

# Proteção do cafeeiro contra cercosporiose por acibenzolar-S-metil e proteína harpina

Diogo Manzano Galdeano<sup>(1)</sup>, Sylvia Dias Guzzo<sup>(1)</sup>, Flávia Rodrigues Alves Patrício<sup>(2)</sup>  
e Ricardo Harakava<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, Caixa Postal 12.898, CEP 04010-970 São Paulo, SP. E-mail: diogo\_manzano@hotmail.com, guzzo@biologico.sp.gov.br, harakava@biologico.sp.gov.br

<sup>(2)</sup>Instituto Biológico, Centro Experimental Central do Instituto Biológico, Laboratório de Fitopatologia, Caixa Postal 70, CEP 13001-970 Campinas, SP. E-mail: flavia@biologico.sp.gov.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar, em cafeeiro suscetível, a proteção contra a cercosporiose, pela aplicação da proteína harpina e acibenzolar-S-metil (ASM), e avaliar seu efeito na germinação de conídios e crescimento micelial in vitro. No primeiro experimento, cafeeiros tratados com ASM (25, 50, 100, 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) receberam o inóculo de uma suspensão de conídios de *Cercospora coffeicola*, e a severidade da doença foi avaliada aos 30 e 60 dias após a inoculação. No segundo experimento, cafeeiros foram aspergidos com harpina (7,5, 15, 30, 60, 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), tendo-se utilizado o mesmo procedimento. No terceiro experimento, plantas aspergidas previamente com ASM (200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ou harpina (15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram tratadas novamente com esses produtos, aos 30 dias após terem recebido inóculo do patógeno. ASM e harpina protegeram os cafeeiros contra cercosporiose 30 dias após a inoculação com *C. coffeicola*. Entretanto, 60 dias após a inoculação, apenas o ASM (200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), com uma ou duas aplicações, protegeu as plantas contra *C. coffeicola*. Os cafeeiros foram protegidos contra cercosporiose, em reaplicação de harpina, 30 dias após o primeiro tratamento com essa proteína. Harpina e acibenzolar-S-metil não inibiram o desenvolvimento micelial nem a germinação in vitro dos conídios do patógeno.

Termos para indexação: *Cercospora coffeicola*, *Coffea arabica*, indutores de resistência, resistência sistêmica.

## Protection of coffee plants against brown eye spot by acibenzolar-S-methyl and harpin protein

Abstract – The objective of this work was to evaluate the protective effect of harpin protein and acibenzolar-S-methyl (ASM) against brown eye spot, in coffee plants, and its effect on in vitro conidial germination and mycelial growth of *Cercospora coffeicola*. In the first assay, plants treated with ASM (25, 50, 100, 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) received the inoculum of a *C. coffeicola* conidial suspension, and the disease severity was evaluated 30 and 60 days after inoculation. In the second assay, plants were sprayed with harpin (7.5, 15, 30, 60, 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) following the same procedure. In a third trial, plants previously sprayed with ASM (200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) or harpin (15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were treated again with these products 30 days after pathogen inoculation. ASM and harpin protected the coffee plants against brown eye spot 30 days after inoculation with *C. coffeicola*. However, 60 days after inoculation, only ASM (200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), with one or two applications, conferred protection to plants against *C. coffeicola*. Coffee plants were protected against cercosporiosis, when harpin was reapplied on plants 30 days after a previous treatment with this protein. Harpin and acibenzolar-S-methyl did not inhibit the in vitro conidial germination and the mycelial growth of the pathogen.

Index terms: *Cercospora coffeicola*, *Coffea arabica*, resistance inducers, systemic resistance.

