

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 Ogradowczyk

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 a 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 µL 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 µL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2; 1000 µL de Peróxido de hidrogênio 0,06 M e 1000 µL guaiacol 0,02 M; Para o branco do reagente foi utilizado 3.900 µL de tampão acetado de sódio 50 mM pH 5,2 e 100 µL do extrato bruto das folhas. As amostras a serem quantificadas foram preparadas da seguinte forma: 1900 µL de tampão acetado de sódio 50 mM pH 5,2; 1000 µL de peróxido de hidrogênio 0,06 M, 1000 µL de guaiacol 0,02 M e 100 µL 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 µL do extrato total, 200 µL de fenilalanina 40 mM, 20 µL de B-mercaptoetanol 50 mM e 480 µL 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 µL de HCL 6N e a absorbância foi medida a 290 nm.

2.6 Delineamento Estatístico

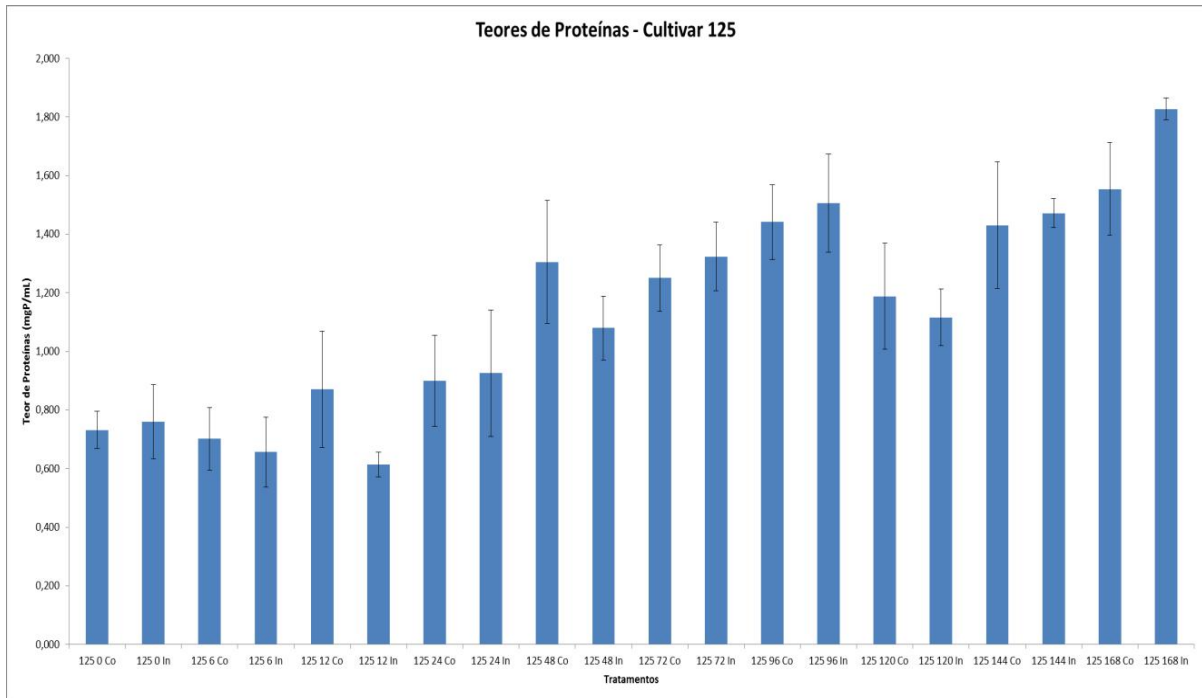
O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em fatorial tipo 2 x 10 x 3 (tratamentos x tempo x cultivares), com 10 repetições, sendo cada uma composta por uma planta. A comparação entre as médias foi feita através do desvio padrão da média ao longo do tempo. Cada média foi resultado 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

