

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Compostos fenólicos relacionados à resistência do cafeeiro ao bicho-mineiro
(*Leucoptera coffeella*) e à ferrugem (*Hemileia vastatrix*)**

Paula Rodrigues Salgado

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia**

**Piracicaba
2009**

Paula Rodrigues Salgado
Engenheiro Agrônomo

Compostos fenólicos relacionados à resistência do cafeeiro ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e à ferrugem (*Hemileia vastatrix*)

Orientador:
Prof. Dr. JOSÉ LAÉRCIO FAVARIN
Co-orientador:
Prof. Dr. JOSÉ DJAIR VENDRAMIM

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Fitotecnia**

Piracicaba
2009

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Salgado, Paula Rodrigues

Compostos fenólicos relacionados à resistência do cafeeiro ao bicho-mineiro
(*Leucoptera coffeella*) e à ferrugem (*Hemileia vastatrix*) / Paula Rodrigues Salgado. - -
Piracicaba, 2009.

109 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
Bibliografia.

1. Bicho-mineiro 2. Café 3. Compostos fenólicos 4. Ferrugem (doença de plantas)
5. Mecanismo de defesa vegetal 6. Resistência de plantas I. Título

CDD 633.73
S164c

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Eternamente ao meu querido e amado Pai, José Antonio Salgado, que durante a sua existência, se dedicou à nossa formação moral e me incentivou à vida acadêmica.

À minha mãe, Maria de Lourde Rodrigues Salgado, pelo exemplo de superação e amor incondicional à família

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Profunda gratidão à Gloriosa Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pelos anos de ensinamento. *“...Oh Escola! Oh flor da montanha! Oh insigne "Luiz de Queiroz"! Tua história é uma força tamanha, que nos faz avançar mais veloz. Tua vida, o passado escreveu! Tua glória, o futuro dirá! Teu presente assinala o apogeu do grandioso amanhã que virá...”*
Ode à ESALQ Salvador de Toledo Piza Jr. (1921).

Ao CNPQ, pela concessão dos recursos financeiros (processo 142997/2005-6) e bolsa de estudo (processo 200087/2006-1) - Doutorado Sanduíche no Exterior (SWE), que possibilitou a minha permanência na Inglaterra durante 6 meses;

À FAPESP pela concessão do auxílio à pesquisa (processo 2007/04669-1), importante para condução de todo o experimento;

Ao meu orientador José Laércio Favarin, que por muitos anos me conduziu pelo caminho da ciência e com muito carinho me presenteou com ensinamentos de vida, que os levarei guardados em meu coração. Agradeço por todo conhecimento compartilhado e pelo entusiasmo em forma de um novo pesquisador;

A todos os colegas e funcionários do Laboratório de Resistência de Plantas do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP pelo auxílio durante a minha permanência no departamento;

Ao meu co-orientador José Djair Vendramim, pela confiança e paciência durante a condução dos meus experimentos. Sua grande intelectualidade me ajudou a solucionar problemas de metodologia e principalmente em minha formação como pesquisadora;

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) por disponibilizar a área experimental, na fazenda Santa Eliza, para instalação dos experimentos;

Ao grande profissional, pesquisador e amigo, Guerreiro Oliveira Filho, do Centro de Café do Instituto Agrônomo de Campinas-SP, pela sua sempre disposição em ajudar, colaborar e ensinar. Participou de momentos importantes durante meu doutorado, auxiliando na instalação e definição do experimento de campo e nas análises estatísticas. Agradeço todos os minutos de atenção, de trabalho e de descontração;

Thanks to University of Surrey for receiving me in 2006;

Thanks shall be particularly given to Professor Michael N. Clifford, at University of Surrey - England, for having kindly received me and shared patiently his brilliant knowledge with me. That period has provided me a personal and intellectual growth; I will be eternally indebted to Professor Michael N. Clifford;

Aos Professores integrantes da banca examinadora de qualificação, José Dias, Francisco de Assis Alves Mourão Filho e Paulo de Castro pela disposição, paciência e sabedoria nas críticas ao projeto;

Às colegas do Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas, ESALQ/USP, pelo acolhimento durante o período em que utilizei as instalações e equipamentos do laboratório;

Ao Professor Ricardo Antunes por disponibilizar o Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas, ESALQ/USP, para realização dos experimentos;

À Pesquisadora Salete Aparecida Gaziola pela orientação durante os trabalhos no Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas, ESALQ/USP, e pelo carinho com que conduz seu trabalho;

Ao Professor Norberto Peporine Lopes do Departamento de Física e Química, Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto, USP, pela confiança com que concedeu os equipamentos de Cromatografia Líquida;

Aos amigos Carlos, Denise e Tomaz do Departamento de Física e Química, Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto, USP, pela grande ajuda nas análises de cromatografia. Agradeço todo o tempo disponibilizado para realização das minhas análises;

Ao Pesquisador Luiz Humberto Gomes do Laboratório de Genética, ESALQ/USP, por disponibilizar e auxiliar na utilização do liofilizador;

Ao Eng. Agr. Paulo Gilberto Venturini, do viveiro Venturini, pela disposição em sempre colaborar com a pesquisa. Agradeço as mudas de cafeeiro cedidas para criação do bicho-mineiro em laboratório;

A todos os funcionários do Departamento de Produção Vegetal, ESALQ/USP, e em especial aos funcionários Silvia, Tino, Gustavo e Creusa pela convivência agradável e pela amizade, permitindo que os dias de trabalho se tornassem mais prazerosos;

À Luciane Aparecida Lopes Toledo, secretária do programa de pós-graduação, pela paciência, carinho e pelo trabalho realizado junto aos alunos da pós-graduação;

À Eliana Maria Garcia, da divisão de Biblioteca e documentação, pela sempre disponibilidade na revisão das normas e simpatia com que recebe os alunos;

À Sala 7 do Departamento de Produção Vegetal, ESALQ/USP – André, Aninha, Carlos, Halan, Rafael, Tiago e Txarli – pelos momentos de trabalho e companheirismo, descontração e confraternizações;

Ao amigo Tiago Tezotto (Sauipi), pela amizade, paciência e colaboração durante todas as etapas do projeto;

À amiga Cristiane Pezzopane por me receber carinhosamente em Campinas e pela amizade;

Aos colegas Aninha e Rafael pela ajuda nos dias quentes e longos de coleta de dado no campo;

À minha mãe, Maria de Lourdes, pelo amor dedicado, pelo zelo e colo. Por todo o estímulo dado a cada telefonema, a cada visita surpresa e pelo exemplo de mulher e mãe;

Aos meus irmãos, Mouzart e Thais, aos meus cunhados, Renata e Tomas e aos meus amados sobrinhos, Gabriel, Laura, Philipp e Matthias, pelos momentos maravilhosos em família, pelo amor e alegria, o que me torna melhor a cada dia. A minha querida irmã Thais, pelas importantes sugestões e correções da tese;

À amiga Giuliana Del Nero Velasco (Tafassiu) pelos 11 anos de amizade, companherismo e paciência, que me possibilitaram refletir sobre a vida e crescer com os ensinamentos da convivência. Amiga, agradeço por me aguentar na fase final da tese, me apoiar nos meus surtos e devaneios e ainda me proporcionar momentos de muitas risadas;

Às grandes amigas e colegas acadêmicas, Maria Luiza Lye Jomori (Di-Lúvio), Mariana Pares Andreucci (Relpi) e Priscila Pereira Coltri (Malhada), por marcarem a minha vida de forma generosa, com amizade, carinho e convivência. A Di-lúvio agradeço por me acompanhar, nas horas mais impróprias, nos meus momentos de descontração. As amigas Relpi e Malhada agradeço por estarem presentes mesmo na distância;

À amiga e colega acadêmica Carina Mendes (Voazã) pelos anos de dedicação a amizade;

À minha amiga bitcha Arroto (Daniela) pelo bom humor, amizade e por me proporcionar momentos de muita alegria;

À amiga Lais Marques por fazer com que meus dias em Piracicaba fossem mais divertidos e prazerosos;

Às amigas Estela Marques (Porvinha) e Maria Teresa Portes (Terê) pelo carinho e pelo pequeno convívio que trouxe mais alegria para nosso Lar DOJÃO;

Ao grande amigo Chorilli pela amizade sincera e por me acolher na sua cidade (Piracicaba/SP);

Às minhas amigas Fernanda, Flávia e Márcia pelos anos de convivência, pelo amor dedicado à amizade e pelos momentos maravilhosos juntas;

À querida e eterna bitcha Tele-Cêna pela ajuda no experimento de campo;

À república REBOQ (ESALQ/USP), pela família constituída e por nos proporcionar momentos de reencontro e amizade;

Aos Formandos 2002, Ano Leitinho (DRAL), pela história construída;

Thanks to my friends Stravoula and Warren for having helped me during all long time in England. I am sincerely grateful for that. I really miss you both, big time!!

A todos que de alguma forma participaram do meu dia a dia trazendo alegria;

O MEU MUITO OBRIGADA!

“A ciência é a maior de todas as histórias de aventura que vem se desdobrando há milhares de anos enquanto procuramos compreender a nós mesmos e nosso entorno.”

Brian Green

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO..... | 15 |
| ABSTRACT..... | 17 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 19 |
| LISTA DE TABELAS..... | 25 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 29 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 31 |
| 2.1 Reprodução do cafeeiro..... | 31 |
| 2.2 Bicho-mineiro, <i>Leucoptera coffeella</i> (Guérin-Mèneville, 1842)..... | 32 |
| 2.3 Ferrugem, <i>Hemileia vastatrix</i> (Berk. Et Br.)..... | 33 |
| 2.4 Mecanismo de defesa das plantas..... | 35 |
| 2.5 Interação compostos fenólicos, insetos e patógenos..... | 37 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 43 |
| 3.1 Material vegetal..... | 43 |
| 3.2 Materiais..... | 46 |
| 3.2.1 Coleta de folhas..... | 46 |
| 3.2.1.1 Folhas destinadas a análises bioquímicas..... | 46 |
| 3.2.1.2 Folhas destinadas aos testes de nível de resistência..... | 47 |
| 3.2.2 Biometria das plantas..... | 47 |
| 3.2.3 Criação do bicho-mineiro (<i>Leucoptera coffeella</i>)..... | 48 |
| 3.2.4 Patógeno..... | 49 |
| 3.2.5 Câmara para inoculação..... | 50 |
| 3.2.6 Análise bioquímica..... | 50 |
| 3.3 Procedimento experimental..... | 51 |
| 3.3.1 Determinação da taxa de crescimento..... | 51 |
| 3.3.1.1 Taxa de crescimento em diâmetro do caule (TCD; mm dia ⁻¹)..... | 51 |
| 3.3.1.2 Taxa de crescimento em altura da planta (TCH; cm dia ⁻¹)..... | 52 |
| 3.3.1.3 Taxa de crescimento de ramos plagiotrópicos (TCR; cm dia ⁻¹)..... | 52 |
| 3.3.2 Infestação das plantas e avaliação do nível de resistência..... | 52 |
| 3.3.3 Inoculação das plantas com o patógeno e a valiação do nível de resistência..... | 54 |

| | |
|---|-----|
| 3.3.4 Análise bioquímica..... | 55 |
| 3.3.4.1 Extração..... | 55 |
| 3.3.4.2 Cromatografia líquida..... | 55 |
| 3.4 Análise estatística..... | 55 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 57 |
| 4.1 Expressão de resistência..... | 57 |
| 4.2 Caracterização dos compostos fenólicos..... | 59 |
| 4.3 Quantificação dos compostos fenólicos..... | 63 |
| 4.3.1 Durante as fases de frutificação do cafeeiro..... | 63 |
| 4.3.1.1 Grupo I..... | 66 |
| 4.3.1.2 Grupo II..... | 73 |
| 4.3.1.3 Grupo III..... | 79 |
| 4.3.2 Resistência ao bicho-mineiro (<i>Leucoptera coffeella</i>)..... | 83 |
| 4.3.2.1 Grupo I..... | 83 |
| 4.3.2.2 Grupo II..... | 87 |
| 4.3.2.3 Grupo III..... | 90 |
| 4.3.3 Resistência à ferrugem (<i>Hemileia vastatrix</i>)..... | 91 |
| 4.3.3.1 Grupo I..... | 91 |
| 4.3.3.2 Grupo II..... | 94 |
| 4.3.3.3 Grupo III..... | 95 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 97 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 99 |
| REFERÊNCIAS..... | 101 |

RESUMO

Compostos fenólicos relacionados à resistência do cafeeiro ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e à ferrugem (*Hemileia vastatrix*)

As plantas apresentam diferentes e complexos mecanismos de defesa, que atuam em conjunto, em respostas a estresses bióticos e abióticos, cuja natureza e intensidade de resposta variam com a idade, o grau de adaptação e a fenologia (OLIVEIRA, 2003). O objetivo principal da pesquisa consiste em: (i) identificar os ácidos clorogênicos nas folhas de *Coffea arabica* L., cultivar Obatã IAC 1669-20, Catuaí Vermelho IAC 99, e das populações em seleção H14945-46 e H20049, e (ii) quantificar as várias classes de ácidos clorogênicos, nos mesmos genótipos, durante a fase reprodutiva do cafeeiro (florescimento, fruto “chumbinho”, expansão/granação e maturação). Os compostos fenólicos foram separados por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, modelo LC-20A) para as análises em CLAE-DAD. O perfil cromatográfico dos genótipos estudados não diferiram entre si. Durante as fases de frutificação houve variação nos teores de ácido clorogênico e dos fenóis totais, no qual apresentou menores valores na fase de granação. O genótipo H14954-46 resistente ao bicho-mineiro apresentou o ácido clorogênico referente ao pico 5, incomum aos outros genótipos estudados. As folhas infestadas por bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) apresentaram menores concentrações de fenóis totais, bem como de alguns ácidos clorogênicos e flavanóides, já as folhas inoculadas por ferrugem (*Hemileia vastatrix*) apresentaram maiores concentração. Há evidências de que os ácidos clorogênicos participem do complexo mecanismo de defesa das plantas.

Palavras-chave: *Coffea arabica*; *Coffea racemosa*; Ácido clorogênico; *Leucoptera coffeella*; *Hemileia vastatrix*

ABSTRACT

Phenolic compounds related to resistance of the coffee tree at coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*) and at the rust (*Hemileia vastatrix*)

The plants present different and complex mechanisms of defense, that work together, in responses to biotic and abiotic stresses, whose nature and intensity of response varies with age, the degree of adaptation and phenology. The main objective from the research is: (i) detect the chlorogenic acids in the leaves of *Coffea arabica* L., cultivars Obatã IAC 1669-20 and Catuaí Vermelho IAC 99, and of the populations into selection H14945-46 and H20049, and (ii) quantify the several classes of chlorogenic acids, in the same coffee plants, during the fructification phases of the coffee tree (flowering, fruits at the beginning of growth, grain expansion/seed, grain maturation). The phenolic compounds have been apart through high performance liquid chromatography (Shimadzu, model LC-20A) for the analyses in CLAE DAD. The studied chromatography profile of the coffee plants has presented no difference between them. During the fructification phases there was variation at the content of chlorogenic acid and of the total phenols, in which has presented under age values at the phase as of grain expansion. The plants of H14954-46 resistant to the coffee leaf miner have presented the chlorogenic acid referring to pico 5, no common to the other coffee plants studied. The infested leaves by coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*) presented lower concentrations of total phenols, as well as, of some chlorogenic acids and flavanoids, unlike, the leaves inoculate by rust (*Hemileia vastatrix*) presented greater concentration. There is evidence that chlorogenic acids have involved in the complex defense mechanism of plants.

Keywords: *Coffea Arabica*; Total phenols; *Leucoptera coffeella*; *Hemileia vastatrix*

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | - Fases de frutificação do cafeeiro. Adaptado de Pezzopane et al. (2003)..... | 31 |
| Figura 2 | - Fases do ciclo biológico de <i>Leucoptera coffeella</i> . Adaptado de Matos (2001)..... | 32 |
| Figura 3 | - Sintoma da ferrugem (<i>Hemileia vastatrix</i>) em folhas de cafeeiro..... | 34 |
| Figura 4 | - Estrutura do ácido quínico e dos ácidos cinâmicos (ácidos caféico, ferúlico e ρ -cumárico)..... | 37 |
| Figura 5 | - Estrutura do flavanóide genérico..... | 38 |
| Figura 6 | - (A) Comportamento climatológico das variáveis temperatura ($^{\circ}$ C) e precipitação (mm) da região de Campinas-SP, no período de 1988 a 2008; (B) variação da precipitação (mm) e temperatura máxima, média e mínima ($^{\circ}$ C) da região de Campinas, durante a realização do experimento (agosto/2007 a outubro/2008)..... | 43 |
| Figura 7 | - Genealogia do genótipo em seleção (H14954-46) para a resistência ao bicho-mineiro (<i>Leucoptera coffeella</i>) desenvolvido pelo Instituto Agrônômico de Campinas..... | 44 |
| Figura 8 | - Genealogia do genótipo em seleção (H20049) para a resistência ao bicho-mineiro (<i>Leucoptera coffeella</i>) e à ferrugem (<i>Hemileia vastatrix</i>) desenvolvido pelo Instituto Agrônômico de Campinas..... | 45 |
| Figura 9 | - (A) Folhas de cafeeiro submersa em água destilada e corte do pecíolo; (B) folhas dispostas em placas de Isopor® com solução de benziladenina 10^{-7} M... | 47 |
| Figura 10 | - Gaiola de criação do bicho-mineiro (<i>Leucoptera coffeella</i>)..... | 48 |
| Figura 11 | - (A) Mudas na gaiola para oviposição; (B) muda com lesão do bicho-mineiro; (C) folha com pupa do bicho-mineiro..... | 49 |
| Figura 12 | - Folhas de cafeeiro infectadas com o fungo <i>Hemileia vastatrix</i> | 49 |
| Figura 13 | - (A) <i>Timer</i> - programar o fotoperíodo de 12 horas; (B) Termômetro - aferir a temperatura máxima e mínima na câmara; (C) Câmara em que as folhas foram dispostas durante o experimento..... | 50 |

- Figura 14 - Tipos de lesões produzidas por *Leucoptera coffeella* em folhas de cafeeiros com diferentes níveis de resistência. (A) lesão pontual; (B) lesão filiforme pequena; (C) lesão grande irregular; (D) lesão grande arredondada..... 53
- Figura 15 - Software Quant para quantificação da intensidade de infecção de ferrugem nas folhas de cafeeiro..... 54
- Figura 16 - Cromatograma no UV 270nm com destaque aos tempos de retenção dos compostos fenólicos estudados em extrato de folhas do cafeeiro H14954-46-R..... 60
- Figura 17 - Espectros na região do UV observado no DAD, na região de 270-325nm referentes aos: ácido clorogênico, ácido, flavanol e flavonol..... 61
- Figura 18 - Cromatograma, na região UV 270nm, das folhas de cv. Catuaí, cv. Obatã, H14954-46 (R e S) e H20049 (RR, RS, SR, SS), em três situações: folhas sadias do campo, folhas destinadas a testes em laboratório de bicho-mineiro e ferrugem, com destaque (flecha) à presença do pico 5 (ácido clorogênico)..... 62
- Figura 19 - Representação gráfica da variação dos teores de fenóis totais nas cultivares Catuaí sem (—○—) e com 50 % (—□—) e 100 % (—Δ—) de produção e Obatã (—●—), durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação..... 63
- Figura 20 - Representação gráfica da variação dos teores de fenóis totais nos genótipos H14954-46-R - resistente ao bicho-mineiro (—○—) e H14954-46-S - suscetível ao bicho-mineiro (—●—), durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação..... 64
- Figura 21 - Representação gráfica da variação dos teores de fenóis totais nos genótipos H20049-SR - suscetível ao bicho-mineiro e resistente à ferrugem (—○—); H20049-RR - resistente ao bicho-mineiro e à ferrugem (—□—); H20049-SS - suscetível ao bicho-mineiro e à ferrugem (—Δ—); H20049-RS - resistente ao bicho-mineiro e suscetível à ferrugem (—●—), durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação..... 65

- Figura 22 - Representação gráfica da variação de folhas lesionadas pelo ataque de bicho-mineiro (%) nas cultivares Catuaí sem (—○—) e com 50 % (—□—) e 100 % (—Δ—) de produção e Obatã (—●—), durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação..... 67
- Figura 23 - Representação gráfica da variação de folhas lesionadas pela infecção de ferrugem (%) nas cultivares Catuaí sem (—○—) e com 50 % (—□—) e 100 % (—Δ—) de produção e Obatã (—●—), durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação..... 68
- Figura 24 - Representação gráfica da variação do número de folhas nas cultivares Catuaí sem (—○—) e com 50 % (—□—) e 100 % (—Δ—) de produção e Obatã (—●—), durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação..... 69
- Figura 25 - Valores médios das áreas dos picos 6 (ácido), 7 (ácido clorogênico), 11 (flavonol), 14 (ácido clorogênico) e 15 (ácido clorogênico) correspondentes à interação entre o nível de resistência das plantas - Catuaí 0 % (—○—), Catuaí 50 % (—□—), Catuaí 100 % (—Δ—) e Obatã (—●—) - e nas fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação..... 72
- Figura 26 - Representação gráfica da variação de folhas lesionadas pelo ataque de bicho-mineiro (%) nos genótipos H14954-46 resistente ao bicho-mineiro (—○—) e H14954-46 suscetível ao bicho-mineiro (—●—), durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação..... 74
- Figura 27 - Representação gráfica da variação de folhas lesionadas pela infecção de ferrugem (%) nos genótipos H14954-46 resistente ao bicho-mineiro (—○—) e H14954-46 suscetível ao bicho-mineiro (—●—), durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação..... 75

- Figura 28 - Valores médios das áreas dos picos 1 (ácido clorogênico), 4 (ácido), 5 (ácido clorogênico) e 6 (ácido) correspondentes à interação entre o nível de resistência das plantas - H14954-46 resistente ao bicho-mineiro (—●—) e H14954-46 suscetível (--□--) nas fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação..... 77
- Figura 29 - Valores médios das áreas dos picos 8 (ácido), 9 (flavanol), 10 (flavanol) e 11 (flavonol) correspondentes à interação entre o nível de resistência das plantas - H14954-46 resistente ao bicho-mineiro (—●—) e H14954-46 suscetível (--□--), nas fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação..... 78
- Figura 30 - Representação gráfica da variação de folhas lesionadas pelo ataque de bicho-mineiro (%) nos genótipos H20049- suscetível ao bicho-mineiro e resistente à ferrugem - SR (—○—); H20049- resistente ao bicho-mineiro e à ferrugem - RR (—□—); H20049- suscetível ao bicho-mineiro e à ferrugem - SS (—●—) e H20049- resistente ao bicho-mineiro e suscetível à ferrugem - RS (—△—), durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação..... 81
- Figura 31 - Representação gráfica da variação de folhas lesionadas pela infecção de ferrugem (%) nos genótipos H20049- suscetível ao bicho-mineiro e resistente à ferrugem - SR (—○—); H20049- resistente ao bicho-mineiro e à ferrugem - RR (—□—); H20049- suscetível ao bicho-mineiro e à ferrugem - SS (—●—) e H20049- resistente ao bicho-mineiro e suscetível à ferrugem - RS (—△—), durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação..... 82
- Figura 32 - Valores médios das áreas dos picos 8 - ácido (—○—), 14 - ácido clorogênico (--□--) e 16 - ácido clorogênico (—●—) correspondentes à interação entre o nível de infestação por bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e as cultivares - Catuaí e Obatã..... 87

- Figura 33 - Análise em componentes principais. Associação entre os picos de 1 a 16 e fenóis totais (FT). Representação no plano 1-2 dos cafeeiros H14954-46-resistente infestadas (RI), resistente não infestadas (RNI), suscetível infestadas (SI) e suscetível não infestadas (SNI)..... 89
- Figura 34 - Análise em componentes principais. Associação entre os picos de 1 a 16 e fenóis totais (FT). Representação no plano 1-2 dos cafeeiros H20049-suscetível ao bicho-mineiro e resistente à ferrugem infestadas (SRI) e não infestadas (SRNI); resistente ao bicho-mineiro e à ferrugem infestadas (RRI) e não infestadas (RRNI), suscetível ao bicho-mineiro e à ferrugem infestadas (SSI) e não infestadas (SSNI); resistente ao bicho-mineiro e suscetível à ferrugem infestadas (RSI) e não infestadas (RSNI)..... 91
- Figura 35 - Análise em componentes principais. Associação entre os picos de 1 a 16 e fenóis totais (FT). Representação no plano 1-2 dos cafeeiros H14954-46-resistente inoculadas por *Hemileia vastatrix* (RI), resistente não inoculadas (RNI), suscetível inoculadas por *Hemileia vastatrix* (SI) e suscetível não inoculadas (SNI)..... 95
- Figura 36 - Análise em componentes principais. Associação entre os picos de 1 a 16 e fenóis totais (FT). Representação no plano 1-2 dos cafeeiros H20049-suscetível ao bicho-mineiro e resistente à ferrugem inoculadas (SRI) e não inoculadas (SRNI); resistente ao bicho-mineiro e à ferrugem inoculadas (RRI) e não inoculadas (RRNI), suscetível ao bicho-mineiro e à ferrugem inoculadas (SSI) e não inoculadas (SSNI); resistente ao bicho-mineiro e suscetível à ferrugem inoculadas (RSI) e não inoculadas (RSNI)..... 96

