)

FV	GL	Clones inoculados (I)					
		Prot	Perox 0'	Perox 10'	Fenil	catal 0'	catal 10'
Tempo (T)	9	4.10**	1.48 ^{ns}	1,7 ^{ns}	4.98**	14.30**	15.55**
Inóculo (I)	2	0.10 ^{ns}	1.53 ^{ns}	1.13 ^{ns}	0.45 ^{ns}	3.08 ^{ns}	3.45 ^{ns}
T x I	18	10.35**	1.93*	1.47 ^{ns}	2.46**	1.00 ^{ns}	1.06 ^{ns}
Resíduo	90	-	-	-	-	-	-
Total	119	-	-	-	-	-	-
Média	-	1,16	0,12	0,13	2,32	2,05	2,08
CV(%)	-	8,68	30,51	55,3	2,16	7,72	7,63

FV: fonte de variação, GL: grau de liberdade, **: significativo a 1% de probabilidade, *: significativo a 5% de probabilidade, ns: não significativo, prot: teor de proteínas, perox 0': atividade de peroxidase no tempo zero, perox 10': atividade de peroxidase no tempo de dez minutos, fenil: atividade de fenilalanina, catal 0': atividade da catalase no tempo zero, catal 10': atividade da catalase no tempo de 10 minutos. CV: coeficiente de variação.

As tabelas 9 e 10 apresentam os diferentes graus de resistência dos clones avaliados quando comparados entre plantas inoculadas e não inoculadas e como elas reagiram ao longo dos tempos. Entre elas a enzima fenilalanina apresentou melhor resultado em relação ao tempo, apresentando uma resposta mais rápida no clone resistente.

4.1 ATIVIDADE DE PROTEÍNAS

Após a quantificação dos teores de proteínas totais, observou-se que, nos Clones 125 e 160, houve um aumento nos teores de proteínas nos tempos finais do experimento (Figuras 4 e 5). Esse aumento ocorreu tanto nas plantas inoculadas quanto nas plantas controle. O clone 125 mostrou um aumento nas plantas inoculadas nos tempos 96 hai e 168 hai. No clone 199 os teores de proteínas se mantiveram estáveis ao longo do experimento (Figura 6). Entretanto, diferente dos demais clones, este mostrou um aumento nos teores de proteínas no tempo 72 hai. Isso pode estar relacionado a uma síntese *de novo* em resposta ao ataque do patógeno, podendo ser uma característica do clone resistente.

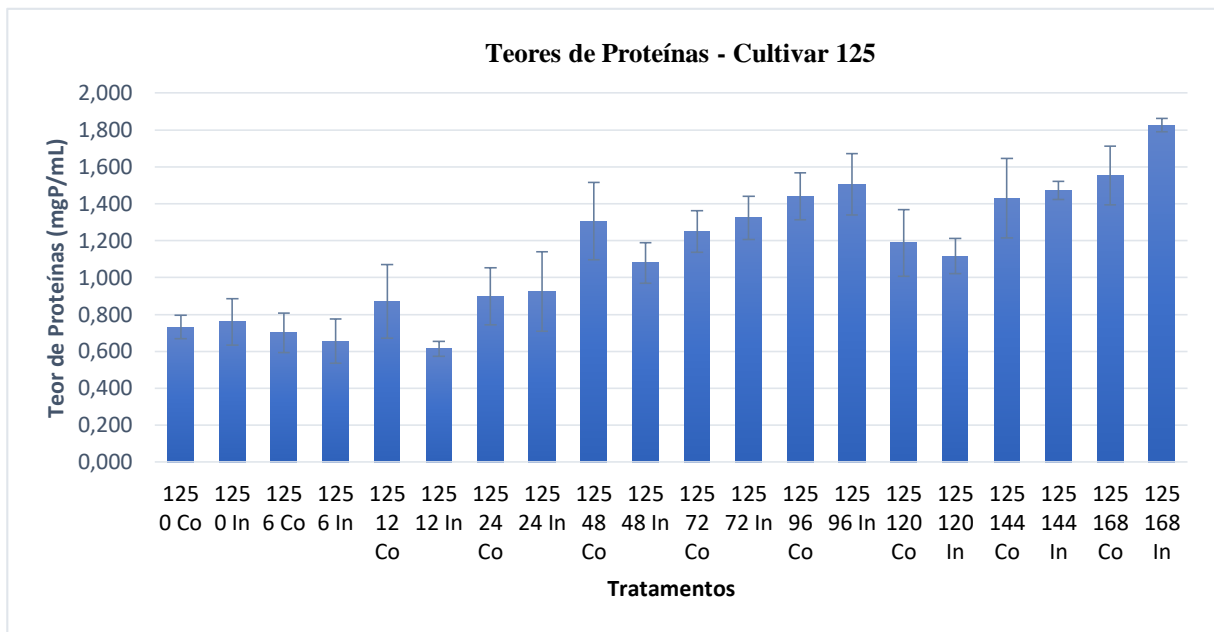


Figura 4. Teores de proteínas no clone 125, na presença e ausência de esporos de *H. vastatrix*, nos diferentes tempos experimentais (0 – 168 horas após a inoculação).

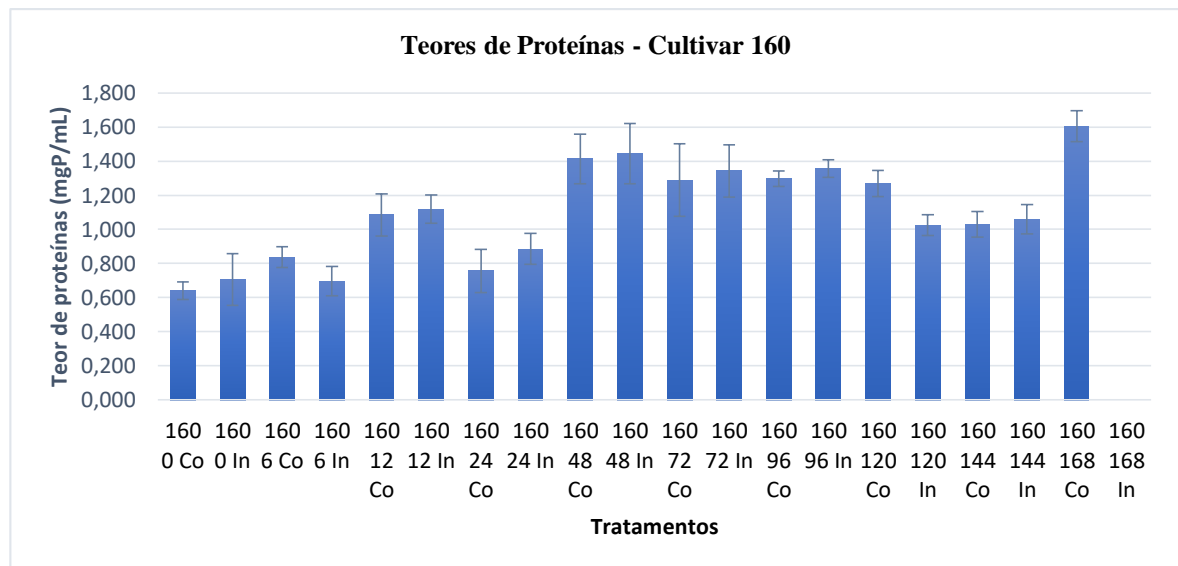


Figura 5. Teores de proteínas no clone 160, na presença e ausência de esporos de *Hemileia vastatrix*, nos diferentes tempos experimentais (0 – 168 horas após a inoculação).

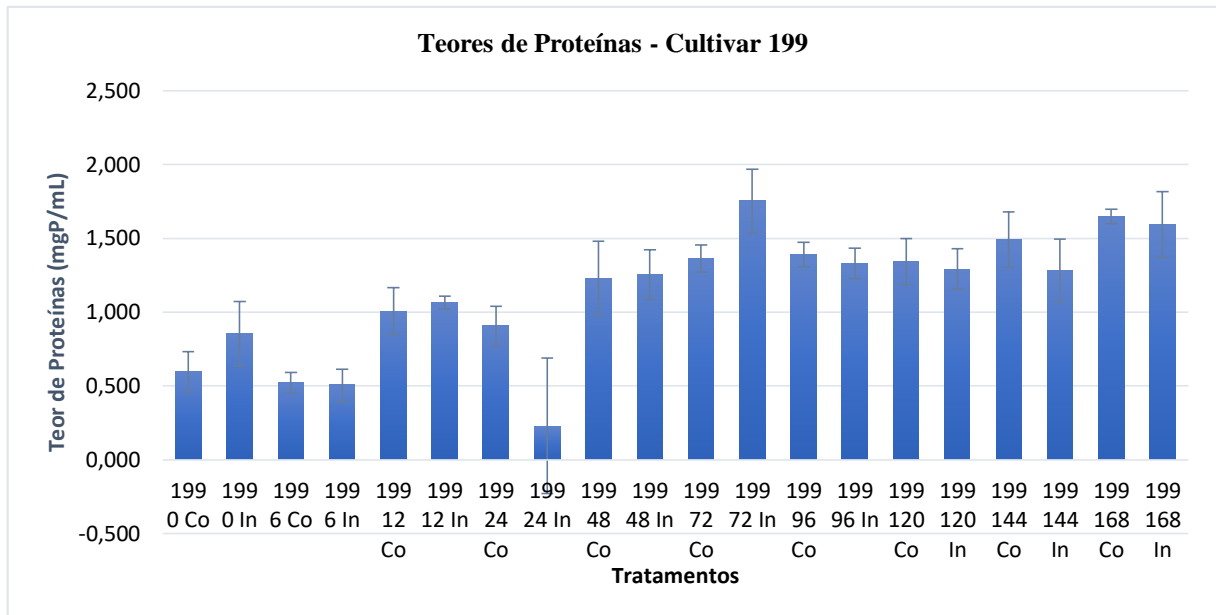


Figura 6. Teores de proteínas no clone 199, na presença e ausência de esporos de *H. vastatrix*, nos diferentes tempos experimentais (0 – 168 horas após a inoculação).

4.2 ATIVIDADE PEROXIDÁSICA (POX)

Na atividade de peroxidase pode-se observar que a resposta desta enzima se deu após 24 horas nos clones 125 (Figura 7), 160 (Figura 8) e no clone 199 (Figura 9). Pode-se observar que os níveis de atividade POX já mais elevados nos clones 160 e 199, o que pode ser devido as características de moderada resistência do 160 e de resistência do clone 199.

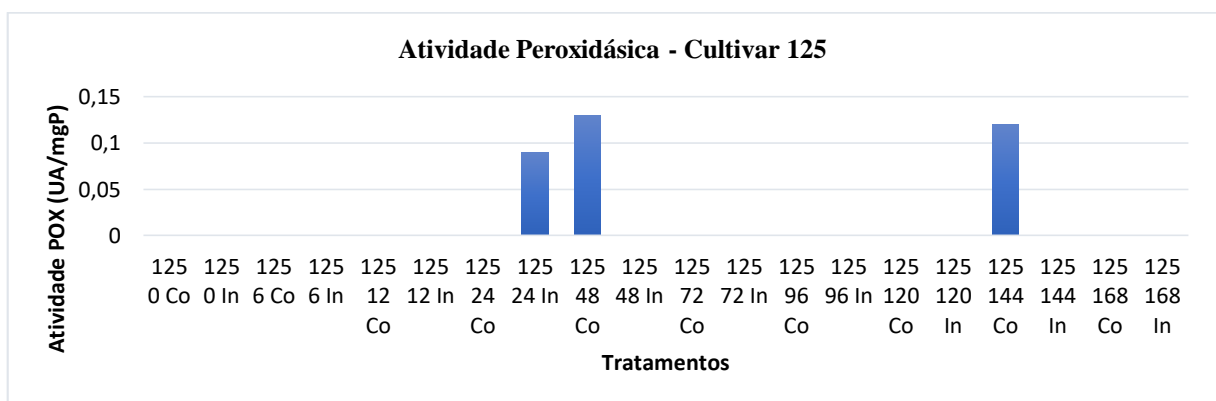


Figura 7. Resposta do aumento da atividade peroxidásica no clone 125 no período de 0 a 168h após a inoculação com esporos de *H. vastatrix*.