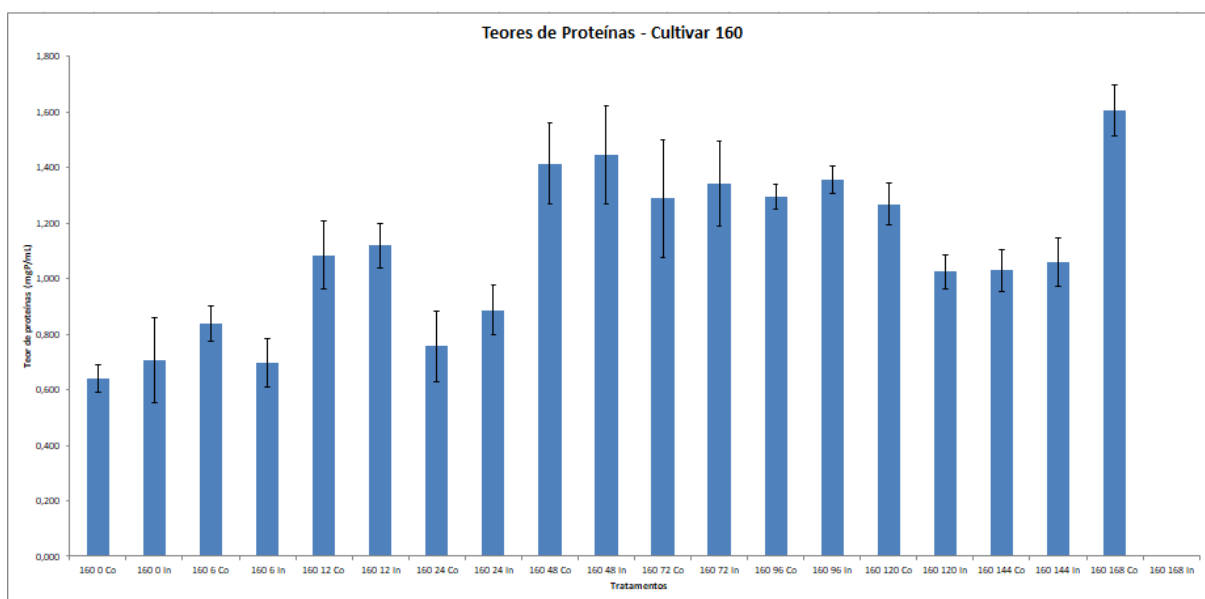
C199 os teores de proteínas se mantiveram estáveis ao longo do experimento (Figura 3). Entretanto, diferente dos demais clones, este mostrou um aumento nos teores de proteínas no tempo 72 hai. Isso pode estar relacionado a uma síntese *de novo* em resposta ao ataque do patógeno, podendo ser uma característica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



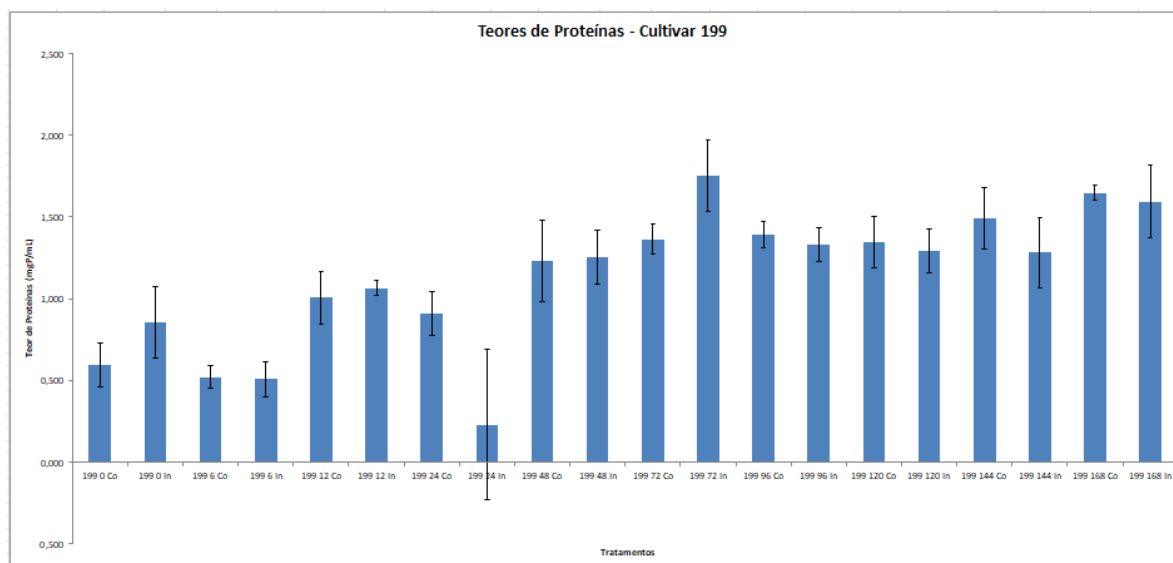
Fonte: Autores (2022).

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).