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | - Identificação das plantas quando ao nível de resistência ao bicho-mineiro (<i>Leucoptera coffeella</i>) e à ferrugem (<i>Hemileia vastatrix</i>)..... | 45 |
| Tabela 2 | - Escala de pontos para a classificação de plantas em função da análise do tipo de lesão desenvolvida em discos foliares pelo ataque de <i>Leucoptera coffeella</i> .. | 53 |
| Tabela 3 | - Nível de resistência ao bicho-mineiro (<i>Leucoptera coffeella</i>) e à ferrugem (<i>Hemileia vastatrix</i>), dos genótipos avaliados em laboratório, mediante o uso de escala de pontos (1-4) e duração em dias das fases de ovo à lagarta e porcentagem de área lesionada, respectivamente..... | 57 |
| Tabela 4 | - Identificação dos picos e caracterização dos compostos gerados pelos cromatogramas..... | 60 |
| Tabela 5 | - Médias seguidas de desvio padrão das áreas dos picos correspondentes aos compostos fenólicos identificados nas cultivares Catuaí sem produção e com 50 % e 100 % de produção e Obatã, durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação..... | 66 |
| Tabela 6 | - Valores médios e desvio padrão das variáveis fenóis totais (área dos picos), número de folhas, folhas lesionadas por bicho-mineiro (%) e folhas lesionadas por ferrugem (%), nas cultivares Catuaí sem e com 50 % e 100 % de produção e Obatã..... | 70 |
| Tabela 7 | - Taxa de crescimento dos ramos plagiotrópicos (TCR; cm.dia ⁻¹), em altura (TCH; cm.dia ⁻¹), em diâmetro (TCD; mm.dia ⁻¹) e produção (g) das plantas cultivar Catuaí sem produção e com 50 % e 100 % de produção e Obatã..... | 70 |
| Tabela 8 | - Médias seguidas de desvio padrão das áreas dos picos correspondentes aos compostos fenólicos identificados nas cultivares Catuaí sem produção e com 50 % e 100 % de produção e Obatã..... | 71 |
| Tabela 9 | - Médias seguidas de desvio padrão das áreas dos picos correspondentes aos compostos fenólicos identificados nos genótipos H14954-46- resistente e suscetível, durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação..... | 73 |

| | |
|---|----|
| Tabela 10 - Valores médios e desvio padrão das variáveis fenóis totais (área dos picos), número de folhas, folhas lesionadas por bicho-mineiro (%) e folhas lesionadas por ferrugem (%), nos genótipos H14954-46 resistente e suscetível ao bicho-mineiro (<i>Leucoptera coffeella</i>)..... | 76 |
| Tabela 11 - Médias seguidas de desvio padrão das áreas dos picos correspondentes aos compostos fenólicos identificados nos genótipos H14954-46- resistente e suscetível..... | 76 |
| Tabela 12 - Médias seguidas de desvio padrão das áreas dos picos correspondentes aos compostos fenólicos identificados nos genótipos H20049-SR, RR, SS, RS, durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação..... | 80 |
| Tabela 13 - Valores médios e desvio padrão das variáveis fenóis totais (área dos picos), número de folhas, folhas lesionadas por bicho-mineiro (%) e folhas lesionadas por ferrugem (%), nos genótipos H20049- suscetível ao bicho-mineiro e resistente à ferrugem - SR; resistente ao bicho-mineiro e à ferrugem - RR; suscetível ao bicho-mineiro e à ferrugem - SS e resistente ao bicho-mineiro e suscetível à ferrugem - RS..... | 82 |
| Tabela 14 - Médias seguidas de desvio padrão das áreas dos picos correspondentes aos compostos fenólicos identificados nos genótipos H20049-SR, RR, SS, RS..... | 83 |
| Tabela 15 - Valores médios e desvio padrão dos fenóis totais (área dos picos) nas folhas, das cultivares Catuaí e Obatã, destinadas aos testes, em laboratório, de resistência ao bicho-mineiro (<i>Leucoptera coffeella</i>)..... | 84 |
| Tabela 16 - Valores médios e desvio padrão dos fenóis totais (área dos picos) nas folhas infestadas, em laboratório, por bicho-mineiro (<i>Leucoptera coffeella</i>) e não infestadas (testemunha)..... | 84 |
| Tabela 17 - Médias seguidas de desvio padrão das áreas dos picos correspondentes aos compostos fenólicos identificados nas folhas, das cultivares Catuaí e Obatã, destinadas aos testes de resistência ao bicho-mineiro (<i>Leucoptera coffeella</i>), em laboratório..... | 85 |

| | |
|--|----|
| Tabela 18 - Médias seguidas de desvio padrão das áreas dos picos correspondentes aos compostos fenólicos identificados nas folhas infestadas, em laboratório, por bicho-mineiro (<i>Leucoptera coffeella</i>) e as não infestadas (testemunhas)..... | 86 |
| Tabela 19 - Médias seguidas de desvio padrão das áreas dos picos correspondentes aos compostos fenólicos identificados nas folhas, das cultivares Catuaí sem produção e com 50 % e 100 % de produção e Obatã, destinadas aos testes de resistência à ferrugem (<i>Hemileia vastatrix</i>), em laboratório..... | 92 |
| Tabela 20 - Médias seguidas de desvio padrão das áreas dos picos correspondentes aos compostos fenólicos identificados nas folhas inoculadas, em laboratório, por ferrugem (<i>Hemileia vastatrix</i>) e as não inoculadas (testemunhas)..... | 93 |
| Tabela 21 - Valores médios e desvio padrão dos fenóis totais (área dos picos) nas folhas inoculadas, em laboratório, por ferrugem (<i>Hemileia vastatrix</i>) e não inoculadas (testemunha)..... | 93 |
| Tabela 22 - Valores médios e desvio padrão dos fenóis totais (área dos picos) nas folhas, das cultivares Catuaí sem produção e com 50 % e 100 % de produção e Obatã, destinadas aos testes de resistência à ferrugem (<i>Hemileia vastatrix</i>) em laboratório..... | 94 |

1 INTRODUÇÃO

As plantas apresentam diferentes e complexos mecanismos de defesa, que atuam em conjunto, em respostas a estresses bióticos e abióticos, cuja natureza e intensidade de resposta variam com a idade, o grau de adaptação e a fenologia (OLIVEIRA, 2003). Para tanto, as plantas reduzem a quantidade de carboidratos na via metabólica principal (formação de grãos) em razão da demanda do metabolismo secundário com a finalidade de, por exemplo, atender a produção de compostos fenólicos. Esses compostos secundários são utilizados pelas plantas para a proteção contra insetos, microrganismos e outros herbívoros.

O mecanismo de defesa das plantas pode ser entendido como: resistência constitutiva e resistência induzida. A constitutiva, ocorre mesmo sem a ação de agentes agressores, enquanto a induzida é ativada por um indutor biótico, como o ataque de uma praga ou patógeno ou por um indutor abiótico como radiação, temperatura, déficit hídrico entre outros.

Em relação ao processo de defesa das plantas há relatos de que teores dos compostos fenólicos correlacionam-se com a resistência da planta (GOODMAN et al., 1986; MISAGHI, 1980). Entretanto, o nível de infestação e ou infecção das plantas depende das concentrações dessas substâncias nas folhas.

Tanto os ácidos clorogênicos, como os flavanóides são substâncias encontradas em abundância no cafeeiro, uma evidência importante da função que desempenham na proteção dessas plantas contra os fatores bióticos e abióticos. No entanto, pouco se sabe a respeito dos processos bioquímicos que ocorrem nas espécies de *Coffea* e o comportamento destas substâncias na resistência das plantas ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e à ferrugem (*Hemileia vastatrix*).

O complexo mecanismo de defesa dos vegetais na interação planta x inseto x patógenos é ainda pouco compreendido pelos pesquisadores, o que levanta uma série de questionamentos a cerca dos aspectos bioquímicos da resistência das plantas. As substâncias do metabolismo secundário, tal como os flavanóides e os ácidos clorogênicos, relacionam com a resistência de algumas plantas a determinados insetos, cuja interação pode ser positiva ou negativa. Com relação ao cafeeiro, há evidências de que os ácidos clorogênicos e flavanóides participam do mecanismo de defesa, porém as informações ainda são pouco elucidativas. Neste contexto, esta pesquisa se fundamenta na hipótese de que a resistência do cafeeiro ao bicho mineiro

(*Leucoptera coffeella*) e ou à ferrugem (*Hemileia vastatrix*) pode estar relacionada com a presença desses ácidos nas folhas (cafeoilquínico, p-coumaroilquínico, feruloilquínico e dicafeoilquínico), bem como depende das suas concentrações presentes no tecido vegetal.

Espera-se que os resultados obtidos com esse trabalho possam contribuir com avanços no conhecimento a respeito dos mecanismos de resistência do cafeeiro ao bicho mineiro (*L. coffeella*) e à ferrugem (*H. vastatrix*).

1.1 Objetivo Geral

O objetivo principal da pesquisa consiste em: (i) identificar os ácidos clorogênicos nas folhas de *Coffea arabica* L., cultivar Obatã IAC 1669-20, Catuaí Vermelho IAC 99, e das populações em seleção H14945-46 e H20049, e (ii) quantificar as várias classes de ácidos clorogênicos, nas mesmos germoplasmas, durante a fase reprodutiva do cafeeiro (florescimento, fruto “chumbinho”, expansão/granação e maturação).

1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar em laboratório o nível de resistência ao bicho mineiro (*L. coffeella*) e à ferrugem (*H. vastatrix*) em folhas das espécies de *Coffea*, na maturação do fruto;
- Determinar a taxa de crescimento das diferentes espécies de *Coffea*, durante a frutificação (florescimento, fruto “chumbinho”, fruto em expansão/granação e maturação);
- Estimar o nível de infestação do bicho mineiro e da infecção da ferrugem no campo durante a frutificação (florescimento, fruto “chumbinho”, frutos em expansão/granação e maturação).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Reprodução do cafeeiro

O desenvolvimento do cafeeiro pode ser dividido em duas fases: vegetativa e reprodutiva. A fase reprodutiva corresponde basicamente a cinco épocas de frutificação: florescimento, fruto “chumbinho”, expansão, granação e maturação (Figura 1).



Figura 1 - Fases de frutificação do cafeeiro. Adaptado de Pezzopane et al. (2003)

O florescimento do cafeeiro exige um período de seca definido seguido de precipitação ou irrigação (ALVIN, 1960), todavia o número de florações depende da região e do ano agrícola (RENA et al., 1987). Esse hábito reprodutivo do cafeeiro conduz a uma série de dificuldades práticas relacionadas à colheita, ao controle efetivo de pragas e doenças, assim como afeta a qualidade dos grãos e da bebida.

Durante o desenvolvimento do cafeeiro, as fases vegetativas e reprodutivas ocorrem concomitantemente, havendo competição por fotoassimilados entre ambas. Esta é uma das causas da alternância de produção da cultura, pois os frutos são formados nos ramos e partes dos ramos que se desenvolveram no ano anterior. Pode-se admitir que em anos de altas produções, a grande demanda por carboidratos comprometerá a vegetação, com redução das taxas de crescimento da planta em altura, diâmetro do caule e comprimento de ramos plagiotrópicos em cafeeiros em produção, comparado à ausência de produção (SALGADO et al., 2008).

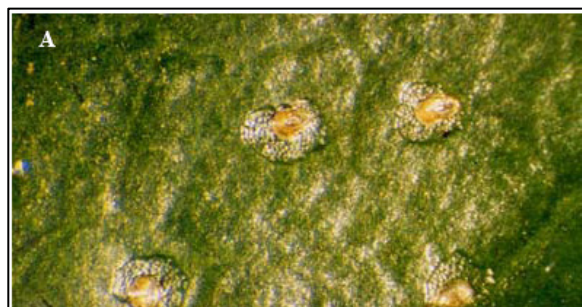
A redução da área foliar do cafeeiro, devido principalmente ao ataque de pragas e doenças, provoca grandes prejuízos na produção dependendo das fases de frutificação do cafeeiro. Segundo Parra (1975), a produção do cafeeiro cv. ‘Mundo Novo’ apresentou redução da ordem de 9, 24 e 87 % quando a área foliar diminuiu em 25, 50 e 75 % respectivamente, na fase inicial de frutificação. Já na fase de granação essas mesmas reduções da área foliar resultaram em danos na produção de 39, 43 e 46 %.

O nível de produção das plantas é um fator que determina maior ou menor grau de infecção do cafeeiro pela ferrugem (*Hemileia vastatrix*) (ESKES; SOUZA, 1981; MANSK; MATIELLO, 1984; MATIELLO et al., 1984; ZAMBOLIM et al., 1997). Em plantas com elevada carga de frutos pode ocorrer um desequilíbrio nutricional com aumento da suscetibilidade do cafeeiro à ferrugem. Em geral, na época de formação de frutos, os desequilíbrios são mais intensos (MORAES, 1983; ZAMBOLIM et al., 1985).

2.2 Bicho-mineiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842)

O bicho-mineiro é uma praga originária do continente africano (GALLO et al., 2002), específica do gênero *Coffea* e todas as variedades de *Coffea arabica* são suscetíveis ao ataque do inseto (MEDINA-FILHO et al., 1977).

Essa praga é considerada um inseto de metamorfose completa (Figura 2), passando pela fase de ovo, lagarta, pupa e mariposa (SOUZA, 1998).



Fase de ovo
5-21 dias



Fase de lagarta
9-40 dias



Fase de pupa
5-26 dias



Fase de adulto
1-4 dias

Figura 2 - Fases do ciclo biológico de *Leucoptera coffeella*. Adaptado de Matos (2001)

Na fase adulta, é uma mariposa com aproximadamente 6,5 mm de envergadura e 2,2 mm de comprimento, de coloração branco-prateado. Durante o dia, as mariposas permanecem na região inferior da copa devido ao microclima úmido favorável ao inseto. No final da tarde as fêmeas realizam a postura na parte adaxial das folhas (PARRA, 1985), com maior frequência em folhas do terceiro e quarto internódios (WALKER; QUINTANA, 1969), sendo que existe preferência por oviposição em folhas mais velhas em relação àquelas mais jovens dos primeiros pares (PARRA, 1975).

O desenvolvimento larval varia de 9 a 26 dias, de acordo com a temperatura (PARRA, 1975), ocorrendo desenvolvimento mais rápido com o aumento da temperatura (PARRA, 1981). Em estudos realizados por Parra (1981), com a cv. 'Mundo Novo', o ciclo biológico completo de *L. coffeella* foi de 44,3 dias a 20° C, 19,6 dias a 27° C, 17,9 dias a 30° C e 17,5 dias a 35° C. A larva, ao eclodir, penetra diretamente no mesófilo foliar, onde inicia a alimentação até a fase de pré-pupa. É comum as lesões conterem mais de uma lagarta por mina.

A idade da folha é importante nessa fase do ciclo biológico, uma vez que o desenvolvimento das lagartas é reduzido e a taxa de mortalidade é elevada em folhas novas (BIGGER, 1969). Esse fato se deve, muitas vezes, à presença de substâncias do metabolismo secundário relacionados à defesa natural das plantas (WALKER; QUITANA, 1969). Salgado et al. (2008) observaram maiores teores de fenóis totais em folhas jovens de cafeeiro (cv. Obatã) em relação às folhas maduras, durante as fases de frutificação. Guerreiro Filho e Mazzafera (2000) não observaram efeito da cafeína sobre a oviposição de *L. coffeella* ou mesmo no desenvolvimento das lagartas, o que indica uma adaptação coevolutiva, sem prejudicar o desenvolvimento do inseto.

A intensidade de infestação do bicho-mineiro varia de ano para ano numa mesma região cafeeira. Nas regiões com altas temperaturas, baixa umidade do ar e distribuição irregular das chuvas, com períodos secos prolongados, ocorre evolução rápida das populações, em razão do ambiente favorável para o desenvolvimento das populações de *L. coffeella* (ALMEIDA, 1973).

2.3 Ferrugem, *Hemileia vastatrix* (Berk. Et Br.)

A ferrugem alaranjada do cafeeiro, doença causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, exclusivo do gênero *Coffea*, foi detectada pela primeira vez na África, próximo ao lago Vitória, em 1961 (SCHIEBER, 1975).

Os principais prejuízos ocasionados pelo ataque severo da ferrugem consistem na redução da área foliar, pela formação de lesões, queda prematura das folhas e secamento dos ramos produtivos, o que afeta o crescimento, o florescimento, o pegamento dos frutos e, em consequência, a produção do ano seguinte (MATIELLO et al., 2002). Segundo Zambolim et al. (2002), os decréscimos da produção devido ao ataque do fungo variam de 35 % a 50 %.

O fungo é um basidiomiceto, da subclasse *Hemibasidio mycetidae*, pertencente à ordem Uredinales e família Pucciniaceae, que se desenvolve na superfície abaxial foliar após a germinação dos uredíniosporos na presença de água e temperatura entre 20° C e 24° C, durante 6 à 8h, ao final do qual emite de um a três tubos germinativos. A emissão do tubo germinativo ao atingir a célula-guarda do estômato forma uma estrutura denominada apressório, da qual saem as hifas primárias e destas, as secundárias ou hifas de penetração. Após a ramificação das hifas pelos espaços intercelulares, forma-se, na face de contato entre o micélio do fungo e a célula do hospedeiro, o haustório, estrutura responsável pela absorção de nutrientes pelo patógeno, dentro das células do hospedeiro (ZAMBOLIM, 2002).

O sintoma característico dessa doença é o aparecimento na face abaxial foliar de manchas amarelo-pálida, com aspecto pulverulento (esporos) e também amarelo-alaranjada (Figura 3). Na face adaxial aparecem manchas cloróticas, amareladas, geralmente limitadas pelas nervuras.



Figura 3 - Sintoma da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) em folhas de café

A produção de grãos correlaciona positivamente com a incidência da ferrugem do café (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.) (ORTOLANI, 1973), em que o nível de infecção, em campo, relaciona-se com a fase de frutificação (ESKES; SOUZA, 1981; MANSK; MATIELLO,

1984). Da mesma forma, Costa et al. (2006) observaram em cafeeiro (cv. Catuaí) que a incidência da ferrugem aumentou à medida que os níveis de desbaste de frutos aumentava (0, 25, 50, 75 e 100 %) e o crescimento da doença iniciou a partir de janeiro, atingindo o pico na época da colheita, em julho e não evoluiu em plantas sem frutos.

2.4 Mecanismo de defesa das plantas

O metabolismo da planta não pode ser estudado individualmente, uma vez que não há uma divisão exata entre o metabolismo primário e o secundário. As variações que ocorrem no metabolismo primário afetam diretamente os processos secundários. Admite-se, porém, que os lipídios, as proteínas, os carboidratos e os ácidos nucléicos, que são comuns aos seres vivos e essenciais para a manutenção das células, são originados do metabolismo primário. Já as substâncias originadas a partir de rotas biossintéticas diversas, e que estão restritas a determinados grupos de organismos, são produtos do metabolismo secundário (VICKERY; VICKERY, 1981). Salgado et al. (2008) observaram em *C. arabica* (cv. Obatã) com produção e sem produção, durante as fases de frutificação, que as concentrações foliares de metabólitos secundários não diferiram entre as plantas, no entanto as plantas sem produção apresentaram taxas de crescimento em diâmetro, no comprimento de ramo e em altura superiores àquelas com carga. Nas fases de granação e expansão dos frutos, em que há uma grande demanda de carboidratos e as condições climáticas são favoráveis para o crescimento vegetativo, as plantas com e sem produção apresentaram menores teores de fenóis totais, sugerindo que o metabolismo primário e o secundário são interdependentes e devem ser entendidos conjuntamente.

Os compostos produzidos a partir do metabolismo secundário são utilizados pelas plantas para defesa contra insetos, microrganismos e outros herbívoros. Estas substâncias distribuem-se, especificamente, nos tecidos da planta e uma complexa rede enzimática participa da síntese dos mesmos, os quais são armazenados em estado reduzido dentro dos vacúolos. Assim, quando a planta é submetida a qualquer tipo de estresse biótico ou abiótico, estes compostos passam de uma forma atóxica, reduzida e compartimentalizada para uma forma tóxica, não reduzida e descompartimentalizada (BECKMAN, 2000).

A defesa da planta deve ser entendida como um conjunto de processos que atuam associados, podendo-se admitir que raramente um único mecanismo explica a resistência e/ou a suscetibilidade da planta (OLIVEIRA; ROMEIRO, 1991). De modo geral, para redução do

ataque dos agentes agressores, a planta desenvolve mecanismos químicos e morfológicos - barreiras físicas - tais como a indução de metabólitos secundários (BALDWIN, 2001), de proteínas defensivas (HARUTA et al., 2001), de substâncias voláteis que atraem predadores dos insetos herbívoros (BIRKETT et al., 2000), e tricomas (FORDYCE; AGRAWAL, 2001). Esse mecanismo de defesa torna a planta repelente, tóxica ou de outro modo, inadequada para serem usadas por esses organismos (VENDRAMIM; CASTIGLIONI, 2000).

As plantas apresentam dois tipos de mecanismo de defesa: constitutivo e induzido. O mecanismo constitutivo consiste na síntese de substâncias secundárias, que são acumuladas e armazenadas, durante todo o crescimento e desenvolvimento das plantas, de modo que as plantas quando atacadas já apresentam meios de deter ou matar o agente agressor. Dessa forma, a defesa constitutiva proporciona à planta hospedeira uma resistência ou tolerância ao ataque de uma espécie específica de inseto/patógeno. Por outro lado, o mecanismo de defesa induzido sintetiza os metabólitos secundários em resposta a um ataque, infecção, injúria ou a outros estresses bióticos ou abióticos, sendo uma manifestação temporária de proteção, em que não fornece a planta uma resistência a um futuro ataque (GATEHOUSE, 2002).

Todo esse complexo mecanismo de defesa das plantas induzido na interação planta-agente agressor tem um alto custo na maioria das vezes para a planta. Durante o ataque do inseto, a planta pode sofrer dois tipos de consequências: perda de tecido e um grande investimento energético para se tornar tolerante (PAUL et al., 2000).

O tecido da planta ferido pelo ataque do inseto pode ser usado posteriormente como um ponto de infecção de outros organismos (PAUL et al., 2000), porém a resistência induzida permite a máxima expressão do potencial de tolerância da planta contra insetos e patógenos (MELLO; SILVA-FILHO, 2002). Os mecanismos de resistência são ativados próximo da área infectada, com a finalidade de prevenir a expansão do patógeno ou deter a contínua predação por insetos. A velocidade com que a planta reconhece a presença do agressor determina o tempo de resposta à invasão, desencadeando uma ou mais reações de defesa. Se a resposta é mais rápida do que o processo de infecção, pode ser um indicativo da resistência da planta, conforme observado por Silva et al. (2002) em plantas da espécie *Coffea arabica*. Nesse caso, o sucesso da planta depende da rapidez e magnitude pela qual a informação genética é transmitida e o seu produto formado (KUC, 1982). A interação entre um agente agressor e um vegetal é “compatível” quando causa danos ao hospedeiro, mas se a planta resiste à agressão a interação é definida como

“incompatível”. Na interação “incompatível” verifica-se um aumento da atividade da polifenoloxidase (PPO) (MAZZAFERA; ROBINSON, 2000), responsável pela oxidação de compostos fenólicos, os quais conferem às plantas maior capacidade de defesa ao agente agressor.

2.5 Interação compostos fenólicos, insetos e patógenos

As folhas e os frutos do cafeeiro apresentam grandes concentrações de ácido clorogênico (CGA). Classicamente o ácido clorogênico é um composto secundário, da via biossintética fenilpropanóide, da família éster, formado a partir da ligação entre o ácido quínico e o ácido cinâmico, na posição trans. Os ácidos cinâmicos mais encontrados são os ácidos caféico, *p*-cumárico e ferúlico (Figura 4) (CLIFFORD, 1999; 2000).