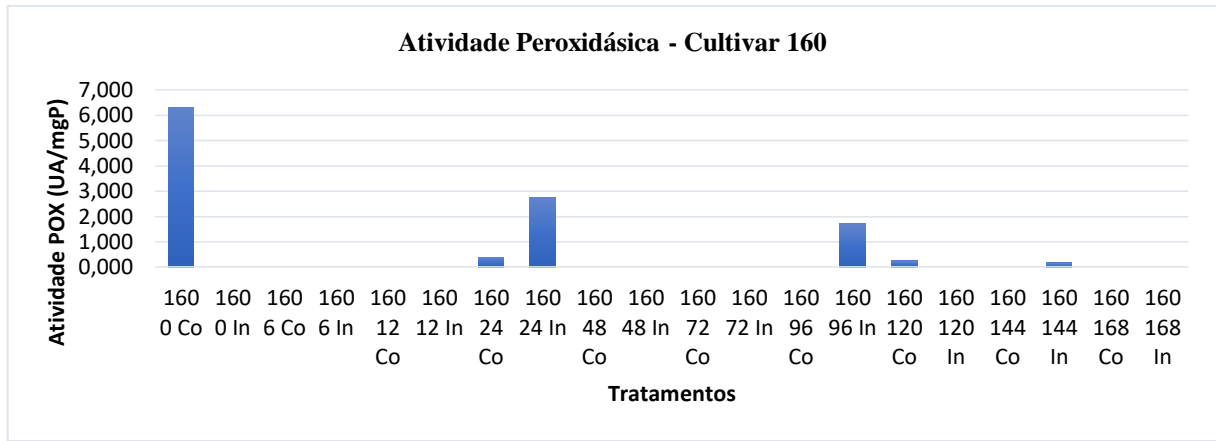


Figura 8. Resposta do aumento da atividade peroxidásica no clone 160 no período de 0 a 168h após a inoculação com esporos de *H. vastatrix*.

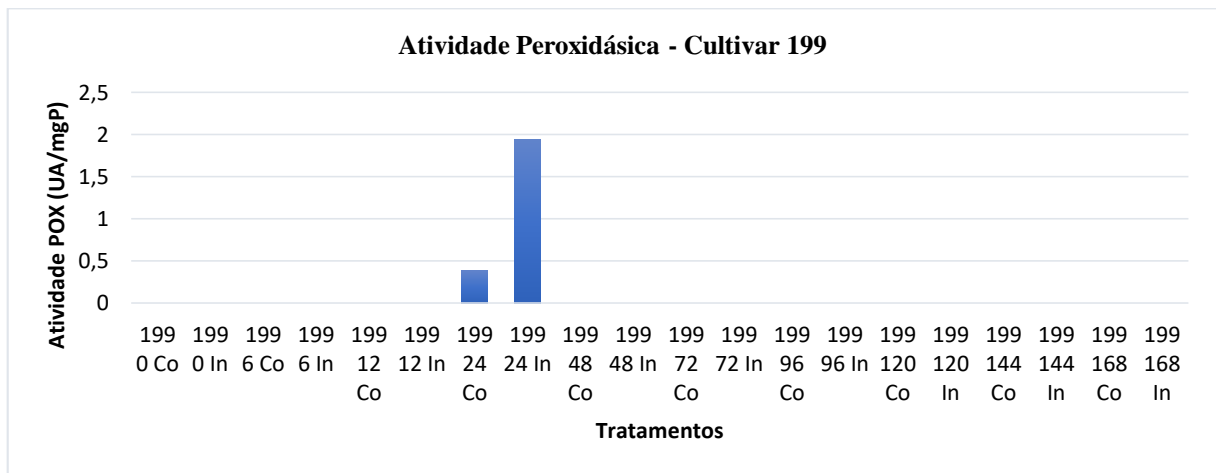


Figura 9. Resposta do aumento da atividade peroxidásica no clone 199 no período de 0 a 168h após a inoculação com esporos de *H. vastatrix*.

Os níveis de atividade POX foram maiores nas cultivares medianamente resistente e na resistente. Essas atividades também foram induzidas no tempo 24 hai em ambas as cultivares, com aumento de 7 e 5 vezes, respectivamente, quando comparamos as plantas não inoculadas e inoculadas.

Os resultados obtidos no presente estudo, embora indique o aumento da atividade POX 24 hai, sinalizam que esta enzima pode não estar participando de forma direta no mecanismo de defesa do cafeeiro contra o ataque de *H. vastatrix*. Essa participação poderia ocorrer de forma indireta, na participação nos processos de lignificação dos materiais resistentes. Para avaliar esse papel novos estudos necessitam ser conduzidos.

4.3 ATIVIDADE DE FENILALANINA (PAL)

Na atividade de PAL no clone 125 houve oscilação entre os tempos avaliados e seus respectivos controles. O pico máximo dessa atividade se deu às 48 horas após a inoculação

(Figura 10). Já nos clones 160 (Figura 11) e 199 (Figura 12) o pico desta atividade se deu no tempo 12 horas demonstrando uma rápida resposta bioquímica desses clones.

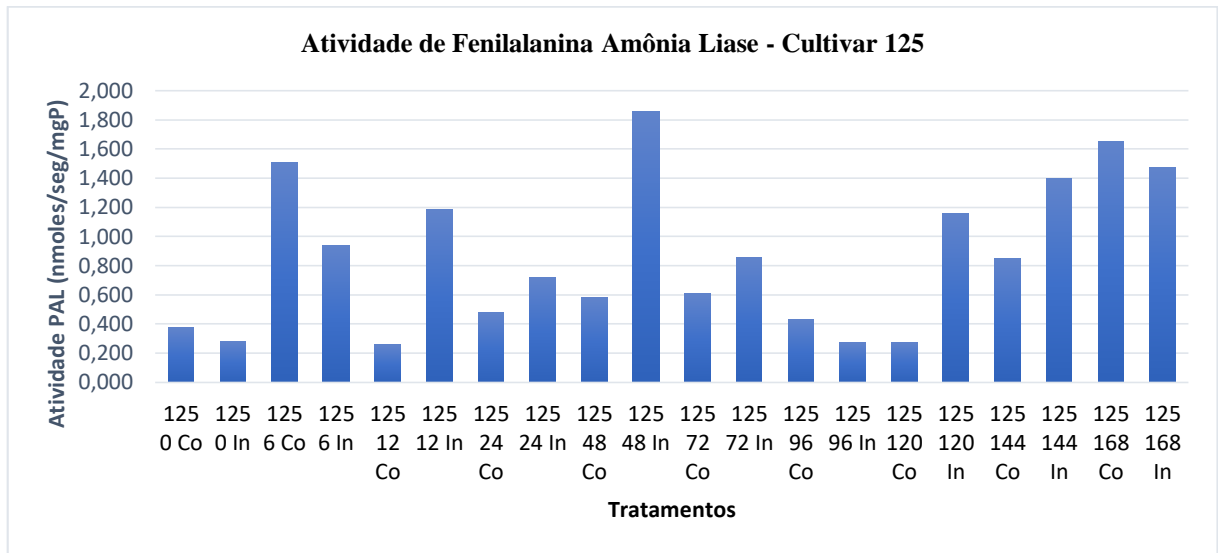


Figura 10. Resposta da atividade Fenilalanina Amônia Liase no clone 125 no período de 0 a 168 horas após a inoculação com esporos de *H. vastatrix*.

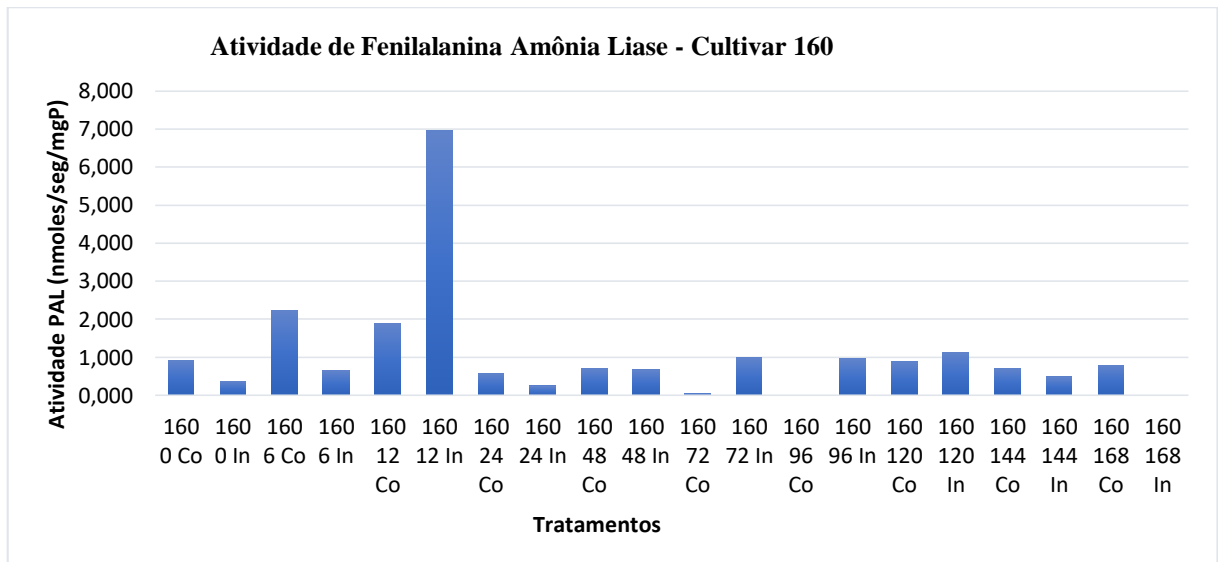


Figura 11. Resposta da atividade Fenilalanina Amônia Liase no clone 160 no período de 0 a 168 horas após a inoculação com esporos de *H. vastatrix*.

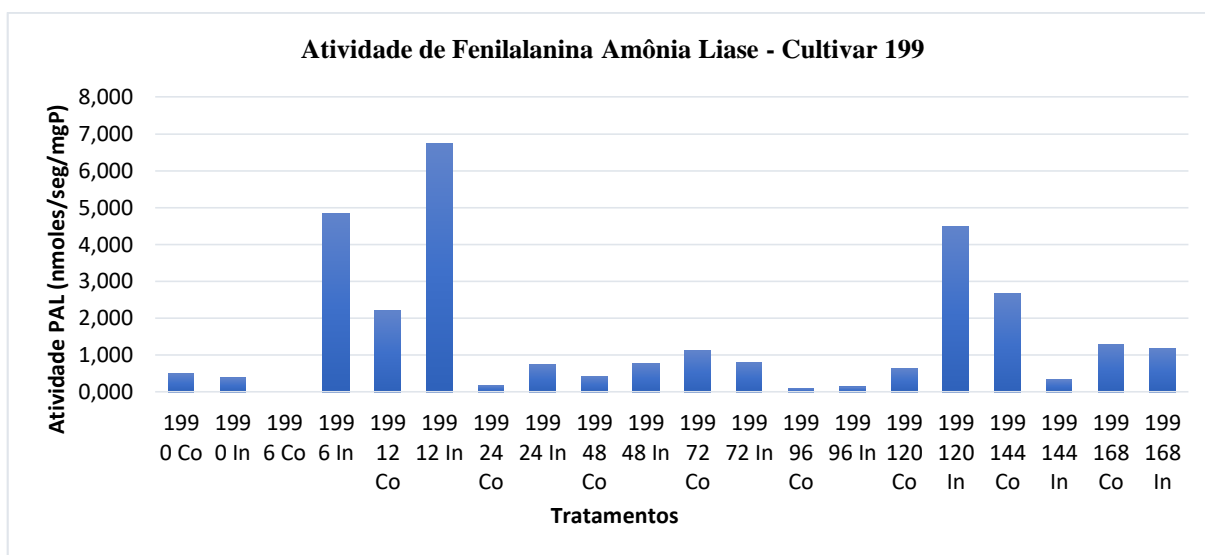


Figura 12. Resposta da atividade Fenilalanina Amônia Liase no clone 199 no período de 0 a 168 horas após a inoculação com esporos de *H. vastatrix*.

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que, após a inoculação com o fungo, um aumento na atividade PAL foi observado em todos os clones avaliados após 12 horas de inoculação. O aumento de atividade foi de 4,6, 3,7 e 3,1 vezes para os clones 125, 160 e 199, respectivamente. Embora tenha apresentado maiores níveis de aumento da atividade PAL, o clone 125, que é suscetível, apresenta níveis de atividade inferiores aos outros dois clones, indicando que, mesmo apresentando uma resposta, esta não atinge os mesmos patamares da resposta dos clones resistentes.

4.4 ATIVIDADE DE CATALASE (CAT)

Após a quantificação da atividade de catalase pode-se observar que os clones analisados apresentaram um pico de atividade CAT 12 h em todos os clones avaliados (Figuras 13, 14 e 15). Os níveis de atividade CAT foram maiores no clone 125, seguido pelo clone 160 e pelo clone 199.