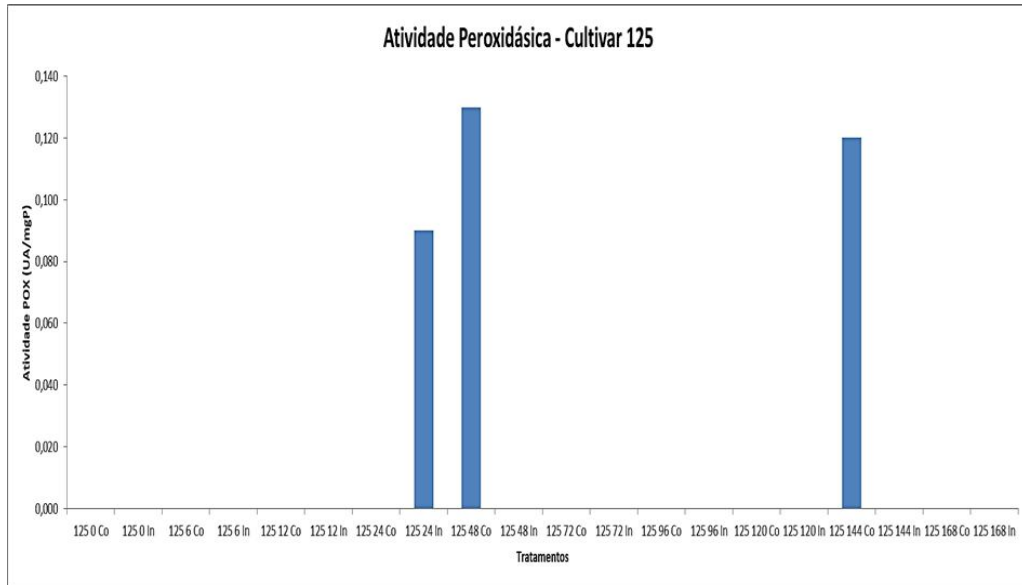
Após a infecção por alguns agentes químicos ou ambientais algumas enzimas chave são ativadas e a partir de suas alterações é possível acompanhar o estado de indução de resistência em plantas expostas a patógenos (Macagnan et al., 2008).

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.

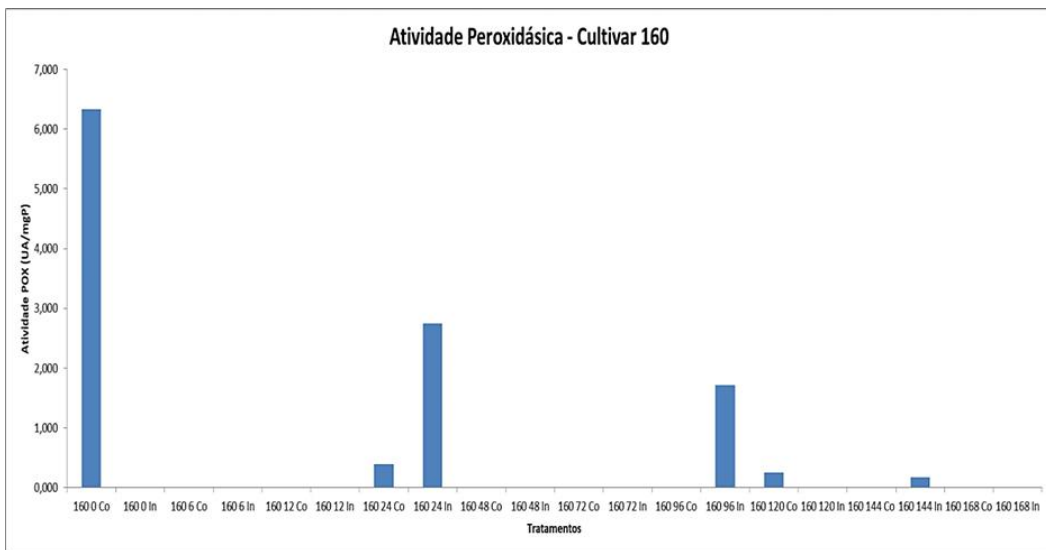
As peroxidases estão relacionadas com os processos de crescimento e diferenciação celular e mudanças morfológicas em resposta aos estresses físico, químico e biológico. O aumento da atividade desta enzima em plantas submetidas a estas condições pode ser fator determinante da capacidade de adaptação dessas 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*.