## Introdução

O Brasil é o líder mundial na produção e exportação de café, porém, para que essa liderança seja mantida, é necessário modernizar a produção utilizando cultivares com boas características agrônômicas, além do controle fitossanitário e de cuidados na pós-colheita (International Coffee Organization, 2010). Entre as doenças que atingem o cafeeiro, a cercosporiose

é uma das mais antigas e importantes. Seu agente etiológico, *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke, é disseminado por vento, água ou insetos e está presente de forma endêmica em quase todas as regiões que apresentam condições favoráveis (Matiello et al., 2002). Os principais prejuízos ocasionados pela cercosporiose consistem na queda de folhas e raquitismo das mudas em condições de viveiro e, em lavouras novas, na queda

de folhas, de frutos e na seca de ramos produtivos, após as primeiras produções. Em lavouras adultas, causa amadurecimento precoce, queda prematura e chochamento dos frutos, o que deprecia a qualidade do café (Carvalho et al., 2008).

A doença vem sendo controlada pelo manejo e práticas culturais, pela aplicação de fungicidas de contato e sistêmicos, como os triazóis, estrobirulinas e outros (Matiello et al., 2002). Porém, um dos maiores desafios para os pesquisadores tem sido determinar métodos eficientes de controle de baixo impacto ambiental. Uma das abordagens consiste no controle de doenças pela ativação dos mecanismos de defesa inerentes às plantas, por meio da aplicação prévia de produtos bióticos (microrganismos viáveis ou inativados) ou abióticos, não tóxicos, que atuam como indutores de resistência (Stangarlin & Pascholati, 1994; Ryals et al., 1996; Guzzo et al., 2001; Martinati et al., 2008; Guzzo et al., 2009).

Diversos indutores de resistência abióticos vêm sendo utilizados, recentemente, nesses estudos como, por exemplo, o composto éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7-carbotiólico (acibenzolar-S-metil, ASM). A aplicação prévia de ASM em plantas resulta na ativação de diversos mecanismos de defesa, o que confere proteção sistêmica contra diferentes patógenos em várias culturas como o feijoeiro, cacauzeiro e cafeeiro (Guzzo et al., 2001; Resende et al., 2002; Iriti & Faoro, 2003; Patrício et al., 2008; Nojosa et al., 2009). Diferentes agentes bióticos apresentam, também, efeitos significativos como ativadores de mecanismos de defesa de plantas contra diversas doenças como, por exemplo, a proteína harpina isolada de *Erwinia amylovora* (Capdeville et al., 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da proteína harpina e do acibenzolar-S-metil na proteção de cafeeiro contra cercosporiose, além de avaliar os efeitos desses dois agentes no crescimento micelial e na germinação de conídios de *C. coffeicola* in vitro.

## Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, do Instituto Biológico, em São Paulo, SP, de novembro de 2008 a janeiro de 2010.

Foram utilizadas mudas de *Coffea arabica* L. cultivar Mundo Novo, linhagem IAC 388-17-1, obtidas a partir de sementes fornecidas pela Cooperativa Escola dos Alunos, da Escola Técnica Estadual (Garça, SP). O plantio foi feito inicialmente em areia esterilizada em sementeiras. Depois de 75 dias, as mudas foram transferidas para uma mistura de terra vegetal e esterco de galinha (250:2,5 L), acrescida de 1.250 g de superfosfato simples, 250 g de calcário calcítico e 250 g de cloreto de potássio. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, entre 25 e 30°C e irrigadas duas vezes ao dia por microaspersão automática, tendo recebido adubação mensal por irrigação com solução de 25 g de sulfato de amônio, 50 g de superfosfato simples e de 10 g cloreto de potássio, em 10 L de água, para 300 mudas. As plantas foram utilizadas quando atingiram de seis a oito pares de folhas totalmente expandidas.

Para a obtenção de suspensões aquosas de ASM, foi utilizado o produto comercial Bion 500WG (Syngenta, Basel, Suíça), que continha 50% de ingrediente ativo (i.a.), nas concentrações 25, 50, 100 e 200 µg de i.a. mL<sup>-1</sup>. Para a obtenção de suspensões aquosas de harpina, foi utilizado o produto comercial Messenger (EDEN Bioscience Corporation, Bothell, EUA), que continha 3% de i.a., nas concentrações 7,5, 15, 30, 60 e 120 µg i.a. mL<sup>-1</sup>. Para os ensaios in vitro, as suspensões aquosas dos dois produtos foram filtradas em membrana Millipore de 0,22 µm imediatamente antes do uso.