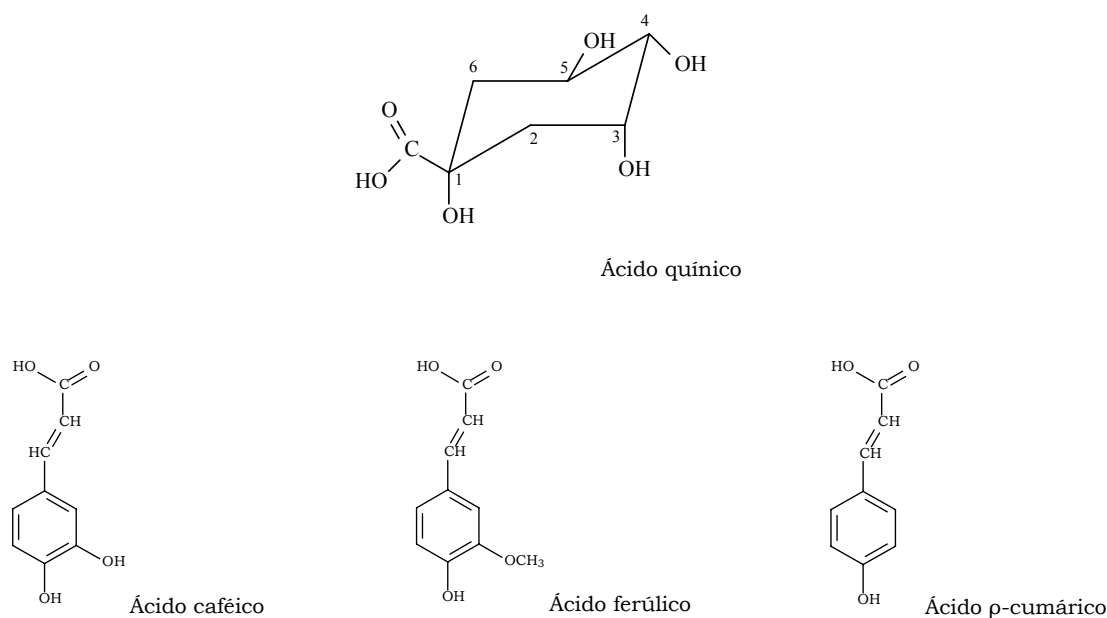


Figura 4 - Estrutura do ácido quínico e dos ácidos cinâmicos (ácidos caféico, ferúlico e *p*-cumárico)

O ácido clorogênico é dividido em cinco classes e os mais conhecidos são: os ácidos cafeoilquínico (3-CQA, 5-CQA, 4-CQA), os ácidos *p*-coumaroilquínico (3-*p*CoQA, 5-*p*CoQA, 4-*p*CoQA), os ácidos feruloilquínico (3-FQA, 5-FQA, 4-FQA), os ácidos dicafeoilquínico (3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA), e os seis ácidos cafeoferuloilquínico (CFQA) (CLIFFORD et al., 2003; 2006). O ácido cafeoilquínico 5-CQA é o composto mais difundido por todos os

monoésteres formados entre o ácido caféico (ácido cinâmico) e o ácido quínico (MOLGAARD; RAVN, 1988), o qual é comumente armazenado e constitui um intermediário na via metabólica da lignina (SCHOCH et al., 2001).

Estima-se que por volta de 2 % de todo o carbono fotossintetizado pela planta é convertido em flavanóides ou em compostos similares (SMITH, 1972). Esses compostos estão presentes em todas as partes da planta, inclusive nas folhas. Os flavanóides aglicolisados apresentam uma variedade de forma estrutural, porém todos possuem 15 carbonos e apresentam uma configuração de C6-C3-C6 (Figura 5). Esses compostos são produzidos pelas plantas a partir de precursores da via biossintética do ácido chiquímico e do ácido malônico. Em geral, os flavanóides se apresentam ligados a um açúcar se tornando menos reativos e, dessa forma, são armazenados nos vacúolos (MARKHAM, 1982).

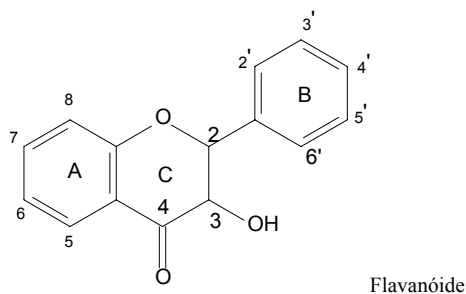


Figura 5 - Estrutura do flavanóide genérico

O aumento dos teores de ácido clorogênico nos tecidos das plantas é ocasionado, muitas vezes, pelas grandes variações de estresses ambientais, tais como luminosidade, deficiência nutricional e hídrica, ataque de pragas e doenças. Alguns fatores associados ao acúmulo de carboidratos nas folhas, incluindo alta irradiação, altas concentrações de CO₂ e fornecimento de sacarose também desencadeiam o acúmulo de ácido clorogênico e outros polifenóis, como as antocianinas (MURRAY; HACKETT, 1991). No entanto, os detalhes que regulam o complexo mecanismo de biossíntese desses compostos ainda são pouco conhecidos.

Na pesquisa com a espécie *Mahonia repens*, em três ambientes diferentes - pleno sol, parcialmente sombreado e totalmente sombreado - e em duas épocas do ano - verão e inverno -, Grace et al. (1998) observaram no verão, concentração duas vezes maior de CGA nas plantas a pleno sol e parcialmente sombreadas do que nas plantas sombreadas, sugerindo que altos níveis

de irradiação tem um efeito estimulador do metabolismo de fenilpropanóide nessa espécie. No inverno os teores de CGA foram maiores que no verão, uma vez que no local onde foi feita a pesquisa, as condições climáticas no inverno são extremas, propiciando às plantas um ambiente estressante.

Devido às propriedades antioxidante e antibiótica, os ácidos clorogênicos estão envolvidos em inúmeras funções biológicas, tais como resistência a pragas e doenças (MATSUDA et al., 2003). Estes compostos são amplamente distribuídos em diferentes partes das plantas e, geralmente, ocorrem nos tecidos em quantidades detectáveis, sendo suscetível à ação da polifenoloxidase (PPO). Entre os vários isômeros encontrados no café, o 5-CQA é o mais abundante em sementes e em folhas de *C. arabica* (CLIFFORD, 1985) e é o substrato mais eficiente da PPO em cafeeiro (MAZZAFERA; ROBINSON, 2000; MELO et al., 2006). A PPO oxida rapidamente esse metabólito convertendo-o a quinona, molécula altamente reativa que forma ligações covalentes com outras moléculas, principalmente com proteínas, que resulta em compostos de difícil assimilação no trato digestivo dos insetos (FELTON et al., 1989). As quinonas limitam o desenvolvimento de doenças no sítio de infecção acelerando a morte das células ao redor da região infectada (BI; FELTON, 1995) e atuam em processos enzimáticos vitais de fungos e bactérias, inibindo, por exemplo, a ação das fosforilases, das desidrogenases, das carboxilases e de coenzimas (GOODMAN et al., 1986).

Algumas pesquisas revelam a interação da enzima polifenoloxidase (PPO) com o mecanismo de defesa do cafeeiro. O papel da enzima foi investigado por Melo et al. (2006) em plantas de café considerando a resistência ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e à ferrugem (*Hemileia vastatrix*). Esses autores reportaram uma maior atividade constitutiva da PPO em folhas de *Coffea racemosa*, resistentes ao bicho-mineiro, em relação às plantas de *C. arabica*, suscetíveis, e a ausência de indução da enzima com os danos mecânicos causados pelo inseto. Por outro lado, a concentração de fenol em *C. arabica* foi superior à encontrada nas folhas de *C. racemosa*. Esta pesquisa corrobora os resultados obtidos por Ramiro et al. (2006), em que dois híbridos de *C. arabica* foram expostos ao ataque do bicho-mineiro e não houve aumento na atividade da PPO, embora tenha sido observado um discreto aumento na atividade constitutiva nas folhas de *C. arabica* depois do ataque. Melo et al. (2006) trabalharam com outras espécies de café e não constataram relação entre a atividade da PPO e a concentração de fenol, concluindo que a resistência a *L. coffeella* e a *H. vastatrix* das diferentes espécies se deve ao potencial

oxidativo dos tecidos, com base na composição fenólica e não pela atividade dessa enzima. A eficiência da ação da PPO depende de outros fatores, tais como o nível dos substratos mais eficientes e a qualidade e quantidade de proteínas presentes nas plantas (FELTON et al., 1992).

Estudos citológicos conduzidos com plantas suscetíveis e resistentes de *C. arabica* inoculadas com o fungo *H. vastatrix* evidenciaram um aumento da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), que está relacionada com a síntese de compostos fenólicos no metabolismo secundário. As plantas resistentes apresentaram concentrações máximas de compostos fenólicos em dois instantes diferentes a partir da infecção, enquanto que nas plantas suscetíveis a concentração máxima ocorreu tardiamente. O primeiro instante de concentração máxima das plantas resistentes coincidiu com o período de acúmulo dos compostos fenólicos e na morte rápida das células do hospedeiro no sítio de infecção. O segundo instante estaria relacionado com o acúmulo tardio de fenóis e a lignificação das células. Nas plantas suscetíveis também ocorreu a morte das células três dias após a inoculação, porém em baixas porcentagens nos sítios de infecção. A atividade da PAL aumentou nas plantas suscetíveis tardiamente, não prevenindo o crescimento e a esporulação do fungo (SILVA et al., 2002).

Em estudos de *Coffea arabica*, Aerts e Baumann (1994) observaram um decréscimo na concentração de ácido clorogênico (CGA) armazenado na parede das células cotiledonares, concomitantemente com o aumento na taxa de polímeros fenólicos durante o desenvolvimento dos cotilédones. Sugere-se que os fenilpropanóides liberados a partir do 5-CQA são depositados como polímeros fenólicos tal como a lignina nas células da parede celular dos cotilédones em expansão. Mosli e Baumann (1996) trabalharam com células em suspensão e protoplastos de folhas de *C. arabica* e os resultados revelaram que 5-CQA pode estar armazenado no vacúolo ou associado à parede celular.

As plantas de *Asimina triloba* que apresentaram altas concentrações de ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA) e baixas de flavonóides (quercetina e kaempferol) foram adequadas para oviposição das fêmeas do lepidóptero *Eurytides marcellus*, enquanto as plantas com menores concentrações de 3-CQA e maiores de flavanóides foram rejeitadas pelas fêmeas. Dessa forma, as fêmeas de *E. marcellus* podem diferenciar as plantas hospedeiras suscetíveis das não adequadas para a aproximação e oviposição, por meio da comparação do perfil químico das folhas, utilizando informações qualitativas e quantitativas sobre os compostos 3-CQA e flavanóides (HARIBAL; FENNY, 2003), corroborando os resultados de Carter et al. (1999). No entanto, três

espécies diferentes de *Salix* atacadas por *Operophtera brumata* apresentaram um comportamento diferente do observado nas plantas *Asimina triloba*. Ruuhola et al. (2001) observaram que as folhas de *Salix phylicifolia* que apresentavam altas concentrações de flavanóides, baixos teores de ácido clorogênico (CGA) e sem a substância salicilato favoreceram o crescimento rápido das larvas de *O. brumata*, enquanto que as folhas de *S. myrsinifolia*, com baixos teores de flavanóides, altos de CGA e altos níveis de salicilato, não foram adequadas para o desenvolvimento da larva. Os autores concluíram que os níveis de salicilato e CGA prejudicaram o crescimento larval, enquanto o flavanóide, principalmente a miricetina, favorece o crescimento das larvas de *O. brumata*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A unidade experimental dessa pesquisa deve ser entendida como a cultura do cafeeiro, que será definida segundo a localização, as características e a forma de seleção das amostras para compor o experimento. Os instrumentos e procedimentos utilizados para atingir os objetivos previamente definidos serão descritos no decorrer desse capítulo.

O delineamento utilizado na pesquisa para testar as relações causa x efeito definidas na hipótese formulada foi o delineamento experimental, baseado nos métodos da concordância e da variação concomitante, segundo Lakaos (1983) citado por Oliveira Netto (2008).

3.1 Material vegetal

Na presente pesquisa utilizaram-se, como material de investigação, as folhas de cafeeiros adultos em condições de campo, do Banco Ativo de Germoplasma do Instituto Agrônomo de Campinas, na Fazenda Santa Eliza, Campinas-SP, situada a 22°53'33,94'' de latitude Sul, 47°04'33,66'' de longitude Oeste e altitude média de 646 m.

A região de Campinas é caracterizada pelo clima tropical de altitude – Cwa, segundo classificação climática de Koeppen, com chuvas no verão, inverno seco e temperatura média do mês mais quente superior a 22°C (Figura 6). Nos períodos de janeiro a março e outubro a dezembro, a umidade relativa do ar varia, normalmente, entre 50 % e 54 %.

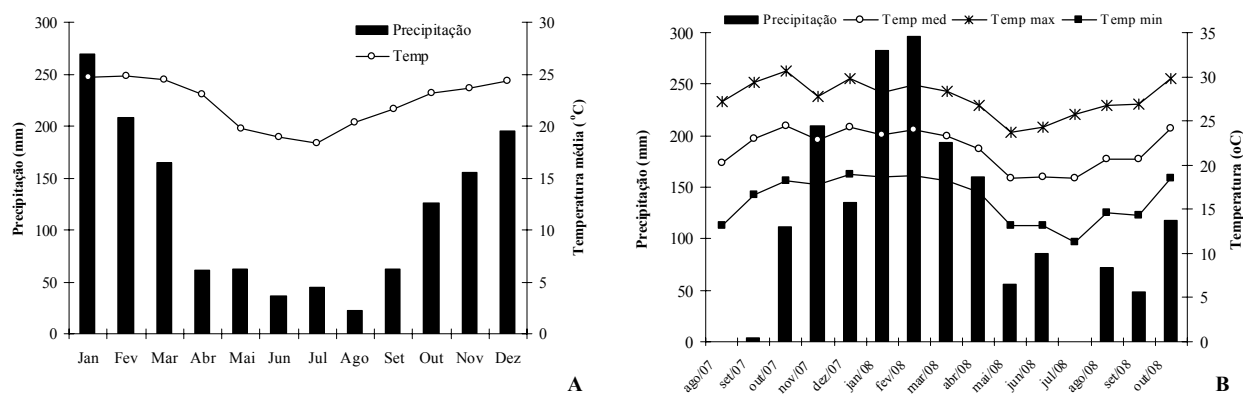


Figura 6 - (A) Comportamento climatológico das variáveis temperatura (°C) e precipitação (mm) da região de Campinas-SP, no período de 1988 a 2008; (B) variação da precipitação (mm) e temperatura máxima, média e mínima (°C) da região de Campinas, durante a realização do experimento (agosto/2007 a outubro/2008)

Neste experimento foram utilizadas plantas de *Coffea arabica* - cultivares Obatã (IAC 1669-20) e Catuaí Vermelho (IAC 99) - e populações obtidas a partir de cruzamentos entre *C. arabica* e *C. racemosa*. As populações oriundas das gerações RC₅ e F₂RC₅ (H14954-46) (Figura 7) foram selecionadas quanto ao nível de resistência ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) - resistente (R) e suscetível (S) - e as populações pertencentes ao RC₆ (H20049) (Figura 8) que apresentam níveis diferentes de resistência ao bicho-mineiro e à ferrugem (*Hemileia vastatrix*).

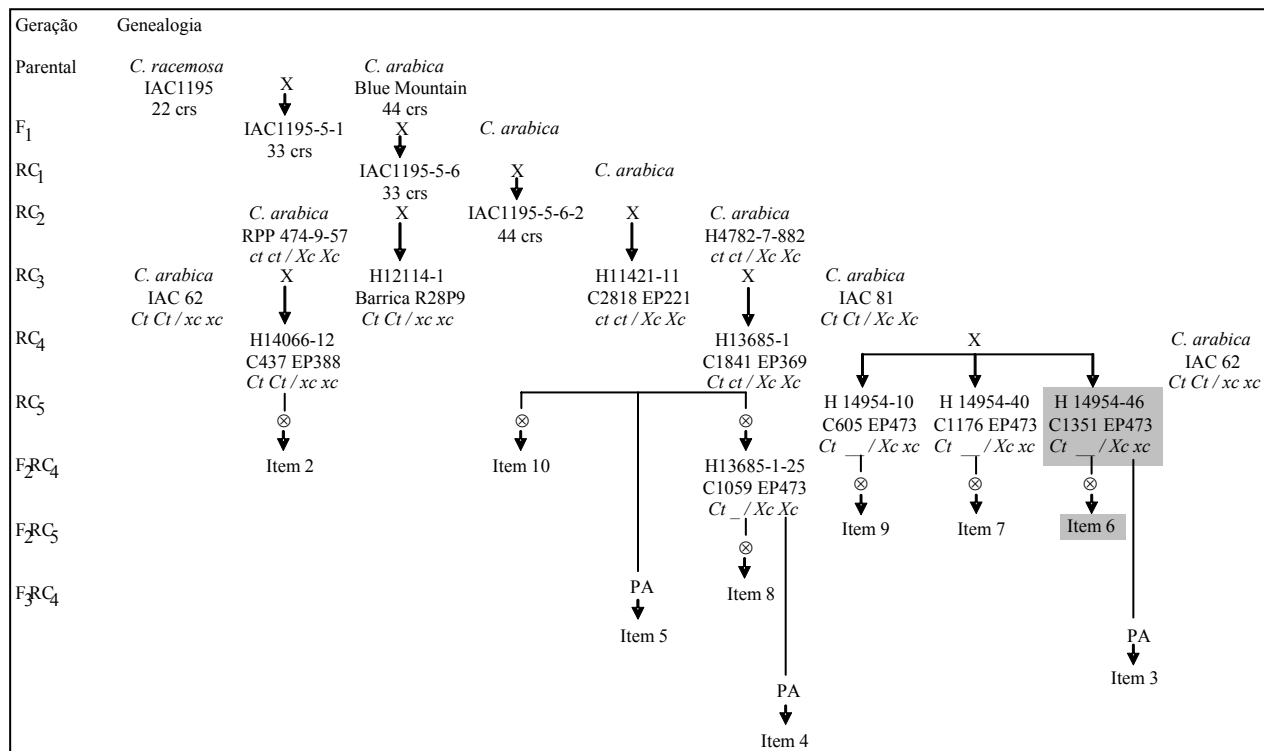


Figura 7 - Genealogia do genótipo em seleção (H14954-46) para a resistência ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) desenvolvido pelo Instituto Agrônomo de Campinas

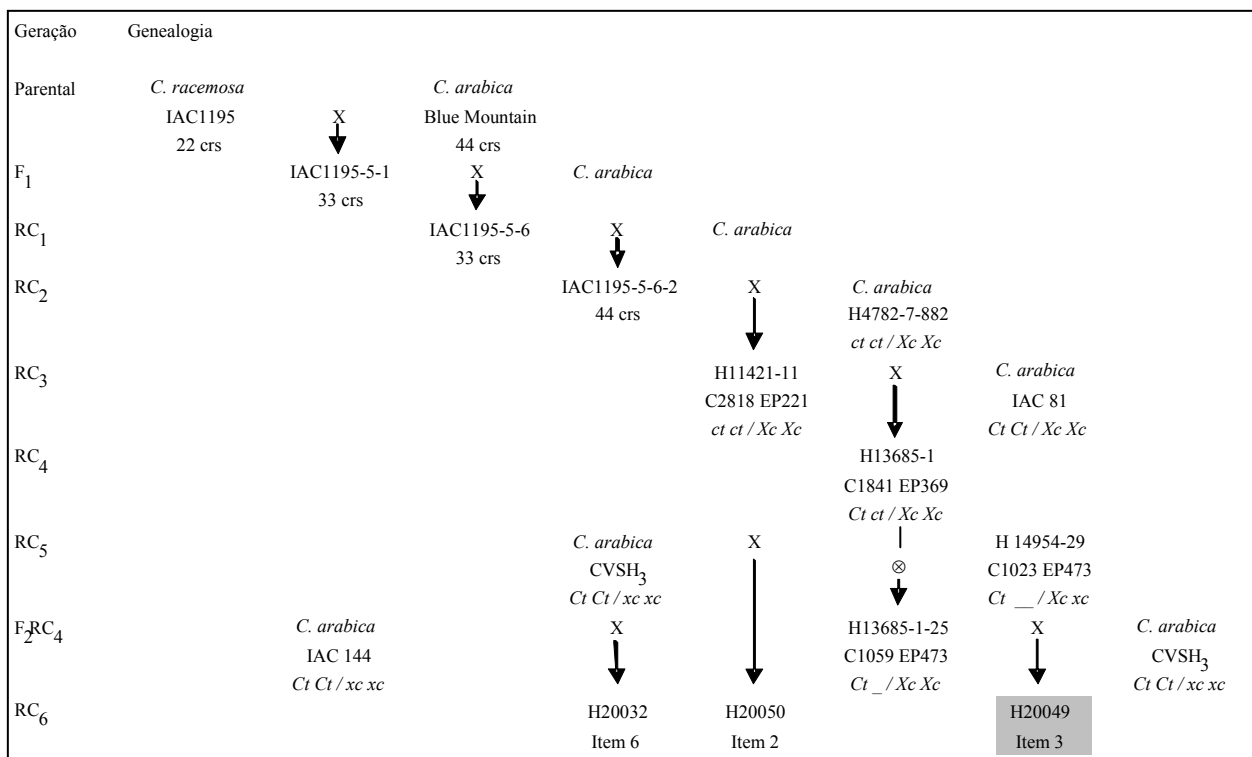


Figura 8 - Genealogia do genótipo em seleção (H20049) para a resistência ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e à ferrugem (*Hemileia vastatrix*) desenvolvido pelo Instituto Agrônomo de Campinas

Estas espécies foram escolhidas em razão das diferenças entre os genótipos quanto à resistência ao bicho-mineiro e à ferrugem observadas anualmente pelo Centro de café do Instituto Agrônomo de Campinas, totalizando 8 tratamentos, e os mesmos divididos em grupos segundo a semelhança do material genético, conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1 - Identificação das plantas quando ao nível de resistência ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e à ferrugem (*Hemileia vastatrix*)

| Genótipo | Número de plantas | Resistência à | | |
|-----------------|-------------------|-----------------------------|---------------------------|---|
| | | <i>Leucoptera coffeella</i> | <i>Hemileia vastatrix</i> | |
| | Repetições | R-S | R-S | |
| Catuaí Vermelho | Grupo I | 7 | S | S |
| Obatã | | 7 | S | R |
| H 14954-46 – R | Grupo II | 7 | R | R |
| H 14954-46 – S | | 7 | R | S |
| H20049 – RR | Grupo III | 3 | R | R |
| H20049 – RS | | 2 | R | S |
| H20049 – SR | | 6 | S | R |
| H20049 – SS | | 4 | S | S |

A seleção dos indivíduos no campo ocorreu no mês de novembro (13/11/2007), período de florescimento do cafeeiro, utilizando como, parâmetro de amostragem, o vigor vegetativo da planta.

Paralelamente foi conduzido um experimento com a cultivar Catuaí Vermelho (IAC 99), constituído de três tratamentos e 7 repetições (1 planta por repetição): T1 - plantas com 100 % de frutos, T2 - plantas com 50 % de frutos e T3 - plantas sem frutos. Os tratamentos com produção (50 % de frutos) e sem produção foram obtidos pela retirada dos frutos, no início da fase de “chumbinho”, de cada ramo da planta.

3.2 Materiais

3.2.1 Coleta de folhas

3.2.1.1 Folhas destinadas a análises bioquímicas

A coleta das folhas destinadas às análises bioquímicas, dos genótipos selecionados (Tabela 1) foi efetuada em quatro épocas que corresponderam às fases de frutificação do cafeeiro: (i) florescimento (13/11/2007); (ii) fruto “chumbinho” (15/01/2008); (iii) granação (27/02/2008) e (iv) maturação (29/04/2008). As folhas foram amostradas na porção mediana e nos quatro quadrantes da planta, coletando-se o terceiro par de folhas. Em média 6 pares de folhas sadias por planta eram usadas nas análises bioquímicas, totalizando 84 folhas por material genético. Essas folhas foram destacadas, acondicionadas em saquinhos de tecido *voil* com *zipper*, previamente identificados e, em seguida, congelados e conservados em nitrogênio líquido.

As folhas congeladas em nitrogênio líquido foram armazenadas em *freezer* -80°C até serem liofilizadas. O material foi retirado do *freezer* (-80°C) e transportado para o liofilizador (Heto Lab equipamentos, FD 4.0) em nitrogênio líquido para que não houvesse oxidação das folhas. A liofilização ocorreu sob pressão de 803 bar e à temperatura de -53°C, durante 48h. Posteriormente, as folhas foram moídas em moinho de faca (Marconi, MA 630) e acondicionadas em frascos de acrílico com tampa de plástico. Todas as amostras de folhas, depois de maceradas, foram levadas para peneira tipo *Tamis* (35 mesh) para homogeneização das mesmas.

3.2.1.2 Folhas destinadas aos testes de nível de resistência

As folhas para os testes em laboratório, de resistência à infestação de bicho-mineiro e à infecção de ferrugem foram coletadas na fase de maturação do fruto. Para tanto, foram usados 15 pares de folhas sadias por planta, sendo 10 folhas para o teste com o bicho-mineiro, 10 folhas para o teste com a ferrugem e as 10 restantes como testemunha, totalizando 105 folhas por genótipo. No campo, as folhas eram acondicionadas em saquinhos de tecido telado com *zipper*, para maior ventilação e previamente identificados. Posteriormente, as folhas foram transportadas para o laboratório e lavadas com água corrente para a retirada das impurezas.

