

- 7 SCHROT, M.N.; LOPEZ, I.E.; HILLDEBRAND, D.C. 1983 Bacteria as biological control of plant disease. In Current perspective in microbial ecology. Ed. by M.S. Klug; L. A. Riddy. Washington American Society of Microbiology p. 349-354
- 8 SPURR, H.W. 1981. Introduction of microbial antagonists for the control of foliar pathogens. In

Biological control in crop production. Allanheld - Osmun Publishers. New Jersey. p. 323-332.

9. WINDELS, E.; LINDOW, S. 1985 Biological control on the phylloplane. St. Paul, Minnesota, The American Phytopathological Society 169 p.

## Resistência Induzida no Complexo *Coffea arabica* L. *Hemileia vastatrix*

Berk.:et Br. Fenóis e Enzimas<sup>1</sup>

P. Mazzafera\*, A. C. N. Magalhães\*

### ABSTRACT

Resistance to *Hemileia vastatrix* was tested in discs of leaves of the cultivars Catuaí (S<sub>h</sub>5) and F840 C1122-18 (S<sub>h</sub>5 S<sub>h</sub>2) of *Coffea arabica* by the pre-treatment with thermally inactivated uredospores of race II (v5) at 0.1 and 2mg/ml<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O concentrations. The discs were inoculated with viable uredospores of race II at 0.25, 0.5 and 1mgml<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O concentrations and on different days after the pre-treatment with inactivated uredospores. As expected, induced resistance was only obtained in the susceptible cultivar (Catuaí). Strongest evidence of induced resistance was observed in the combination of 2 mgml<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O of inactivated uredospores with 0.5 mgml<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O of viable uredospores, applied one day after pre-treatment. Total phenol content was also evaluated; however, no significant differences were observed among treatments. Phenolic extracts were analyzed by cellulose thin-layer chromatography and two new spots were detected, being identified as a flavonol in the susceptible cultivar Catuaí, and as an isoflavone in the resistant cultivar C1122-18. Flavonol might be associated with the induced resistance in leaf discs of Catuaí by the pre-treatment with inactivated uredospores, as suggested by its appearance on the days that induced resistance was most evident. Discs of leaves treated with inactivated uredospores of race II at concentrations of 0 and 2 mgml<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O, were also assayed to peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia-lyase. No significant differences were observed between treatments, indicating, and as supported by other data, that the involvement of phenolics in induced resistance to leaf rust in coffee, might be more associated with qualitative than quantitative aspects. The results indicated the need for further studies on other phenolic enzymes.

### RESUMO

Foi testada a indução de resistência em discos de folhas dos cultivares Catuaí (S<sub>h</sub>5) e F840 C1122-18 (S<sub>h</sub>5 S<sub>h</sub>2) de *Coffea arabica* pelo pré-tratamento com esporos da raça II (v5) de ferrugem inativados termicamente, nas concentrações 0.1 e 2 mgml<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O. Posteriormente, os discos foram inoculados com esporos viáveis da mesma raça de ferrugem nas concentrações 0.25, 0.5 e 1mgml<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O e em diferentes dias após o pré-tratamento. Como esperado, a resistência induzida foi observada somente no cultivar suscetível Catuaí e a maior evidência do fenômeno ocorreu na combinação de 2 mg ml<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O de esporos inativos com 0.5 mgml<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O de esporos viáveis, inoculados um dia após o pré-tratamento. Também foi avaliado o conteúdo total de fenóis, no entanto, não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre tratamentos. Análises cromatográficas dos extratos fenólicos revelaram o aparecimento de um novo composto em Catuaí e um outro em C1122-18, sendo identificados como flavonol e isoflavona, respectivamente. Estes compostos não estavam presentes em cromatogramas do tratamento controle. Em Catuaí, o flavonol foi detectado nos dias em que a resistência induzida era mais evidente, sugerindo uma possível relação com este tipo de resistência. Nas dosagens de atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase, nos discos de folhas pré-tratadas com 0 e 2 mgml<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O de esporos inativos, não foram evidenciadas diferenças nos dois cultivares. Os resultados ressaltam o aspecto qualitativo do envolvimento dos compostos fenólicos na resistência induzida, assim como a necessidade de novos estudos com outras enzimas oxidativas de fenóis, intermediárias na via biossintética desses compostos.

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 2 setembro 1988  
os autores agradecem ao Instituto Agronômico de Campinas através da Seção de Genética, nas pessoas do Dr Alcides Carvalho e Dr Luiz Carlos Fazuoli, que propiciaram todas as condições para a realização deste trabalho, assim como um grande incentivo

\* UNICAMP, I B., Depto Fisiologia Vegetal, CP6109, Campinas, SP, Brasil, CEP13081

### INTRODUÇÃO

**A**lguns trabalhos relatam a importância dos compostos fenólicos como possíveis participantes na resistência de plantas às doenças. De maneira geral, estes estudos revelam o acúmulo desses compostos em tecidos vegetais em resposta à infecção por patógenos (21, 22).

Em plantas suscetíveis existem indicações de que o acúmulo de fenóis ocorre quando o tecido já foi invadido pelo patógeno, enquanto que em plantas resistentes o aumento também ocorre, porém, mais rápido o suficiente para bloquear o desenvolvimento do organismo invasor (42).

Em café existem contradições quanto a participação de fenóis, sob o aspecto quantitativo, na resistência à ferrugem. Nacacche (32) observou aumento do conteúdo total de fenóis em interações incompatíveis de café e ferrugem, utilizando-se de discos de folhas inoculados com esporos do fungo. Nas combinações compatíveis o mesmo ocorria, mas somente passado algum tempo após a inoculação. Por outro lado, Brugues e Contreiras (5) não obtiveram semelhantes resultados para interações incompatíveis, atribuindo que a qualidade, ou melhor, os tipos de fenóis é que estaria mais diretamente relacionado com a resistência, do que a quantidade desses compostos.

Normalmente, em plantas atacadas por parasitas o aumento do conteúdo de fenóis é acompanhado pela maior atividade de enzimas oxidativas e, em café, assim como para fenóis, os dados encontrados na literatura sobre comportamento enzimático são controversos.

Polifenoloxidase (PFO), peroxidase (PO) e fenilalanina amônia-liase (FAL) são enzimas que já foram amplamente estudadas em vários sistemas patógeno-hospedeiro, e têm em comum o fato de estarem diretamente implicadas no metabolismo dos fenóis. A PFO catalisa a passagem de monofenóis para O-quinonas (27). Quanto a PO existem fortes evidências do seu envolvimento na resistência de plantas às doenças, através da oxidação de compostos fenólicos para ser formada lignina e, assim, aumentar a resistência das paredes celulares do hospedeiro à ação hidrolítica de enzimas fúngicas (43). A FAL, enzima chave na biossíntese de fenóis, atua logo nos primeiros passos da via do ácido shiquímico (7) e tem sido relacionada com a resistência de plantas às doenças (6).

Para café, alguns autores dosaram a atividade de PO e PFO em plantas inoculadas com ferrugem. Nacacche (32) observou aumento de PO e PFO em interações incompatíveis, no entanto, Sievers *et al.* (40) não detectaram aumento em PO passadas 38 horas após a inoculação de ferrugem em cafeeiro resistente. Brugues e Contreiras (5) inocularam cafeeiros resistentes às raças I e II de ferrugem e observaram que a maior atividade em PFO ocorria somente após quase três semanas, caindo para os níveis iniciais após a quarta semana.