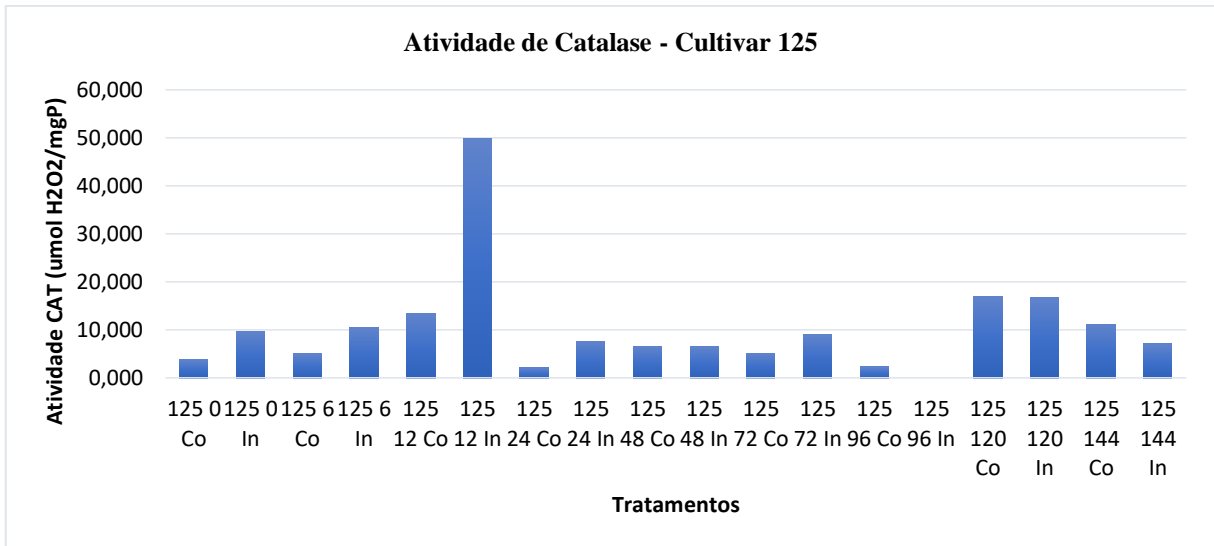


Figura 13. Resposta da atividade de catalase no clone 125 no período de 0 a 144 horas após a inoculação com esporos de *H. vastatrix*.

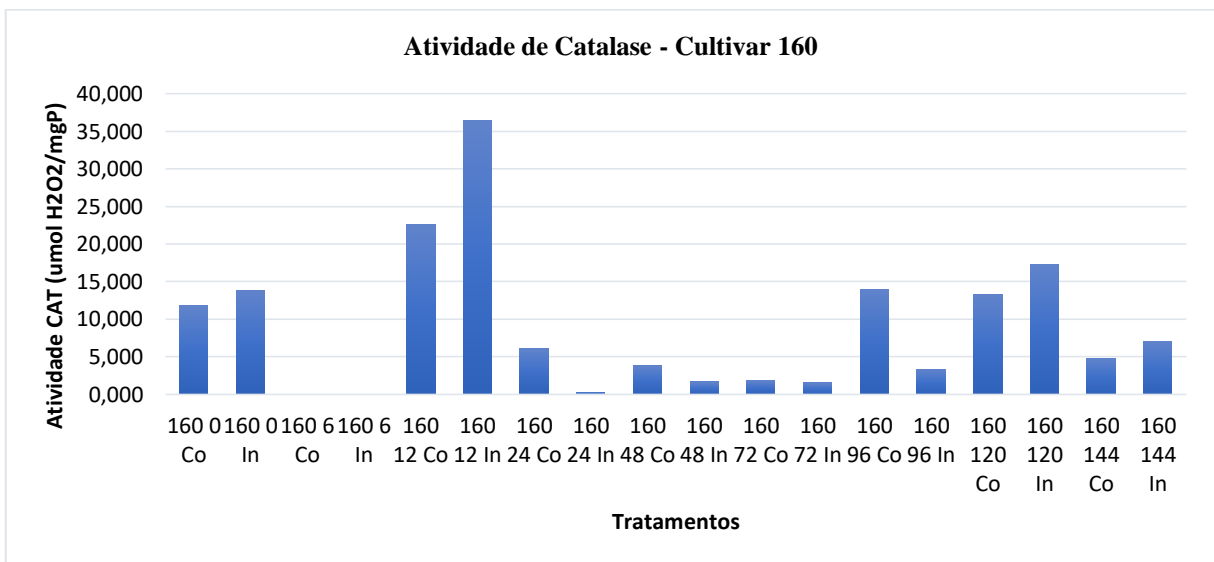


Figura 14. Resposta da atividade de catalase no clone 160 no período de 0 a 144 horas após a inoculação com esporos de *H. vastatrix*.

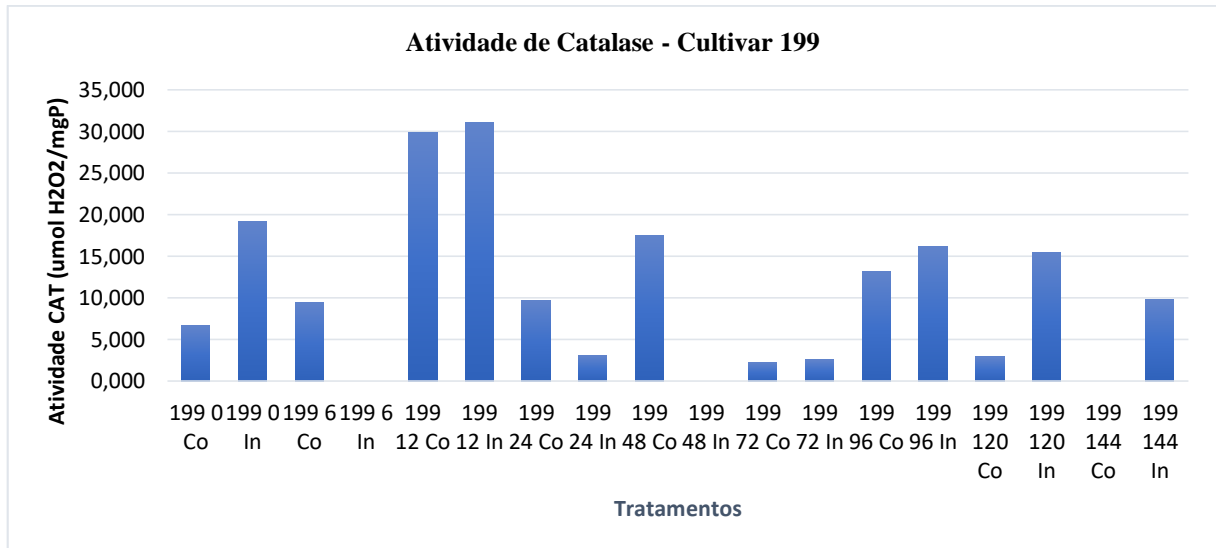


Figura 15. Resposta da atividade de catalase no clone 199 no período de 0 a 144 horas após a inoculação com esporos de *H. vastatrix*.

No presente estudo foi observado um aumento da atividade CAT, com níveis de atividade 3,7, 1,6 e 1,04 vezes para os clones 125, 160 e 199, respectivamente. O maior aumento no clone suscetível traz para o centro da discussão os possíveis mecanismos pelos quais essas enzimas poderiam participar do mecanismo de defesa do cafeeiro ao ataque do fungo *H. vastatrix*.

Para tentar contribuir nessa elucidação o presente estudo verificou um aumento da atividade PAL. Esse aumento poderia levar a um aumento na produção de ácido salicílico, com redução da atividade de catalase e consecutivo aumento de peróxido de hidrogênio. Esse aumento poderia levar a um aumento da morte celular, visando impedir a penetração do patógeno.

Essa estratégia parece ser interessante para os clones 160 e 199, medianamente e resistente, visto que o patógeno é um organismo biotrófico, necessitando de tecido vivo para sua dispersão. Por outro lado, para o clone suscetível, o aumento da atividade de catalase leva a uma redução do acúmulo de peróxido de hidrogênio, reduzindo a morte celular e favorecendo, assim, a dispersão do patógeno.

3 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho em relação a quantificação de proteínas totais corroboram com os de Galeano (2019) que quantificando proteínas de milho após a inoculação com novas estirpes de bactérias da espécie *A. brasilense*, observou que a inoculação proporcionou um aumento na concentração proteica em comparação ao controle sem inoculação.

Após a infecção por alguns agentes químicos ou ambientais algumas enzimas chave são ativadas e a partir de suas alterações é possível acompanhar o estado de indução de resistência em plantas expostas a patógenos (MACAGNAN *et al.*, 2008).

Nas plantas a adaptação e a resistência podem ser explicadas por alterações no metabolismo da célula vegetal, entre elas a síntese de proteínas de defesa, expressas por genes específicos que são ativados assim que a planta entra em contato com o agressor, desencadeando uma ou mais reações de defesa, porém quando isso não acontece a doença pode ocorrer (RYAN, 2000; PINTO, 2011).

Com relação a peroxidase podemos dizer que estas estão relacionadas com os processos de crescimento e diferenciação celular e mudanças morfogênicas em resposta aos estresses físico, químico e biológico, podendo ser provocadas por ferimentos, infecções por fungos, salinidade, déficit hídrico, déficit nutricional, dentre outros. O aumento da atividade desta enzima em plantas submetidas a estas condições pode ser fator determinante da capacidade de adaptação dessas plantas, podendo essa atividade ser identificada como um marcador bioquímico de estresse (PIZA *et al.*, 2003).

Plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*), na presença do fungo *Thanatephorus cucumeris*, em tratamentos água/fungo e ácido salicílico/fungo mostrou um aumento significativo da atividade POX, 5,5 e 19 vezes quando comparado com o tempo inicial (T0), respectivamente, com picos de atividade em 24 e 72 hai (FERNANDES *et al.*, 2020).

Plantas de tomate tratadas com polissacarídeos extraídos de microalgas mostraram um efeito significativo na indução da atividade de peroxidase. Esse aumento chegou a alcançar níveis superiores a 40% quando comparadas plantas controle e plantas tratadas com os polissacarídeos de microalgas (RACHIDI *et al.*, 2021).

O papel de compostos fenólicos e das enzimas peroxidase e polifenoloxidase na resposta contra *Leucoptera coffeella* foi avaliado em cafeeiro, *C. arabica* e *C. racemosa*. Nesse estudo, o aumento da atividade peroxidásica foi observado apenas em *C. racemosa* (RAMIRO *et al.*, 2006).

Silva et al. 2002 realizaram estudos citológicos conduzidos com plantas suscetíveis e resistentes de *C. arabica* inoculadas com o fungo *H. vastatrix* os quais evidenciaram um

aumento da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), que está relacionada com a síntese de compostos fenólicos no metabolismo secundário.

A PAL é uma enzima chave para todas as vias de síntese de compostos fenólicos, os quais estão envolvidos com resistência a pragas e patógenos (RAHMAN e PUNJA, 2005).

A fenilalanina amônia liase (PAL) é uma enzima que está em um ponto de ramificação entre o metabolismo primário e secundário, de modo que a reação catalisada por ela é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos, sendo uma das principais enzimas que atuam na formação dos precursores da lignina, atuando na resposta de defesa das plantas reforçando as paredes celulares contra invasão dos patógenos, catalisando a formação de ácido cinâmico pela remoção de uma molécula de amônia da fenilalanina (RAES *et al.*, 2003) (GARCIA e CARRIL, 2009).

Estudos com calos de nabo na presença do fungo *Plasmodiophora brassicae* mostraram um aumento na atividade PAL em 4 a 6 vezes quando comparadas amostras inoculadas e não inoculadas (TAKAHASHI *et al.*, 2002). A aplicação de polissacarídeos extraídos de microalgas, induziram um aumento na atividade PAL em plantas de tomateiro, sugerindo a participação dessa enzima no mecanismo de defesa de plantas (RACHIDI *et al.*, 2021).

Efeito bioestimulante de polissacarídeos extraídos da microalga verde *Chlorella sorokiniana* foi verificado em plantas de tomateiro. Aumento nas atividades de beta-1,3-glucanases, lipoxigenase, peroxidase do ascorbato, catalase, peroxidase e fenilalanina amônia liase foram observados. Para a atividade PAL, esse aumento chegou a mais de 180%, quando comparado com plantas não tratadas (FARID *et al.*, 2019).

Nas plantas a adaptação e a resistência traduzem-se por alterações no metabolismo da célula vegetal, entre elas a síntese de proteínas de defesa, expressas por genes específicos (PINTO, 2011). A velocidade com que a planta reconhece a presença do agressor determina o tempo de resposta à invasão, desencadeando uma ou mais reações de defesa (RYAN, 2000). As combinações de características estruturais e reações bioquímicas que as plantas usam para se defender são diferentes em diversos sistemas patógeno-hospedeiro, pois dependem de alguns fatores, como a idade do vegetal, o tipo de órgão e tecido atacado, a condição nutricional e o clima (TEIXEIRA, 2011).

Estudos de Alarcon & Malone (1995) avaliando a injúria em tomate demonstraram que a idade da planta influencia a indução de inibidores de proteinase em resposta à lesão. Esses dados evidenciam que a expressão de proteínas em plantas feridas não é um processo somente dependente da lesão, mas também do estado fisiológico do vegetal.

Segundo Macheix *et al.* (1986), há uma diferente resposta entre cultivares e estádios de desenvolvimento das plantas no acúmulo de compostos fenólicos e a resposta aos ferimentos.

A ativação do metabolismo de fenóis após uma infecção, segundo esses autores, pode levar mais ou menos tempo, dependendo da formação de moléculas mais simples e de sua integração com estruturas químicas mais complexas, podendo este fenômeno ser interpretado como parte da indução de resistência de uma planta.