A manutenção da turgidez das folhas durante os testes de resistência se deu pela submersão das folhas em água destilada para o corte da ponta oxidada do pecíolo (Figura 9A). As folhas de cada Genótipo foram organizadas em placas furadas de Isopor®, as quais foram colocadas dentro de caixas plásticas com solução de benziladenina na concentração de 10^{-7} M (REIS JUNIOR et al., 2000). Cada caixa continha 70 folhas (10 folhas por planta) referente a um Genótipo, conforme esquematizado na figura 9B. Dessa forma, as folhas foram mantidas na posição horizontal e seus pecíolos em contato com a solução de hormônio, conservando a turgidez foliar no período que durou o experimento de laboratório.



Figura 9 - (A) Folhas de cafeeiro submersa em água destilada e corte do pecíolo; (B) folhas dispostas em placas de Isopor® com solução de benziladenina 10^{-7} M

3.2.2 Biometria das plantas

As avaliações biométricas das plantas selecionadas dos diferentes genótipos ocorreram periodicamente durante a condução do experimento. A taxa de crescimento do cafeeiro foi estimada mensurando o crescimento em diâmetro do caule, da altura e do comprimento dos

ramos plagiotrópicos selecionados e identificados previamente. As medidas das variáveis foram obtidas por meio de paquímetro digital (diâmetro do caule) e régua milimetrada (altura e comprimento dos ramos).

3.2.3 Criação do bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*)

A criação do inseto foi realizada, segundo metodologia descrita por Parra (1985), em gaiola de infestação construída com estrutura e fundo de madeira, com dimensões de 110 x 60 x 60 cm, e revestida com tecido de algodão (*voil*). A gaiola foi apoiada em vasos de plástico e, periodicamente, uma camada de vaselina era passada nos vasos para evitar o ataque de formigas (Figura 10).

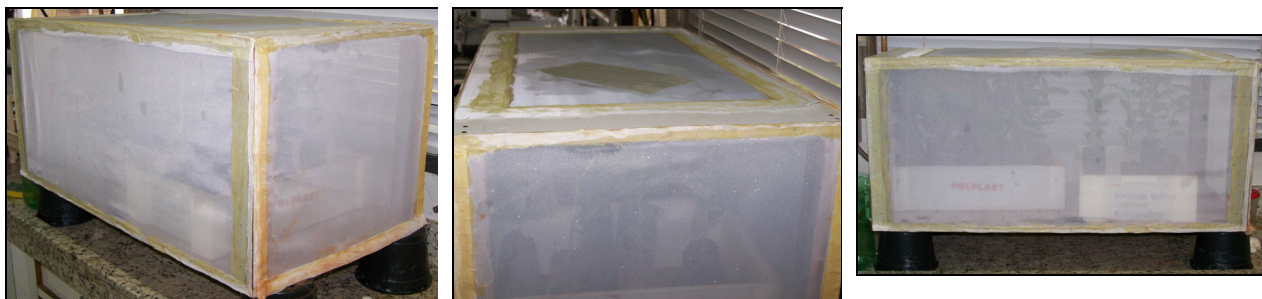


Figura 10 - Gaiola de criação do bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*)

Na criação do bicho-mineiro mudas de *C. arabica*, cultivar ‘Mundo Novo’, considerada suscetível ao ataque dessa praga, foram utilizadas para evitar o condicionamento pré-imaginal, conforme descrito por Lara (1991).

O laboratório foi mantido à temperatura de $27 \pm 2^\circ \text{C}$, fotofase de 14 horas e umidade relativa de $70 \pm 10\%$, permitindo a obtenção de insetos em maior número e ciclos curtos (PARRA, 1985). Durante a produção dos insetos, as mariposas eram alimentadas com solução de mel 10% (NANTES; PARRA, 1978), fornecida diariamente em papel filtro mantido sobre a gaiola.

No início da criação, foram utilizadas folhas de cafeeiro, cv. Obatã, com pupas de bicho-mineiro, que eram colocadas dentro da gaiola de infestação e permaneciam até a eclosão da mariposa. Essas folhas foram utilizadas até que a população do inseto no interior da gaiola estivesse adequada para iniciar a oviposição em mudas de cafeeiro ‘Mundo Novo’. As mudas de ‘Mundo Novo’ eram colocadas na gaiola e permaneciam três ou quatro noites dependendo do

tamanho da população. Uma vez infestadas, as mudas eram retiradas e mantidas, em laboratório, em caixas plásticas até a fase de pupa. As folhas com pupas do inseto foram destacadas e colocadas no interior da gaiola (Figura 11), onde ocorria a emergência do adulto, depois de, aproximadamente, 5 dias.

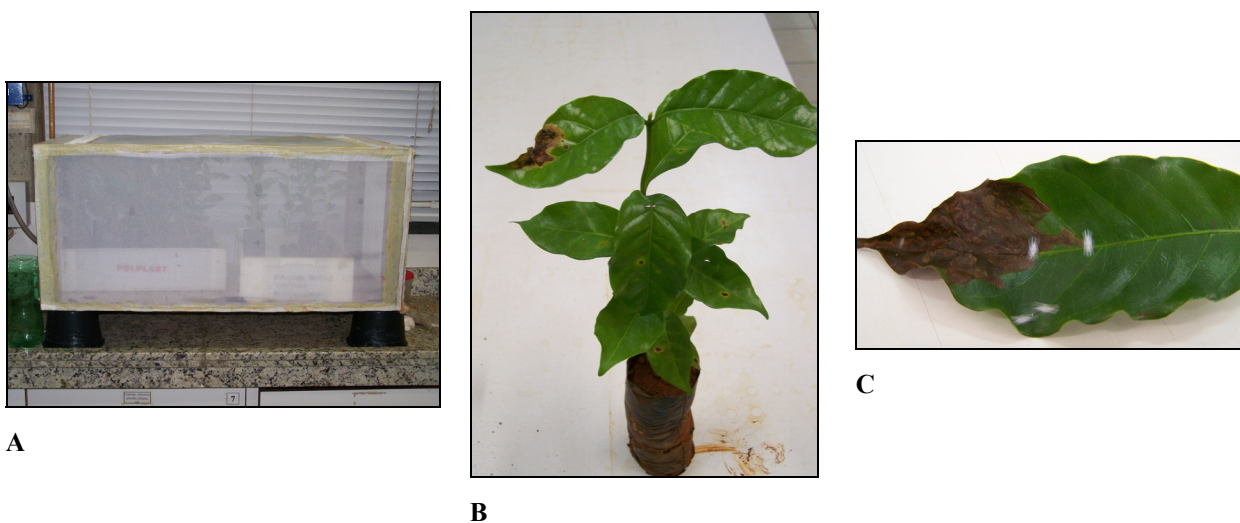


Figura 11 - (A) Mudanças na gaiola para oviposição; (B) muda com lesão do bicho-mineiro; (C) folha com pupa do bicho-mineiro

3.2.4 Patógeno

Os uredíniosporos de *H. vastatrix* foram coletados em cafeeiro naturalmente infectados (Figura 12), na fazenda Santa Elisa, pertencente ao Instituto Agrônomo de Campinas.



Figura 12 - Folhas de cafeeiro infectados com o fungo *Hemileia vastatrix*

Os esporos foram recolhidos com auxílio de um pincel, raspando-se suavemente as lesões da superfície abaxial das folhas e conservados em papel alumínio. Após a coleta, os uredíniosporos foram passados em peneiras de 0,149 mm para eliminar impurezas, sendo em seguida acondicionados em *ependorf* e mantidos em nitrogênio líquido até a inoculação das folhas.

3.2.5 Câmara para inoculação

Uma câmara foi construída com estrutura de cano PVC e recoberta com plástico grosso para formação de um ambiente propício (24°C e $97 \pm 3\%$ de umidade relativa) para a inoculação e crescimento do fungo em folhas de cafeeiro destacadas. Para o controle da temperatura e do fotoperíodo, utilizou-se um termômetro e um *timer*, respectivamente (Figura 13).

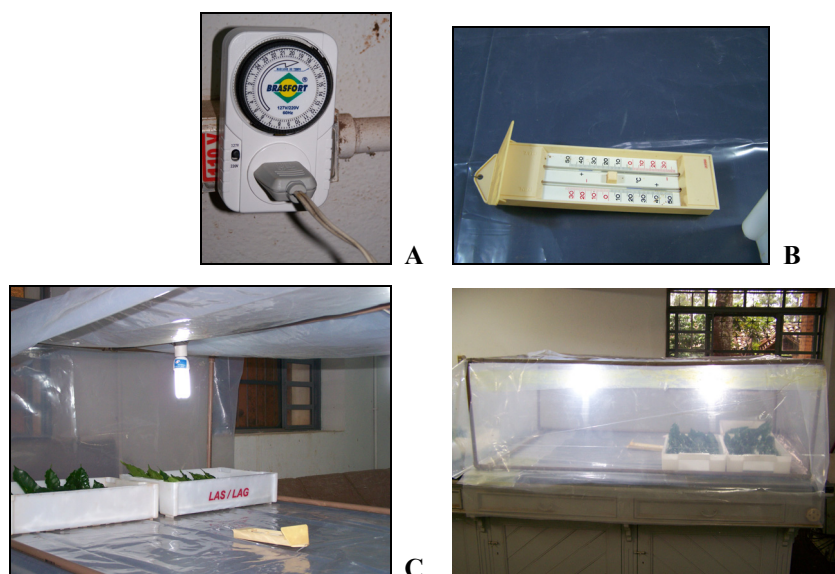


Figura 13 - (A) *Timer* - programar o fotoperíodo de 12 horas; (B) Termômetro - aferir a temperatura máxima e mínima na câmara; (C) Câmara em que as folhas foram dispostas durante o experimento

3.2.6 Análise bioquímica

Durante o processo de extração das amostras de folhas foi usado como solvente o metanol (MeOH) grau HPLC. Dois reagentes Carrez são também usados nesse processo, Carrez A (21,9 g de acetato de zinco em 100 ml de água) e Carrez B (10,6 g de ferrocianeto de potássio em 100 ml de água). As amostras foram extraídas em ultra-som e centrifugadas por 20 min à 6000 rpm.

Utilizou-se o cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, modelo LC-20A) para as análises em CLAE-DAD, em sistema de gradiente constituído por duas bombas, um controlador de sistema e detector UV-VIS com arranjos de fotodiodo (Shimadzu, modelo SPD-M20A), ajustado para 210-600nm. Os espectros foram monitorados em três comprimentos de onda: 220 nm, 270 nm e 310 nm. Os dados obtidos foram analisados e integrados por meio do software Shimadzu LC-solution. Duas colunas monolíticas (Onyx™ 100 x 3,0 mm, C18 Phenomenex) em linhas e uma pré-coluna monolítica (Onyx™ 5 x 4,5 mm, C18 Phenomenex) foram utilizadas para as análises no cromatógrafo líquido. Os solventes utilizados na fase móvel foram acetonitrila e ácido acético.

3.3 Procedimento experimental

3.3.1 Determinação da taxa de crescimento

A avaliação do crescimento vegetativo foi realizada nas mesmas plantas amostradas para as análises bioquímicas e nas mesmas épocas – florescimento (13/11/2007); fruto “chumbinho” (15/01/2008); frutos em granação/expansão (27/02/2008) e maturação (29/04/2008). Esse procedimento foi adotado com o objetivo de estimar, indiretamente, a alocação de carboidratos nas plantas com produção e sem produção da cultivar Catuaí e os demais genótipos selecionados.

Nessa avaliação complementar foram determinadas as taxas de crescimento das plantas em diâmetro (TCD), em altura (TCH) e em comprimento de ramos plagiotrópicos (TCR), a partir do acompanhamento da altura da planta (cm), diâmetro do caule (mm), e comprimento dos ramos plagiotrópicos (cm).

3.3.1.1 Taxa de crescimento em diâmetro do caule (TCD; mm dia⁻¹)

Essa variável foi determinada por meio das medidas de diâmetro do caule (DC, mm), na região localizada abaixo da cicatriz de inserção das folhas cotiledonares.

A taxa de crescimento do diâmetro (TCD) foi calculada de acordo com a expressão 1:

$$\text{TCD} = \Delta\text{DC}/\Delta t \quad (1)$$

em que TCD (mm dia^{-1}) corresponde à taxa de crescimento em diâmetro, ΔDC (mm) a variação do diâmetro em cada intervalo de amostragem e Δt (dia) relativos aos intervalos entre as amostragens (t_2-t_1 ; t_3-t_2 ; t_4-t_3).

3.3.1.2 Taxa de crescimento em altura da planta (TCH; cm dia^{-1})

Para a determinação da altura (H, cm) foi efetuada a medida entre o nível do solo até a inserção do último par de folhas expandidas.

A taxa de crescimento em altura (TCH) foi calculada de acordo com a expressão 2:

$$\text{TCH} = \Delta H / \Delta t \quad (2)$$

em que TCH (cm dia^{-1}) corresponde à taxa de crescimento em altura, ΔH (cm) a variação da altura obtida em cada intervalo de amostragem e Δt (dia) relativos aos intervalos entre as amostragens (t_2-t_1 ; t_3-t_2 ; t_4-t_3).

3.3.1.3 Taxa de crescimento de ramos plagiotrópicos (TCR; cm dia^{-1})

Os 5 ramos marcados aleatoriamente e em torno da planta foram identificados pela, colocação de uma fita indicativa nos nós determinados. Todas as medidas de comprimento foram feitas sempre a partir do ponto previamente identificado (fita).

A taxa de crescimento dos ramos plagiotrópicos (TCR) foi calculada de acordo com a expressão 3:

$$\text{TCR} = \Delta CR / \Delta t \quad (3)$$

em que TCR (cm dia^{-1}) corresponde à taxa de crescimento dos ramos plagiotrópicos, ΔCR (cm) à variação do comprimento desses ramos em cada intervalo de amostragem e Δt (dia) relativos aos intervalos entre as amostragens (t_2-t_1 ; t_3-t_2 ; t_4-t_3).

3.3.2 Infestação das plantas e avaliação do nível de resistência

As caixas com as folhas em solução de benziladenina 10^{-7} M foram colocadas individualmente dentro da gaiola de infestação para oviposição do bicho-mineiro. Cada Genótipo

permaneceu no interior da gaiola por uma noite, sendo anotada a data para o acompanhamento das fases de desenvolvimento do inseto. As caixas foram armazenadas em prateleiras e cobertas com tecido de algodão (*voil*), em condições controladas até o surgimento das primeiras pupas.

A avaliação do nível de resistência foi feita mediante escala de 1 a 4 pontos, segundo metodologia descrita por Guerreiro Filho et al. (1999), que consiste na classificação das plantas quanto à resistência ao bicho-mineiro em função do tipo de lesão apresentada após infestação artificial em laboratório (Tabela 2) (Figura 14).

Tabela 2 - Escala de pontos para a classificação de plantas em função da análise do tipo de lesão desenvolvida em discos foliares pelo ataque de *Leucoptera coffeella*

| Pontos | Classificação | Descrição |
|--------|--------------------------|-----------------------------|
| 1 | Resistente | Lesões pontuais |
| 2 | Moderadamente resistente | Lesões filiforme pequenas |
| 3 | Moderadamente suscetível | Lesões grandes irregulares |
| 4 | Suscetível | Lesões grandes arredondadas |

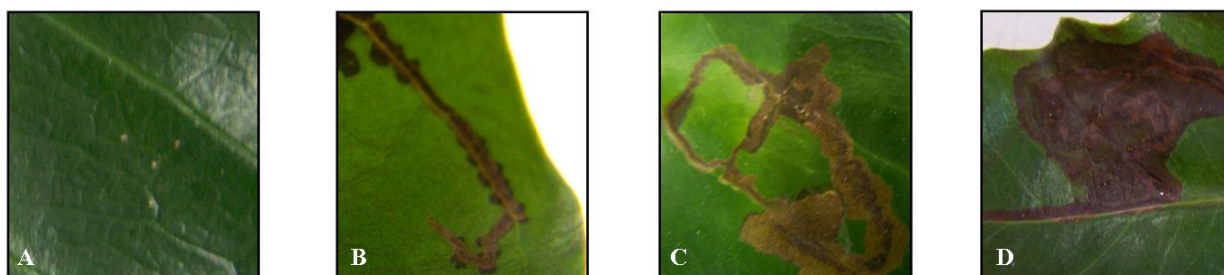


Figura 14 - Tipos de lesões produzidas por *Leucoptera coffeella* em folhas de cafeeiros com diferentes níveis de resistência. (A) lesão pontual; (B) lesão filiforme pequena; (C) lesão grande irregular; (D) lesão grande arredondada

Após a avaliação do nível de resistência de cada Genótipo, as folhas foram acondicionadas em saquinhos de tecido de algodão (*voil*) e congeladas em nitrogênio líquido. Essas amostras foram preparadas para análise bioquímica conforme descrição no item 3.2.1.1.

3.3.3 Inoculação das plantas com o patógeno e a avaliação do nível de resistência

Os uredíniosporos do fungo *H. vastatrix*, congelados em nitrogênio líquido, foram submetidos a um choque térmico por 10 min pela imersão do *ependorf* em água aquecida a 40°C. Os esporos foram misturados em água destilada em uma concentração de 2 mg ml⁻¹ em que se adicionou detergente 0,1 % (*Tween* 20) para facilitar a homogeneização da suspensão. Posteriormente, a suspensão foi agitada por 20 min em agitador magnético (Guzzo, 2004).

Para a inoculação das folhas com o patógeno, foi aspergida a suspensão de uredíniosporos nas superfícies abaxiais das folhas coletadas no campo. As folhas inoculadas foram mantidas no escuro por meio da cobertura das caixas com um saco plástico preto por 48h e umidade relativa de 85 % ± 3 % e temperatura de 24° C ± 3° C. As caixas foram transferidas para câmara (Figura 13C) e mantidas em condições adequadas até o surgimento dos sintomas.

O surgimento dos primeiros sintomas ocorreu após 22 dias da inoculação. A intensidade da infecção nas folhas dos genótipos foi quantificada por meio do software para quantificação de doenças em plantas - Quant V. 1.0 (Vale et al., 2002) e os resultados expressos em porcentagem de área foliar lesionada (Figura 15).

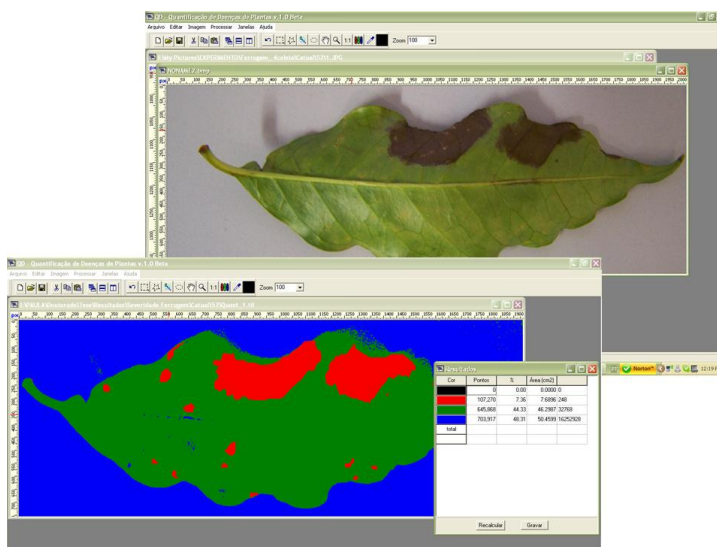


Figura 15 - Software Quant para quantificação da intensidade de infecção de ferrugem nas folhas de cafeeiro

Após a avaliação do nível de resistência de cada Genótipo, as folhas foram acondicionadas em saquinhos de tecido de algodão (*voil*) e congeladas em nitrogênio líquido. Essas amostras foram preparadas para análise bioquímica conforme descrição no item 3.2.1.1.

3.3.4 Análise bioquímica

3.3.4.1 Extração

Para análise em cromatografia líquida foram pesadas 30 mg de cada amostra de folhas maceradas e armazenadas em tubos *ependorf*. Em seguida, adicionou-se 3ml de solução de metanol 50 % (1 MeOH: 1 H₂O). Os tubos foram fechados com tampa de rosca e mantidos por 20 minutos em ultra-som. Posteriormente, foi acrescentado 15 µL de Carrez A e agitado por 30 segundos em vortex e depois mais 15 µL de Carrez B e agitado por mais 30 segundos em vortex. Os extratos foram centrifugados a vácuo por 15 minutos com velocidade de 6000 g à temperatura de 10° C (CARROLO, 2008). O sobrenadante foi transferido para um *ependorf* e armazenado em câmara fria por uma noite. A amostra foi filtrada com filtro de seringa de PVDF 0,2 µm e transferido para um recipiente próprio utilizado em cromatografia líquida (*vial* 2 ml com tampa de rosca e septo PTFE/ Silicone).

3.3.4.2 Cromatografia líquida

Para a separação dos compostos fenólicos dos extratos de folhas utilizou-se um equipamento de cromatografia líquida, em que se usou como fase móvel H₂O : ácido acético 1 % (fase A) e acetonitrila : ácido acético 1 % (fase B), com um gradiente de 0 a 3 % de fase B em 10 minutos; 3 a 30 % de fase B em 10 a 30 minutos; 30 a 100 % de fase B em 30 a 32 minutos; 100 % de fase B em 32 a 34 minutos; 3 % em 34 a 35 minutos, além de 2 minutos para retorno às condições iniciais e re-equilíbrio da coluna (conforme descrito no item 3.2.6).

Dentre todos os compostos separados nas análises dos extratos de folhas foram escolhidos apenas os picos principais e majoritários presentes no cromatograma. A variável fenóis totais, que consiste na somatória de todas as áreas dos picos obtidas no cromatograma, também foi utilizada para verificar comportamento dos genótipos estudados. Para a quantificação dos compostos selecionados utilizou-se a área dos gráficos fornecidos pelo software Shimadzu LC-solution.

3.4 Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos de laboratório e os dados coletados no campo foram submetidos à análise de variância com auxílio do programa estatístico Statistica 6.0 (data analysis software system - STATSOFT, 2001) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey, ao nível

de 5 % de probabilidade. Nos casos em que houve perda de repetições, os resultados foram analisados em componentes principais (ACP)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão de resistência

A análise de variância dos valores referentes à escala de dano (1 a 4) e a duração da fase de ovo à lagarta do bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e a porcentagem de área lesionada pela ferrugem (*Hemileia vastatrix*), foi realizada com todos as plantas das populações selecionadas, por reunir genótipos de diferentes classes de resistência (resistente-R; moderadamente resistente-MR; moderadamente suscetível-MS; suscetível-S). Os genótipos H20049-RR (resistente ao bicho-mineiro e à ferrugem) e RS (resistente ao bicho-mineiro e suscetível a ferrugem), ambos resistentes ao bicho-mineiro, não fizeram parte da análise de variância para variável duração (ovo-lagarta), uma vez que não foram observadas pupas em folhas destes tratamentos.

Os resultados obtidos nos experimentos, em laboratório, de nível de resistência foram os esperados, revelando que há variação entre as populações na expressão de resistência ao bicho-mineiro e à ferrugem. As folhas infestadas pelo bicho-mineiro apresentaram lesões do tipo 1, 2, 3 e 4 (Figura 14), em que as folhas das cvs. Catuaí e Obatã e do genótipo H14954-46-S (suscetível ao bicho-mineiro) não diferiram quanto à escala de dano, com lesões do tipo 4 (Tabela 3).

Tabela 3 - Nível de resistência ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e à ferrugem (*Hemileia vastatrix*), dos genótipos avaliados em laboratório, mediante o uso de escala de pontos (1-4) e duração em dias das fases de ovo à lagarta e porcentagem de área lesionada, respectivamente

| Genótipo | Nível de Resistência | | <i>Leucoptera coffeella</i> | | | | <i>Hemileia vastatrix</i> | |
|--------------|------------------------|--|-----------------------------|---------------|-----------------------|---------------|---------------------------|---------------|
| | Bicho-mineiro/Ferrugem | | Escala de dano | | Duração (ovo-lagarta) | | Área lesionada | |
| | Resistente/Suscetível | | Médias (pontos) | Desvio Padrão | Médias (dias) | Desvio Padrão | Médias (%) | Desvio Padrão |
| Catuaí 0% | S/S | | ... | ... | ... | ... | 6,0 b | 0,38 |
| Catuaí 50% | S/S | | ... | ... | ... | ... | 10,9 a | 1,53 |
| Catuaí 100% | S/S | | 3,9 a | 0,08 | 18,0 b | ... | 8,6 a | 2,17 |
| Obatã | S/R | | 3,7 a | 0,15 | 18,5 b | ... | 0,0 c | 0,0 |
| H14954-46-R* | R/S | | 1,0 d | 0,00 | ... | ... | 0,1 b | 0,04 |
| H14954-46-S | S/S | | 3,8 a | 0,16 | 18,4 b | ... | 5,0 a | 1,52 |
| H20049-RR* | R/R | | 1,0 d | 0,06 | ... | ... | 0,1 b | 0,22 |
| H20049-RS | R/S | | 1,1 d | 0,14 | ... | ... | 0,9 ab | 0,03 |
| H20049-SR | S/R | | 2,8 b | 0,29 | 33,3 a | ... | 0,3 b | 5,27 |
| H20049-SS | S/S | | 1,8 c | 0,17 | 33,0 a | ... | 5,9 a | 0,34 |

* R: resistente ao bicho-mineiro; S: suscetível ao bicho-mineiro; RR: resistente ao bicho-mineiro e à ferrugem; RS: resistente ao bicho-mineiro e suscetível à ferrugem; SR: suscetível ao bicho-mineiro e resistente à ferrugem; SS: suscetível ao bicho-mineiro e à ferrugem

** Médias seguidas por uma mesma letra, nas colunas, não diferem pelo teste Tukey 5%

(...) Dado numérico não disponível

As plantas de H20049-RR e RS, apresentaram danos do tipo 1, menor nota da escala de pontos descrita na tabela 2, demonstrando adequação e uniformidade das plantas selecionadas. As plantas da população H20049-SR (suscetível ao bicho-mineiro e resistente à ferrugem) selecionadas como plantas suscetíveis ao desenvolvimento do inseto apresentaram uma leve expressão de resistência - dano do tipo 2 (Tabela 3), contudo os insetos conseguiram completar seu desenvolvimento, cuja duração entre as fases de ovo e lagarta foi de 33 dias (Tabela 3). Já nas plantas cv. Catuaí, cv. Obatã e H14954-46-S este período foi de 18 dias, o que indica que as mesmas são mais adequadas para o desenvolvimento do bicho-mineiro, com nível de suscetibilidade superior dos outros genótipos estudados.