Como inóculo, foi utilizado o isolado IBLF78 de *C. coffeicola*, pertencente à coleção do Laboratório de Fitopatologia do Centro Experimental Central do Instituto Biológico, em Campinas, SP, obtido de lesões foliares de cafeeiros na região de Franca, SP. Para propiciar a esporulação adequada do fungo in vitro, o micélio do fungo cultivado em meio BDA foi transferido para placas com meio de cultura V8-ágar. As placas foram mantidas por dez dias, a 25°C, em regime de luz contínua (Soares, 2003). Após esse período, o micélio foi transferido para um almofariz de porcelana e macerado, com o auxílio de um pistilo, em água destilada esterilizada. A suspensão obtida foi uniformemente distribuída sobre a superfície de meio de cultura V8-ágar, com o auxílio de uma alça de vidro. Em seguida, as placas foram mantidas a 25°C, em regime de luz contínua durante sete dias. Os conídios formados foram, então, removidos da superfície do

meio de cultura, para preparo da suspensão ajustada para  $2 \times 10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  para a inoculação nas plantas.

Foram realizados três experimentos para avaliar os efeitos dos elicitores, ASM e proteína harpina, na proteção de cafeeiro contra cercosporiose.

No primeiro experimento, o segundo, terceiro e quarto par de folhas dos cafeeiros, a partir do ápice das plantas, foram aspergidos com as concentrações de ASM descritas anteriormente, nas superfícies abaxiais e adaxiais, com um atomizador de plástico, até o ponto de escorrimento. As plantas controle foram aspergidas com água destilada esterilizada. Após 72 horas, os mesmos pares e superfícies foliares tratados anteriormente foram inoculados, por aspersão, com a suspensão de conídios de *C. coffeicola*. Imediatamente após a inoculação, as plantas foram mantidas por sete dias em câmara a  $24^\circ\text{C}$ , com umidade relativa de 100%, em fotoperíodo de 12 horas e, em seguida, transferidas para casa de vegetação e mantidas entre 25 e  $30^\circ\text{C}$ . As plantas foram irrigadas duas vezes ao dia por microaspersão automática. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, tendo-se utilizado 15 plantas por tratamento. Foram realizadas duas avaliações nas plantas, a partir do aparecimento dos primeiros sintomas na testemunha, em média 30 dias após a inoculação (D.A.I.), com um intervalo de aproximadamente 30 dias entre a primeira e a segunda avaliação. A severidade da doença foi determinada pela contagem do número total de lesões por folha por planta (Patrício et al., 2008).

No segundo experimento, os cafeeiros foram aspergidos com as concentrações de proteína harpina, descritas anteriormente, com o mesmo procedimento. A severidade da doença foi avaliada conforme Patrício et al. (2008).

No terceiro experimento, os mesmos procedimentos descritos anteriormente foram utilizados, porém, com as concentrações  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ASM ou  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  de proteína harpina. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com dez plantas por tratamento. Os tratamentos foram: dez plantas tratadas com ASM, 72 horas antes da inoculação do patógeno; dez plantas tratadas com ASM, 72 horas antes da inoculação do patógeno, e tratadas novamente com ASM 30 dias após a inoculação; dez plantas tratadas com proteína harpina, 72 horas antes da inoculação do patógeno; dez plantas tratadas com harpina, 72 horas antes da inoculação do patógeno, e tratadas novamente

com harpina 30 dias após a inoculação; 10 plantas tratadas com água destilada esterilizada e infectadas com o patógeno. A severidade da doença foi avaliada 70 dias após a inoculação (Patrício et al., 2008).