Quanto a FAL, nada foi feito em café em relação ao seu comportamento quando da inoculação com ferrugem. Sobre esta enzima o que se conhece pela literatura em café é o trabalho de Carrizosa e Espitia (8), abordando aspectos metodológicos.

Conseqüentemente, desde que muito pouco é conhecido sobre o papel dos fenóis e de enzimas envolvidas no seu metabolismo em cafeeiros infectados por ferrugem, seria de se esperar que menos ainda fosse conhecido à respeito do assunto no fenômeno da resistência induzida, onde a pré-exposição do tecido vegetal a um determinado tratamento leva ao aumento de resistência à posterior inoculação com fungo patogênico. Dois trabalhos pioneiros são conhecidos sobre resistência induzida em café (4, 30), porém, não abordam sobre fenóis e enzimas.

No presente trabalho foi investigado o papel dos compostos fenólicos na resistência induzida do cafeeiro à ferrugem, a partir do pré-tratamento de discos de folhas de dois cultivares de café, suscetível e resistente, com esporos inativados da raça II de ferrugem. Estudou-se ainda, o papel das enzimas PFO, PO e FAL no fenômeno da resistência induzida do cafeeiro à ferrugem, desde que, consideradas as posições em que essas enzimas são atuantes no metabolismo dos fenóis, poderiam estar relacionadas quanto aos aspectos quantitativo (FAL) e qualitativo (PO e PFO).

## MATERIAIS E MÉTODOS

—Plantas e patógeno— A espécie *C. arabica* apresenta resistência vertical à *H. vastatrix* e segue a teoria gene-por-gene de Flor (33). As plantas usadas diferiam em apenas um gene de resistência, a saber Catuai ( $S_{h1}5 S_{h1}5$ ) e F840 CI122-18 ( $S_{h1}5 S_{h1}5 S_{h2} S_{h2}$ ). Esporos da raça II de ferrugem ( $v_5 v_5$ ) foram obtidos em plantas infectadas e mantidas em casa de vegetação. A germinação dos esporos foi testada em água destilada (15) e permaneceu entre 20-30%. A inativação dos esporos foi feita em banho maria a 70°C/2 horas e testou-se a eficiência do tratamento com a posterior germinação em água.

—Teste de disco de folhas— Folhas sadias do 2° e 3° par de folhas foram coletadas da porção mediana das plantas no campo, no meio do dia com sol pleno. O teste de discos seguiu a padronização feita por Eskes (12), acondicionando-se discos de folhas, obtidos com um furador de rolhas ( $r = 0.8$  cm), em uma caixa que tem no fundo espuma umedecida com água. A caixa é tampada com um vidro transparente e permanece em laboratório a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas e iluminação de luz fluorescente com 500-1000 lux. De cada folha coletada no campo, ao

todo 189, foram retirados 10 discos, que foram ordenados em 7 caixas, permanecendo agrupados de forma a representar a folha de origem. Em cada caixa os discos foram divididos em três grupos (Fig. 1). No mesmo dia em que isto foi feito (Dia 0), em cada disco de um grupo de cada caixa foi colocada uma gota (0,025 ml) de solução aquosa de esporos inativos de ferrugem raça II, na concentração  $2 \text{ mg ml}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ; outro grupo de cada caixa recebeu uma gota na concentração  $1 \text{ mg ml}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$  e no último grupo, os discos foram gotejados com água destilada. Cada grupo em cada caixa foi subdividido, então, em três. Um subgrupo recebeu uma gota (0,025 ml) de solução aquosa de esporos viáveis na concentração  $0,25 \text{ mg ml}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ , outro de  $0,5 \text{ mg ml}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$  e o último  $1 \text{ mg ml}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ . Porém, a inoculação com esporos viáveis foi feita em diferentes dias após o pré-tratamento com esporos inativos, correspondendo uma caixa a um dia. No dia 0 a concentração foi dobrada para ambos os tipos de esporos. Um dia após o pré-tratamento (Dia 1), as gotas do pré-tratamento sobre os discos estavam praticamente secas e as concentrações usadas de soluções com esporos viáveis foram normais. Assim, a cada dia (0, 1, 3, 5, 7, 10, 13 após o pré-tratamento) uma nova caixa era inoculada com esporos viáveis formando um fatorial de  $3 \times 3 \times 7$ . O desenvolvimento da doença foi avaliado pelo período de latência (em dias), tipo de reação (escala de 0-9 pontos), densidade de lesão (escala de 0-9 pontos) e porcentagem de discos lesionados (13).

**Extração e determinação de fenóis** – Ao mesmo tempo em que foi feito o experimento anterior, um outro semelhante foi realizado. No dia em que foram feitas as inoculações com esporos viáveis no primeiro

		esporos inativos ( $\text{mg ml}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ )			esporos viáveis ( $\text{mg ml}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ )			esporos viáveis ( $\text{mg ml}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ )		
		0	1	2	0,25	0,5	1	0,25	0,5	1
discos de folhas		000	000	000	000	000	000	000	000	000
		000	000	000	000	000	000	000	000	000
		000	000	000	000	000	000	000	000	000
		000	000	000	000	000	000	000	000	000
		000	000	000	000	000	000	000	000	000
		000	000	000	000	000	000	000	000	000
		000	000	000	000	000	000	000	000	000
		000	000	000	000	000	000	000	000	000
		000	000	000	000	000	000	000	000	000
		000	000	000	000	000	000	000	000	000

Fig. 1 Esquema de inoculação de um grupo, ou de um dia.

experimento, no segundo os discos eram analisados quando ao teor total de fenóis. Desta forma, observou-se a influência do pré-tratamento sobre estes compostos. A extração foi feita com etanol 70% (lg peso fresco/20 ml) por 90 minutos sob refluxo (17). A determinação do conteúdo total de fenóis seguiu o método de Swain e Hillis (41).

**Identificação cromatográfica dos compostos fenólicos** – Os extratos etanólicos foram reduzidos de volume e resuspenso em metanol 80% (1,5 ml). Aplicou-se 0,05 ml de extrato metanólico por placa e na primeira direção empregou-se butanol: ácido acético: água (6:2:1) e na segunda, ácido acético 2% (11, 38). As placas foram observadas em UV longo e curto, com e sem vapores de amônia, e reveladas com solução aquosa de  $\text{FeCl}_3$  e  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , para fenóis totais (3), solução etanólica de  $\text{AlCl}_3$  com observação em UV, para flavonóides (35, 38) e com solução HCl-Vanilina 10%; para flavonóides com núcleo floroglucinol (35, 37).

**Enzimas** – Em face aos resultados obtidos nos testes de discos, que evidenciaram resistência induzida no pré-tratamento com  $2 \text{ mg ml}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$  de esporos inativos (ver Resultados), as dosagens das atividades das enzimas foram feitas nessa concentração e  $0 \text{ mg ml}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ .

**Extração e dosagem da atividade de peroxidase e polifenoloxidase** – A extração de PO e PFO seguiu o método de Nacacche (32) com pequenas alterações. Discos de folhas ( $\pm 350 \text{ mg}$ ) foram macerados a frio ( $4^\circ\text{C}$ ) com 2 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 contendo KCl 0,8 M e ácido ascórbico 0,05 M. O volume foi completado a 5 ml e submetido a centrifugação a 10 000 rpm por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . O precipitado foi ressuspenso em 4 ml de tampão e novamente centrifugado. Aos sobrenadantes misturados adicionou-se 0,5 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e após filtração o extrato foi submetido a coluna de Sephadex G-25. Para as dosagens de atividade de PO utilizou-se o método de Kar e Mishra (20), porém, substituiu-se guaiacol por pirogalol como substrato. A mistura de reação continha 1,6 ml de tampão fosfato 0,125 M, pH 6,8, 1 ml de pirogalol 0,2 M, 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,25% e 0,4 ml de extrato enzimático. Como branco substituiu-se peróxido por tampão. A incubação foi feita a  $25^\circ\text{C}$  por 30 minutos, a reação interrompida por adição de 0,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5% e procedeu-se à leitura de absorbância em 420 nm. A atividade de PFO também seguiu o método de Kar e Mishra (20). A mistura de reação continha 2 ml de tampão fosfato 0,125 M, pH 6,8, 1 ml de pirogalol 0,2 M e 0,4 ml de extrato enzimático. O tampão fosfato continha piruvato de sódio 0,1 M para impedir a liberação de peróxido, que poderia estimular PO interferindo nos res-

Tabela 1. Período de latência (dias) em discos de folhas de Catuaí inoculados com raça II de ferrugem após pré inoculação com esporos inativos de ferrugem raça II.

	Esporos mgml <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O	Dias após a pré inoculação							$\bar{x}$
		0	1	3	5	7	10	13	
Inativo	Viável	*							
		**							
0	0.25	28.6	34.4	26.2	36.9	30.0	37.0	30.8	32.0
	0.50	29.7	28.0	28.7	32.0	28.2	32.0	30.3	29.8
	1.00	29.8	28.0	26.5	31.6	32.0	29.3	33.2	30.1
$\bar{x}$		29.4	30.1 <sup>▲</sup>	27.1	33.5	30.1	32.8	31.4	30.6
1	0.25	33.6	31.0	29.2	31.0	28.0	33.8	28.9	30.8
	0.50	29.3	29.1	27.9	32.8	30.3	28.9	27.9	29.5
	1.00	34.5	29.0	32.8	32.0	28.6	31.9	32.1	31.6
$\bar{x}$		32.5	29.7 <sup>▲</sup>	29.9	31.9	29.0	31.5	29.6	30.6
2	0.25	35.4	36.2 <sup>△</sup>	31.1	33.3	31.5	30.3	32.3	32.9
	0.50	29.7b	61.5a <sup>○</sup>	34.5b	36.5b	28.0b	31.5b	39.0b	36.0
	1.00	30.4	38.3 <sup>△</sup>	28.6	33.3	30.8	31.5	30.3	32.4
$\bar{x}$		31.8b	45.3a <sup>■</sup>	31.4b	34.3b	30.1b	31.1b	32.2b	33.7
$\bar{x}$		31.2	35.1	29.5	33.3	29.7	31.8	31.1	31.7
CV%		9.49							

\* Médias de três repetições.

\*\* Letras diferentes indicam significância pelo teste de Tukey a 5% entre dias, símbolos cheios entre pré-tratamentos com esporos inativos em um determinado dia e símbolos vazios entre tratamentos com esporos viáveis em um determinado pré-tratamento com esporos inativos em um determinado dia.

sultados (40). A incubação foi feita a 37°C por 30 minutos (40), a reação interrompida adicionando-se 0.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% e as leituras de absorbância foram feitas em 420 nm. Para ambas as enzimas os resultados da dosagem de atividade foram expressos em unidades de enzima, ou seja, a quantidade de proteína que causa a variação de uma unidade de absorbância por minuto (10).

Extração e dosagem de fenilalanina amônia-liase – Para extração da FAL preparou-se pó-cetônico de discos de folhas, conforme estabelecido por Carrizosa e Espitia (8). O tecido foi macerado com acetona 2% 2-mercaptoetanol a -25°C, na proporção de 1g de tecido verde/20 ml. O homogenato foi filtrado sob vácuo em funil de Buckner, efetuando-se, em seguida, lavagem com acetona 2% 2-mercaptoetanol (80 ml) a -25°C. Nova lavagem foi feita utilizando-se acetona a -25°C (20 ml). Para extração da FAL o pó-cetônico foi suspenso em tampão borato 0.1M, pH 8.8, na proporção de 1/100 (p/v), com agitação por 60 minutos a 4°C. O extrato foi centrifugado por 30 minutos em 20 000 rpm, a 4°C, e o sobrenadante utilizado para dosagem de atividade (8). O meio de reação continha 0.5 ml do extrato enzimático, 1ml de L-fenilalanina 12mM e 1.5 ml de tampão borato 0.1M, pH 8.8. Como branco substituiu-se o substrato por tampão. A

incubação deu-se a 40°C por 90 minutos e as leituras de absorbância foram feitas em 290 nm (8). Os resultados de atividade da FAL foram expressos em unidades de absorbância.

## RESULTADOS

Teste de disco de folhas – Apesar de ser conhecido que o cafeeiro C1122-18 é resistente a ferrugem raça II, foram feitas as inoculações com esporos viáveis após o pré-tratamento com esporos inativos. Como esperado, não foi observado desenvolvimento do fungo nos discos de folhas, portanto, os resultados deste item referem-se ao Catuaí.

Na Tabela 1 são apresentados os dados de período de latência (PL). Na média geral de pré-tratamentos não houve diferenças significativas mas, na média de dias do pré-tratamento 2 mgml<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O o dia 1 foi diferente dos restantes. No dia 1 este pré-tratamento foi diferente dos outros. Na interação 2 mgml<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O/dia 1 a concentração 0.5 mgml<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O de esporos viáveis teve o maior PL, em outras palavras, o desenvolvimento e a esporulação da ferrugem foi mais lenta do que nas outras interações. Na interação 2 mg/0.5 mgml<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O o dia 1 foi diferente dos restantes, com maior valor para PL.

A Tabela 2 contém os dados de tipo de reação (TR). Somente nos dias 1 e 3 é que foram observados diferenças significativas entre os pré-tratamentos com esporos inativos. A concentração  $2 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$  teve os menores valores. Neste pré-tratamento o dia 1 diferiu de todos os outros. Apesar de não ter sido observada diferença significativa na interação  $2 \text{ mg}/0.5 \text{ mg}/\text{dia } 1$ , ela mostrou-se com o melhor valor para TR.

Em densidade de lesões (DL) (Tabela 3) a média do pré-tratamento de concentração  $2 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$  teve o menor valor, seguida por  $1 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ . Na média geral de dias, o dia 0 diferiu de todos os outros com exceção do dia 3, que foi estatisticamente igual aos restantes. Na média de dias por pré-tratamento, o dia 1 foi diferente dos outros na concentração  $1 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$  e na concentração  $2 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ , foi diferente do dia 3, mas igual aos dias 5, 7, 10 e 13. No dia 1 as concentrações  $1 \text{ mg}$  e  $2 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$  diferiram do controle ( $0 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ ), ocorrendo o mesmo no dia 3, e nos dias 5, 7 e 13 a maior concentração teve menor DL que  $1 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$  e o controle.

Para porcentagem de discos lesionados (PDL) (Tabela 4) a média do pré-tratamento  $1 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$  foi diferente dos outros. No dia 1 os pré-tratamentos  $1 \text{ mg}$  e  $2 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$  mostraram menor PDL que o controle. Nos dias 3, 5 e 7, o tratamento de concen-

tração intermediária diferiu do controle mas não da quele de maior concentração.