A duração do ciclo total (ovo à emergência do adulto) de *L. coffeella*, bem como a viabilidade têm correlação direta com cada uma das fases de desenvolvimento do inseto, as quais podem variar com a temperatura, umidade e o hospedeiro. Essas informações possibilitam caracterizar as plantas quanto ao nível de resistência, podendo ser plantas mais ou menos adequadas ao desenvolvimento completo do inseto. Neste contexto, as plantas H20049-SR e SS (suscetível ao bicho-mineiro e à ferrugem), suscetíveis ao ataque do bicho-mineiro se apresentaram pouco adequadas ao inseto, uma vez que as plantas dessas populações são oriundas do cruzamento entre *C. arabica* e *C. racemosa*. Provavelmente, os genes de resistência a *L. coffeella* presentes em *C. racemosa* tenham alguma relação com a reação dessas plantas ao ataque deste inseto.

As áreas foliares lesionadas decorrentes da inoculação de esporos de *H. vastatrix* variaram conforme o nível de resistência dos genótipo estudados, em que as plantas da cv. Catuaí e das populações H14954-46-S e H20049-SS não diferiram estatisticamente entre si na porcentagem de área lesionada, no entanto os valores foram superiores aos encontrados nos outros genótipos (Tabela 3).

Os genótipos H20049-RR e SR, com expressão de resistência à ferrugem, apresentaram baixas porcentagens de área foliar lesionada, entretanto os mesmos não diferiram estatisticamente das populações H14954-46-R e H20049-RS. Estas populações em seleção (H14954-46-R e H20049-RS) ainda que suscetível ao patógeno expressaram determinado nível de resistência à ferrugem, uma vez que são oriundas do retrocruzamento com *C. arabica*, cv. Icatu Vermelho (H4782-7-882), resistente à ferrugem.

O nível de produção do cafeeiro está intimamente relacionado com a incidência de ferrugem no campo, uma vez que as altas cargas de frutos comprometem o estado nutricional com o aumento da suscetibilidade da planta à ferrugem (ESKES; SOUZA, 1981; MANSK; MATIELLO, 1984; MATIELLO et al., 1984; ZAMBOLIM et al., 1997). Nesse contexto, as plantas selecionadas da cv. Catuaí, suscetível à ferrugem, foram desbastadas em diferentes níveis de produção (0 %, 50 % e 100 % de frutos), conforme descrito no item 3.1. Os resultados obtidos foram os esperados, uma vez que as plantas sem frutos apresentaram menores valores de área foliar lesionada, no entanto não houve diferenças entre as plantas com 50 % dos frutos e as plantas com 100% (Tabela 3), pois a produção de grãos (g) entre os dois tratamentos foi semelhante pelo teste Tukey 5 % (4471 g - Catuaí 0 % e 4314 g - Catuaí 100 %). Esta semelhança se deve, provavelmente, o raleamento de 50 % dos frutos beneficiou a granação, o que resultou em frutos maiores. É importante salientar que não foi avaliado o peso de 100 sementes.

4.2 Caracterização dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos presentes nas folhas dos genótipos estudados foram separados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) e analisados em dois comprimentos de onda: 270 e 325 nm, sendo este último utilizado para verificar a presença ou ausência do flavanol (pico 9). Os resultados obtidos nos cromatogramas foram bastante complexos e, dessa forma optou-se por picos majoritários correspondentes a diferentes compostos fenólicos e os picos referentes aos ácidos clorogênicos (CGA), totalizando 16 picos (Tabela 4). Para caracterização desses picos foi levado em conta o tempo de retenção e o espectro na região UV.

Tabela 4 - Identificação dos picos e caracterização dos compostos gerados pelos cromatogramas

| Picos | Tempo de Retenção (min) | Fenóis |
|-------|-------------------------|-------------------|
| 1 | 2,5 | Ácido clorogênico |
| 2 | 2,7 | Ácido |
| 3 | 6,8 | Ácido clorogênico |
| 4 | 8,6 | Ácido |
| 5 | 12,3 | Ácido clorogênico |
| 6 | 15,5 | Ácido |
| 7 | 16,1 | Ácido clorogênico |
| 8 | 17,4 | Ácido |
| 9 | 18,3 | Flavanol |
| 10 | 18,8 | Flavanol |
| 11 | 20,0 | Flavanol |
| 12 | 20,5 | Flavanol |
| 13 | 22,5 | Flavanol |
| 14 | 24,0 | Ácido clorogênico |
| 15 | 24,3 | Ácido clorogênico |
| 16 | 25,5 | Ácido clorogênico |

Os picos selecionados para o estudo dos genótipos estão relacionados no cromatograma abaixo, em que aparece o tempo de retenção em destaque de cada composto, com exceção do pico 2, que só foi observado nas folhas destinadas aos testes de resistência em laboratório (Figura 16). Os espectros na região UV, observado no DAD, entre 270-325nm, caracterizaram os picos do cromatograma gerado no UV 270nm (Figura 17).

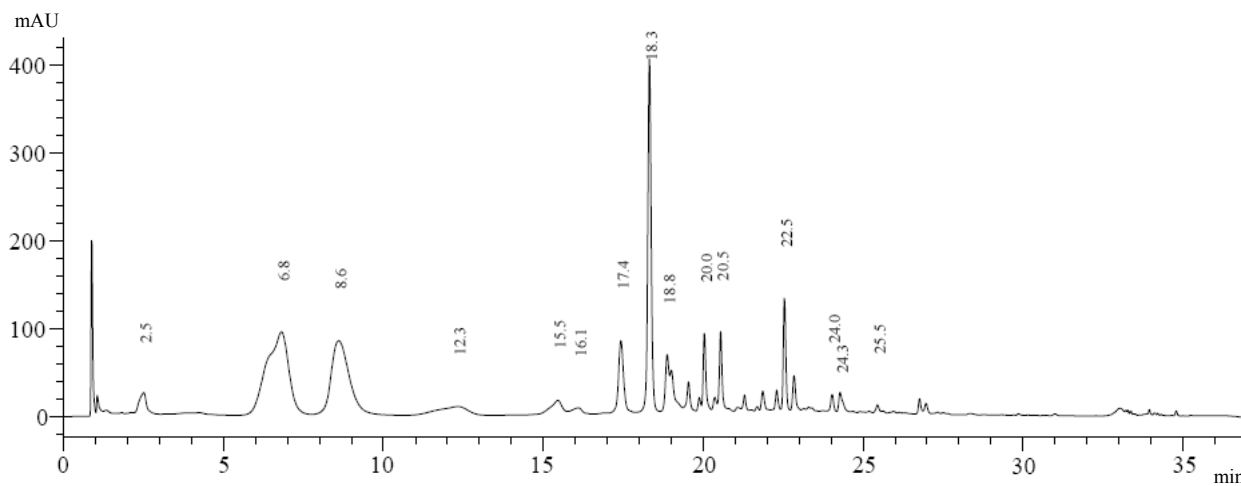


Figura 16 - Cromatograma no UV 270nm com destaque aos tempos de retenção dos compostos fenólicos estudados em extrato de folhas do cafeeiro H14954-46-R

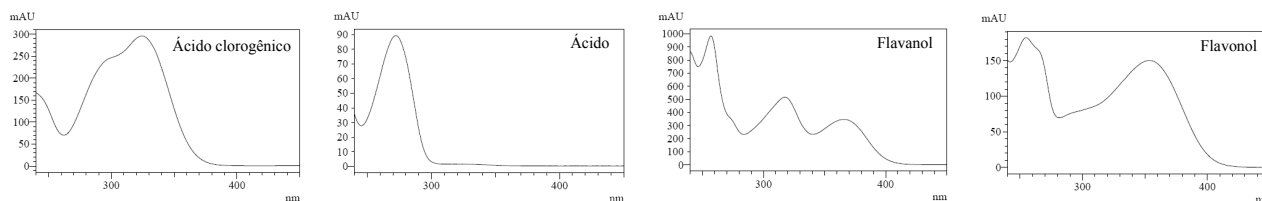


Figura 17 - Espectros na região do UV observado no DAD, na região de 270-325nm referentes aos: ácido clorogênico, ácido, flavanol e flavonol

Os cromatogramas gerados pelo DAD apresentaram perfis semelhantes entres os genótipos, diferindo apenas na concentração dos compostos (dados avaliados pelas áreas dos picos nos cromatogramas na região do UV) e na presença do pico 5 (em destaque) nas plantas H14954-46-R e H20049 (RR, RS, SR e SS) (Figura 18). Dessa forma, as diferenças existentes quanto ao nível de resistência ao bicho-mineiro e à ferrugem das populações estudadas não podem ser atribuídas ao perfil cromatográfico, podendo conferir à presença de genes oriundos de cruzamentos com *C. arabica*, comum a todas as populações. Em estudos com diferentes espécies de *Coffea* os perfis cromatográficos podem ser distintos com ausência ou presença de picos, conforme observado por Melo et al. (2006), em *C. arabica*, *C. racemosa* e *C. salvatrix*.

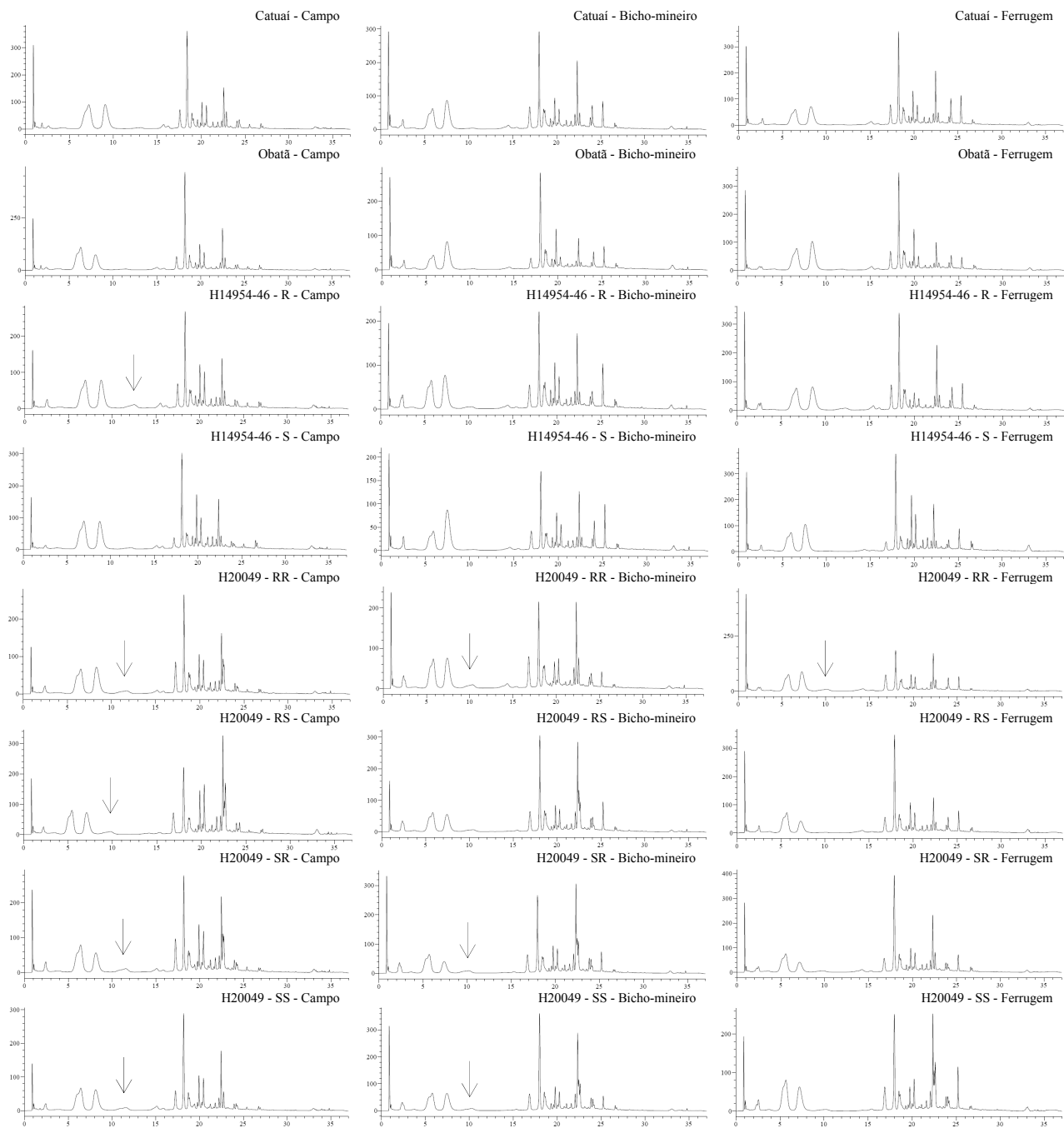


Figura 18 - Cromatograma, na região UV 270nm, das folhas de cv. Catuaí, cv. Obatã, H14954-46 (R e S) e H20049 (RR, RS, SR, SS), em três situações: folhas saudas do campo, folhas destinadas a testes em laboratório de bicho-mineiro e ferrugem, com destaque (flecha) à presença do pico 5 (ácido clorogênico)

4.3 Quantificação dos compostos fenólicos

4.3.1 Durante as fases de frutificação do cafeeiro

As análises em cromatografia líquida foram realizadas em quatro fases de frutificação do cafeeiro - florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação - nos diferentes genótipos, com a finalidade de observar a variação sazonal dos ácidos clorogênicos (CGA), flavanol, flavonol e fenóis totais.

Os teores de fenóis totais variaram durante os estágios de maturação do cafeeiro de forma semelhante entres os genótipos, com uma diminuição acentuada na síntese dos compostos fenólicos na fase de granação (Figuras 19, 20 e 21).

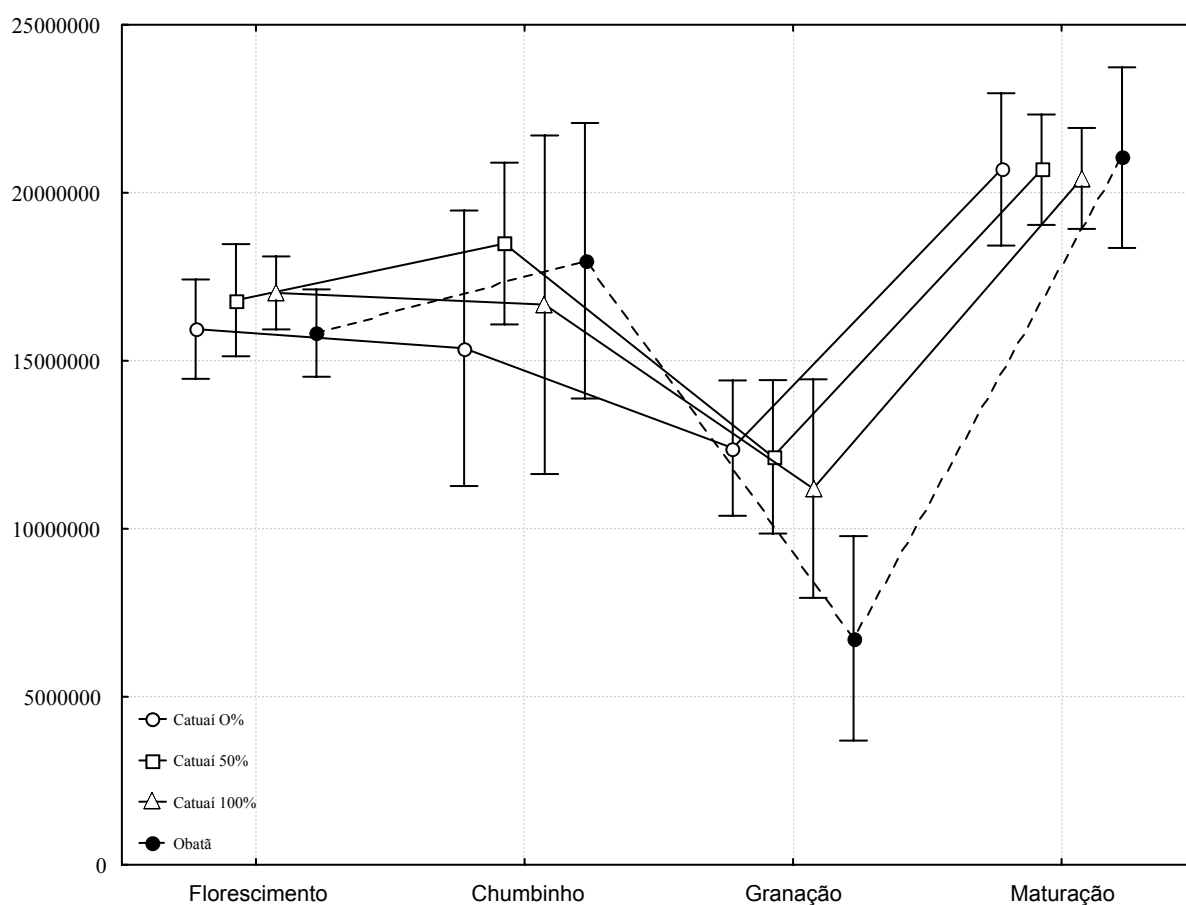


Figura 19 - Representação gráfica da variação dos teores de fenóis totais nas cultivares Catuai sem (—○—) e com 50 % (—□—) e 100 % (—△—) de produção e Obatã (---●---), durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação

Na fase de granação do fruto, quando há maior demanda por carboidrato para enchimento do grão, a planta prioriza o metabolismo primário em detrimento à síntese de fenóis totais. Esse mesmo comportamento foi observado por Salgado et al. (2008) em *C. arabica*, em que a concentração de fenóis totais na planta diminuiu nas fases de expansão e granação, época que o acúmulo de matéria seca é da ordem de 44,6 % e 27,2 %, respectivamente (CHAVES; SARRUGE, 1984)

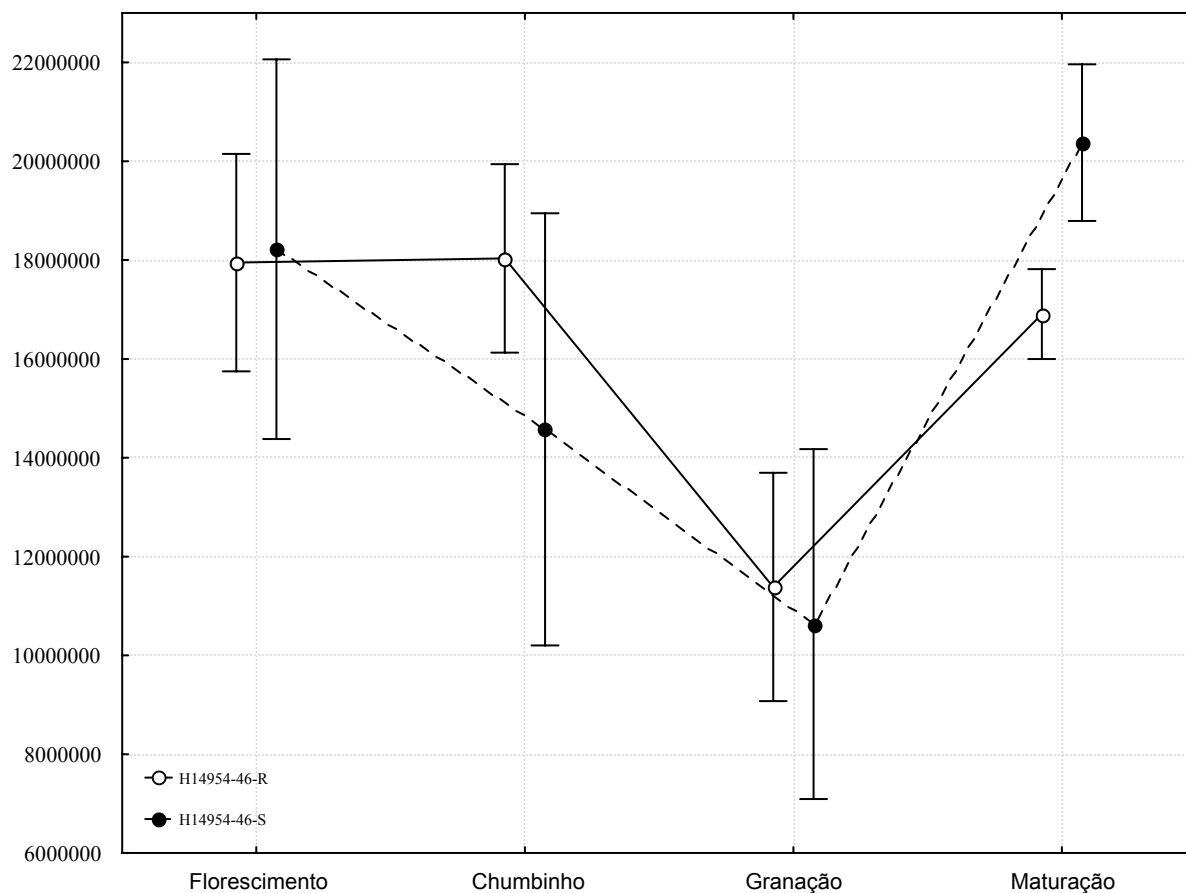


Figura 20 - Representação gráfica da variação dos teores de fenóis totais nos genótipos H14954-46-R - resistente ao bicho-mineiro (—○—) e H14954-46-S - suscetível ao bicho-mineiro (---●---), durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação

As altas variabilidades observadas nas barras de variância das figuras 19, 20 e 21 são justificadas pelo delineamento experimental, no qual determinou uma planta por repetição. Dessa

forma, as particularidades existentes em cada planta, independentemente de pertencerem à mesma espécie, mesma cultivar ou mesmo genótipo, interferiram na análise estatística.

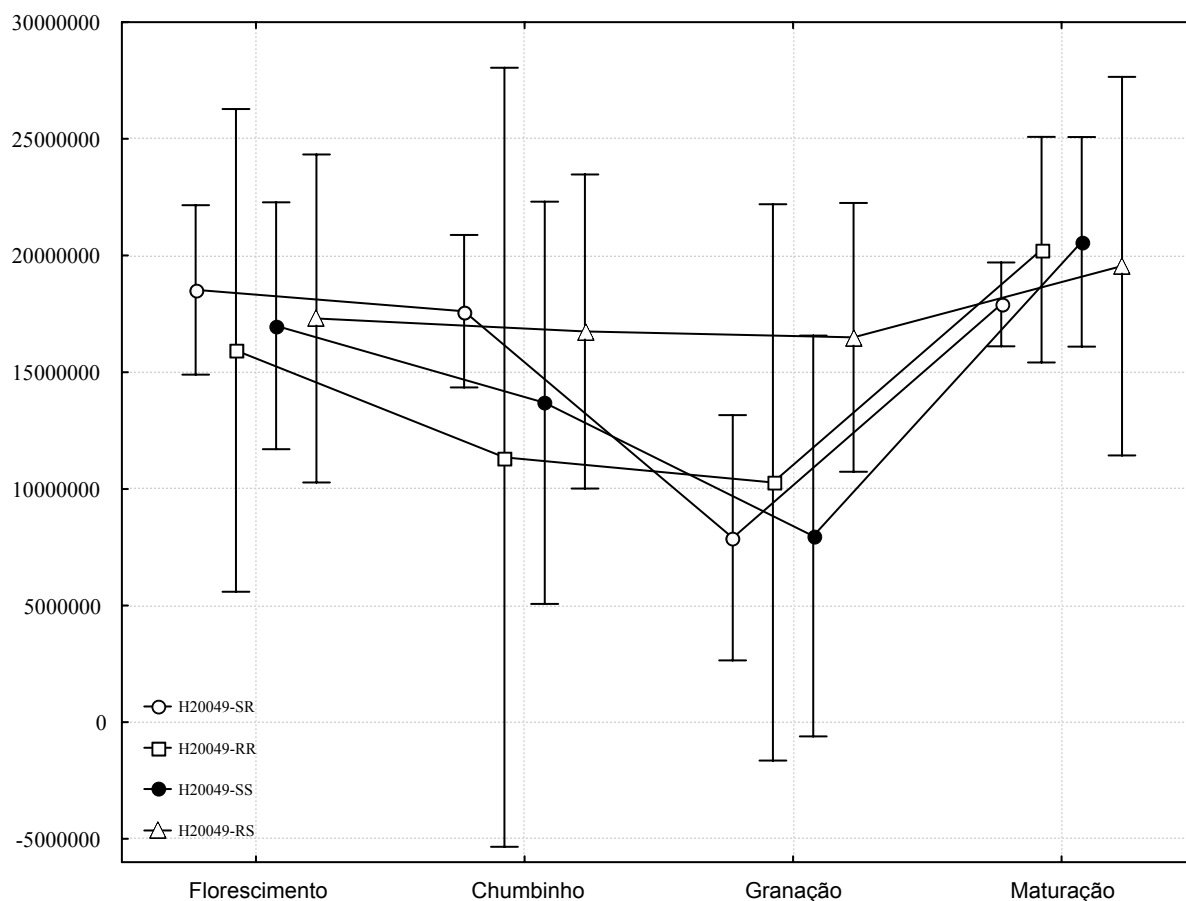


Figura 21 - Representação gráfica da variação dos teores de fenóis totais nos genótipos H20049-SR - suscetível ao bicho-mineiro e resistente à ferrugem (○—); H20049-RR - resistente ao bicho-mineiro e à ferrugem (□—); H20049-SS - suscetível ao bicho-mineiro e à ferrugem (●—); H20049-RS - resistente ao bicho-mineiro e suscetível à ferrugem (△—), durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação

Os resultados obtidos com as análises das populações foram agrupados segundo semelhança do material genético: Grupo I - cv. Catuaí e cv. Obatã; Grupo II - H14954-46; Grupo III - H20049 (Tabela 1) e submetidos à análise de variância.