Alguns autores descreveram um aumento na atividade de algumas proteínas de cafeeiro em resposta ao ataque de *H. vastatrix*, tais como quitinases e β -1,3-glucanases (SILVA *et al.*, 2002), lipoxigenase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase (ROJAS *et al.*, 2003), polifenoloxidase (MELO *et al.*, 2006). Com isso há a necessidade agora de identificar qual ou quais enzimas estão envolvidas na resposta e como estas reagem a condições de estresse da planta em relação ao patógeno.

Nesse estudo, para o clone 125, suscetível, verificou-se um aumento da atividade PAL. Entretanto os níveis de atividade dessa enzima são baixos, o que poderia não ser suficiente para induzir um aumento na produção do ácido salicílico, deixando, assim, a enzima catalase atuar sobre o peróxido de hidrogênio, reduzindo seus níveis, e diminuindo a morte celular nos tecidos afetados. O fungo *H. vastatrix* é um patógeno biotrófico, que precisa do tecido vivo para se instalar, o que aconteceria no clone 125.

Os clones 160 e 199, resistentes, apresentam níveis de atividade PAL elevados. Isso levaria a um aumento na produção de ácido salicílico, redução de atividade catalásica, aumento de peróxido de hidrogênio e maior ocorrência de morte celular nos tecidos afetados, levando a um bloqueio na penetração do fungo *H. vastatrix*.

Com isso, a realização de estudos posteriores permitirá elucidar o mecanismo de defesa do cafeeiro e o papel desses compostos na interação com o fungo *H. vastatrix*.

4 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo sugerem o envolvimento das enzimas fenilalanina amônia liase e catalase no mecanismo de defesa do cafeeiro contra o ataque do fungo *H. vastatrix*. Possivelmente, a atuação dessas enzimas estaria controlando os níveis de compostos envolvidos no processo de morte celular, que restringiria/reduziria e até mesmo favoreceria o processo de infecção do fungo. O estudo também indica a possível participação da enzima peroxidase, que poderia atuar no controle dos níveis de peróxido de hidrogênio ou no processo de lignificação celular.

Fica assim aberta uma linha de investigação que visará identificar, em estudos posteriores, os níveis desses compostos envolvidos nos diferentes processos metabólicos do cafeeiro, visando, com isso, identificar os compostos envolvidos nessa interação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARCON, J.J.; MALONE, M. The influence of plant age on wound induction of proteinase inhibitors in tomato. **Physiologia Plantarum**, v. 95, p. 423 – 427, 1995.
- ANDERSON, M.D., PRASAD, T.K., STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, v. 109, n. 4, p. 1247 - 1257, 1995.
- ARDILA H.D.; MARTÍNEZ, S.T.; HIGUERA B.L. Levels of constitutive flavonoid biosynthetic enzymes in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivars with differential response to *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 4, p. 1233 – 1245, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1162-0>
- BARBOSA, M.R.; SILVA, M.M. de A.; ULISSES, L. W.C.; CAMARA, T.R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, p. 453 - 460, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782014000300011>
- BAYSAL, O.; SOYLU, E.M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. michiganensis. **Plant Pathology**, v. 52, p. 747 - 753, 2003. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2003.00936.x>
- BELAN, L.L.; JESUS JUNIOR, W.C.; SOUZA, A.F.; ZAMBOLIM, L.; TOMAZ, M.A.; ALVES, F.R.; FERRÃO, M.A.G.; AMARAL, J.F.T. Monitoring of leaf rust in conilon coffee clones to improve fungicide use. **Australasian Plant Pathology**, v. 44, n. 1, p. 5 - 12, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13313-014-0310-y>
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 - 254, 1976.
- BREUSEGEM, V.; VRANOVÁ, F.; DAT, E.; JAMES, F. DIRK, I. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**. v. 161, p. 405 - 414, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00452-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00452-6)
- CAPUCHO, Alexandre Sandre. **Epidemiologia e resistência do cafeeiro conilon à ferrugem**. 2011. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.
- CARVALHO, A.; ESKES, A.B.; CASTILLO, J.; SREENIVASAN, M.S.; ECHEVERRI, J.H.; FERNANDEZ, C.E.; FAZUOLI, L. C. Breeding programmes. In: Kushalappa, A. C.; Eskes, A. B. *Coffee rust: epidemiology, resistance and management*. Boca Raton, CRC Press. p. 293 - 335, 1989.
- CARVALHO, V. L.; CUNHA, R. L.; SILVA, N. R. N. Alternativas de controle de doenças do cafeeiro. **Coffee Science**, v. 7, n. 1, p. 42 - 49, 2012.
- CONAB, **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira – Café- v. 04 - SAFRA 2016, n. 05 - Quarto levantamento.
- CONAB, **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira – Café- v. 05 - SAFRA 2017, n. 06 - Quarto levantamento.

CONAB, **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira – Café- v. 04 - SAFRA 2020, n. 04 - Terceiro levantamento.

CONAB, **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira - Café, v.01 - SAFRA 2022, n.01 – Primeiro Levantamento.

CUI, H., TSUDA, K.; PARKER, J.E. Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, p. 487 – 511, 2015. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040012>

DEUNER, S.; ALVES, J.D.; FRIES, D.D.; ZANANDREA, I.; LIMA, A. A.; HENRIQUE, P. de C. et al. Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro. **Revista Ceres**, v. 55, p. 135 - 140, 2008.

DeYOUNG, B.J.; INNES, R.W. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. **Nature Immunology**, v. 7, p. 1243 – 1249, 2006. <https://doi.org/doi:10.1038/ni1410>

DHINGRA, O.D.& SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**, Boca Raton, CRC Press, 1995, 355 p.

FARID, R., MUTALE-JOAN, C.; REDOUANE, B., MERNISSI N.E.L.; ABDERAHIME, A.; LAILA, S.; ARROUSSI HICHAM, E.L. Effect of Microalgae Polysaccharides on Biochemical and Metabolomics Pathways Related to Plant Defense in *Solanum lycopersicum*. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 188, n.1, p. 225 - 240, 2019. doi: 10.1007/s12010-018-2916-y.

FAULKNER, C. Defense Mechanisms in Plants. **Encyclopedia of Immunobiology**, v.1, p. 389 – 396, 2016. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.12001-6>

FERNANDES, C.F.; VIEIRA JUNIOR, J.R.; SILVA, D.S.G.; REIS, N.D.; ANTUNES JÚNIOR, H. **Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos**, 2009.

FERNANDES, C.F.; VIEIRA JUNIOR, J.R.; AGUIAR, P.N.; SOUZA, M.F.; FREIRE, T.C.; FONSECA, A.S.; ALVES, R.C. Atividade peroxidásica em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Aporé na presença de ácido salicílico e *Thanatephorus cucumeris*. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v. 11, n.1, p.72 - 79, 2020. DOI: <http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2020.001.0008>

FERRÃO, M.A.G. et al. **Origem, Dispersão Geográfica, Taxonomia e Diversidade Genética de *Coffea canephora***. In: FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A.da; FERRÃO, M.A.G.; DE MUNER, L.H.. (Org.). **Café Conilon**. 2ª ed.Vitoria: DCM/Incaper, 2016, v. 1, p. 81 - 101.

FREITAS, F.M.F.; HIRATA, G.F.; CLEMENTE, E.; SCHMIDT, F.L. Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geleias. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 28 n. 1, p. 172 - 177, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000100025>

GARCIA, A.A., CARRIL, E.P. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca**. Serie Fisiología Vegetal. v. 2, n. 3, p. 119 - 145, 2009.

GALEANO, R.M.S.; CAMPELO, A.P.S.; MACKERT, A.; BRASIL, M.S. Desenvolvimento inicial e quantificação de proteínas do milho após inoculação com novas estirpes de *Azospirillum brasilense*. **Agricultura Neotropical**. v. 6, n. 2, p. 95 - 99, 2019. <https://doi.org/10.32404/rean.v6i2.2613>

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. **Plant Physiol**. v. 57 n. 2, p. 315 - 91976. doi: 10.1104/pp.57.2.315

KINNEAR, P.R.; GRAY, C.D. SPSS for windows made simple. Department of Psychology, University of Aberdeen. United Kingdom. 2000

MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R.S.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; LANNA-FILHO, R.; BATISTA, G.S.; POMELLA, AW.V. Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cacaueteiro expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 1, p. 34 - 37, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052008000100007>

MHAMDI, A.; QUEVAL, G.; CHAOUCH, S.; VANDERAUWERA, S.; BREUSEGEM, F. V.; NOCTOR, G. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models, **Journal of Experimental Botany**, V. 61, p. 4197 - 4220, 2010. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq282>

MARCOLAN, A.L. *et al.* **Cultivo dos cafeeiros conilon e robusta para Rondônia**. Porto Velho: EMBRAPA, 2009. 67 p. (EMBRAPA Rondônia: Sistema de Produção, 33).

MATIELLO, J.B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A.W.R.; ALMEIDA, S.R.; FERNANDES, D. R. Cultura de café no Brasil. Novo manual de recomendações. In: Matiello, J. B. MAPA/PROCAFÉ. Rio de Janeiro. p. 387, 2002.

MELO, G.A.; SHIMIZU, M.M.; MAZZAFERA, P. Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. **Phytochemistry**. v. 67, p. 277 - 285. 2006.

Ministério da Agricultura pecuária e Abastecimento – Mapa - Café no Brasil. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura-brasileira> 2018.

MORI, Y.; NAGAMINE, K.; TOMITA, N.; NOTOMI, T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 289, n. 1, p. 150 - 154, 2001.

NICHOLLS, P.; FITA, I.; LOEWEN, P.C. Enzymology and structure of catalases. *Advances In Inorganic Chemistry*, v. 51, p. 51 - 106, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0898-8838\(00\)51001-0](https://doi.org/10.1016/S0898-8838(00)51001-0)

PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends Plant Sci**. v. 9, n. 11, p. 534 - 40. 2004. doi: 10.1016/j.tplants.2004.09.002.

PARTELLI, F.L.; MORAES, W.B. Café conilon: qualidade e sucessão familiar, Alegre ES CAUFES, 188 p. 2018.

PAULO, E.M., MONTES, S.M.N.M., FISCHER, I.H. Progresso temporal da ferrugem alaranjada em cultivares de cafeeiro no oeste de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 80, n. 1, p. 59 - 64, 2013.

PIMENTEL G.F. Curso de Estatística Experimental. 14 ed. Piracicaba: Degaspari. p. 477, 2000.

PINTO, M.S.T.; RIBEIRO, J.M.; OLIVEIRA, E.A.G. O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. **Revista Brasileira de Biociências**, 2011.

PIZA, I.M.T.; LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G. Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 4, p. 361 - 366, 2003.

RACHIDI, F.; BENHIMA, R.; KASMI, Y.; SBABOU, L.; ARROUSSI, H. E. Evaluation of microalgae polysaccharides as biostimulants of tomato plant defense using metabolomics and biochemical approaches. **Sci Rep.** v. 13, n. 11, p. 930. 2021. doi: 10.1038/s41598-020-78820-2.

RAHMAN, M.; PUNJA, Z.K. Biochemistry of ginseng root tissues affected by rusty root symptoms. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2005.

RAMIRO, D.A., GUERREIRO-FILHO, O., MAZZAFERA, P. Phenol Contents, Oxidase Activities, and the Resistance of Coffee to the Leaf Miner *Leucoptera coffeella*. **J Chem Ecol.** v. 32, p. 1977 – 1988, 2006. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9122-z>

RAES, J; ROHDE, A; CHRISTENSEN, J.H; VAN DE PEER, Y; BOERJAN, W. Genome-Wide Characterization of the Lignification Toolbox in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 133, n. 3, p. 1051 - 1071, 2003.

REIS, E.M.; CASA, R.T.; BIANCHIN, V. Control of plant disease by crop rotation. **Summa Phytopathologica.** v. 37, n. 3, p. 85 - 91, 2011. DOI: 10.1590/S0100-54052011000300001

RIBEIRO, B.B.; MENDONÇA, L.M.V.L.; ASSIS, G.A.; MENDONÇA, J.M.A.; MALTA, M. R.; MONTANARI, F.F. Avaliação química e sensorial de blends de *Coffea canephora* Pierre e *Coffea arabica* L. **Coffee Science**, v. 9, n. 2, p. 178 - 186, 2014.

ROCHA, R.B., VIEIRA, D.S., RAMALHO, A.R., TEIXEIRA, A.L, Caracterização e uso da variabilidade genética de germoplasma de *coffea canephora* pierre ex froehner. **Coffe Science**, v. 8, n. 4, p. 478 - 485, 2013.

RODRIGUES-BRANDÃO, I., RODRIGUES, G.C.; VEIGA, A.D.; BARTHOLO G.F.; MARRACCINI, P.; FREITAS, T.; MATOS, N. M. S.; LOPES, A.M.; CARVALHO, M. A. F. **Metabolismo antioxidante enzimático de plantas de *coffea canephora* em condições de cerrado.** 2016.

ROJAS, M.L.; MONTES DE GÓMEZ, V.; OCAMPO, C.A. Stimulation of lipoxigenase activity in cotyledonary leaves of *coffee* reacting hypersensitively to the coffee leaf rust. **Physiological and Molecular Plant Pathology.** v. 43, p. 209 - 219, 2003.