O efeito direto do ASM e da proteína harpina no crescimento micelial *C. coffeicola* foi avaliado em dois experimentos in vitro. A suspensão aquosa de ASM foi adicionada a meio BDA, para que estivesse nas concentrações finais de 25, 50, 100 e  $200 \mu\text{g}$  de i.a.  $\text{mL}^{-1}$ ; em seguida, o meio de cultura foi homogeneizado e vertido em placas de Petri. Como testemunha, água deionizada esterilizada foi misturada ao meio BDA. No centro de cada placa, foi depositado um disco do meio de cultura, com 1 cm de diâmetro, que continha micélio de *C. coffeicola*. As placas foram mantidas em BOD a  $25^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas e os diâmetros das colônias foram medidos após 20 dias. No segundo experimento, de forma semelhante à anterior, foi avaliado o efeito da proteína harpina no crescimento micelial de *C. coffeicola*. Foram utilizadas placas de Petri com meio BDA e, no centro de cada placa, foram aplicadas alíquotas de  $200 \mu\text{L}$  nas concentrações 7,5, 15, 30, 60 e  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$  de harpina, espalhadas na superfície do meio de cultura com alça de Drigalsky. A testemunha consistiu de placas com meio BDA, em que foi adicionada água deionizada e esterilizada.

Os dois experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, e cada parcela foi constituída por uma placa de Petri.

Para averiguar a germinação de conídios de *C. coffeicola*, em presença de ASM e proteína harpina, foram realizados dois experimentos in vitro. Os tratamentos utilizados foram: 25, 50, 100 e  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ASM e 7,5, 15, 30 e  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$  de proteína harpina, no primeiro e segundo experimentos, respectivamente, além de água deionizada e esterilizada como testemunha. Os ensaios foram realizados conforme Soares (2003). Foram utilizadas três placas de Petri por tratamento, às quais foram adicionadas as soluções de proteína harpina ou ASM incorporadas em meio de cultura V8-ágar. Após a solidificação do meio, foram depositados três discos de meio BDA, com 1 cm de diâmetro, com micélio de *C. coffeicola* em cada placa. Em seguida, as placas foram incubadas por nove dias em BOD a  $25^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 24 horas. Após esse período, as áreas totais das colônias que cresceram

nas placas de cada um dos tratamentos foram retiradas, com o auxílio de um estilete, e transferidas para tubos Falcon, que continham 10 mL de água deionizada e esterilizada acrescida de uma gota de Tween 20. Os tubos foram submetidos à agitação vigorosa por 1 min em um agitador. As suspensões obtidas foram filtradas em gaze dupla, e a concentração de conídios de *C. coffeicola* foi ajustada, em hemacitômetro, à concentração de  $1,5 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup>.

Alíquotas de 0,75 mL dessa suspensão de conídios foram transferidas para placas de Petri com ágar-água a 2%, e espalhadas na superfície do meio com o auxílio da alça de Drigalsky. Três placas por tratamento foram mantidas em BOD a 25°C, por 24 horas, em fotoperíodo de 24 horas, e, após esse período, a germinação foi paralisada com azul de lactofenol obtido a partir de 20 g de fenol cristalizado, 20 mL de ácido láctico, 40 mL de glicerina, 20 mL de água destilada e 0,05 g de azul-algodão. O número de esporos germinados foi aferido aleatoriamente, numa amostra de 100 conídios por placa por tratamento, com o auxílio de um microscópio óptico com aumento de 100X. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com três placas por tratamento.

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey nos ensaios in vitro e pelo teste t, com os dados transformados pela função raiz de x ( $x^{0,5}$ ), nos ensaios in vivo, ambos a 5% de probabilidade, com o uso do programa estatístico Assistat versão 7.5 Beta (Silva & Azevedo, 2006).