—Teor total de fenóis— Em Catuai o teste de variância indicou significância a 1% para a interação concentração de esporos inativos e dias. A decomposição desta interação mostrou diferenças significativas a 5% entre concentração de esporos inativos no dia 1, e a 1% entre dias para cada pré-tratamento. No entanto, tais diferenças não foram evidenciadas pelo teste de Tukey 5%. Contudo, observando a Tabela 5, notamos que, de um modo geral, os maiores valores para fenóis encontram-se nos dados do controle ( $0 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ ). Para C1122-18 não foi possível observar o mesmo, mas este genótipo apresentou maior conteúdo de fenóis do que Catuai.

—Análises cromatográficas— As Figs. 2 e 3 mostraram os cromatogramas dos extratos metabólicos de Catuai e C1122-18, respectivamente, representando os vários dias de análise dos discos que sofreram tratamentos com  $0 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$  e  $2 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$  de esporos inativos. Ao todo foram identificadas 49 manchas, sendo 42 comuns aos dois genótipos de café. O Quadro 1 representa as identificações quanto a fenol, flavonóide e flavonóide com núcleo floroglucinol. Em Catuai (Fig. 2) foram identificadas 45 manchas e as de número 4 e 44 não foram encontradas em C1122-18. A mancha 31 foi muito pouco visível nos dias 0 e

Tabela 2. Tipo de reação (0 a 9 pontos) em discos de folhas de Catuai inoculados com raça II de ferrugem após pré inoculação com esporos inativos de ferrugem raça II.

	Esporos		Dias após a pré inoculação							
	$\text{mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$		0	1	3	5	7	10	13	$\bar{x}$
Inativo	Viável	*								
		**								
0	0.25	8.3	8.7	9.0	8.5	8.7	8.0	8.7	8.6	
	0.50	8.0	9.0	8.7	8.0	8.7	8.0	8.7	8.4	
	1.00	8.0	9.0	8.7	8.7	7.0	8.7	8.0	8.3	
$\bar{x}$		8.1	8.9 <sup>▲</sup>	8.8 <sup>▲</sup>	8.4	8.1	8.2	8.5	8.4	
1	0.25	7.0	8.0	8.3	9.0	8.5	7.7	9.0	8.2	
	0.50	8.0	8.7	8.3	8.0	8.3	8.7	8.7	8.4	
	1.00	6.0	8.7	7.3	7.0	8.3	8.5	8.5	7.8	
$\bar{x}$		7.0	8.5 <sup>▲</sup>	8.0 <sup>▲●</sup>	8.0	8.4	8.3	8.7	8.1	
2	0.25	6.0	6.0	8.0	7.9	8.0	8.0	8.0	7.4	
	0.50	7.0	3.0	5.7	6.0	8.0	7.5	7.3	6.4	
	1.00	7.7	6.0	8.0	7.9	8.3	8.0	8.0	7.7	
$\bar{x}$		6.9a	5.0b <sup>●</sup>	7.2a <sup>●</sup>	7.3a	8.1a	7.8a	7.8a	7.2	
$\bar{x}$		7.3	7.5	8.0	7.9	8.2	8.1	8.3	7.9	
CV%		10.59								

\* Médias de três repetições.

\*\* Letras diferentes indicam significância pelo teste de Tukey a 5% e símbolos cheios entre pré-tratamentos com esporos inativos em um determinado dia.

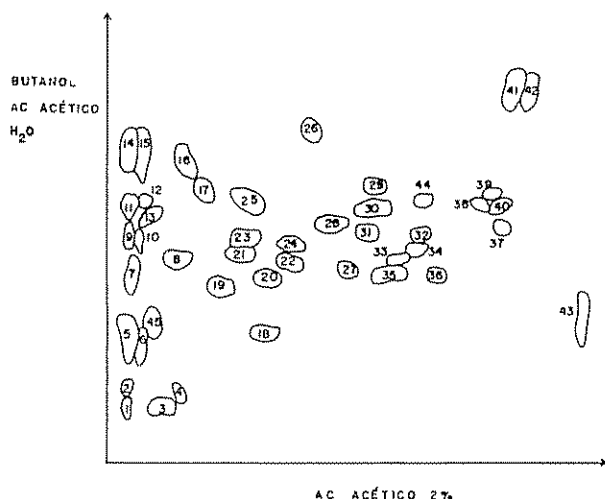


Fig. 2. Representação dos cromatogramas dos extratos de Catuaí, no ensaio de pré-inoculação com esporos inativos de ferrugem raça II

1 na concentração  $0 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ , sendo visualizada melhor nos dias 1, 3 e 5 de  $2 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ . A mancha 44 foi detectada apenas nos dias 3 e 5 de  $2 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ .

Em C1122-18 (Fig. 3) identificaram-se 47 manchas sendo que as de número 46, 47, 48 e 49 não eram comuns a Catuaí. Também neste genótipo a mancha 31 apareceu no dia 0 e foi melhor visualizada nos dias 3 e 5 de  $2 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ . A mancha número 47 foi observada somente em  $2 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$  nos extratos dos dias 3, 5, 7 e 10.

As manchas 31 e 44 foram identificadas como flavonóis e a 47 como isoflavona, segundo as observações em UV e a série de revelações realizadas.

Quanto às atividades das enzimas estudadas, em nenhum dos casos foram observadas diferenças significativas entre o tratamento controle ( $0 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ ) e com solução de  $2 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$  de esporos inativos de ferrugem raça II (dados não apresentados). Apenas foram detectadas algumas variações significativas para dias após o tratamento. Isto ocorreu para PO no cultivar C1122-18 e para PFO em Catuaí, no entanto, tais dados não mostraram uma variação coerente de atividades, e que pudessem ser relacionadas com os valores encontrados para fenóis totais.

Quanto a FAL, o cultivar C1122-18 apresentou tendência a possuir maior atividade do que o Catuaí, tanto no controle como no tratamento  $2 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ .

#### DISCUSSÃO

Em café, somente dois trabalhos são conhecidos

sobre a resistência induzida à ferrugem com o próprio patógeno (4, 30). Neles avaliou-se somente o número de lesões, não sendo oferecidas informações sobre velocidade e/ou intensidade de esporulação. No presente trabalho isto foi observado através de PL e TR, no entanto, tanto para estes parâmetros como para DL e PDL faltaram maiores evidências para que fossem destacadas as interações proporcionadas segundo o modelo estatístico adotado (fatorial  $3 \times 3 \times 7$ ). Porém, isto pode, em parte, ser explicado pelo fato do teste de variância ser baseado em médias e ao rigor do teste de Tukey.

De modo geral, pode-se concluir que na combinação  $2 \text{ mg}/0 \text{ mg}/\text{dia 1}$  a resistência induzida expressou-se com maior intensidade. PL foi o parâmetro que mais evidenciou esta interação. Apesar de não ter sido diferenciado estatisticamente, pode-se notar que, em relação a  $0 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}/0 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ , na combinação  $2 \text{ mg}/0 \text{ mg}$  os quatro parâmetros avaliados mostraram resistência induzida com maior intensidade no dia 1, decrescendo nos outros dias, principalmente quando considerados os dias 3 e 5.