RYAN, C.A. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. **Biochimica Biophysica Acta**, 2000.

- RYALS, J.A.; NEUENSCHWANDER, U.H.; WILLITS, M.G.; MOLINA, A.; STEINER, H.Y.; HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1809 - 1819, 1996.
- SCHWAN-ESTRADA, K.; STANGARLIN, R.; PASCHOLATI, S.F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.) Interação planta - patógeno: Fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 227 - 283.
- SOARES, A.M. SANTOS.; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica**, v. 1, n. 1, p. 9, 2007.
- SILVA, M.C.; NICOLE, M.; GUERRA-GUIMARÃES, L. RODRIGUES J.R. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the Orange rus (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 2002.
- SILVA, D.N, VÁRZEA, V.; PAULO, O.S.; BATISTA, D. Pegadas genômicas populacionais de adaptação, introgressão e recombinação do hospedeiro na ferrugem do café. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, p. 1742 - 1753, 2018.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.
- TAKAHASHI, H.; TAKITA, K.; KISHIMOTO, T.; MITSUI, T.; HORI, H. Ca²⁺ is required by cluroot resistant turnip cells for transient increases in PAL activity that follow inoculation with *Plasmodiophora brassicae*. **Journal of Phytopathology**, v. 150, p. 529 - 535, 2002.
- TALHINHAS, P.; BATISTA, D.; DINIZ, I.; VIEIRA, A.; SILVA, D.N.; LOUREIRO, A., TAVARES, S.; PEREIRA, A.P, AZINHEIRA, H.G, GUERRA-GUIMARÃES, L.; VÁRZEA, V.; SILVA, M.D.C. O patógeno da ferrugem do café, *Hemileia vastatrix*: Um século e meio nos trópicos. **Molecular Plant Pathology**. v. 18, p. 1039 - 1051, 2017.
- TANAKA, K. Fatigue crack propagation from a crack inclined to the cyclic tensile axis. **Engineering Fracture Mechanics**, v. 6, n. 3, p. 493 - 507, 1974.
- TEIXEIRA, R.A. Mecanismos de resistência a fitodoenças. **Revisão bibliográfica**. Goiânia, 2011.
- URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E; HERKA H. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 13, p. 43 - 50, 1991.
- VÁRZEA, V.M.P.; MARQUES, D. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: Zambolim, L.; Zambolim, E. M.; Várzea, V. M. P. (Eds). Durable Resistance to Coffee Leaf Rust. Viçosa: Editora UFV, 2005, p. 53 - 74.
- VENEZIANO, W.; FAZUOLI, L.C. Avaliação de cultivares de cafeeiros robusta (*Coffea canephora*) em Rondônia. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2000, Poços de Caldas, MG. **Anais**. Brasília: Embrapa Café/ Minasplan, p. 459 - 461, 2000.
- VENTURA, J.A., COSTA, H., LIMA, I.M. Manejo das doenças do cafeeiro conilon. In: Ferrão, R.G., FONSECA, A.F.A., Ferrão, M.A.G., Muner, L.H. (Ed.). **Café conilon**. Vitória: Incaper, p. 435 - 479, 2017.

VIEIRA, D.C., NOLDIN, J.A., DESCHAMPS, F.C., RESGALLA, C. Jr. Ecological risk analysis of pesticides used on irrigated rice crops in southern Brazil. **Chemosphere**. v. 162, p. 48 - 54, 2016. [https://doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.07.046](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.046).

VIEIRA JÚNIOR, J.R.; FERNANDES, C. de F.; RODRIGUES, V. G. S.; BENTES-GAMA, M. de M.; SILVA, D. S. G. da.; FERNANDES, S. R.; DIOCLECiano, J. M. **Avaliação da severidade ferrugem (*Hemileia vastatrix*) em cafeeiros (*Coffea canephora*) cultivados em condições de sombreamento**. Circular Técnica, 103. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2008.

VIEIRA JUNIOR, J.R.; FERNANDES, C.F. Doenças do cafeeiro. *In* Café na Amazônia. 2015.

VIEIRA JUNIOR, J.R., FONSECA, A.S. da., FREIRE, T.C. **Identificação e manejo de doenças do cafeeiro (*Coffea canephora*)**. Cap. 1, p. 11 - 43. 2020. *In*: VIEIRA JUNIOR, J. R.; COSTA, J. N. M. (Ed.). Guia de bolso: diagnose e manejo de doenças e pragas do cafeeiro na Amazônia. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2020. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1126495>

XIAODONG, C.; RICHARD, J. ROBERTS, AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 15, p. 3784 – 3795, 2001. <https://doi.org/10.1093/nar/29.18.3784>

YANG, Q.; BALINT-KURTI, P.; XU, M. Quantitative Disease Resistance: Dissection and Adoption in Maize. **Mol. Plant**. v. 10, p. 402 – 413, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2017.02.004>

ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R., COSTA, H., PEREIRA, A.A. & CHAVES, G.M. **Epidemiologia e controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.)**. *In*: Zambolim, L. (Ed.) O Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café. Viçosa, Minas Gerais. Suprema. p. 369 - 433, 2002.

ZAMBOLIM, L.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; VALE, F.X.R.; PEREIRA, A. A.; SAKYIAMA, N. S., CAIXETA, E.T. Physiological races of *Hemileia vastatrix* in Brazil: physiological variability, current situation and future prospects, 2005. *In*: Zambolim L, Maciel-Zambolim E, Várzea VMP (eds) Durable resistance to coffee leaf rust. UFV, Viçosa, p. 53 – 74.

ZAMBOLIM, L.; SOBREIRA, D.G.; SOUZA, A.F.; COSTA, H. Manejo integrado de doenças do conilon (*Coffea canephora*). *In*: Zambolim, L. (Ed.). **Tecnologias para produção do café conilon**. Viçosa, MG: UFV, 2009, 360 p.

ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 1, p. 1 - 8, 2016.

ANEXOS

Caracterização da resposta bioquímica de acessos de *Coffea canephora* quanto a resistência à ferrugem alaranjada

Characterization of the biochemical response of *Coffea canephora* accessions regarding resistance to orange rust

Caracterización de la respuesta bioquímica de accesiones de café *canephora* frente a la resistencia a la roya naranja

Recebido: 10/05/2022 | Revisado: 21/05/2022 | Aceito: 29/05/2022 | Publicado: 04/06/2022

Aline Souza da Fonseca

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4019-3412>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: alinesouzadafonseca@gmail.com

Tamiris Chaves Freire

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8938-3751>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: tamirischavesfreire@gmail.com

Jessica Silva Félix Bastos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8009-979X>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: jessicafelixbio@gmail.com

Simone Carvalho Sangi

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7365-015X>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: simonecarvalhosangi@gmail.com

Liliani Ogrodowczyk

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7497-8114>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: lili_wczyk@hotmail.com

Rodrigo Barros Rocha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5275-5315>
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasil
E-mail: rodrigo.rocha@embrapa.br

Marcelo Curitiba Espindula

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7481-9746>
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasil
E-mail: marcelo.espindula@embrapa.br

José Roberto Vieira Junior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7939-8119>
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasil
E-mail: jose-roberto.vieira@embrapa.br

Cléberon de Freitas Fernandes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5269-1139>
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasil
E-mail: cleberon.fernandes@embrapa.br

Resumo

Em situações de estresse abiótico ou biótico as plantas tendem a ativar respostas de defesa, sejam estruturais ou bioquímicas. Objetivou-se neste trabalho estudar a interação de clones de *Coffea canephora* x *Hemileia vastatrix*, identificar as respostas do hospedeiro na interação de incompatibilidade e de compatibilidade com o patógeno. Para tanto, mudas com 120 dias de idade dos clones da variedade BRS 'Ouro Preto' C199, C160 e C125, foram inoculadas com o patógeno ($1,5 \times 10^4$ uredósporos/mL) e as plantas foram levadas à câmara de inoculação à 25 °C e umidade relativa de 90% por até 168 horas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por teste de Tukey a 1% de significância. Após a quantificação das proteínas totais, é possível observar que nos Clones C199 e C160 a primeira resposta de aumento de teor de proteínas ocorreu após seis horas, sendo o pico máximo de produção ocorrido após 72 horas. E este dispersando-se levemente somente após 120 horas. No clone susceptível, a resposta só ocorreu após 48 horas, sendo este 20% inferior à variedade resistente e não houve um segundo pico de resposta, de produção. Para as atividades de peroxidase e fenilalanina-amônia-liase, o padrão de resposta semelhante foi observado para os clones em estudo, onde uma indução da atividade e a intensidade desta foram maiores nestes clones

resistentes. Este resultado sugere que há resposta bioquímica envolvida na resistência à ferrugem e esta deve ser especialmente investigada às 72 horas após a inoculação.

Palavras-chave: Atividade enzimática; Café; Clones; Melhoramento genético.

Abstract

In situations of abiotic or biotic stress, plants tend to activate defense responses, whether structural or biochemical. The objective of this work was to study the interaction of clones of *Coffea canephora* x *Hemileia vastatrix*, to identify the host responses in the interaction of incompatibility and compatibility with the pathogen. For that, seedlings with 120 days of age of the clones of the variety BRS 'Ouro Preto' C199, C160 and C125, were inoculated with the pathogen (1.5×10^4 urediniospores/mL) and the plants were taken to the inoculation chamber at 25 °C and 90% relative humidity for up to 168 hours. The data were submitted to analysis of variance and the means were compared by Tukey test at 1% of significance. After the quantification of total proteins, it is possible to observe that in Clones C199 and C160 the first increase in protein content occurred after six hours, with the maximum production peak occurring after 72 hours. And this dispersing slightly only after 120 hours. In the susceptible clone, the response only occurred after 48 hours, which was 20% lower than the resistant variety and there was no second peak of response, of production. For the activities of peroxidase and phenylalanine-ammonia-lyase, a similar response pattern was observed for the clones under study, where an induction of activity and its intensity were higher in these resistant clones. This result suggests that there is a biochemical response involved in rust resistance and this should be especially investigated at 72 hours after inoculation.

Keywords: Enzyme activity; Coffee; Clones; Genetical enhancement.

Resumen

En situaciones de estrés abiótico o biótico, las plantas tienden a activar respuestas de defensa, ya sean estructurales o bioquímicas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la interacción de clones de *Coffea canephora* x *Hemileia vastatrix*, para identificar las respuestas del huésped en la interacción de incompatibilidad y compatibilidad con el patógeno. Para ello, se inocularon plántulas con 120 días de edad de los clones de la variedad BRS 'Ouro Preto' C199, C160 y C125, con el patógeno ($1,5 \times 10^4$ urediniosporas/mL) y se llevaron las plantas a la cámara de inoculación a 25 °C y 90% de humedad relativa hasta por 168 horas. Los datos se sometieron a análisis de varianza y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey al 1% de significación. Luego de la cuantificación de las proteínas totales, es posible observar que en los Clones C199 y C160 el primer incremento en el contenido de proteína se presentó a las seis horas, ocurriendo el pico máximo de producción a las 72 horas. Y esta dispersándose ligeramente solo después de 120 horas. En el clon susceptible, la respuesta solo se presentó a las 48 horas, que fue un 20% menor que la variedad resistente y no hubo un segundo pico de respuesta, de producción. Para las actividades de peroxidasa y fenilalanina-amoniaco-liasa se observó un patrón de respuesta similar para los clones en estudio, donde la inducción de actividad y su intensidad fue mayor en estos clones resistentes. Este resultado sugiere que existe una respuesta bioquímica involucrada en la resistencia a la roya y esto debería investigarse especialmente a las 72 horas después de la inoculación.

Palabras clave: Actividad enzimática; Café; Clones; Mejoramiento genético.

1. Introdução

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e o segundo maior consumidor. Dentre os produtos agrícolas brasileiros, o café se destaca como um dos mais importantes, estando entre os cinco principais setores exportadores do agronegócio. Entre esses produtos, a soja fica em primeiro lugar representando 24,1% de participação nas exportações totais, seguido das carnes com 18,2%, produtos florestais com 14,3%, cereais, farinhas e preparações com 10,6% e café com 8,2% (MAPA, 2022).

A produção nacional de café para a safra 2022 está estimada em 55,7 milhões de sacas de 60kg, das quais aproximadamente 38,7 milhões são de café da espécie arábica e 17 milhões de sacas de conilon (CONAB, 2022).

Nesse contexto o Estado de Rondônia se destaca como o 5º maior produtor de café do país e o maior produtor da Região Norte, com estimativa de produção para 2022 de 2,49 milhões de sacas de 60kg (CONAB, 2022). Em Rondônia os municípios com maior produção de café são: Cacoal, São Miguel do Guaporé, Alta Floresta do Oeste, Nova Brasilândia do Oeste, Machadinho D'Oeste, Alto Alegre dos Parecis, e Buritis (CONAB, 2020).