## Resultados e Discussão

Os cafeeiros tratados previamente com o Bion, nas concentrações 25, 50, 100 e 200 µg mL<sup>-1</sup> do ingrediente ativo ASM, aplicadas 72 horas antes da inoculação com *C. coffeicola*, e avaliados 30 dias após a inoculação, apresentaram redução dos sintomas da doença e proteção significativa à cercosporiose (Tabela 1). Os dados obtidos corroboraram os de Patrício et al. (2008), que avaliaram o efeito do ASM, nas concentrações 25, 50 e 100 µg mL<sup>-1</sup>, sobre a proteção de cafeeiros 'Catuaí' e 'Obatã', contra o fungo *C. coffeicola*. Esses autores constataram uma proteção de 47, 74 e 25%, respectivamente, nas aplicações em intervalo de 96 horas entre tratamento e inoculação do patógeno. Amaral (2005) demonstrou

que a concentração de 200 µg mL<sup>-1</sup> do ingrediente ativo ASM, aplicada sete dias antes da inoculação com *C. coffeicola*, em cafeeiros 'Topázio', diminuiu em 47% os sintomas da cercosporiose em relação ao controle aspergido com água.

As plantas tratadas com ASM, nas concentrações de 25, 50 e 100 µg i.a. mL<sup>-1</sup>, e avaliadas 60 dias após terem recebido inóculo de *C. coffeicola*, não apresentaram proteção significativa em relação ao controle; mas, a concentração de 200 µg mL<sup>-1</sup> de ingrediente ativo demonstrou eficácia na proteção (Tabela 1). Gurgel et al. (2005) verificaram que mudas de tomateiro tratadas com ASM, nas concentrações 25 e 50 mg L<sup>-1</sup> do produto comercial, e avaliadas 43 dias após a inoculação de *Fusarium oxysporum*, não diferiram significativamente do controle quanto à severidade da doença, o que mostra que o efeito do ASM na indução de resistência depende do patossistema em estudo.

As plantas de café 'Mundo Novo', tratadas previamente com o Messenger nas concentrações 7,5, 15 e 30 µg mL<sup>-1</sup> de proteína harpina, aplicadas 72 horas antes da inoculação de *C. coffeicola*, e avaliadas 30 dias

**Tabela 1.** Número de lesões por folha, aos 30 e 60 dias após a inoculação de *Cercospora coffeicola* em cafeeiro 'Mundo Novo', tratado com acibenzolar-S-metil (ASM) 72 horas antes da inoculação<sup>(1)</sup>.

ASM (µg mL <sup>-1</sup> )	30 dias	60 dias
25	4,63±1,00b	12,39±2,58ab
50	4,61±1,28b	16,08±3,33ab
100	2,79±0,61b	13,78±2,78ab
200	1,78±0,49b	9,34±2,27b
0	9,13±2,44a	23,21±4,80a

<sup>(1)</sup>Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, pelo teste t, a 5% de probabilidade; os dados foram transformados pela função raiz de x.

**Tabela 2.** Número de lesões por folha aos 30 e 60 dias após a inoculação de *Cercospora coffeicola* em cafeeiro 'Mundo Novo', tratado com a proteína harpina 72 horas antes da inoculação<sup>(1)</sup>.

Harpina (µg mL <sup>-1</sup> )	30 dias	60 dias
7,5	4,85±1,88c	38,36±9,19b
15	3,72±1,17c	30,02±9,57b
30	4,98±1,24c	25,63±4,68b
60	11,62±2,60b	42,69±5,34b
120	32,66±6,16a	66,96±8,29a
0	14,26±2,81b	39,83±5,49b

<sup>(1)</sup>Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, pelo teste t, a 5% de probabilidade; os dados foram transformados pela função raiz de x.

após a inoculação, apresentaram redução do número de lesões por folha, o que conferiu proteção significativa contra a cercosporiose (Tabela 2). A concentração de 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de proteína harpina não diferiu significativamente do controle, e a concentração mais alta utilizada, 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , aumentou significativamente o número de lesões de cercosporiose nas folhas do cafeeiro. Esses dados corroboram os de Danner et al. (2008), que observaram redução de sintomas em pêssegos tratados em pós-colheita com 80  $\text{mg L}^{-1}$  de proteína harpina, 12 horas antes da inoculação do patógeno *Monilinia fructicola*.