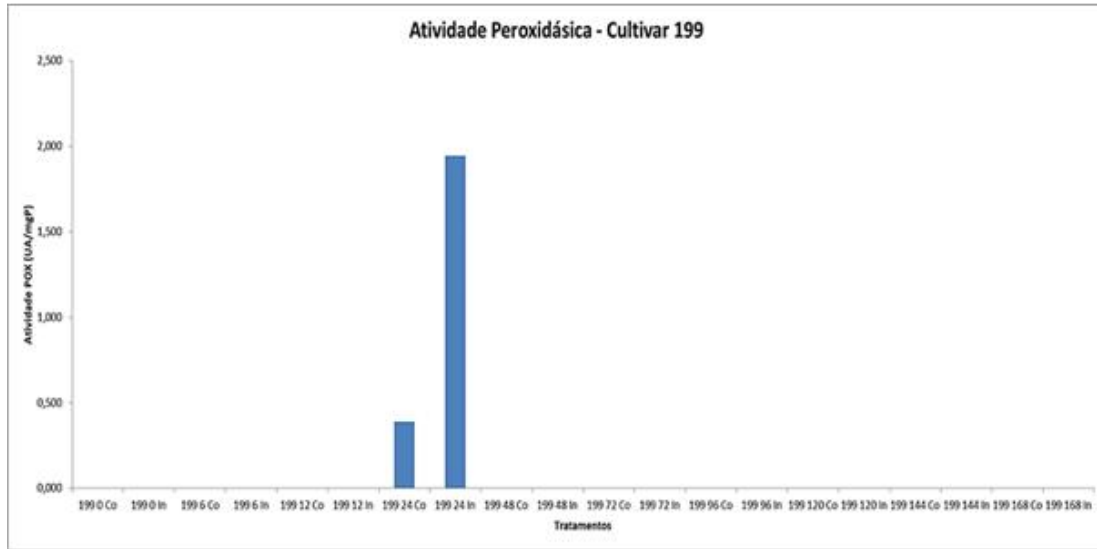
Fonte: Autores (2022).

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*.



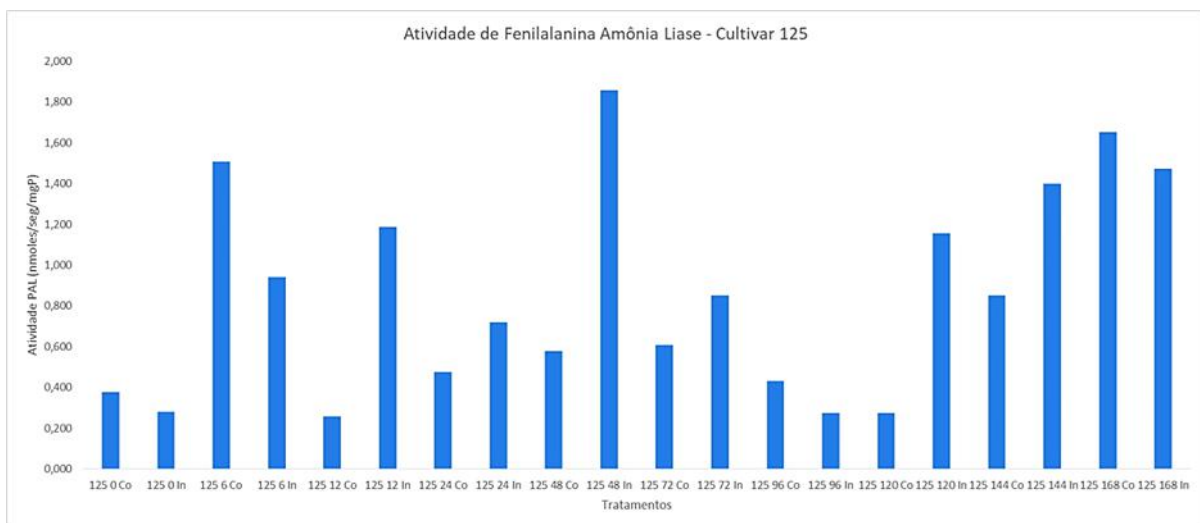
Fonte: Autores (2022).

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.