Porém, alguns fatores podem diminuir drasticamente a produtividade cafeeira, como fatores bióticos e abióticos os quais podemos destacar longos períodos de seca e doenças fúngicas como a ferrugem do cafeeiro (Menezes-Silva et al., 2017)

A ferrugem-alaranjada causada por *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome é um fungo biotrófico obrigatório que ataca especificamente o cafeeiro, sendo a principal doença pelo nível de dano causado, acarretando o desfolhamento precoce em várias espécies do gênero *Coffea*, das quais *C. arabica* é a mais suscetível, comprometendo, em alguns casos em mais de 45%, a produção do cafeeiro em regiões onde as condições climáticas são favoráveis (Zambolim, 2016; Talhinhos et al., 2017; Silva et al., 2018; Alfonsi, et al. 2019).

Para minimizar os prejuízos causados pela ferrugem, é necessário adotar estratégias de controle. Dentre as principais medidas no controle da ferrugem a mais eficiente é a resistência genética, que pode ser expressa em forma qualitativa (absoluta) ou quantitativa (relativa), o que significa a possibilidade de haverem tanto plantas imunes quanto plantas que apresente níveis variáveis de resistência. Além disso, dentre as cultivares que apresentam resistência quantitativa, há aquelas que são altamente e moderadamente suscetíveis e aquelas que têm boa resistência (Campos et al., 2011).

Com isso, o propósito neste ensaio foi verificar o acúmulo e o aumento da atividade de enzimas relacionadas à resistência em plantas de cafeeiro, exibindo as características e os possíveis mecanismos de defesa do cafeeiro contra o patógeno, entendendo a interação planta-patógeno e o desenvolvimento de estratégias de controle dessa doença.

2. Metodologia

O ensaio de avaliação das respostas de defesa foi conduzido na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Porto Velho, Rondônia, com mudas de cafeeiro resistentes e susceptíveis à *H. vastatrix* provenientes do campo experimental da Embrapa/RO.

2.1 Inoculação

Folhas naturalmente infectadas com *H. vastatrix* foram coletadas no campo experimental da Embrapa – RO. Em seguida, os urediniósporos foram retirados das folhas com auxílio de um pincel de ponta macia, acondicionados em tubos tipo penicilina e guardados em geladeira até a utilização.

Para a inoculação foi preparada uma suspensão de propágulos dos patógenos ($1,5 \times 10^4$ esporos/ml) medida em câmara de Neubauer. Antes da inoculação foi realizado o teste de viabilidade do inóculo, determinando a porcentagem de urediniósporos germinados.

Após o período de 48 horas as mudas de cafeeiro foram aspergidas com a suspensão na superfície abaxial das folhas, de acordo com Dhingra & Sinclair (1995). Foram usadas as plantas da variedade BRS Ouro Preto (Clones 199, 160 e 125 sendo estes, resistente à ferrugem, resistência mediana e susceptível, respectivamente). As plantas inoculadas foram mantidas no escuro com umidade relativa de 90% até o momento da coleta. As plantas controles, não inoculadas, foram pulverizadas com água destilada e expostas às mesmas condições das plantas inoculadas.

Nesse sentido tiveram 3 clones, sendo 10 plantas de cada clone. Os tempos de coleta das amostras para verificação das respostas de defesa foram 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas, sendo um total de 30 tratamentos e um fitopatógeno.

2.2 Preparo do Extrato Vegetal

A detecção enzimática se deu via extrato foliar. Para isso, folhas das plantas dos clones da BRS Ouro Preto utilizadas no ensaio foram coletadas e trituradas em nitrogênio líquido, utilizando almofariz e pistilo. O pó obtido foi macerado por 5 minutos na presença de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, adicionado de polivinilpirrolidona 1% (p/v), na proporção de 1:5 (p/v), sob banho de gelo e posteriormente centrifugado a $20.000 \times g$, 10 minutos, 4 °C. Após centrifugada, a solução sobrenadante, considerada como extrato enzimático, foi transferida para novos tubos e armazenada em freezer a -18 °C.

Os sobrenadantes foram utilizados para a dosagem de proteínas totais e determinações das atividades de peroxidase e fenilalanina amônia-liase.

2.3 Determinação do conteúdo total de proteínas.

O teste de Bradford (1976) foi empregado para a quantificação do conteúdo total de proteínas nas amostras. Para tanto foram adicionadas alíquotas de 100 μ L dos extratos totais e 2,5 mL do reagente de Bradford e, após 10 minutos, a leitura das absorbâncias foi feita a 595 nm em espectrofotômetro. O teor de proteínas solúveis foi calculado utilizando-se uma curva padrão construída a partir das concentrações conhecidas de BSA.

2.4 Ensaio para detecção de atividade de Peroxidase (POX).

Para quantificação da peroxidase foi utilizado o método descrito por Urbanek et al. (1991). Foram utilizados tubos de ensaios devidamente identificados, nos quais foram adicionados os seguintes reagentes: Para o branco do reagente foi utilizado 2000 μ L de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2; 1000 μ L de Peróxido de hidrogênio 0,06 M e 1000 μ L guaiacol 0,02 M; Para o branco do reagente foi utilizado 3.900 μ L de tampão acetado de sódio 50 mM pH 5,2 e 100 μ L do extrato bruto das folhas. As amostras a serem quantificadas foram preparadas da seguinte forma: 1900 μ L de tampão acetado de sódio 50 mM pH 5,2; 1000 μ L de peróxido de hidrogênio 0,06 M, 1000 μ L de guaiacol 0,02 M e 100 μ L de extrato bruto.

As amostras reacionais foram preparadas sem a adição do extrato bruto, todos os tubos foram colocados em banho-maria a 30 °C por 10 minutos e após esse período foram retirados e postos à leitura em absorbância, feita em espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 480 nm, sendo a leitura iniciada pelo branco do reagente utilizado como branco para zerar o espectrofotômetro.

Foi também realizada a leitura em tempo zero, na qual o extrato bruto foi colocado na mistura reacional e logo em seguida se deu a leitura, sem ir ao banho-maria. Todas as amostras foram quantificadas em triplicatas, sendo cada bateria repetida.

2.5 Ensaio para detecção de atividade de Fenilalanina Amônia-liase (PAL).

A atividade de Fenilalanina Amônia Liase (PAL) foi determinada seguindo o método adaptado por Mori et al. (2001), adaptado para as condições experimentais. A mistura reacional consistiu de 200 μ L do extrato total, 200 μ L de fenilalanina 40 mM, 20 μ L de B-mercaptoetanol 50 mM e 480 μ L do tampão Tris-HCL 100 mM, pH 8,8. A mistura reacional foi incubada a 30 °C por 1 hora. A reação foi parada pela adição de 100 μ L de HCL 6N e a absorbância foi medida a 290 nm.

2.6 Delineamento Estatístico

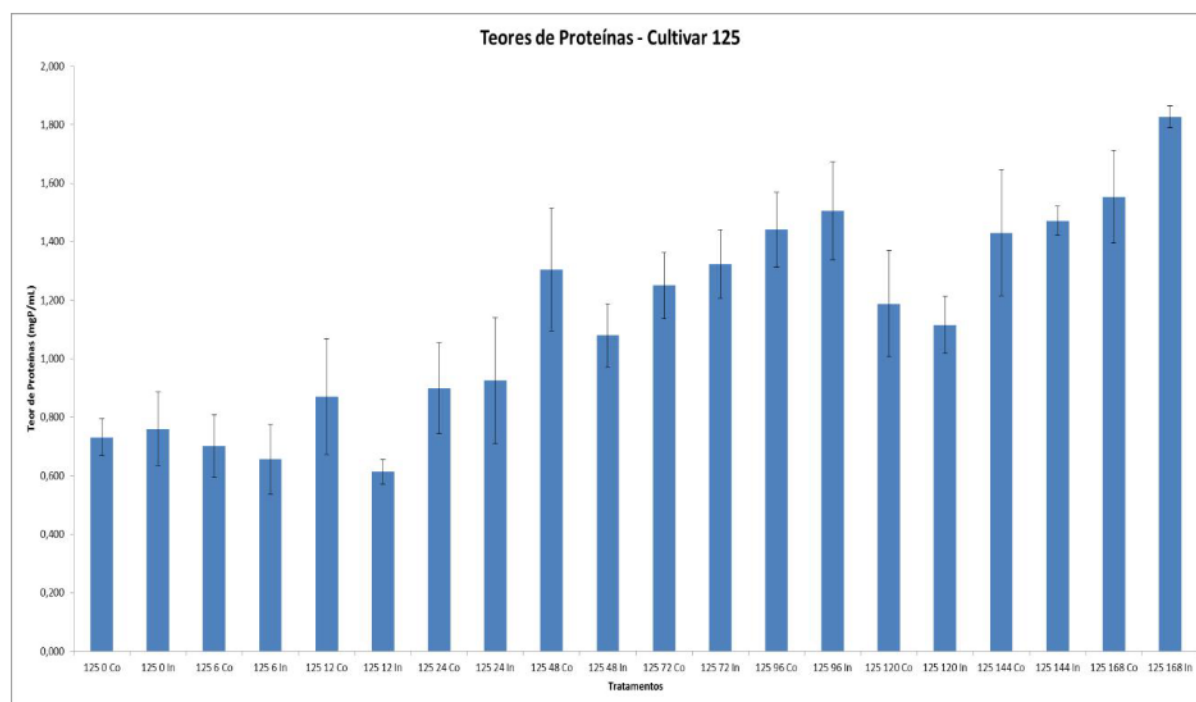
O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em fatorial tipo 2 x 10 x 3 (tratamentos x tempo x cultivares), com 10 repetições, sendo cada uma composta por uma planta. A comparação entre as médias foi feita através do desvio padrão da média ao longo do tempo. Cada média foi resultado de determinações em triplicata para cada um dos parâmetros estudados. Análises estatísticas foram conduzidas usando o programa one-way ANOVA e Student's t-test do software SPSS para Windows (Kinnear & Gray, 2000).

3. Resultados e Discussão

Após a quantificação dos teores de proteínas totais, foi observado um aumento na concentração de proteína total nas folhas com o decorrer do tempo para os diferentes tratamentos. Nos Clones C125 e C160 o aumento maior se deu nos tempos finais do experimento (Figuras 1 e 2). O clone 125 mostrou um aumento nas plantas inoculadas no tempo 168 hai. No clone

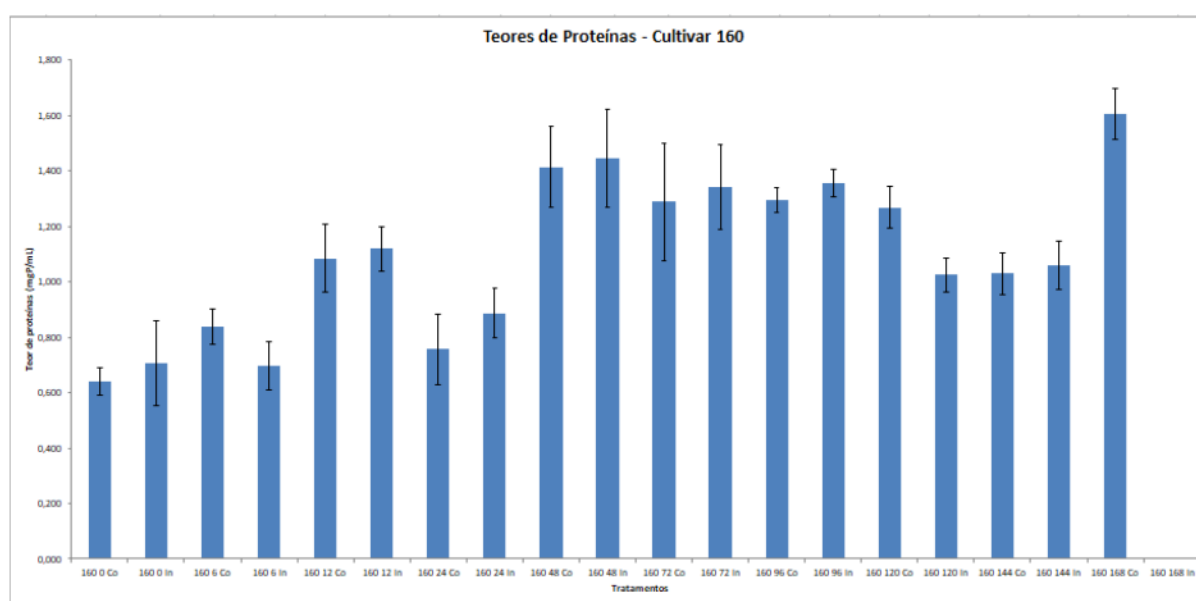
C199 os teores de proteínas se mantiveram estáveis ao longo do experimento (Figura 3). Entretanto, diferente dos demais clones, este mostrou um aumento nos teores de proteínas no tempo 72 hai. Isso pode estar relacionado a uma síntese *de novo* em resposta ao ataque do patógeno, podendo ser uma característica do clone resistente.

Figura 1. Teores de proteínas no clone 125, na presença e ausência de esporos de *Hemileia vastatrix*, nos diferentes tempos experimentais (0 – 168 horas após a inoculação).