4.3.1.1 Grupo I

Os teores médios do ácido clorogênico (CGA), do flavanol e do flavonol nas folhas das cultivares Catuaí e Obatã, durante as fases de frutificação, diminuíram na fase de granação, com exceção dos picos 8 (ácido), 11, 12 e 13 (flavonol) que apresentaram menores concentrações nas três primeiras fases, aumentando a síntese destes na fase de maturação. O ácido clorogênico referente ao pico 1 foi maior na fase de florescimento (Tabela 5).

Tabela 5 - Médias seguidas de desvio padrão das áreas dos picos correspondentes aos compostos fenólicos identificados nas cultivares Catuaí sem produção e com 50 % e 100 % de produção e Obatã, durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação

| Pico | Fenóis | Florescimento | | Chumbinho | | Granação | | Maturação | |
|------|----------|---------------|---------------|-----------|---------------|----------|---------------|-----------|---------------|
| | | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão |
| 1 | CGA | 155456 | a 9753 | 145470 | ab 10279 | 14212 | c 5934 | 121883 | b 10108 |
| 2 | Ácido | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| 3 | CGA | 4873079 | a 945485 | 3869561 | a 253786 | 1319340 | b 165952 | 4058867 | a 249844 |
| 4 | Ácido | 3566930 | a 89399 | 3083696 | b 78834 | 3380850 | ab 56990 | 3471179 | ab 205268 |
| 5 | CGA | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| 6 | Ácido | 264693 | a 16995 | 294583 | a 24009 | ... | b ... | 234276 | a 42615 |
| 7 | CGA | 136629 | a 5529 | 130743 | a 10852 | ... | b ... | 106631 | a 18888 |
| 8 | Ácido | 673800 | b 20826 | 649910 | b 51643 | 88283 | c 16123 | 943706 | a 99771 |
| 9 | Flavanol | 2171918 | a 61486 | 2622766 | a 184192 | 1477742 | b 103937 | 2502299 | a 180815 |
| 10 | Flavanol | 321286 | a 9976 | 392607 | a 28923 | 193293 | b 16334 | 384561 | a 25961 |
| 11 | Flavonol | 605145 | b 30224 | 628303 | b 38766 | 591962 | b 37003 | 829016 | a 60848 |
| 12 | Flavonol | 343357 | c 37296 | 507710 | b 48487 | 527313 | ab 43675 | 665159 | a 51069 |
| 13 | Flavonol | 447073 | c 48579 | 802715 | b 64409 | 933102 | b 70337 | 1243473 | a 84448 |
| 14 | CGA | 113052 | a 8049 | 138490 | a 10473 | 42881 | b 14591 | 144786 | a 17530 |
| 15 | CGA | 116439 | b 14016 | 186233 | a 14160 | 58582 | c 5840 | 91403 | bc 14440 |
| 16 | CGA | 70764 | a 3165 | 75342 | a 6008 | 13757 | c 3893 | 51499 | b 3671 |

* Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%
(...) Dado numérico não disponível

O ácido clorogênico (CGA) correspondente ao pico 5 não foi observado no cromatograma do Grupo I, na região UV 270nm, em nenhuma fase de frutificação do cafeeiro. Já os picos 6 (ácido) e 7 (CGA) não estiveram presentes apenas na fase de granação (Tabela 5).

Nos meses de fevereiro e março, fase de granação do cafeeiro, observou-se na área experimental, na região de Campinas, um período de alta incidência de bicho-mineiro, sendo a cv. Obatã a mais atacada pelo inseto (Figura 22). Já o período de alta incidência de ferrugem ocorreu nos meses de abril e maio (fase de maturação), em que as plantas dos tratamentos cv.

Catuai com 50 % e Catuai com 100 % de frutos foram os mais infectados pelo patógeno (Figura 23).

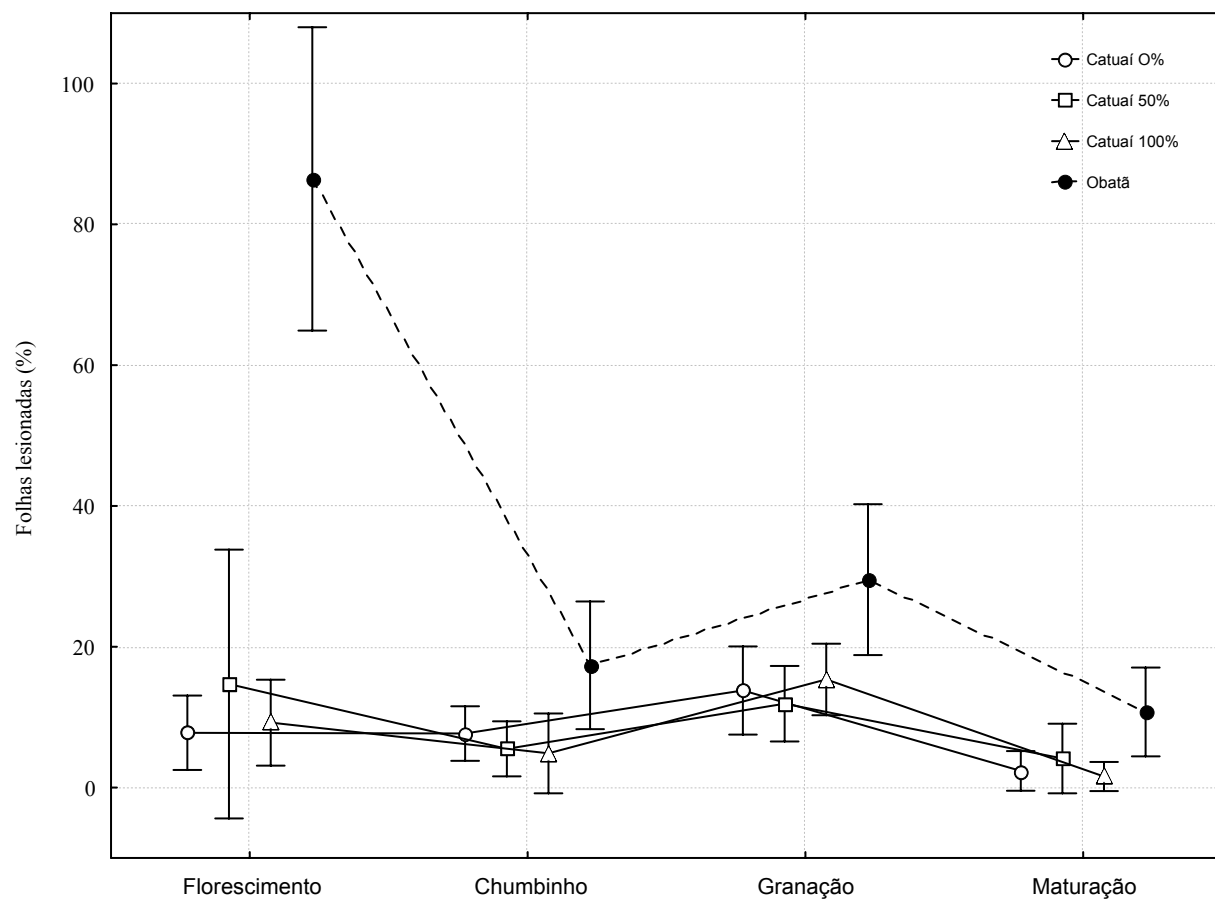


Figura 22 - Representação gráfica da variação de folhas lesionadas pelo ataque de bicho-mineiro (%) nas cultivares Catuai sem (—○—) e com 50 % (—□—) e 100 % (—△—) de produção e Obatã (—●—), durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação

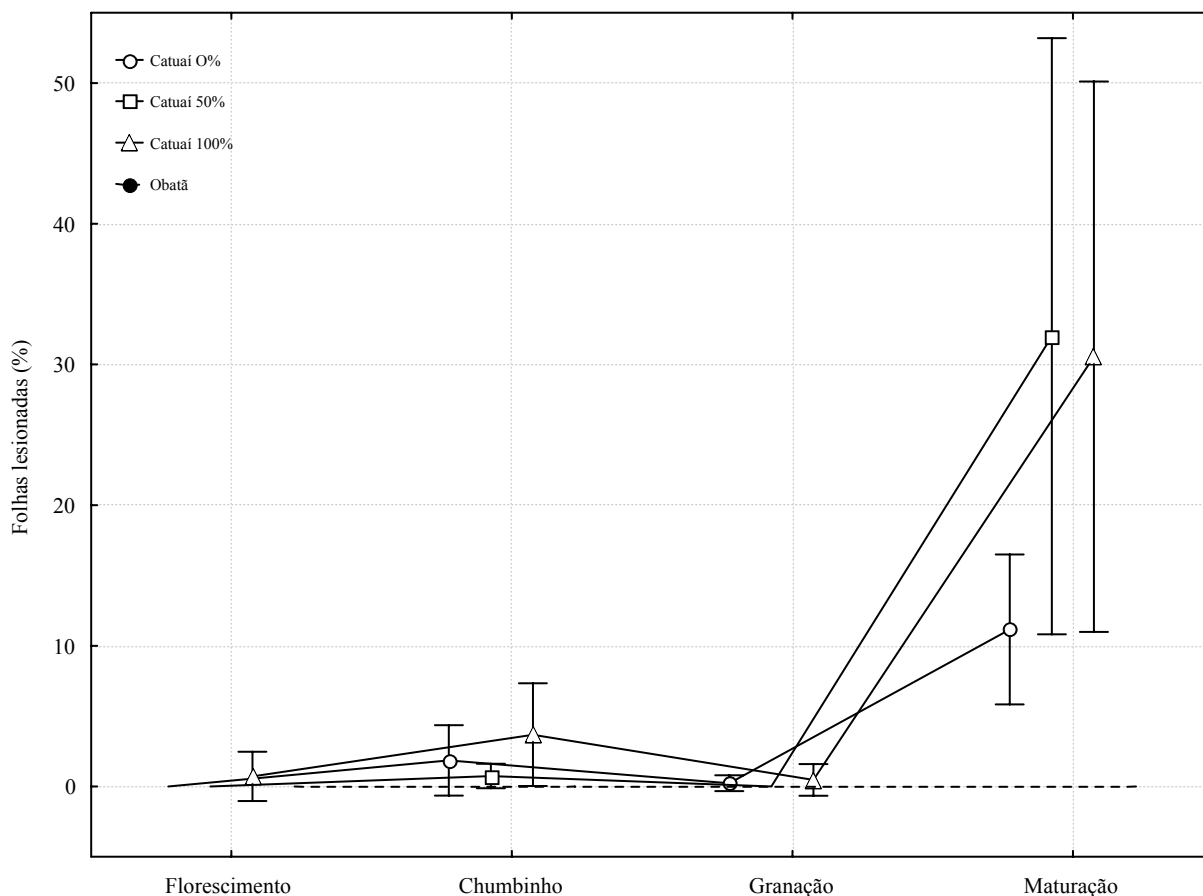


Figura 23 - Representação gráfica da variação de folhas lesionadas pela infecção de ferrugem (%) nas cultivares Catuai sem (—○—) e com 50 % (—□—) e 100 % (—△—) de produção e Obatã (—●—), durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação

As plantas da cv. Obatã apresentaram maior número de folhas lesionadas pelo bicho-mineiro em relação aos outros tratamentos (Figura 22). Assim, nessa cultivar que é resistente à ferrugem e que, por isso, apresenta maior retenção foliar nos períodos de alta incidência do patógeno, verifica-se que as folhas lesionadas pelo bicho-mineiro tornam-se mais numerosos e visíveis. No entanto, o número de folhas por ramos marcados da cv. Obatã, durante todo o período de maturação do fruto, foi inferior ao da cv. Catuai (Figura 24). Segundo Matos (2001), fêmeas de *L. coffeella* apresentam preferência para oviposição em folhas da cultivar Obatã IAC 1669-20 quando comparada à cultivar Catuai Vermelho de *C. arabica*.

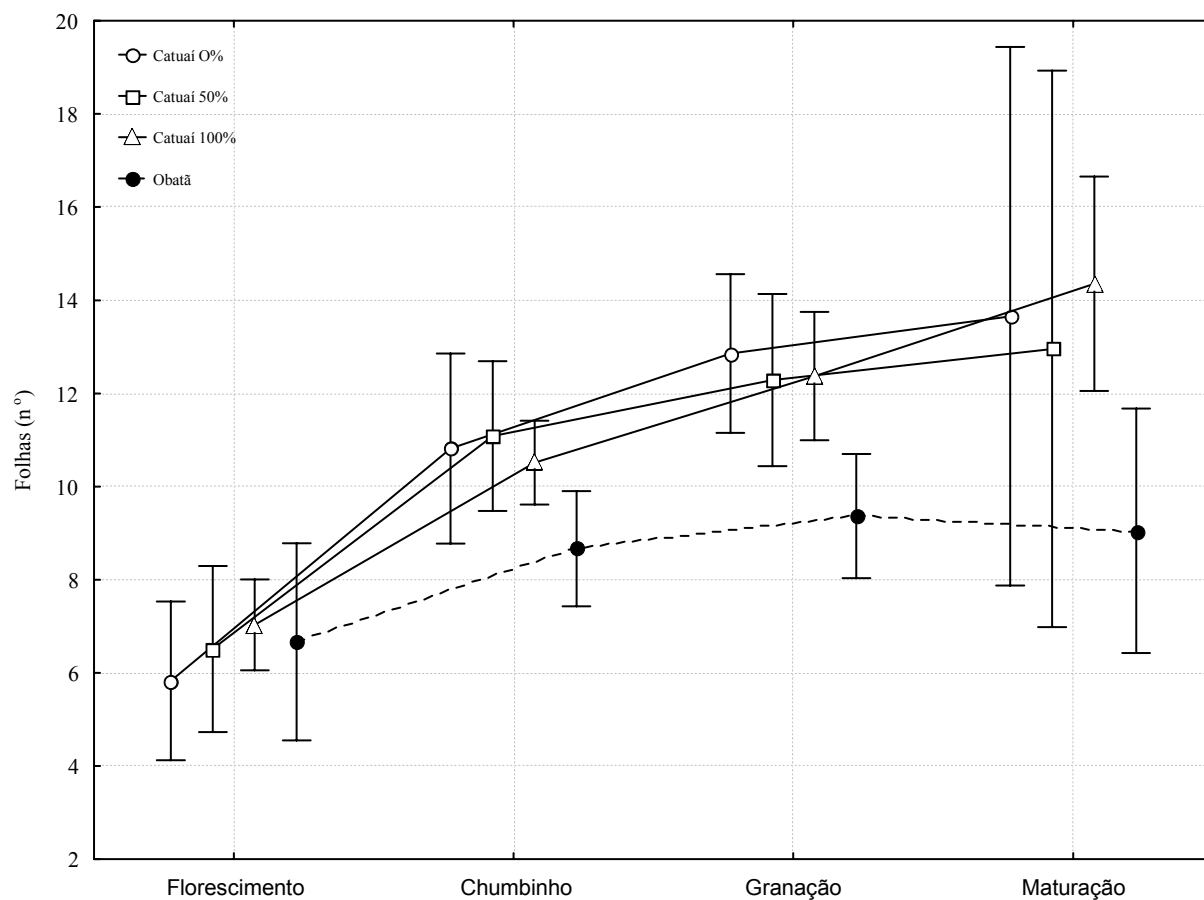


Figura 24 - Representação gráfica da variação do número de folhas nas cultivares Catuai sem (○) e com 50 % (□) e 100 % (△) de produção e Obatã (●), durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação

As diferenças encontradas na porcentagem de folhas lesionadas no campo entre as cultivares foram semelhantes às observadas em laboratório (descritos no item 4.1), em que a cv. Catuai sem produção apresentou valores inferiores aos tratamentos representados pelas plantas de Catuai com 50 % e 100 % de frutos (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão das variáveis fenóis totais (área dos picos), número de folhas, folhas lesionadas por bicho-mineiro (%) e folhas lesionadas por ferrugem (%), nas cultivares Catuaí sem e com 50 % e 100 % de produção e Obatã

| Variável | Catuaí 0 % | | Catuaí 50 % | | Catuaí 100 % | | Obatã | | | | | | | | | |
|--------------------------|------------|---------------|-------------|---------------|--------------|---------------|---------|---------------|----------|---|---------|--|----------|---|---------|--|
| | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | | | | | | | | |
| Fenóis Totais | 16105241 | a | 4060015 | | 17031781 | a | 3810414 | | 16329721 | a | 4645244 | | 15397774 | a | 6048029 | |
| Folha (n°) | 11 | a | 5 | | 11 | a | 4 | | 11 | a | 3 | | 8 | b | 2 | |
| Bicho-mineiro (%) | 7,9 | b | 6,4 | | 9,1 | b | 11,5 | | 7,8 | b | 7,3 | | 36,0 | a | 32,7 | |
| Ferrugem (%) | 3,3 | ab | 5,6 | | 8,2 | a | 17,7 | | 8,9 | a | 16,4 | | 0,0 | b | 0,0 | |

* Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%

As concentrações dos compostos referentes aos picos 1 (CGA), 6 (ácido), 7 (CGA), 12 (flavonol), 14 (CGA) e 15 (CGA), durante os estágios de maturação do cafeeiro, variaram conforme a cultivar (Tabela 8), no entanto os teores de fenóis totais não apresentaram diferenças significativas entre as cultivares (Tabela 6). Os teores destes fenóis variaram mesmo entre os tratamentos com as plantas da cv. Catuaí (0 %, 50 % e 100 % de produção), em que aquelas com 50 % e 100 % de frutos apresentaram os maiores teores de fenóis referente aos picos 6, 7, 12 e 14. Dessa forma, atribui-se ao aumento da síntese destes compostos fenólicos à maior incidência de ferrugem nos tratamentos com maior produção de frutos. Já a cv. Obatã, resistente à ferrugem, apresentou teores maiores de ácido clorogênico (picos 1 e 15).

As taxas de crescimento das plantas Catuaí nos diferentes níveis de produção não diferiram entre si, com exceção ao crescimento dos ramos plagiotrópicos, em que as plantas sem produção apresentaram as maiores taxas (Tabela 7). Assim sendo, o carboidrato translocado do metabolismo secundário para primário para atender a demanda destinada ao crescimento vegetativo não ocorreu entre os tratamento, dessa forma a síntese de fenóis totais foi semelhante entre as plantas Catuaí (0 %, 50 % e 100 %).

Tabela 7 - Taxa de crescimento dos ramos plagiotrópicos (TCR; cm.dia⁻¹), em altura (TCH; cm.dia⁻¹), em diâmetro (TCD; mm.dia⁻¹) e produção (g) das plantas cultivar Catuaí sem produção e com 50 % e 100 % de produção e Obatã

| Variável | | Catuaí 0 % | | Catuaí 50 % | | Catuaí 100 % | | Obatã | | | | | | | | | |
|----------|-------------------------|------------|---------------|-------------|---------------|--------------|---------------|--------|---------------|--------|----|--------|--|--------|---|--------|--|
| | | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | | | | | | | | |
| TCR | (cm.dia ⁻¹) | 0,0930 | a | 0,0163 | | 0,0789 | ab | 0,0250 | | 0,0671 | ab | 0,0152 | | 0,0498 | b | 0,0179 | |
| TCH | (cm.dia ⁻¹) | 0,1168 | a | 0,0379 | | 0,1115 | a | 0,0796 | | 0,0798 | a | 0,0192 | | 0,1128 | a | 0,0477 | |
| TCD | (mm.dia ⁻¹) | 0,0406 | a | 0,0207 | | 0,0452 | a | 0,0295 | | 0,0322 | a | 0,0149 | | 0,0192 | a | 0,0049 | |
| Produção | (g) | 371 | b | 267 | | 4471 | a | 2349 | | 4314 | a | 1272 | | 5558 | a | 1695 | |

* Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%

Tabela 8 - Médias seguidas de desvio padrão das áreas dos picos correspondentes aos compostos fenólicos identificados nas cultivares Catuaí sem produção e com 50% e 100% de produção e Obatã

| Pico | Fenóis | Catuaí 0 % | | Catuaí 50 % | | Catuaí 100 % | | Obatã | | | | | |
|------|----------|------------|---------------|-------------|---------------|--------------|---------------|---------|---------------|--------|---------|-----|--------|
| | | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | | | | |
| 1 | CGA | 98378 | b | 11921 | 113363 | b | 11902 | 98458 | b | 11856 | 166981 | a | 18667 |
| 2 | Ácido | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| 3 | CGA | 3563016 | a | 286715 | 4672428 | a | 1020278 | 3205073 | a | 306479 | 3230043 | a | 324807 |
| 4 | Ácido | 3392350 | a | 88972 | 3254435 | a | 150586 | 3312047 | a | 75757 | 3597984 | a | 218823 |
| 5 | CGA | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| 6 | Ácido | 143859 | c | 32065 | 269677 | a | 32905 | 251355 | ab | 32432 | 174608 | bc | 38038 |
| 7 | CGA | 78817 | b | 13495 | 130116 | a | 16418 | 111833 | a | 14356 | 72783 | b | 16562 |
| 8 | Ácido | 614127 | a | 72169 | 746960 | a | 113302 | 577804 | a | 69983 | 540250 | a | 63845 |
| 9 | Flavanol | 2252530 | a | 122653 | 2199412 | a | 166206 | 2120838 | a | 162170 | 2459344 | a | 236646 |
| 10 | Flavanol | 336093 | a | 19844 | 333243 | a | 26111 | 300977 | a | 26244 | 367898 | a | 36265 |
| 11 | Flavonol | 638792 | a | 33535 | 695405 | a | 36512 | 673086 | a | 38102 | 667572 | a | 88610 |
| 12 | Flavonol | 486256 | ab | 30780 | 522121 | ab | 43036 | 626932 | a | 41466 | 361312 | b | 82328 |
| 13 | Flavonol | 848423 | a | 65290 | 800235 | a | 72629 | 965982 | a | 85691 | 760954 | a | 141841 |
| 14 | CGA | 100211 | b | 14047 | 142183 | a | 10805 | 120660 | ab | 17191 | 88875 | b | 14920 |
| 15 | CGA | 89475 | b | 14693 | 117498 | ab | 14082 | 114871 | ab | 14463 | 156224 | a | 20737 |
| 16 | CGA | 51621 | a | 5478 | 57838 | a | 6423 | 49915 | a | 5780 | 65765 | a | 7800 |

* Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%
 (...) Dado numérico não disponível

Os picos 6 (ácido), 7 (CGA), 11 (flavanol), 14 (CGA) e 15 (CGA) apresentaram interação entre as fases de frutificação e as cultivares pela análise de variância (Figura 25).

O ácido (pico 6) e o ácido clorogênico (pico 7) não foram sintetizados na fase de granação pelas plantas de todos os tratamentos. Já na fase de granação apenas as plantas da cv. Obatã não produziram estes compostos. A concentração do ácido clorogênico correspondente ao pico 14 diminuiu na cultivar Obatã, resistente a *H. vastatrix*, na fase maturação, período em que ocorreu maior incidência de ferrugem na região experimental (Figura 25).