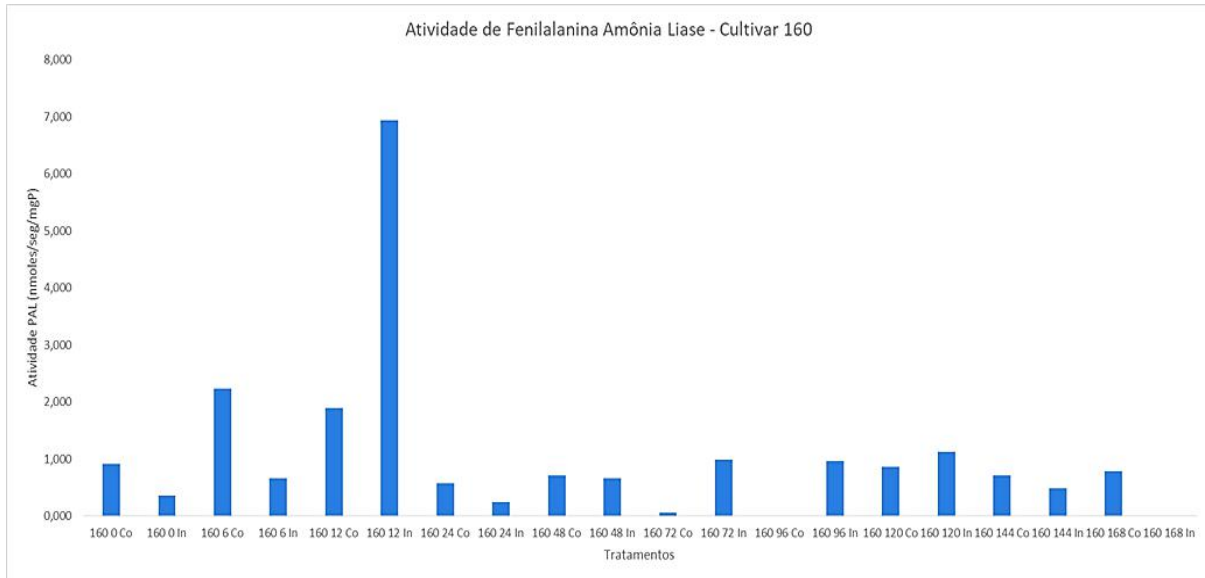
A PAL é uma enzima chave para todas as vias de síntese de compostos fenólicos, os quais estão envolvidos com resistência a pragas e patógenos (Rahman & Punja, 2005).

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*.



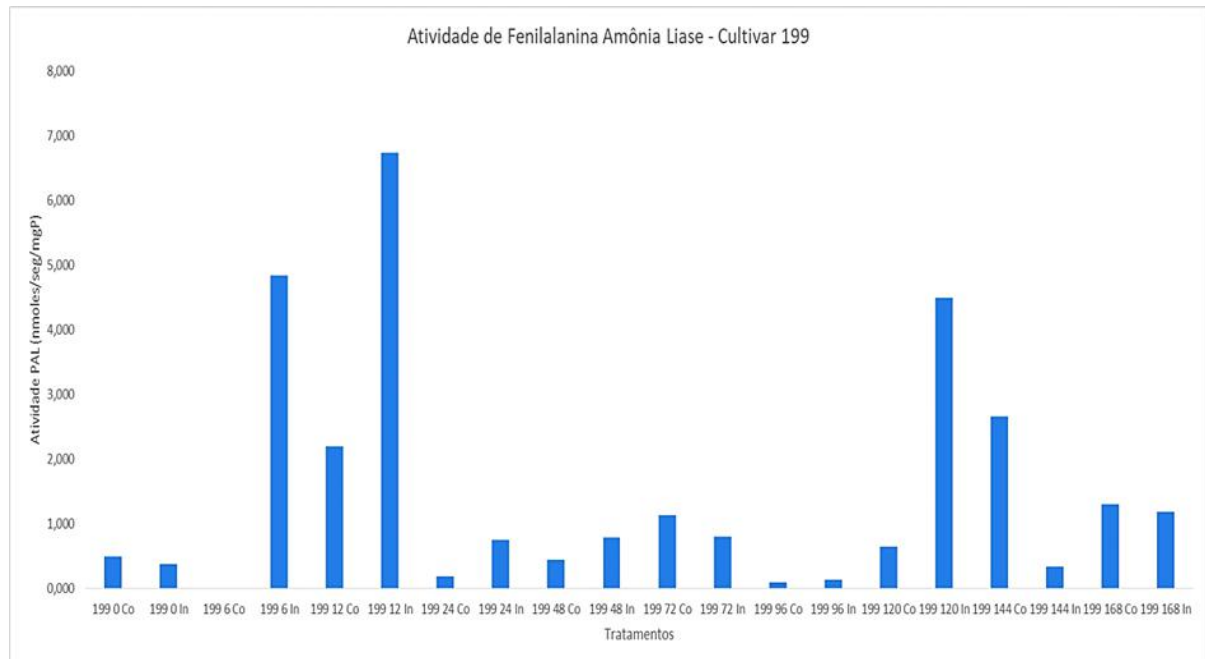
Fonte: Autores (2022).

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/safras/cafe>.
- 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/safras/cafe>.
- 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/pmpp.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 cafeeiro (*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>