Beretta *et al.* (4) induziram resistência à ferrugem em café, através da pré-exposição das folhas de mudas do cultivar Mundo Novo de *C. arabica* à esporos inativados termicamente ( $120^\circ\text{C}$ ). Os autores observaram que o pré-tratamento com esporos inativos na concentração de  $2 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$  conferia resistência em níveis constantes até o sétimo dia à inoculação com esporos viáveis ( $2 \text{ mgml}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ ). Após este dia o número de lesões aumentava novamente, tendendo a igualar-se ao controle no 14º dia. No presente trabalho não foi notada a manutenção dos níveis de resistência iguais ao dia 1 nos outros dias.

Cabe, portanto, ressaltar que Beretta *et al.* (4) permitiram um intervalo de 96 horas entre o pré-tratamento com esporos inativos e a inoculação em si. Ainda, após a inoculação, as plantas permaneceram por 72h sob incubação em ambiente com alta umidade. Considerando-se que o indutor presente nos esporos de ferrugem localiza-se externamente na parede celular e é liberado facilmente em água (1, 4, 29), tais autores deram condições bastante propícias para que isto ocorresse pois, o período de molhamento foi de pelo menos três dias (72 horas), já que não foi citado em que condições permaneceram as plantas após o pré-tratamento, e no máximo de sete dias (96 horas + 72 horas).

Para o presente trabalho, o período de molhamento foi no máximo de dois dias, já que no dia 1 as gotas do pré-tratamento encontravam-se praticamente secas e a incubação com esporos viáveis era de 24

Tabela 3. Densidade de lesões (0 a 9 pontos) em discos de folhas de Catuaí inoculados com raça II de ferrugem após pré inoculação com esporos inativos de ferrugem raça II.

Esporos mgml <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O		Dias após a pré inoculação							
		0	1	3	5	7	10	13	$\bar{x}$
Inativo	Viável	*							
		**							
0	0.25	7.0	5.7	6.7	3.5	7.0	4.0	3.3	5.3
	0.50	6.3	8.0	5.7	5.8	6.7	3.3	5.0	5.8
	1.00	7.0	6.7	6.7	6.0	3.7	5.3	3.7	5.6
$\bar{x}$		6.8	6.8 $\Delta$	6.4 $\Delta$	5.1 $\Delta$	5.8 $\Delta$	4.2	4.0 $\Delta$	5.6 $\Delta$
1	0.25	5.3	2.7	4.0	4.0	3.5	2.7	4.5	3.8
	0.50	6.0	3.3	4.3	4.5	4.7	6.3	4.7	4.8
	1.00	5.7	3.0	4.3	3.0	4.0	3.5	4.5	4.0
$\bar{x}$		5.7a	3.0b $\circ$	4.2a $\circ$	3.8a $\Delta$	4.1a $\Delta$	4.2a	4.6a $\Delta$	4.2 $\bullet$
2	0.25	5.0	1.0	4.0	3.6	3.8	3.0	1.5	3.1
	0.50	6.3	1.0	2.7	2.0	3.0	2.0	2.0	2.7
	1.00	5.0	1.5	5.7	3.6	3.8	3.0	1.5	3.4
$\bar{x}$		5.4a	1.2c $\circ$	4.1ab $\circ$	3.1abc $\circ$	3.5abc $\circ$	2.7bc	1.7bc $\circ$	3.1 $\#$
$\bar{x}$		6.0a	3.7b	4.9ab	3.9b	4.5b	3.7b	3.4b	4.3
CV%		31.37							

\* Médias de três repetições

\*\* Letras diferentes indicam significância pelo teste de Tukey a 5% entre dias, símbolos vazios entre pré-tratamentos com esporos inativos em um determinado dia e símbolos cheios entre pré-tratamentos com esporos inativos

horas. Caso realmente o tempo de molhamento afete a resistência induzida, explicando a diferença entre os dois trabalhos, torna-se bastante importante um dos pontos levantados por Johnson (18) para esta resistência, relativo ao tempo em que ela é eficiente após a indução. Isto poderia limitar a sua aplicação em condições de campo, entretanto, teria ainda um importante papel no melhoramento de plantas resistentes à doenças pois, pode gerar informações para a compreensão do controle genético de mecanismos de reconhecimento entre plantas e agentes patogênicos (39).

Fixando-se uma concentração de esporos inativos seria de se esperar que o aumento gradual da quantidade inoculada de esporos viáveis levasse a maiores valores de DL e PDL e menores de PL e TR. Isto não ocorreu quando considerada a concentração 2mg ml<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O de esporos inativos, pois, a combinação deste pré-tratamento com a inoculação com a solução 0.5mgml<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O de esporos viáveis levou a menores valores de DL e PDL e maiores de PL e TR, quando comparada à inoculação de 0.25 mgml<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O de esporos viáveis. Frente a isto poder-se-ia considerar a influência nos resultados através da presença de um auto inibidor (31), obstrução física dos estômatos impedindo a penetração do fungo na folha, presença do parasita *Verticillium hemileiae* (2) e de outros mi-

croorganismos que inibissem a germinação dos esporos de ferrugem, como por exemplo, bactérias.

A primeira hipótese pode ser descartada facilmente, já que a interação 2mg/lmg apresentava maior quantidade de esporos, logo, de auto inibidor. A mesma justificativa pode ser aplicada à segunda hipótese, porém, para confirmação foram feitas impressões foliares dos discos com esmalte sintético (26), excluindo a obstrução física como interferência.

O fungo *V. hemileiae* parasita a ferrugem do café, rompendo a parede dos esporos (2). Tal fungo quando presente se manifesta por formar um esbranquiçamento no centro das lesões, o que não ocorreu durante a condução dos experimentos.

Quanto a interferência por bactérias foram feitas impressões foliares em discos que receberam as combinações 2mg/0.5 mg e 0 mg/0.5 mg nos dias 1 e 3. Na primeira combinação os dados sobre germinação foram divididos por 5 e os valores obtidos foram de 14.7% para o dia 1 e 12.2% para o dia 3. No controle a germinação foi de 12.4% e 16.1% nos dias 1 e 3, respectivamente, excluindo a influência de bactérias sobre a germinação.

Segundo Medeiros e Rodrigues Jr (28) e Rodrigues Jr et al. (36), que sugeriram a presença de compostos

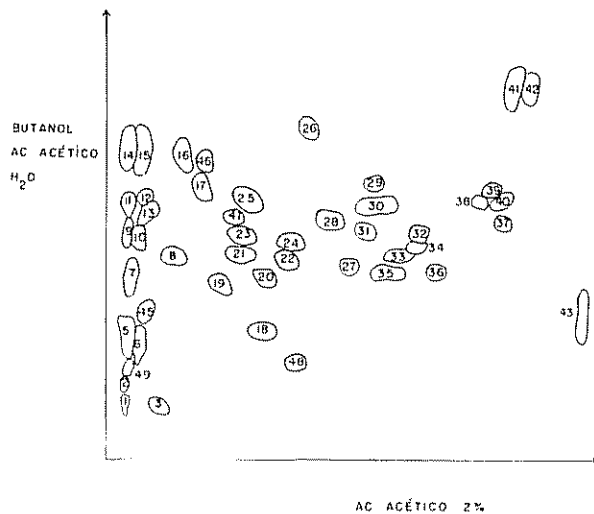


Fig 3 Representação dos cromatogramas dos extratos de C1122-18, no ensaio de pré-inoculação com esporos inativos de ferrugem raça II.

tipo fitoalexinas em interações incompatíveis de café-ferrugem, a resistência vertical, expressa pelos genes  $S_{H_1}$ , não implicaria diretamente na produção de compostos fungitóxicos e sim que, os produtos codificados por estes fatores seriam responsáveis pelo reconhecimento da raça do patógeno. Posteriormente haveria a produção ou aumento da quantidade de com-

postos fungitóxicos. Isto de certa forma equivale ao conceito gene-por-gene de Flor (14), onde para um gene de avirulência do patógeno existe um gene de resistência do hospedeiro. Assim, a interação entre os produtos destes genes levariam para a incompatibilidade. Na ausência de genes de resistência na planta, que reconheceria o produto do gene do patógeno, haveria a suscetibilidade, da mesma forma que uma mutação no patógeno poderia levar a esta mesma reação.