Quando a avaliação das plantas de cafeeiro, tratadas com harpina e com inoculação de *C. coffeicola* após 72 horas, foi feita 60 dias após a inoculação, a severidade em todos os tratamentos aumentou e não apresentou diferença significativa em relação ao controle (Tabela 2). O tratamento com a concentração de 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de harpina teve a maior média de lesões de cercosporiose por folha, como já havia sido observado na avaliação feita 30 dias após a inoculação com o patógeno, o que aumentou significativamente a severidade da doença em relação ao controle.

As concentrações de ASM não inibiram a germinação in vitro dos conídios de *C. coffeicola*, em comparação ao controle (Tabela 3). A concentração 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ASM aumentou significativamente a germinação dos conídios in vitro. Pereira et al. (2008) utilizaram a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e constataram que o ASM na concentração 0,2  $\text{mg mL}^{-1}$  não apresentou qualquer alteração na germinação de *C. coffeicola*, na superfície de folhas de cafeeiro. Houve efeito da concentração de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ASM sobre o crescimento micelial in vitro. As duas maiores concentrações de proteína harpina avaliadas estimularam significativamente a germinação dos

conídios de *C. coffeicola* (Tabela 4). Esses dados corroboram os de Boro (2009) e Jesus (2009), que verificaram que a concentração 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de harpina in vitro estimulou o desenvolvimento de colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e a germinação de uredíniosporos de *Hemileia vastatrix*, respectivamente. Nenhuma das concentrações de proteína harpina utilizadas inibiu o crescimento micelial de *C. coffeicola* in vitro. Esses dados corroboram os observados por Pereira et al. (2008), que verificaram que o ASM não afetou o crescimento micelial de *C. coffeicola* em meio de cultura com 0,1 g i.a.  $\text{L}^{-1}$  do produto comercial, e por Yang et al. (2005) que não observaram efeito direto da proteína harpina no desenvolvimento do fungo *Trichothecium roseum* in vitro.

O aumento no número de lesões de cercosporiose em cafeeiros previamente tratados com 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de harpina, em relação ao controle (Tabela 2), pode estar associado ao estímulo na germinação dos conídios do patógeno na presença da proteína (Tabela 4).

Os cafeeiros tratados previamente com as soluções aquosas dos produtos comerciais Bion e Messenger, nas concentrações 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do ingrediente ativo ASM e 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de proteína harpina, respectivamente, em uma aplicação 72 horas antes da inoculação com *C. coffeicola*, avaliados 70 dias após a inoculação, apresentaram evidência de que apenas o ASM protegeu significativamente as plantas contra a cercosporiose em relação ao controle (Tabela 5). Porém, quando os mesmos tratamentos foram aplicados duas vezes às folhas, antes e 30 dias após a inoculação com o patógeno, observou-se proteção significativa contra a doença nas plantas tratadas com ASM ou proteína harpina. Os cafeeiros tratados com ASM, uma ou duas vezes, não diferiram significativamente entre

**Tabela 3.** Germinação de conídios e crescimento micelial in vitro de *Cercospora coffeicola*, em diferentes concentrações de acibenzolar-S-metil (ASM)<sup>(1)</sup>.

ASM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Número total de conídios germinados	Crescimento micelial em diâmetro (cm)
25	72,0 $\pm$ 1,52ab	4,32 $\pm$ 0,09ab
50	81,1 $\pm$ 2,41a	4,34 $\pm$ 0,12ab
100	72,7 $\pm$ 2,41ab	4,75 $\pm$ 0,09a
200	75,7 $\pm$ 2,67ab	4,57 $\pm$ 0,12ab
0	70,1 $\pm$ 1,61b	4,24 $\pm$ 0,10b

<sup>(1)</sup>Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

**Tabela 4.** Germinação de conídios e crescimento micelial in vitro de *Cercospora coffeicola*, em diferentes concentrações da proteína harpina<sup>(1)</sup>.