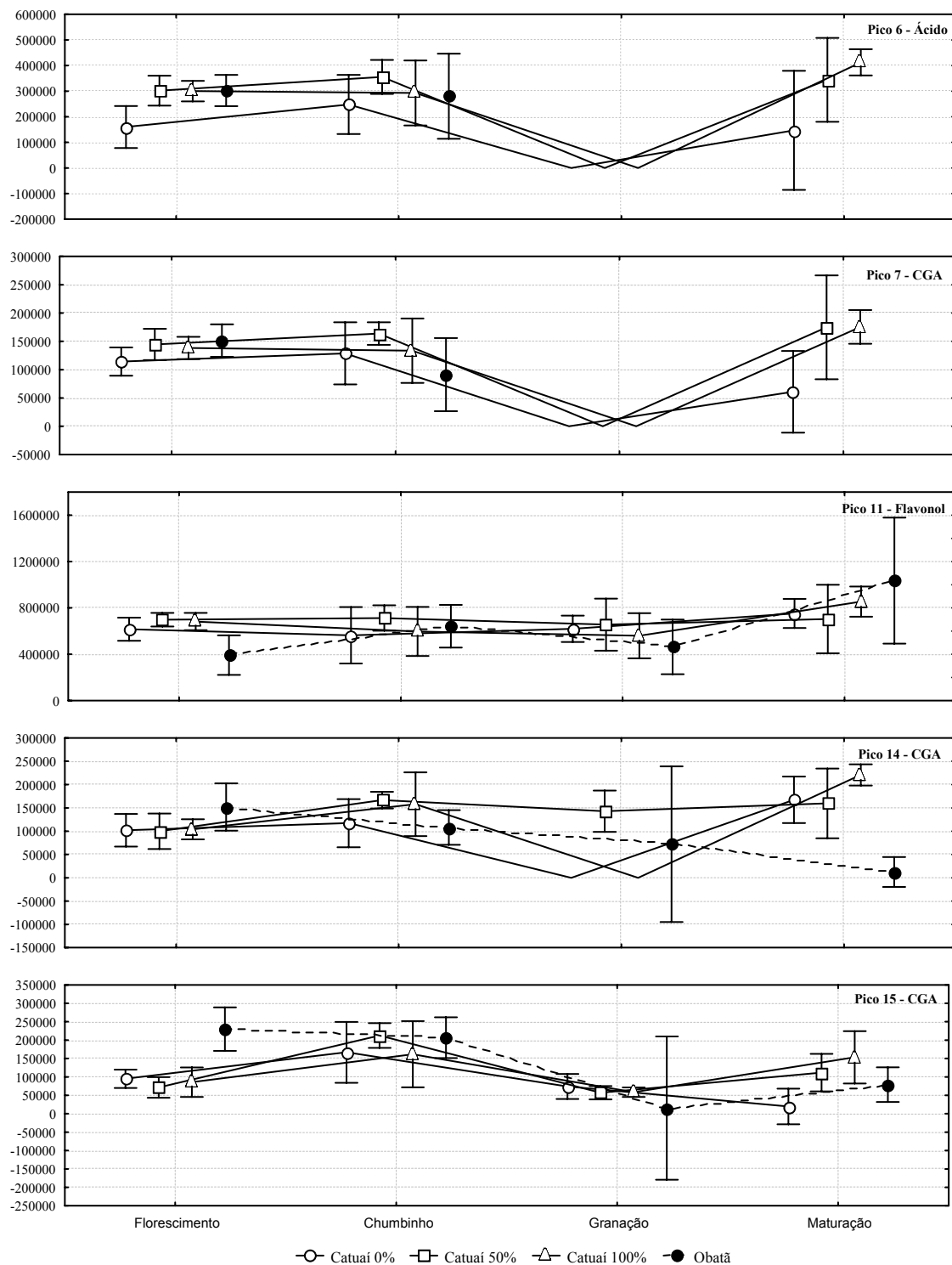


Figura 25 - Valores médios das áreas dos picos 6 (ácido), 7 (ácido clorogênico), 11 (flavonol), 14 (ácido clorogênico) e 15 (ácido clorogênico) correspondentes à interação entre o nível de resistência das plantas - Catuai 0 % (—○—), Catuai 50 % (—□—), Catuai 100 % (—△—) e Obatã (—●—) - e nas fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação

4.3.1.2 Grupo II

A fase de granação do cafeeiro foi o período em que ocorreu diminuição nas concentrações da maioria dos compostos fenólicos (picos 3, 9, 10, 11, 15, 16) sintetizados nas plantas do genótipo H14954-45 (tanto na população resistente como na suscetível ao bicho-mineiro), possivelmente, por ser uma fase que requer muita disponibilidade de carboidrato para o enchimento do grão (conforme descrito no item 4.3.1). Por outro lado, é a época de maior incidência de bicho-mineiro na área experimental (Campinas-SP).

Na fase de maturação, época de elevada incidência de ferrugem, observou-se uma maior concentração dos picos 12 e 13 (flavonol). Já o pico 4 não variou durante as fases de frutificação do cafeeiro. O pico 5 (ácido clorogênico) esteve presente apenas nas fases de fruto “chumbinho” e maturação, enquanto que o pico 6 (ácido) não apareceu nas fases de granação e na maturação (Tabela 9).

Tabela 9 - Médias seguidas de desvio padrão das áreas dos picos correspondentes aos compostos fenólicos identificados nos genótipos H14954-46- resistente e suscetível, durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação

| Pico | Fenóis | Florescimento | | Chumbinho | | Granação | | Maturação | | | | | |
|------|----------|---------------|---------------|-----------|---------------|----------|---------------|-----------|---------------|--------|---------|-----|--------|
| | | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | | | | |
| 1 | CGA | 196995 | b | 23325 | 259588 | a | 40995 | 58179 | c | 14625 | 279456 | a | 23330 |
| 2 | Ácido | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| 3 | CGA | 4540913 | a | 286205 | 3658541 | a | 425044 | 1162417 | b | 273751 | 4290457 | a | 218227 |
| 4 | Ácido | 3413919 | a | 142926 | 2659433 | a | 218478 | 2778993 | a | 333125 | 3320427 | a | 164540 |
| 5 | CGA | ... | b | ... | 234622 | a | 65943 | ... | b | ... | 61065 | b | 47831 |
| 6 | Ácido | 318215 | a | 40411 | 255666 | a | 31937 | ... | b | ... | ... | b | ... |
| 7 | CGA | 171831 | a | 18015 | 128919 | a | 16593 | 12848 | b | 6852 | 13259 | b | 13259 |
| 8 | Ácido | 750827 | a | 47826 | 580722 | b | 72873 | 58591 | c | 19738 | 756717 | a | 36514 |
| 9 | Flavanol | 2276011 | a | 182157 | 1853503 | a | 238383 | 936879 | b | 176862 | 2090016 | a | 68017 |
| 10 | Flavanol | 326779 | a | 28806 | 266860 | a | 33114 | 123989 | b | 25798 | 291555 | a | 12092 |
| 11 | Flavonol | 699889 | ab | 36783 | 603249 | ab | 75232 | 503876 | b | 83596 | 771004 | a | 49712 |
| 12 | Flavonol | 461696 | b | 34116 | 534322 | ab | 69206 | 470333 | ab | 79699 | 701338 | a | 66987 |
| 13 | Flavonol | 551223 | b | 74946 | 672335 | b | 86659 | 618577 | b | 99681 | 1137264 | a | 57636 |
| 14 | CGA | 122791 | a | 14859 | 134792 | a | 16625 | 34673 | b | 16842 | 57830 | b | 18319 |
| 15 | CGA | 120378 | a | 15773 | 149734 | a | 21324 | 35799 | b | 15889 | 106472 | a | 10818 |
| 16 | CGA | 78187 | a | 12262 | 78703 | a | 9790 | 17111 | b | 8519 | 78173 | a | 8635 |

* Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%
 (...) Dado numérico não disponível

O período de maior infestação de bicho-mineiro coincide com a fase de granação (Figura 26), enquanto que a incidência de ferrugem foi superior na maturação (Figura 27).

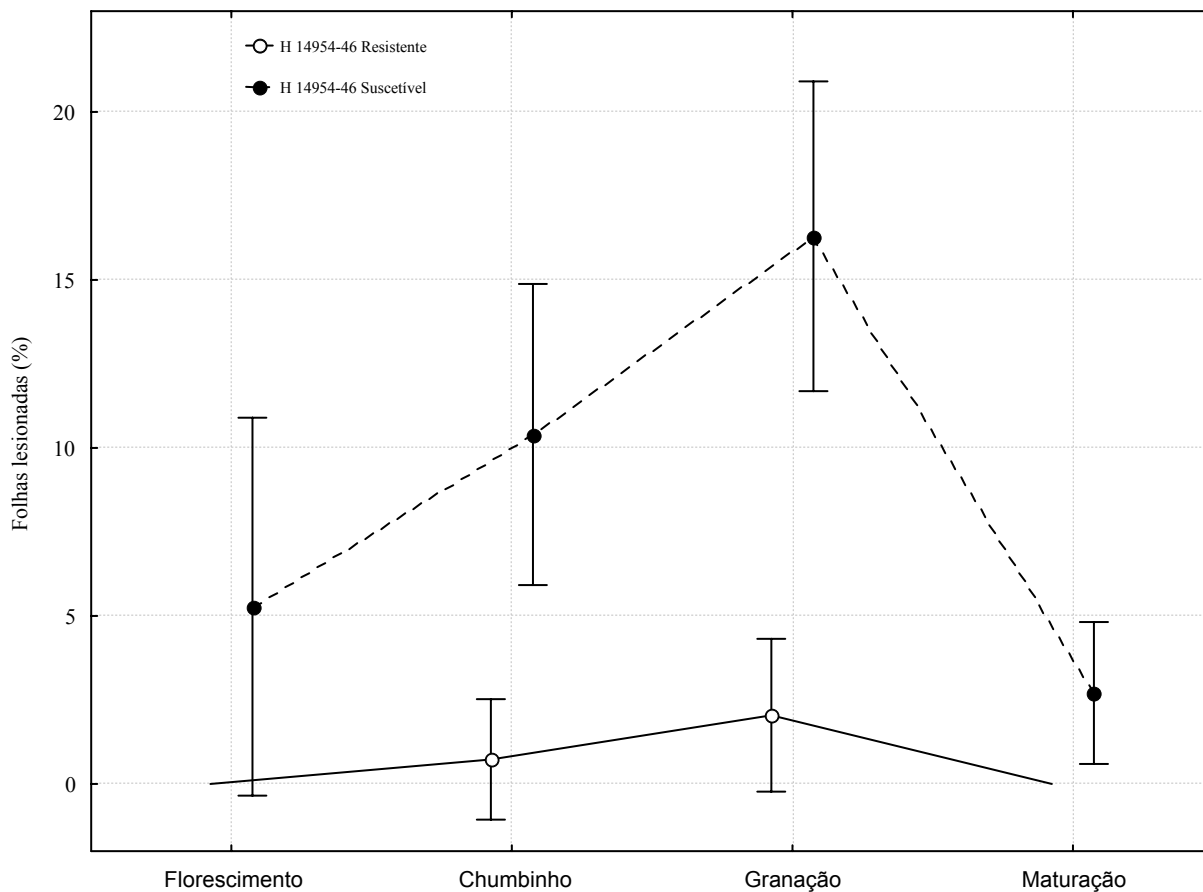


Figura 26 - Representação gráfica da variação de folhas lesionadas pelo ataque de bicho-mineiro (%) nos genótipos H 14954-46 resistente ao bicho-mineiro (—○—) e H 14954-46 suscetível ao bicho-mineiro (---●---), durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação

O genótipo resistente ao bicho-mineiro (H14954-46-R) apresentou baixas porcentagens de folhas lesionadas pelo inseto, demonstrando que houve uniformidade na seleção das plantas, enquanto que as plantas suscetíveis apresentaram altos valores de folhas lesionadas (Figura 26).

As porcentagens de folhas lesionadas pela incidência de ferrugem não diferiram entre os tratamentos (Figura 27) e os valores determinados foram baixos (Tabela 9). As populações resistente (R) e suscetível (S) do genótipo H14954-46 apresentaram uma pequena expressão de

resistência à ferrugem, uma vez que este híbrido é originado do cruzamento com a cultivar Icatu Vermelho (H4782-7-882), resistente à ferrugem (conforme descrito na figura 7).

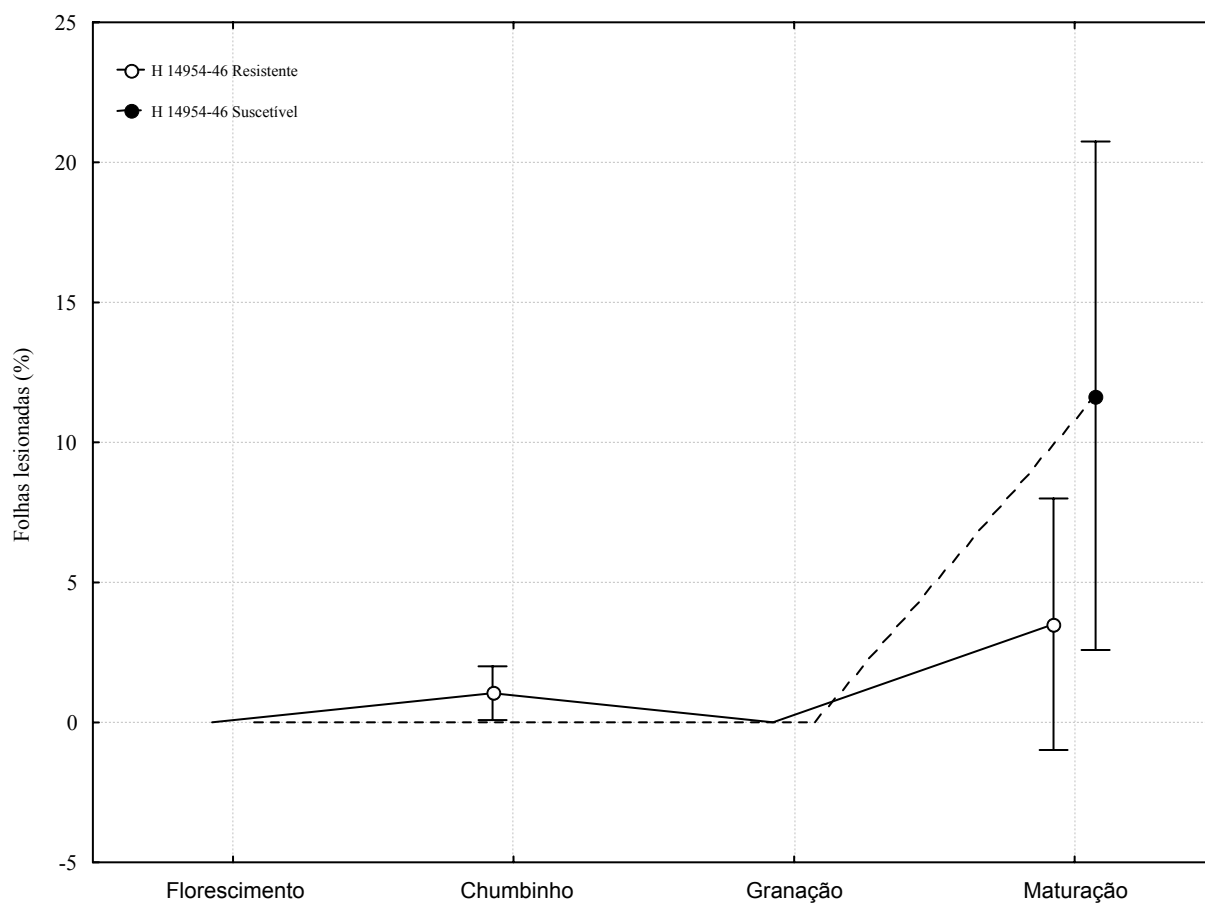


Figura 27 - Representação gráfica da variação de folhas lesionadas pela infecção de ferrugem (%) nos genótipos H14954-46 resistente ao bicho-mineiro (—○—) e H14954-46 suscetível ao bicho-mineiro (---●---), durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação

Com relação aos fenóis totais, as concentrações não diferiram estatisticamente entre as plantas resistentes e suscetíveis (Tabela 10), variando apenas a concentração de quatro fenóis (picos 1, 9, 10, 11) (Tabela 11).

Tabela 10 - Valores médios e desvio padrão das variáveis fenóis totais (área dos picos), número de folhas, folhas lesionadas por bicho-mineiro (%) e folhas lesionadas por ferrugem (%), nos genótipos H14954-46 resistente e suscetível ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*)

| Variável | Resistente* | | Suscetível* | |
|-------------------|-------------|---------------|-------------|---------------|
| | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão |
| Fenóis Totais | 16068887 | a 3405147 | 15951668 | a 5190797 |
| Folha (n°) | 10 | a 2 | 10 | a 3 |
| Bicho-mineiro (%) | 0,7 | b 1,7 | 8,7 | a 6,9 |
| Ferrugem (%) | 1,1 | a 2,8 | 2,9 | a 6,9 |

* Resistente ao bicho-mineiro; Suscetível ao bicho-mineiro

** Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%

As concentrações referentes aos picos 1 (CGA), 9 e 10 (flavanol), 11 (flavonol) foram superiores no genótipo resistente ao bicho-mineiro, enquanto que os outros compostos fenólicos não houve diferença significativa entre os tratamentos. O pico 5 (ácido clorogênico) não esteve presente nas plantas suscetíveis (Tabela 11). Na época de maior incidência de bicho-mineiro (Figura 26) houve menor síntese de flavanol (picos 9 e 10) e flavonol (pico 11) (Tabela 9), em que as plantas resistentes apresentaram maiores valores destes fenóis (Tabela 11). Já no período de maior incidência de ferrugem, os fenóis correspondentes aos picos 12 e 13 (flavonol) apresentaram menores teores, sem que tenha havido diferença entre as concentrações destes compostos fenólicos entre as plantas resistentes e suscetíveis ao bicho-mineiro.

Tabela 11 - Médias seguidas de desvio padrão das áreas dos picos correspondentes aos compostos fenólicos identificados nos genótipos H14954-46- resistente e suscetível

| Pico | Fenóis | Resistente* | | Suscetível* | |
|------|----------|-------------|---------------|-------------|---------------|
| | | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão |
| 1 | CGA | 268731 | a 24838 | 128378 | b 17074 |
| 2 | Ácido | ... | ... | ... | ... |
| 3 | CGA | 3459618 | a 257459 | 3366546 | a 398755 |
| 4 | Ácido | 3024998 | a 69161 | 3061388 | a 229832 |
| 5 | CGA | 147844 | a 43319 | ... | b ... |
| 6 | Ácido | 150242 | a 31739 | 136698 | a 34480 |
| 7 | CGA | 71697 | a 14205 | 91731 | a 18843 |
| 8 | Ácido | 581614 | a 59950 | 491814 | a 67194 |
| 9 | Flavanol | 1972285 | a 108642 | 1605919 | b 188726 |
| 10 | Flavanol | 281357 | a 17338 | 223235 | b 27130 |
| 11 | Flavonol | 712826 | a 27093 | 576183 | b 60305 |
| 12 | Flavonol | 534028 | a 28405 | 549816 | a 62586 |
| 13 | Flavonol | 789129 | a 52618 | 700570 | a 85887 |
| 14 | CGA | 74622 | a 13466 | 100421 | a 14407 |
| 15 | CGA | 96977 | a 11924 | 109214 | a 15596 |
| 16 | CGA | 61331 | a 8492 | 64756 | a 8629 |

* Resistente ao bicho-mineiro; Suscetível ao bicho-mineiro

** Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%

(...) Dado numérico não disponível

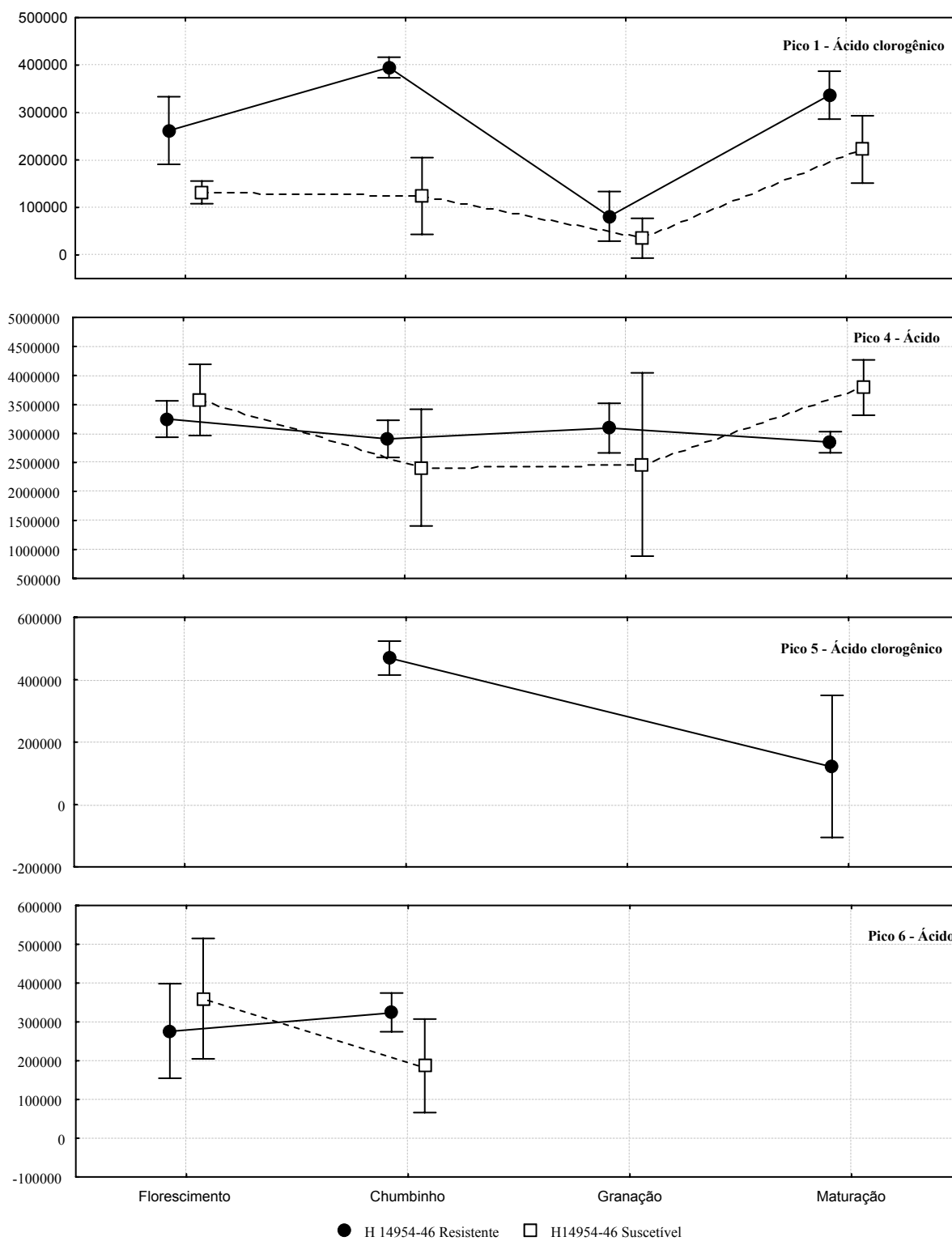


Figura 28 - Valores médios das áreas dos picos 1 (ácido clorogênico), 4 (ácido), 5 (ácido clorogênico) e 6 (ácido) correspondentes à interação entre o nível de resistência das plantas - H14954-46 resistente ao bicho-mineiro (—●—) e H14954-46 suscetível (---□---) nas fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação

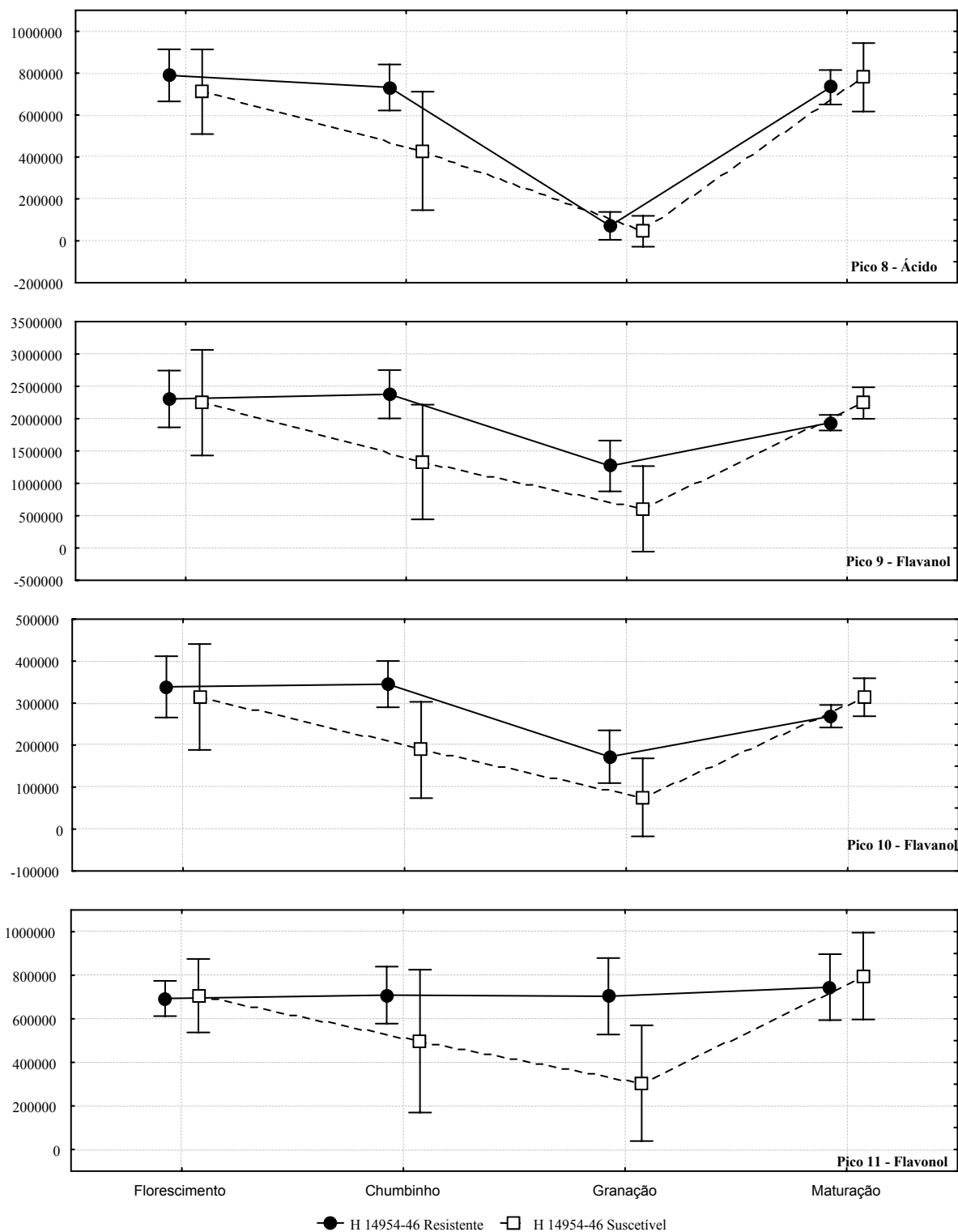


Figura 29 - Valores médios das áreas dos picos 8 (ácido), 9 (flavanol), 10 (flavanol) e 11 (flavonol) correspondentes à interação entre o nível de resistência das plantas - H14954-46 resistente ao bicho-mineiro (—●—) e H14954-46 suscetível (---□---), nas fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação

O ácido clorogênico (pico 5) sintetizado apenas nas plantas resistentes ao bicho-mineiro não foi observado nas fases de florescimento e na granação. Os teores dos compostos correspondentes aos picos 4 (ácido) e 11 (flavonol) presente nas folhas do genótipo resistente, mantiveram-se constantes durante as fases de frutificação do cafeeiro, enquanto que nas plantas suscetíveis variou a concentração desses compostos, com os menores valores observados nas fases de fruto “chumbinho” e na granação (Figura 28 e 29).