Outra teoria que procura explicar a forma como ocorre o reconhecimento entre patógeno e hospedeiro propõe que, a suscetibilidade ocorre quando um produto de um gene de virulência interage com o produto do gene de suscetibilidade de planta, havendo o bloqueio da reação de defesa da planta. Na introdução de um novo gene de suscetibilidade por melhoramento, ou ocorrendo mutação, não ocorreria mais o bloqueio do mecanismo de defesa (44).

No entanto, tais modelos não se adaptam aos resultados aqui obtidos, assim como aos de outros autores (4, 30), onde induziu-se a resistência em café a uma raça patogênica de ferrugem com esporos da mesma raça, porém, inativados. Portanto, houve o reconhecimento entre planta e o patógeno na forma inativada.

Desta forma, seria mais aceitável a proposta de que o reconhecimento entre planta e patógenos não é es-

Tabela 4. Porcentagem de discos lesionados (%) em discos de folhas de Catuaí inoculados com raça II de ferrugem após pré inoculação com esporos inativos de ferrugem raça II.

Esporos		Dias após a pré inoculação							
mg/ml H <sub>2</sub> O		0	1	3	5	7	10	13	$\bar{x}$
Inativo	Viável	*							
		**							
0	0.25	80.4	71.1	76.3	66.3	84.1	50.9	35.2	66.3
	0.50	83.3	100.0	66.3	70.5	71.5	46.6	55.4	70.5
	1.00	95.8	73.3	80.6	66.7	70.0	69.3	42.5	71.2
$\bar{x}$		86.5	81.5 $\Delta$	74.4 $\Delta$	67.8 $\Delta$	75.2 $\Delta$	55.6	44.4	69.3 $\Delta$
1	0.25	64.0	27.0	44.9	37.5	34.0	40.0	62.5	44.3
	0.50	81.9	36.1	50.5	40.0	45.7	68.2	48.9	53.0
	1.00	70.4	33.6	48.5	51.3	60.1	50.0	45.0	51.3
$\bar{x}$		72.1	32.2 $\circ$	48.0 $\circ$	42.9 $\circ$	46.6 $\circ$	52.7	52.1	49.5 $\bullet$
2	0.25	57.6	13.7	58.9	62.5	60.9	54.4	48.3	50.9
	0.50	80.4	11.1	31.0	55.5	61.0	54.3	48.2	48.8
	1.00	62.5	16.3	74.1	70.0	60.9	54.3	47.9	55.1
$\bar{x}$		66.8	13.7 $\circ$	54.7 $\circ\Delta$	62.7 $\circ\Delta$	60.9 $\circ\Delta$	54.3	48.1	51.6 $\Delta$
$\bar{x}$		75.1	42.5	59.0	57.8	60.9	54.2	48.2	56.8
CV%		30.91							

\* Médias de três repetições.  
 \*\* Símbolos vazios diferentes indicam significância pelo teste de Tukey a 5% entre pré-tratamentos com esporos inativos em um determinado dia e símbolos cheios entre pré-tratamentos com esporos inativos.



Tabela 5. Teor de fenóis totais em Catuai e C1122-18 (mgs tecido verde) – ensaio de pré inoculação de discos de folhas de café com esporos inativos de ferrugem raça II.

Esporos mgml <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O	Dias após a pré inoculação							$\bar{x}$
	0	1	3	5	7	10	13	
Catuaí	*							
0	13.4	16.0	14.2	12.9	14.5	15.4	12.8	14.2
1	13.4	12.0	13.5	15.2	11.7	12.3	11.4	12.8
2	13.4	12.6	13.4	11.2	15.1	13.4	11.6	12.9
$\bar{x}$	13.4	13.5	13.7	13.1	13.8	13.7	11.9	13.3 <sup>▲</sup>
CV%	11.03							
C1122-18								
0	16.0	15.1	15.2	15.2	12.9	15.1	14.8	14.9
1	16.0	13.7	12.8	14.9	12.7	13.9	15.4	14.2
2	16.0	15.4	13.8	15.8	13.5	15.3	14.2	14.9
$\bar{x}$	16.0	14.7	13.9	15.3	13.1	14.8	14.8	14.6 <sup>●</sup>
CV%	11.87							
$\bar{x}$	14.7	14.1	13.8	14.2	13.4	14.2	13.4	14.0

\* Médias de três repetições.

\*\* Símbolos cheios diferentes indicam significância pelo teste de Tukey a 5% entre genótipos

pecífico, já que mesmo raças avirulentas, ou ainda microorganismos não virulentos, podem induzir resistência em plantas (16, 23). A expressão da resistência seria dependente da presença de informação genética para mecanismos de resistência e da rapidez e magnitude pela qual esta seria transmitida e o (s) seu (s) produto (s) formado (s) (23, 24).

Segundo os dados sobre o teor total de fenóis, PL, TR, DL e PDL pode-se afirmar que, muito provavelmente, não houve relação entre a quantidade destes compostos e a resistência induzida observada. Porém não pode ser descartada a possibilidade de produção ou aumento em quantidade de um determinado composto mas, sem afetar de forma mensurável o conteúdo de fenóis totais.

Nacacche (32) observou aumento no total de fenóis em combinações compatíveis e incompatíveis de café e ferrugem. O aumento foi mais rápido e pronunciado nos casos de incompatibilidade. Por outro lado, Bruges e Contreiras (5) não observaram aumento nestes compostos e quinonas em interações incompatíveis de café e ferrugem, concluindo que não era possível atribuir a resistência observada à ação fungistática que poderia ocorrer devido ao acúmulo de fenóis, alegando ainda, que a resistência estaria associada a diferenças qualitativas dos compostos fenólicos, que poderiam estar presentes antes ou após a infecção. Quanto a este último aspecto, Lopes e Monaco (25) não conseguiram traçar qualquer relação entre tipos de compostos fenólicos encontrados nos frutos de vários cafeeiros e resistência à ferrugem.

Apesar de C1122-18 ter apresentado maior conteúdo de fenóis do que Catuaí, a sua resistência a raça II de ferrugem não poderia ser explicada somente por este aspecto quantitativo, já que é suscetível a outras raças de ferrugem.

Portanto, supondo-se que realmente os fenóis estejam relacionados à resistência do cafeeiro à ferrugem, a indução de resistência observada em discos de folhas de Catuaí não poderia ser explicada pelo aspecto quantitativo e sim pelo qualitativo, como observado nos cromatogramas das Figs. 2 e 3.