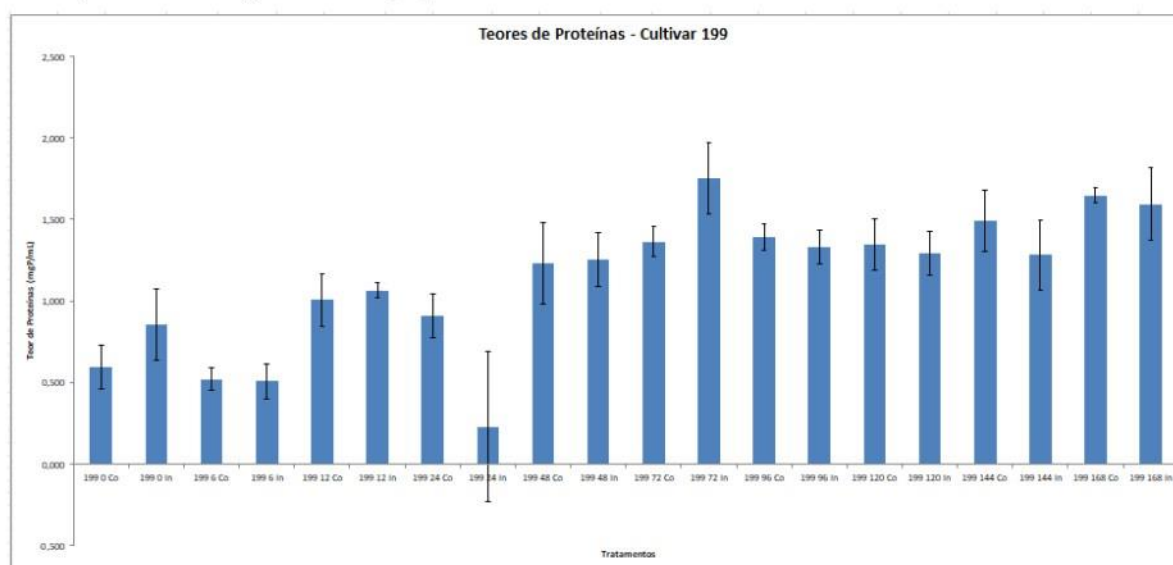
Fonte: Autores (2022).

Figura 2. Teores de proteínas no clone 160, na presença e ausência de esporos de *Hemileia vastatrix*, nos diferentes tempos experimentais (0 – 168 horas após a inoculação).



Fonte: Autores (2022).

Figura 3. Teores de proteínas no clone 199, na presença e ausência de esporos de *Hemileia vastatrix*, nos diferentes tempos experimentais (0 – 168 horas após a inoculação).



Fonte: Autores (2022).

Galeano (2019) quantificando proteínas de milho após a inoculação com novas estirpes de bactérias da espécie *A. brasilense*, observou que a inoculação proporcionou um aumento na concentração proteica em comparação ao controle sem inoculação.

Nas plantas a adaptação e a resistência podem ser explicadas por alterações no metabolismo da célula vegetal, entre elas a síntese de proteínas de defesa, expressas por genes específicos que são ativados assim que a planta entra em contato com o agressor, desencadeando uma ou mais reações de defesa, porém quando isso não acontece a doença pode ocorrer (Ryan, 2000; Pinto, 2011).

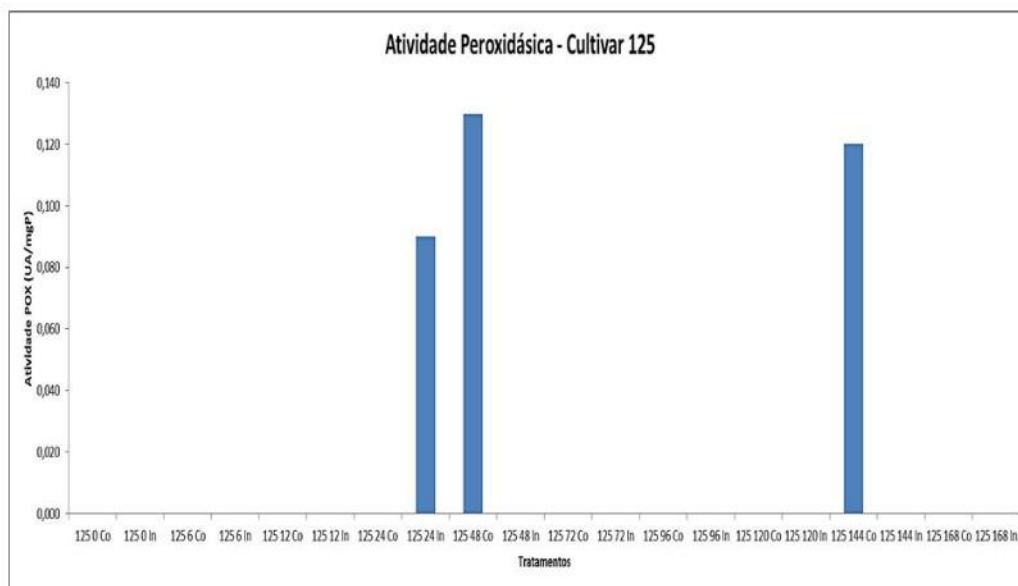
Após a infecção por alguns agentes químicos ou ambientais algumas enzimas chave são ativadas e a partir de suas alterações é possível acompanhar o estado de indução de resistência em plantas expostas a patógenos (Macagnan et al., 2008).

3.1 Atividade peroxidásica (POX)

Na atividade de peroxidase pode-se observar que a resposta desta enzima se deu após 24 horas nos clones 125 (Figura 4), 160 (Figura 5) e no clone 199 (Figura 6). Pode-se observar que os níveis de atividade POX já mais elevados nos clones 160 e 199, o que pode ser devido as características de moderada resistência do 160 e de resistência do clone 199.

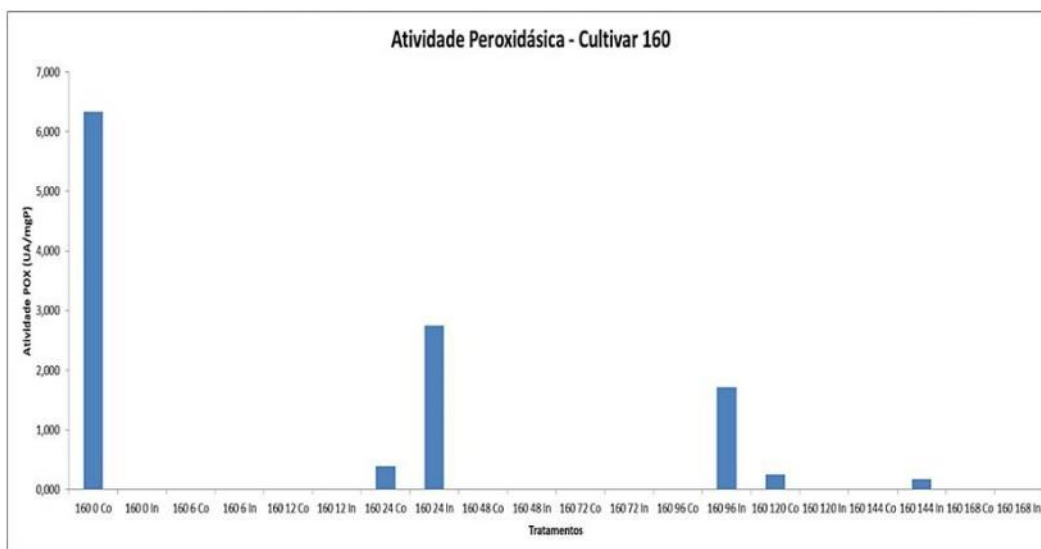
As peroxidases estão relacionadas com os processos de crescimento e diferenciação celular e mudanças morfológicas em resposta aos estresses físico, químico e biológico. O aumento da atividade desta enzima em plantas submetidas a estas condições pode ser fator determinante da capacidade de adaptação dessas plantas, podendo essa atividade ser identificada como um marcador bioquímico de estresse (Piza et al., 2003).

Figura 4. Resposta do aumento da atividade peroxidásica no clone 125 no período de 0 a 168h após a inoculação com esporos de *Hemileia vastatrix*.



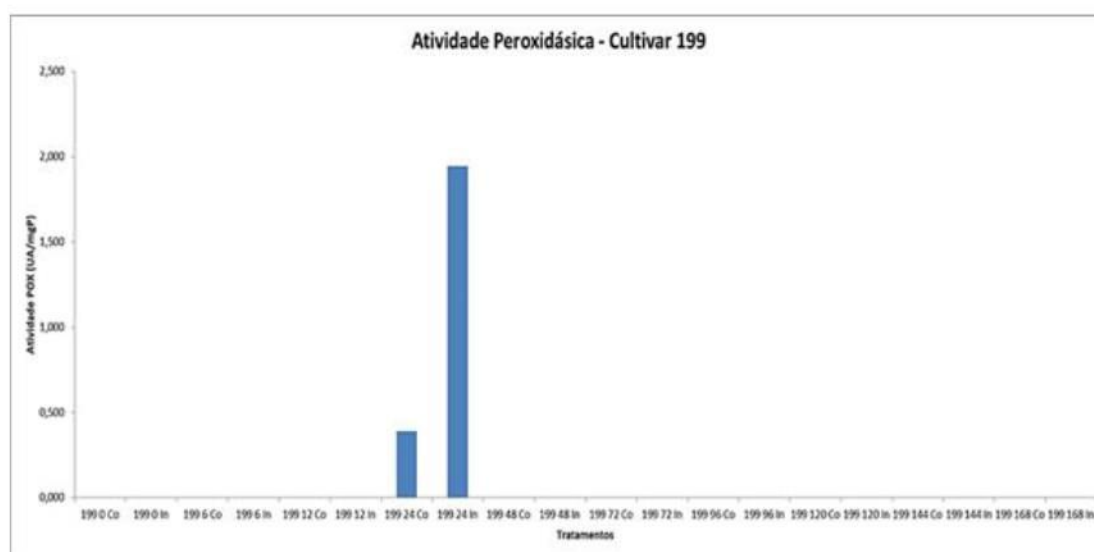
Fonte: Autores (2022).

Figura 5. Resposta do aumento da atividade peroxidásica no clone 160 no período de 0 a 168h após a inoculação com esporos de *Hemileia vastatrix*.



Fonte: Autores (2022).

Figura 6. Resposta do aumento da atividade peroxidásica no clone 199 no período de 0 a 168h após a inoculação com esporos de *Hemileia vastatrix*.



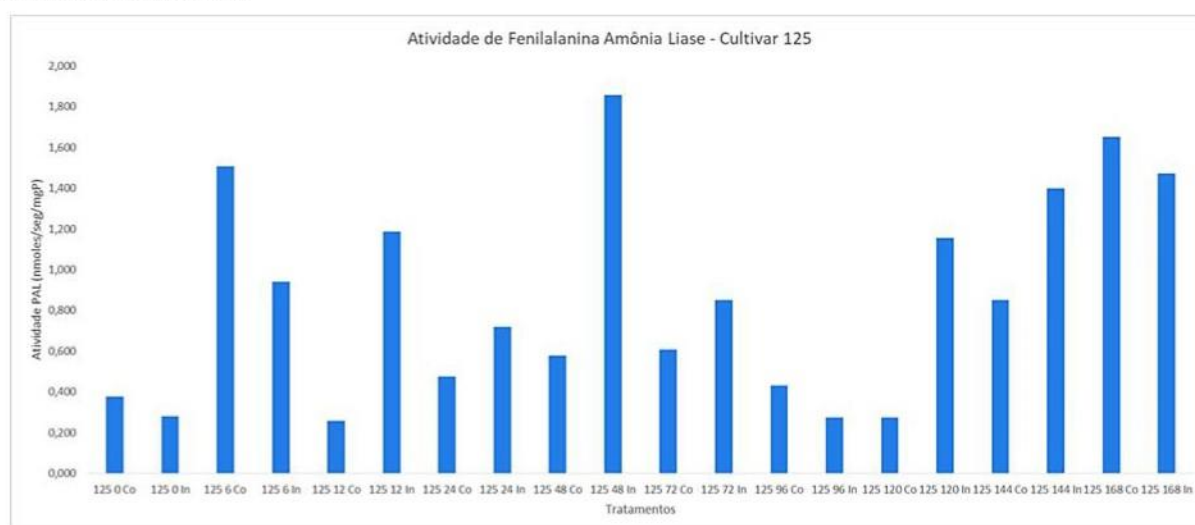
Fonte: Autores (2022).

3.2 Atividade de Fenilalanina (PAL)

Na atividade de PAL no clone 125 houve oscilação entre os tempos avaliados e seus respectivos controles. O pico máximo dessa proteína se deu às 48 horas após a inoculação (Figura 7). Já nos clones 160 (Figura 8) e 199 (Figura 9) o pico desta atividade se deu no tempo 12 horas demonstrando uma rápida resposta bioquímica desses clones.