Harpina ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Número total de conídios germinados	Crescimento micelial em diâmetro (cm)
7,5	73,67 $\pm$ 0,67b	5,32 $\pm$ 0,15a
15	73,36 $\pm$ 0,31b	5,11 $\pm$ 0,16a
30	86,73 $\pm$ 1,05a	5,43 $\pm$ 0,04a
60	- <sup>(2)</sup>	5,45 $\pm$ 0,30a
120	85,60 $\pm$ 1,13a	5,55 $\pm$ 0,06a
0	71,82 $\pm$ 1,39b	5,11 $\pm$ 0,09a

<sup>(1)</sup>Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. <sup>(2)</sup>Não avaliado.

**Tabela 5.** Severidade de cercosporiose em cafeeiro 'Mundo Novo', tratado com ASM e proteína harpina 72 horas antes e 30 dias após a inoculação com *Cercospora coffeicola*<sup>(1)</sup>.

Tratamento <sup>(2)</sup>	Número de aplicações <sup>(3)</sup>	Número médio de lesões por folha
200 µg mL <sup>-1</sup> de ASM	1	2,76±0,45b
	2	2,66±0,39b
15 µg mL <sup>-1</sup> de harpina	1	5,35±0,98a
	2	3,07±0,38b
Controle	-	5,34±0,62a

<sup>(1)</sup>Avaliação realizada 70 dias após a inoculação. <sup>(2)</sup>Soluções aquosas dos produtos Bion e Messenger nas concentrações 200 e 15 µg mL<sup>-1</sup> de ASM e proteína harpina, respectivamente; controle tratado com água. <sup>(3)</sup>Número de aplicações dos tratamentos: 1, aplicação dos tratamentos 72 horas antes da inoculação do patógeno; 2, aplicação 72 horas antes e 30 dias após a inoculação do patógeno. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si, pelo teste t, a 5% de probabilidade; os dados foram transformados pela função raiz de x.

si, mas tiveram proteção significativa em relação ao controle. O ASM na concentração 200 µg de i.a. mL<sup>-1</sup>, provavelmente, deve ter efeito residual que faz com que a defesa do cafeeiro continue sendo ativada contra a invasão do patógeno, mesmo 70 dias após a inoculação. Esses resultados corroboram os de Patrício et al. (2008), que trataram cafeeiros com o ASM quatro dias antes da inoculação com *C. coffeicola* e que, após 30 dias aplicaram novamente o produto nas plantas e obtiveram proteção de 25 a 74%. Os dados concordam, ainda com os de Piccinin et al. (2005), que avaliaram o efeito de *Saccharomyces cerevisiae*, aplicado semanalmente sobre a severidade de doenças foliares como antracnose (*Colletotrichum sublineolum*) e mancha foliar (*Exserohilum turcicum*), e observaram que houve redução no progresso das duas doenças.

### Conclusões

1. Acibenzolar-S-metil e proteína harpina protegem as mudas de *Coffea arabica* contra cercosporiose até 30 dias após a inoculação com *Cercospora coffeicola* sendo que, 60 dias após a inoculação, apenas o acibenzolar-S-metil protege as plantas contra *Cercospora coffeicola*.

2. O acibenzolar-S-metil e a proteína harpina não inibem o crescimento micelial nem a germinação dos conídios de *Cercospora coffeicola* in vitro.

### Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro.