A resistência induzida em Catuaí foi observada com maior intensidade no dia 1 na combinação 2mg/0.5mg, mas, como citado anteriormente, ela parece também ter se manifestado nos outros dias, principalmente 3 e 5, com menor intensidade. No entanto, a mancha 44, identificada como um flavonol, foi observada somente nos dias 3 e 5. Isto poderia ser explicado pelo fato de que nestes dias a quantidade acumulada fosse tal, permitindo a visualização pelos métodos empregados. Mesmo a aplicação de maiores quantidades do extrato metanólico não permitiu a observação da mancha 44 no dia 1. Assim, seria correto afirmar que o aparecimento deste flavonol estivesse relacionado com o processo de resistência induzida mas, que o mesmo não seria o único responsável pela diminuição da infecção pela ferrugem nos discos de folhas de Catuaí. Comentário semelhante é válido para a mancha 47, identificada como uma isoflavona, visualizada em C1122-18.

Supondo-se serem estes compostos do tipo fitoalexinas, o discutido acima vêm, em parte, confirmar que tais compostos não são notáveis agentes antibióticos, pois, a quantidade requerida para interromper o avanço de uma infecção é considerada bastante alta ( $LD_{50} = 1 \text{ a } 5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) (9, 24)

Quanto a mancha 31, identificada como um flavonol, provavelmente o seu aparecimento esteja relacionado aos ferimentos provocados pelo furador empregado na retirada dos discos, já que a mesma apareceu, para ambos os genótipos estudados, desde o dia 0 no tratamento controle

Nacacche (32) detectou aumento de PO e PFO em discos de folhas de cafeeiros ( $S_h 1$ ,  $S_h 4$  e  $S_h 5$ ) inoculados com raça II de ferrugem, originando combinações compatíveis e incompatíveis. Nas interações de resistência o pico de atividade de PFO deu-se logo no 5º dia após a inoculação, enquanto que para a reação de suscetibilidade houve aumento significativo somente após o 28º dia. Para PO observou-se maior atividade no 14º dia nas interações incompatíveis e nas compatíveis não se observou aumento significativo dessa enzima. Quando discos de folhas foram expostos ao indutor extraído da parede celular dos esporos de ferrugem, houve aumento de PO e PFO nas combinações incompatíveis no período de 24 horas, no entanto, o aumento de atividade nas compatíveis não foi nítido. Assim, isto, de certa forma, confirma os dados obtidos sobre a atividade dessas enzimas no processo de resistência induzida.

Contrariando os resultados de Nacacche (32) surge o trabalho de Sievers *et al.* (40), que não detectaram aumento em PO em 38 horas após a inoculação de café ( $S_h 2$ ) com esporos incompatíveis de ferrugem. Da mesma forma, Bruges e Contreiras (3) constataram que a máxima atividade de PFO —em combinações incompatíveis de café e ferrugem ocorria somente após 20 dias da inoculação e caía para o nível inicial após o 27º dia, sendo que este aumento era desprezível quando comparado com a planta sadia.

Segundo Sievers *et al.* (40), o aumento de PO em interações compatíveis de ferrugem e café ( $S_h 2$ ) ocorreu somente após várias semanas depois da inoculação o que, juntamente com alguns dos dados de Nacacche (32), pode levar à suposição de que o aumento dessa enzima em plantas suscetíveis de café inoculadas com ferrugem seja mais uma consequência do que uma causa (19, 45), pois nos períodos considerados o fungo já se encontra estabelecido no mesófilo foliar.

Assim, os resultados aqui obtidos para PFO e PO vêm mostrar a complexidade do assunto, ressaltando ainda mais que no processo de indução de resistência outras enzimas do metabolismo dos fenóis podem estar envolvidas e que a resistência em si parece ser um processo dinâmico, onde muitos fatores podem estar envolvidos.

A dosagem da atividade da FAL indicou que não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, entretanto, C1122-18 mostrou tendência a apresentar maiores valores do que Catuaí. Tal resultado, visto desta forma, é concordante com o fato de que C1122-18 apresenta maior teor de fenóis do que Catuaí, permitindo especulações sobre a capacidade dessa enzima afetar o conteúdo dos compostos fenólicos nas células.

Os valores de atividades obtidos para FAL variaram bastante, apresentando o Catuaí um coeficiente de variação de 58% e C1122-18 de 50%, assim como os valores encontrados mostraram-se razoavelmente baixos. Para estudos da FAL em outras plantas tem-se utilizado de metodologias conhecidas e que não apresentam maiores dificuldades (46). Porém, em café a extração e dosagem dessa enzima parece possuir certa dificuldade no que diz respeito, principalmente, à interferência de fenóis, que uma vez unidos à proteínas causam a formação de polímeros praticamente insolúveis (34). Isto justificou o trabalho desenvolvido por Carrizosa e Espitia (8). No entanto, para o presente trabalho parece que algum tipo de interferência deve ter ocorrido, levando à obtenção de valores baixos de atividades e que, com relação à indução de resistência, não permitiu conclusões concretas.

Conclui-se, portanto, que no processo de resistência induzida do cafeeiro à ferrugem o metabolismo dos fenóis, se atuante, está aparentemente relacionado com o (s) tipo (s) de composto (s) e que, provavelmente, outras enzimas podem estar envolvidas no processo. Em face à dimensão e à grande variedade de compostos que podem ser formados através do metabolismo de fenóis, quinonas, ligninas, aminoácidos, ácidos cinâmicos e ácidos coumáricos, e a posição onde agem as três enzimas estudadas, as mesmas poderiam ser consideradas como atuantes em extremos da via biossintética, pouco sujeitas, portanto, a alterações significativas em suas atividades.

Com isto novos estudos estão sendo conduzidos a fim de se estudar a real importância dos fenóis na resistência induzida do cafeeiro à ferrugem, assim como a participação de outras enzimas no processo.