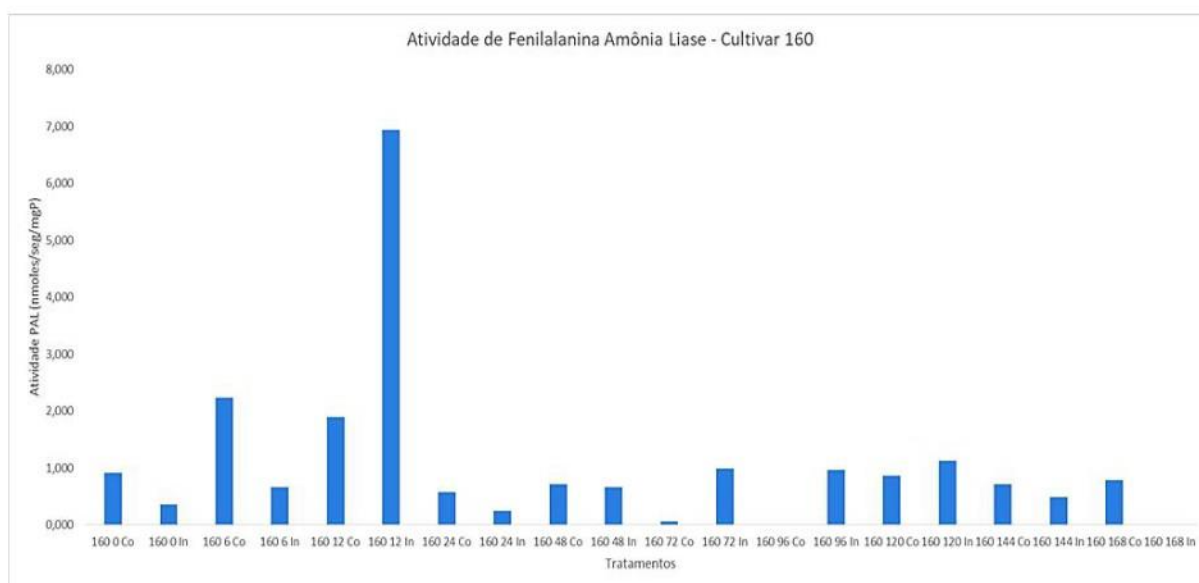
A PAL é uma enzima chave para todas as vias de síntese de compostos fenólicos, os quais estão envolvidos com resistência a pragas e patógenos (Rahman & Punja, 2005).

Figura 7. Resposta da atividade Fenilalanina Amônia Liase no clone 125 no período de 0 a 168 horas após a inoculação com esporos de *Hemileia vastatrix*.



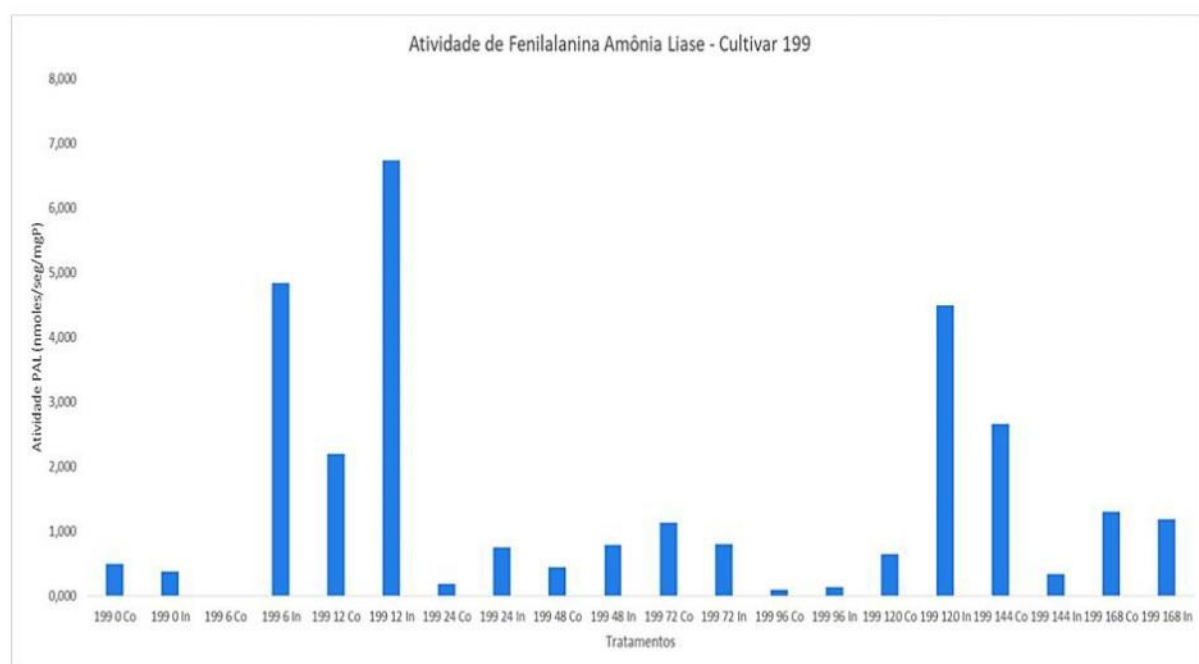
Fonte: Autores (2022).

Figura 8. Resposta da atividade Fenilalanina Amônia Liase no clone 160 no período de 0 a 168 horas após a inoculação com esporos de *Hemileia vastatrix*.



Fonte: Autores (2022).

Figura 9. Resposta da atividade Fenilalanina Amônia Liase no clone 199 no período de 0 a 168 horas após a inoculação com esporos de *Hemileia vastatrix*.



Fonte: Autores (2022).

Estes resultados sugerem uma possível resposta bioquímica envolvida na resistência à ferrugem dentre os clones testados e esta deve ser especialmente investigada às 72 horas após a inoculação. Segundo Macheix et al. (1986), há uma diferente resposta entre cultivares e estádios de desenvolvimento das plantas no acúmulo de compostos fenólicos e a resposta aos ferimentos. A ativação do metabolismo de fenóis após uma infecção, segundo esses autores, pode levar mais ou menos tempo, dependendo da formação de moléculas mais simples e de sua integração com estruturas químicas mais complexas, podendo este fenômeno ser interpretado como parte da indução de resistência de uma planta.

Alguns autores descreveram um aumento na atividade de algumas proteínas de cafeeiro em resposta ao ataque de *H. vastatrix*, tais como quitinases e β -1,3-glucanases (Silva et al., 2002), polifenoloxidase (Melo et al., 2006). Outros trabalhos também demonstraram estudos com enzimas do estresse oxidativo ao ataque do nematoide das galhas no cafeeiro (Karanastasi et al., 2018), em plantas de tomateiro (Pérez-Álvarez et al., 2021) e na ativação de enzimas de defesa em videiras cv. Margot (Horst et al., 2021).

Os resultados até aqui obtidos sugerem um possível envolvimento das enzimas avaliadas na resposta do cafeeiro ao ataque de *H. vastatrix*. Com isso há a necessidade agora de identificar qual ou quais enzimas estão envolvidas na resposta de defesa e como estas reagem a condições de estresse da planta em relação ao patógeno, visto que o uso de clones resistentes é importante para o manejo eficiente da ferrugem e contribui de forma considerável para uma boa produção.

4. Conclusões

As atividades de peroxidase sugerem até o momento participação desta enzima nos mecanismos de defesa do café frente ao fungo *Hemileia vastatrix*.

A atividade peroxidásica responde de forma diferenciada quando comparada aos tempos de exposição ao patógeno nos diferentes tratamentos.

A atividade de fenilalanina apresentou resposta a partir das 12 horas nos clones 160 e 199 após a inoculação do patógeno.

Com isso, torna-se, portanto, importante a realização de novos experimentos que possam confirmar os resultados obtidos, incluindo novos clones com características de resistência e suscetibilidade ao patógeno.

Agradecimentos

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

FAPERO – Fundação de Amparo ao Desenvolvimento das Ações Científicas e Tecnológicas e a Pesquisa - RO.

UNIR – Universidade Federal de Rondônia.

Referências

- Alfonsi, W. M. V., Coltri, P. P., Zullo Jr., J., Patrício, F. R. A. & Alfonsi, E. L. (2019). Período de incubação da ferrugem do cafeeiro. *Summa phytopathol.* 45(2), 134-140. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/187216>.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254, 1976.
- CONAB. (2020). Acomp. safra brasileira de café, v. 6 – Safra 2020, n.1- Primeiro levantamento. CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília, p. 1-62. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/cafes>.
- CONAB. (2022). Acomp. safra brasileira de café, v. 9 – Safra 2022, n.1- Primeiro levantamento. CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília, p. 1-60. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/cafes>.
- Dhingra, O. B. & Sinclair, J. B. (1995). *Basic Plant Pathology Methods*. (2a ed.), CRC Press, Boca Raton.
- Galeano, R. M. S., Campelo, A. P. S., Mackert, A., & Brasil, M.S. (2019). Desenvolvimento inicial e quantificação de proteínas do milho após inoculação com novas estirpes de *Azospirillum brasilense*. *Agricultura Neotropical*. 6(2) 95-99. <https://doi.org/10.32404/rean.v6i2.2613>
- Horst, M. V., Leite, C. D., Garcia, C., Maia, A. J., Faria, C. M. D. R. & Botelho, R. V. (2021). Subproduto da vitivinicultura no controle do míldio e indução de enzimas de defesa em videira. *Research, Society and Development*, 10(11). <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i11.19908>
- Karanastasi, E., Kostara, T., Malamos, N. & Zervoudakis G. (2018). Catalase activity, lipid peroxidation, and protein concentration in leaves of tomato infected with *meloidogyne javanica*. *Nematropica*. 48(1). file:///C:/Users/Profissional/Downloads/admin-final-galley-ms-648-karanastasi-pages-15-20%20.pdf
- Kinney, P. R. & Gray, C. D. (2000). *SPSS for windows made simple*. Department of Psychology, University of Aberdeen. United Kingdom.

- Macagnan, D., Romeiro, R. S., Baracat-Pereira, M. C., Lanna-Filho, R., Batista, G. S. & Pomella, A.W.V. (2008). Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cacauero expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. *Summa Phytopathologica*, 34(1) 34-37. <https://www.scielo.br/j/sp/a/g6dVyh8XqrDSVfKdL9Z9tgR/?lang=pt>
- MAPA. (2022). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agronegócio brasileiro: balança comercial do agronegócio – janeiro/2022. <https://static.poder360.com.br/2022/02/exportacoes-agro-jan2022.pdf>
- Melo, G. A., Shimizu, M. M. & Mazzafera, P. (2006). Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. *Phytochemistry*, 67(3), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.11.003>
- Menezes-Silva, P. E., Sanglard, L. M. V. P., Ávila, R. T., Morais, L. E., Martins, S. C. V., Nobres, P. & Matta, F. M. (2017). Photosynthetic and metabolic acclimation to repeated drought events play key roles in drought tolerance in coffee. *Journal of Experimental Botany*, 68(15), 4309–4322. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx211>
- Mori, T., Sakurai, M. & Sakuta, M. (2001). Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. *Plant Science*, 160(2), 355–360. [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(00\)00399-x](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(00)00399-x)
- Pérez-Álvarez, S., Héctor-Ardisana, E. F., Escobedo-Bonilla, C. M., Flores-Córdova, M. A., Sánchez-Chávez, E. & García, C. U. (2021). Actividad bioquímica y molecular de enzimas del estrés oxidativo en plantas de tomate creciendo con plomo. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 8(3). <https://doi.org/10.19136/era.a8n3.3163>
- Pinto, M. S. T., Ribeiro, J. M. & Oliveira, E. A. G. (2011). O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. *Revista Brasileira de Biociências*, 9(2), 241-248. <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1732>
- Piza, I. M. T., Lima, G. P. P. & Brasil, O. G. (2003). Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. *Revista Brasileira de Agrociência*, 9(4), 361-366. <https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/article/view/661/659>
- Rahman, M. & Punja, Z. K. (2005). Biochemistry of ginseng root tissues affected by rusty root symptoms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(12), 1103-1114. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.09.004>
- Ryan, C. A. (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477 (1–2), 112-121. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00269-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00269-1)
- Silva, M. C., Nicole, M., Guerra-Guimarães, L. & Rodrigues J. R. (2002). Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the Orange rus (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60(4), 169-183. <https://doi.org/10.1006/prmp.2002.0389>
- Silva, L. C., Silva, I. S., Souza, P. C., Vieira, R. J., Oliveira, D. C., Costa, L. G. & Campos, D. S. (2018). Distribuição espacial da ferrugem do caféiro (*Hemileia vastatrix*) em uma lavoura do IFMG, campus Bambuí/MG. <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/11673>
- Talhinhas, P., Batista, D., Diniz, I., Vieira, A., Silva, D. N., Loureiro, A., Tavares, S., Pereira, A. P., Azinheira, H. G., Guerra-Guimaraes, L., Varzea, V. & Silva, M. C. (2017). The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular plant pathology*, 18(8), 1039 – 1051. <https://doi.org/10.1111/mpp.12512>
- Urbanek, H., Kuzniak-Gebarowska, E. & Herka, K. (1991). Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. *Acta Physiologiae Plantarum*, 13(1), 43-50
- Zambolim, L. (2016). Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 41(1), p.1-8. <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0065-9>