### Referências

- AMARAL, D.R. **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais**. 2005. 96p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- BORO, M.C. **Indução de resistência em maracujazeiro - amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae***. 2009. 87p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Biológico, São Paulo.
- CAPDEVILLE, G. de; WILSON, C.L.; BEER S.V.; AIST, J.R. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'Red delicious' apple fruit. **Phytopathology**, v.92, p.900-908, 2002.
- CARVALHO, V.L. de; CUNHA, R.L. da; MOURA, P.H.A. **Manejo integrado da cercosporiose do cafeeiro**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2008. 4p. (EPAMIG. Circular técnica, 16).
- DANNER, M.A.; SASSO, S.A.Z.; MEDEIROS, J.G.S.; MARCHESE, J.A.; MAZARO, S.M. Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.793-799, 2008.
- GURGEL, L.M.S.; OLIVEIRA, S.M.A. de; COÊLHO, R.S.B.; SILVA, R.L.X. da. Proteção à murcha de fusário do tomateiro com acibenzolar-S-metil e ácido β-aminobutírico, em campo. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.655-657, 2005.
- GUZZO, S.D.; HARAKAVA, R.; TSAI, S.M. Identification of coffee genes expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with *Hemileia vastatrix*. **Journal of Phytopathology**, v.157, p.625-638, 2009.
- GUZZO, S.D.; CASTRO, R.M. de; KIDA, K.; MARTINS, E.M.F. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, p.89-94, 2001.
- INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Total production of exporting countries**. Disponível em: <http://dev.ico.org/prices/po.htm>. Acesso em: 20 mar. 2010.
- IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology**, v.151, p.171-180, 2003.
- JESUS, C.O. de. **Genes envolvidos na indução de resistência de cafeeiro à *Hemileia vastatrix***. 2009. 66p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Biológico, São Paulo.
- MARTINATI, J.C.; HARAKAVA, R.; GUZZO, S.D.; TSAI, S.M. The potential use of a silicon source as a component of an ecological management of coffee plants. **Journal of Phytopathology**, v.156, p.458-463, 2008.
- MATIELLO, J.B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A.W.R.; ALMEIDA, S.R.; FERNANDES, D.R. **Cultura de café no Brasil: novo manual de recomendações**. Varginha: Fundação PROCAFÉ, 2002. 387p.
- NOJOSA, G.B.A.; RESENDE, M.L.L.; BARGUIL, B.M.; MORAES, S.R.G.; VILAS BOAS, C.H. Efeito de indutores de

- resistência em cafeeiro contra a mancha de *Phoma*. **Summa Phytopathologica**, v.35, p.60-62, 2009.
- PATRÍCIO, F.R.A.; ALMEIDA, I.M.G.; BARROS, B.C.; SANTOS, A.S.; FRARE, P.M. Effectiveness of acibenzolar-S-methyl fungicides and antibiotics for the control of brown eye spot, bacterial blight, brown leaf spot and coffee rust in coffee. **Annals of Applied Biology**, v.152, p.29-39, 2008.
- PEREIRA, R.B.; ALVES, E.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; RESENDE, M.L.V. de; LUCAS, G.C.; FERREIRA, J.B. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.1287-1296, 2008.
- PICCININ, E.; DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.5-9, 2005.
- RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; CAVALCANTI, L.S.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, L.H.C.P.; PEREZ, J.O.; ANDRADE, G.C.G.; CARVALHO, G.A.; CASTRO, R.M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, v.51, p.621-628, 2002.
- 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.
- SILVA, F. de A.S. e; AZEVEDO, C.A.V. de. A new version of the Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4., 2006, Orlando. **Proceedings**. Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p.393-396.
- SOARES, D.J. **Esporulação e germinação in vitro de conídios de *Cercospora coffeicola***. 2003. 31p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**. v.20, p.16-21, 1994.
- YANG, B.; SHIPING, T.; JIE, Z.; YONGHONG, G. Harpin induces local and systemic resistance against *Trichothecium roseum* in harvested 'Hami' melons. **Postharvest Biology and Technology**, v.38, p.183-187, 2005.

---

Recebido em 15 de março de 2010 e aprovado em 21 de junho de 2010