## LITERATURA CITADA

1. ALBA, A.P.C.; GUZZO, S.D.; MAHLOW, M.P.F.; MORAES, W.B.C.; 1983. Common antigens in extracts of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. urediospores and *Coffea arabica* leaves and roots. Fitopatologia Brasileira 8:473-483.
2. BALDACCI, E.; GLILLINI, C.A.; SCARAMUZZI, G. 1971. Studies by transmission and scanning electron microscopy on the *Hemileia vastatrix-Verticillium hemileiae* association. Revista di Patol. Veg. 7:127-145.
3. BARTON, G.M.; EVANS, R.S.; GARNER, J.A.F. 1952. Paper chromatography of phenolic substances. Nature (London) 170:249-250.
4. BERETTA, M.J.G.; MARTINS, E.M.F.; MORAES, W.B.C. 1977. Induced protection to *Hemileia vastatrix* at a distance from the site of inducing action in coffee plants. Summa Phytopatologica 3(1):66-70.
5. BRUGES, J.; CONTREIRAS, J. 1968. Aspects biochimiques de la résistance du caféier à l'*Hemileia vastatrix*. Portugalia Acta Biol. Série A 10:75-88.
6. BURREL, M.M.; APRILES, J. 1974. Metabolism of phenylalanine and tyrosine by rice leaves infected by *Piricularia oryzae*. Physiological Plant Pathology 4:497.
7. CAMM, E.L.; TOWERS, G.H.N. 1977. Phenylalanine ammonia-lyase. Progress in Phytochemistry 4:169-188.
8. CARRIZOSA, M.I.; ESPINOSA, H.Z. 1982. Determinación de la fenilalanina amonio-lyase en extractos de hojas de cuatro variedades de café y en otros tejidos vegetales. Tese de Graduação em Química Colômbia, Universidade de Bogotá.
9. DARVILL, A.G.; ALBERSHILN, P. 1984. Phytoalexins and their elicitors. A defense against microbial infection in plants. Annual Review of Plant Physiology 35:243-275.
10. DRAETTA, I.S.; LIMA, E.E. 1976. Isolamento e caracterização das polifenoloxidasas do café. Coletânea do Inst. de Tecnol. Alimentos (Campinas) 7:13-28.
11. EGGER, K. 1969. Plant phenol derivatives. In Thin Layer Chromatography. Ed. by E.S. Stahl. New York, Springer-Verlag, p. 687-706.
12. ESKES, A.B. 1982. The use of leaf disc inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). Netherlands Journal of Plant Pathology 88(4):127-141.
13. ESKES, A.B.; TOMA-BRAGHINI, M. 1981. Assessment methods for resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.). Plant Protection Bull. (FAO) 29:56-66.
14. FLOR, H.H. 1956. The complementary genetic system in flax rust. Advances in Genetics 8:29-59.
15. FUMIKO ITO, M.; SOAVE, J. PARADELA F., O.; RIBEIRO, I.J.A. 1978. Efeitos do substrato água sobre a germinação de uredosporos de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. Summa Phytopatologica 4:83-88.
16. GOODMAN, R.N.; KYRALY, Z.; ZAILLIN, M. 1967. Phenol metabolism. In Biochemistry and Physiology of Infectious Plant Disease, D. Van Nostrand, Inc. p. 187-231.
17. HARBORNE, J.B. 1973. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis. Ed. by J.B. Harborne, London, Chapman and Hall. p. 278.
18. JOHNSON, L.B. 1978. Induced resistance to fungal diseases with special reference to yellow rust of wheat. Ann. Appl. Biology 89(1):107-110.
19. JOHNSON, L.B.; LEE, R.F. 1978. Peroxidase changes in wheat isolines with compatible and incompatible leaf rust infections. Physiological Plant Pathology 13:173-181.
20. KAR, M. e MISHRA, D. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology 57:315-319.
21. KOSUGE, T. 1969. The role of phenolics in the host response infection. Annual Review of Phytopathology 7:195-222.
22. KUC, J. 1966. Resistance of plants to infectious agents. Annual Review of Microbiology 20:337-370.
23. KUC, J. 1982. Induced immunity to plant disease. Bioscience 32(11):854-860.
24. KUC, J. 1985. Resistência sistêmica para moléstias de plantas e fitointerferons. São eles compatíveis? Fitopatologia Brasileira 10(1):15-40.
25. LOPES, C.R.; MONACO, L.C. 1977. Estudos de quimiotaxonomia em cultivares de *Coffea arabica* L. Turrialba 27(1):55-61.
26. MAZZAFERA, P.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C.; LEVY, F.A. 1984. Contagem do número de estomatos para identificação do efeito da colchicina em cafeeiros. In Congr. Bras. Pesquisas Cafeeiras (II). Resumos p. 193-194.
27. MAYER, A.M.; HAREL, E. 1979. Polyphenoloxidases in plants. Phytochemistry 18:193-215.
28. MEDEIROS, E.F.; RODRIGUES JUNIOR, C.J. 1978. Produção de substâncias do tipo fitoalexinas em folhas de *Coffea arabica* L. inoculadas com ferrugens não patogênicas. Garcia de Orta 9(1-2):15-18.
29. MORAES, W.B.C.; MARTINS, E.M.F.; BERETTA, J.G. 1981. Studies on induced protection on coffee plants to *Hemileia vastatrix*. III. Chemical analysis of the inducer. Colloque International sur la Protection de Cultures Tropicales, Abstracts p. 58.

30. MORAES, W.B.C.; MARTINS, E.M.F.; MUSUMECI, M.R.; BERETTA, M.J.G. 1976. Induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants. *Summa Phytopathologica* 2:39-43.
31. MUSUMECI, M.R.; MORAES, W.B.C.; STAPLES, R.C. 1973. Evidência de um autoinibidor de germinação nos uredosporos de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. *O Biológico* 39(7):171-173.
32. NACHACCHE, V.M. 1983. Alterações bioquímicas em folhas de *Coffea arabica* resistentes e suscetíveis à infecção por *Hemileia vastatrix* (Ferrugem do café). Tese de Doutorado Escola Paulista de Medicina, Depto. de Bioquímica.
33. NORONHA-WAGNER, M.; BETTENCOURT, A.J. 1967. Genetic study of the resistance to leaf rust. I. Identification and behavior of four factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* L. to 12 physiologic races of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. *Canadian Journal of Botany* 45:2021-2031.
34. PIERPOINT, W.S. 1969. O-quinones formed in plant extracts. Their reactions with aminoacids and peptides. *Biochemical Journal* 112:609-616.
35. RIBEREAU-GAYON, P. 1972. Plant Phenolics. Edinburg, Oliver and Boyd, p. 254.
36. RODRIGUES JUNIOR, C.J.; BETTENCOURT, A.J.; RIJO, L. 1975. Race of pathogens and resistance to coffee leaf rust. *Annual Review of Phytopathology* 13:49-70.
37. ROUX, D.G.; MAIHS, A.E. 1960. Selective spray reagent for identification and stimation of flavonoid compounds associated with condensed tannins. *Journal of Chromatography* 4:65-74.
38. SEIKEL, M.K. 1962. Chromatography methods of separation, isolation and identification of flavonoid compounds. In *Chemistry of Flavonoid Compounds*. Ed. by T.A. Geissman, New York, Mac Millan. p. 34-69.
39. SEQUEIRA, L. 1983. Mechanisms of induced resistance in plants. *Annual Review of Microbiology* 37:51-79.
40. SIEVERS, S.; ABLANQUE, E.; BAUTISTA, E.; CHAPARRO, F.; GUTIERREZ, J.; HAVERKAMP, J.; MORENO, E.; PEÑA, M. DE POSADA, E.; ROJAS, M.A.L.; SPETIEL, D.; ZAMUDIO, V.; QUIJANO-RICO, M. 1980. Relationship between genetics and chemistry in the system *Coffea* spp/ *Hemileia vastatrix*. IX Colloque Ass. Scienc. Int. du Café (ASIC). London. p. 671-680.
41. SWAIN, T.; HILLS, W.E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science Food and Agriculture* 10:63-68.
42. TOUZÉ, A.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T. 1982. Defence mechanisms of plants against varietal non-specific pathogens. In *Active Defence Mechanisms in Plants*. Ed. by R.K.S. Wood. London. p. 103-117.
43. VANCE, C.P.; SHERWOOD, R.I. 1977. Lignified papilla formation as a mechanism for protection in reed canarygrass. *Physiological Plant Pathology* 10:247-256.
44. DE WITT, P.J.M. 1983. Physiological studies on cultivar specific resistance of tomato plants to *Cladosporium fulvum*. Doctoral Thesis Wageningen, Netherlands. 124 p.
45. YAMAMOTO, H.; HOKIN, H.; TANI, T. 1978. Peroxidase and polyphenoloxidase in relation to the crown rust resistance of oat leaves. *Phytopathology* Z. 91:191-202.
46. ZUCKER, M. 1972. Light and enzymes. *Annual Review of Plant Physiology* 23:133.