4.3.1.3 Grupo III

Os compostos fenólicos presentes nas folhas dos genótipos H20049-SR (suscetível ao bicho-mineiro e resistente à ferrugem); RR (resistente ao bicho-mineiro e à ferrugem); SS (suscetível ao bicho-mineiro e à ferrugem); RS (resistente ao bicho-mineiro e suscetível à ferrugem) - apresentaram o mesmo comportamento em relação ao Grupo I e Grupo II, em que os picos 3 (CGA), 9 (flavanol), 10 (flavanol) e 16 (CGA) diminuíram na fase de granação, enquanto que a síntese dos picos 12 e 13 aumentaram na fase de maturação. Já o pico 4 não variou durante as fases nos três grupos (I, II e III) (Tabela 12).

Tabela 12 - Médias seguidas de desvio padrão das áreas dos picos correspondentes aos compostos fenólicos identificados nos genótipos H20049- SR, RR, SS, RS, durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação

| Pico | Fenóis | Florescimento | | Chumbinho | | Granação | | Maturação | | | | | |
|------|----------|---------------|---------------|-----------|---------------|----------|---------------|-----------|---------------|--------|---------|-----|--------|
| | | Média | Desvio padrão | Média | Desvio padrão | Média | Desvio padrão | Média | Desvio padrão | | | | |
| 1 | CGA | 198089 | a | 14610 | 234521 | a | 36013 | 58491 | b | 19568 | 202520 | a | 18831 |
| 2 | Ácido | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| 3 | CGA | 3945110 | a | 223525 | 3060415 | a | 360831 | 1077647 | b | 317598 | 3376883 | a | 239780 |
| 4 | Ácido | 2407838 | a | 209441 | 2364075 | a | 138764 | 2440324 | a | 165292 | 2516419 | a | 248006 |
| 5 | CGA | 24385 | ab | 13204 | 173603 | a | 57807 | ... | b | ... | 125769 | ab | 70480 |
| 6 | Ácido | 369765 | a | 36858 | 220722 | b | 38107 | 2165 | c | 2165 | 353796 | ab | 71450 |
| 7 | CGA | 142875 | a | 9818 | 85922 | b | 10754 | 11080 | c | 5890 | 86466 | b | 20764 |
| 8 | Ácido | 822185 | a | 49656 | 624350 | a | 85502 | 101327 | b | 31578 | 659564 | a | 122941 |
| 9 | Flavanol | 2215765 | a | 147820 | 2183353 | a | 267705 | 1139401 | b | 247521 | 2224116 | a | 112609 |
| 10 | Flavanol | 340253 | a | 24635 | 341567 | a | 44859 | 146342 | b | 42568 | 312369 | a | 32849 |
| 11 | Flavanol | 747569 | ab | 47437 | 580529 | bc | 58072 | 468490 | c | 80169 | 856739 | a | 61713 |
| 12 | Flavanol | 669173 | b | 64391 | 606988 | b | 64847 | 514639 | b | 94683 | 985372 | a | 49207 |
| 13 | Flavanol | 698865 | b | 110032 | 816369 | b | 81332 | 771302 | b | 140384 | 1582008 | a | 149385 |
| 14 | CGA | 141078 | a | 14294 | 136961 | a | 13425 | 124029 | a | 19388 | 87801 | a | 16795 |
| 15 | CGA | 165509 | a | 13975 | 109731 | ab | 10574 | 61877 | b | 13556 | 64400 | b | 22792 |
| 16 | CGA | 77376 | a | 9612 | 58848 | a | 9191 | 17997 | b | 5874 | 59161 | a | 8556 |

*Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%
 (...) Dado numérico não disponível

As fases de florescimento e de granação do cafeeiro coincidem com o período de maior infestação de bicho-mineiro (Figura 30), com as plantas SR e SS sendo as mais atacadas (Tabela 13), o que evidencia que foram selecionadas plantas uniformes no campo. Por outro lado, as plantas RS apresentaram altas porcentagens de folhas lesionadas pelo o ataque do bicho-mineiro quando comparados com as plantas RR, também resistente ao inseto. Dessa forma, a grande variabilidade encontrada neste tratamento decorre possivelmente da segregação presente nas plantas selecionadas H20049-RR.

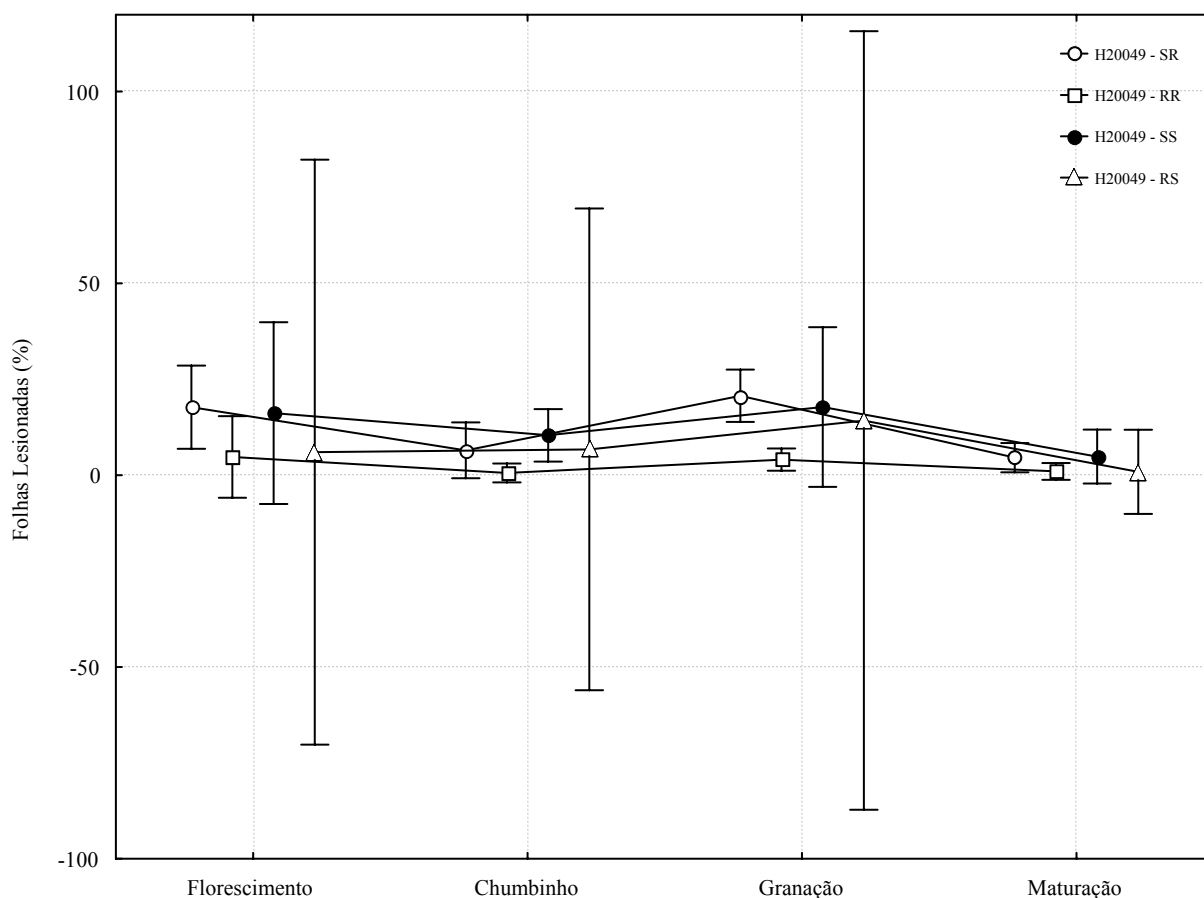


Figura 30 - Representação gráfica da variação de folhas lesionadas pelo ataque de bicho-mineiro (%) nos genótipos H20049- suscetível ao bicho-mineiro e resistente à ferrugem - SR (○); H20049- resistente ao bicho-mineiro e à ferrugem - RR (□); H20049- suscetível ao bicho-mineiro e à ferrugem - SS (●) e H20049- resistente ao bicho-mineiro e suscetível à ferrugem - RS (△), durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação

O período de maior incidência de ferrugem na área experimental ocorreu nos meses de abril e maio (Figura 31). As plantas selecionadas como resistente a *H. vastatrix* (SR e RR) apresentaram baixas porcentagens de folhas lesionadas, no entanto os genótipos RR e RS não diferiram estatisticamente. Já o genótipo SS foi o mais prejudicado pela infecção do patógeno com 4,1 % de folhas lesionadas (Tabela 13). Essas plantas apresentam genes de resistência à ferrugem oriundos do cruzamento com Icatu Vermelho (H4782-7-882) (conforme descrito na figura 7), com diferença no nível de expressão de resistência entre os mesmos.

Tabela 13 - Valores médios e desvio padrão das variáveis fenóis totais (área dos picos), número de folhas, folhas lesionadas por bicho-mineiro (%) e folhas lesionadas por ferrugem (%), nos genótipos H20049-suscetível ao bicho-mineiro e resistente à ferrugem - SR; resistente ao bicho-mineiro e à ferrugem - RR; suscetível ao bicho-mineiro e à ferrugem - SS e resistente ao bicho-mineiro e suscetível à ferrugem - RS

| Variável | SR* | | RR* | | SS* | | RS* | | | | | | | | | |
|-------------------|----------|---------------|---------|---------------|----------|---------------|---------|---------------|----------|---|---------|--|----------|----|---------|--|
| | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | | | | | | | | |
| Fenóis Totais | 15489392 | a | 5561793 | | 14455162 | a | 5778506 | | 14812478 | a | 6200683 | | 17523311 | a | 1415892 | |
| Folha (n°) | 11 | a | 3 | | 13 | a | 3 | | 11 | a | 3 | | 12 | a | 3 | |
| Bicho-mineiro (%) | 12,3 | a | 9,8 | | 2,6 | b | 2,7 | | 12,3 | a | 10,7 | | 7,0 | ab | 7,9 | |
| Ferrugem (%) | 0,0 | b | 0,0 | | 1,7 | ab | 3,3 | | 4,1 | a | 10,7 | | 1,3 | ab | 2,5 | |

* SR: suscetível ao bicho-mineiro e resistente à ferrugem; RR: resistente ao bicho-mineiro e à ferrugem; SS: suscetível ao bicho-mineiro e à ferrugem; RS: resistente ao bicho-mineiro e suscetível à ferrugem

**Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%

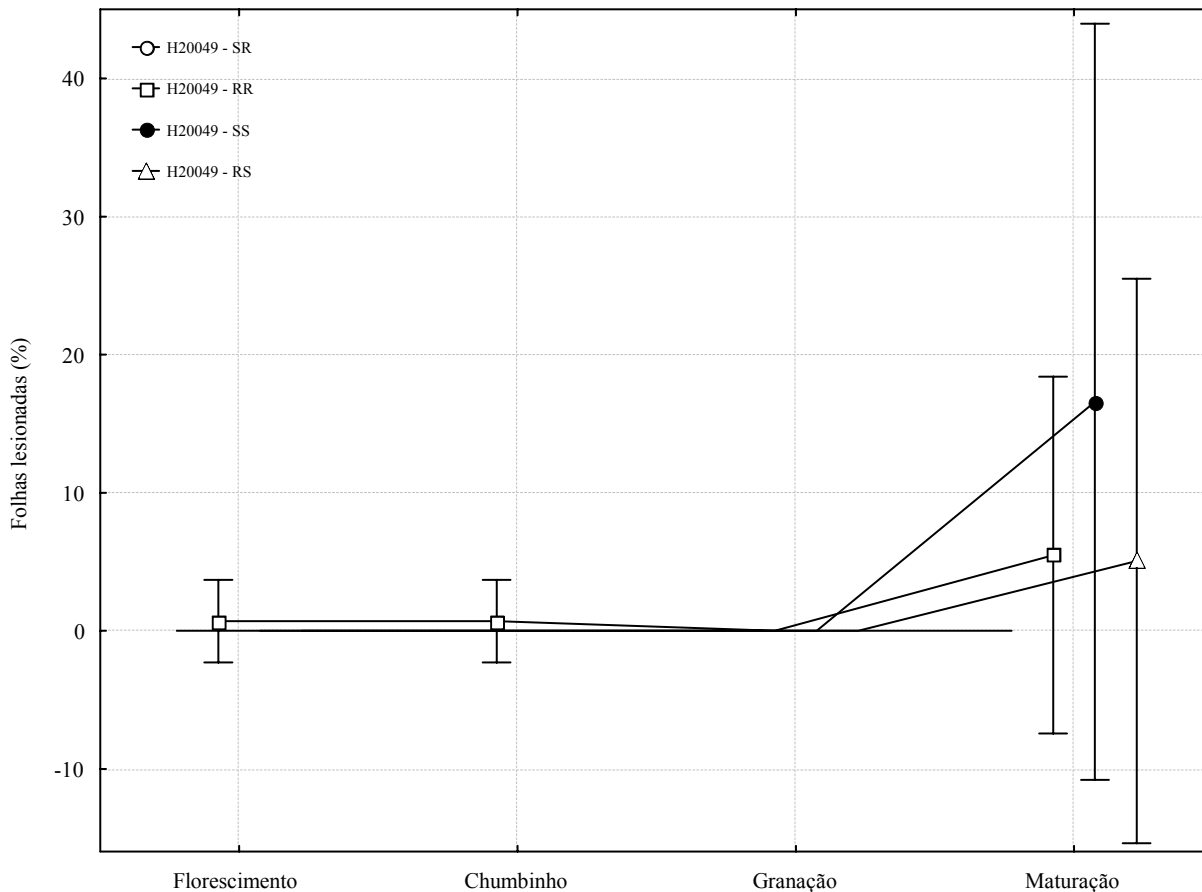


Figura 31 - Representação gráfica da variação de folhas lesionadas pela infecção de ferrugem (%) nos genótipos H20049- suscetível ao bicho-mineiro e resistente à ferrugem - SR (○); H20049- resistente ao bicho-mineiro e à ferrugem - RR (□); H20049- suscetível ao bicho-mineiro e à ferrugem - SS (●) e H20049- resistente ao bicho-mineiro e suscetível à ferrugem - RS (△), durante as fases de frutificação do cafeeiro: florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação

O ácido clorogênico (pico 5) não foi observado na fase de granação, resultado semelhante ao que havia sido obtido para o genótipo H14956-46-R (Grupo II), porém na fase de florescimento este pico esteve presente no Grupo III (Tabela 12) e não no Grupo II (Tabela 9). Os picos 6 e 7 também apresentaram um comportamento semelhante ao observado no genótipo H14956-46, em que as maiores concentrações ocorreram no florescimento.

Os genótipos H20049 com níveis distintos de resistência ao bicho-mineiro e à ferrugem (SR, RR, SS e RS) diferiram estatisticamente apenas pelas concentrações do pico 4 (ácido) e do pico 16 (ácido clorogênico) (Tabela 14).

Tabela 14 - Médias seguidas de desvio padrão das áreas dos picos correspondentes aos compostos fenólicos identificados nos genótipos H20049-SR, RR, SS, RS

| Pico | Fenóis | SR* | | RR | | SS | | RS | | | | | |
|------|----------|---------|---------------|--------|---------------|-------|---------------|---------|---------------|--------|---------|-----|--------|
| | | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | | | | |
| 1 | CGA | 161036 | a | 24601 | 193667 | a | 30932 | 175582 | a | 35152 | 183007 | a | 24500 |
| 2 | Ácido | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| 3 | CGA | 2997169 | a | 338462 | 2656689 | a | 460496 | 2642996 | a | 457959 | 3193226 | a | 332544 |
| 4 | Ácido | 2010328 | b | 138819 | 2387127 | ab | 236587 | 2841015 | a | 105555 | 2902029 | a | 133394 |
| 5 | CGA | 65113 | a | 32853 | 119065 | a | 77148 | 92742 | a | 45515 | 49960 | a | 49960 |
| 6 | Ácido | 277123 | a | 45187 | 234605 | a | 72336 | 213574 | a | 56974 | 151210 | a | 56558 |
| 7 | CGA | 87192 | a | 14392 | 70412 | a | 23814 | 83602 | a | 17170 | 82639 | a | 16074 |
| 8 | Ácido | 537946 | a | 84951 | 552729 | a | 144743 | 544617 | a | 103575 | 620257 | a | 99357 |
| 9 | Flavanol | 2175833 | a | 205782 | 1621268 | a | 215090 | 1694255 | a | 268972 | 2119642 | a | 58474 |
| 10 | Flavanol | 326199 | a | 37106 | 221549 | a | 43048 | 252618 | a | 44943 | 314646 | a | 8954 |
| 11 | Flavanol | 702817 | a | 62980 | 629947 | a | 76751 | 547097 | a | 69534 | 761310 | a | 54097 |
| 12 | Flavanol | 694166 | a | 68777 | 650187 | a | 95273 | 583490 | a | 85429 | 868972 | a | 43631 |
| 13 | Flavanol | 927579 | a | 113445 | 980626 | a | 225799 | 778060 | a | 134866 | 1212422 | a | 132450 |
| 14 | CGA | 135491 | a | 13347 | 122425 | a | 20965 | 103708 | a | 12830 | 133053 | a | 24947 |
| 15 | CGA | 110040 | a | 15661 | 113865 | a | 28310 | 89914 | a | 15333 | 93675 | a | 16984 |
| 16 | CGA | 67031 | a | 8589 | 31004 | b | 10236 | 46325 | ab | 9990 | 57326 | ab | 6296 |

* SR: suscetível ao bicho-mineiro e resistente à ferrugem; RR: resistente ao bicho-mineiro e à ferrugem; SS: suscetível ao bicho-mineiro e à ferrugem; RS: resistente ao bicho-mineiro e suscetível à ferrugem

** Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%

(...) Dado numérico não disponível

4.3.2 Resistência ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*)

4.3.2.1 Grupo I

Os teores de fenóis totais nas folhas destinadas aos testes de resistência ao bicho-mineiro, não diferiram estatisticamente entre as cultivares Catuaí e Obatã (Tabela 15), no entanto

observou-se uma maior concentração dos fenóis totais nas folhas não infestadas (testemunhas) quando comparadas com folhas infestadas pelo bicho-mineiro (Tabela 16).

Tabela 15 - Valores médios e desvio padrão dos fenóis totais (área dos picos) nas folhas, das cultivares Catuaí e Obatã, destinadas aos testes, em laboratório, de resistência ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*)

| Variável | Catuaí | | Obatã | |
|---------------|------------|---------------|------------|---------------|
| | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão |
| Fenóis Totais | 16988282 a | 2905808 | 16262503 a | 1964996 |

* Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%

O ataque do bicho-mineiro não resultou em uma maior produção de fenóis totais, como era de se esperar, uma vez que diversos trabalhos indicam para um aumento da síntese de compostos fenólicos em folhas lesionadas pelo inseto (BI; FELTON, 1995; SIMMONDS, 2003).

Tabela 16 - Valores médios e desvio padrão dos fenóis totais (área dos picos) nas folhas infestadas, em laboratório, por bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e não infestadas (testemunha)

| Variável | Não Infestada | | Infestada | |
|---------------|---------------|---------------|------------|---------------|
| | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão |
| Fenóis Totais | 18368150 a | 16729778 | 15173094 b | 2024278 |

* Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%

Nos testes de resistência ao bicho-mineiro, em laboratório, com folhas das cultivares Catuaí e Obatã, nos quais ambos apresentam características de suscetibilidade ao ataque do inseto, foi verificado que concentrações de cinco fenóis diferiram estatisticamente entre as cultivares. Dentre estes fenóis apenas o pico 11 (flavonol) apresentou maior concentração nas folhas da cv. Obatã em relação à cv. Catuaí (Tabela 17).

Tabela 17 - Médias seguidas de desvio padrão das áreas dos picos correspondentes aos compostos fenólicos identificados nas folhas, das cultivares Catuaí e Obatã, destinadas aos testes de resistência ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*), em laboratório

| Pico | Fenóis | Catuaí | | Obatã | | | |
|------|----------|---------|---------------|--------|---------------|-------|--------|
| | | Médias | Desvio Padrão | Médias | Desvio Padrão | | |
| 1 | CGA | 41098 | a | 14431 | 73450 a | 18727 | |
| 2 | Ácido | 186301 | a | 54914 | 163063 | a | 56853 |
| 3 | CGA | 2574962 | a | 293415 | 2568333 | a | 185195 |
| 4 | Ácido | 3209500 | a | 112943 | 3387937 | a | 144690 |
| 5 | CGA | ... | | ... | ... | | ... |
| 6 | Ácido | 183424 | a | 28362 | 90260 | b | 22443 |
| 7 | CGA | 46697 | a | 9709 | 28429 | a | 10040 |
| 8 | Ácido | 762902 | a | 92907 | 496497 | b | 25727 |
| 9 | Flavanol | 2132631 | a | 152584 | 2207770 | a | 169945 |
| 10 | Flavanol | 290010 | a | 23460 | 311901 | a | 24880 |
| 11 | Flavonol | 514813 | b | 62566 | 861474 | a | 49423 |
| 12 | Flavonol | 495609 | a | 43521 | 413475 | a | 52897 |
| 13 | Flavonol | 1162366 | a | 101254 | 808843 | b | 130846 |
| 14 | CGA | 211350 | a | 9454 | 131477 | b | 9768 |
| 15 | CGA | 540536 | a | 53588 | 414182 | a | 37209 |
| 16 | CGA | 453863 | a | 53296 | 435749 | a | 32643 |

* Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%
 (...) Dado numérico não disponível

Os compostos fenólicos separados pelas análises de cromatografia líquida nas folhas infestadas e nas testemunhas (não infestadas) totalizaram 16 picos majoritários e principais, sendo que o pico 5 (CGA) não esteve presente nos cromatogramas. Este ácido clorogênico (pico 5) não é comum nas plantas das cultivares Catuaí e Obatã, conforme observado nas análises realizadas durante as fases de frutificação (item 4.3.1.1), enquanto que o ácido (pico 2) é produzido apenas nas folhas que foram atacadas em laboratório pelo bicho-mineiro (Tabela 18).

As concentrações de fenóis não diferiram estatisticamente entre os tratamentos, com exceção a sete picos (1, 3, 7, 8, 9, 10 e 11), nos quais observou-se menores concentrações nas folhas infestadas por bicho-mineiro.

Tabela 18 - Médias seguidas de desvio padrão das áreas dos picos correspondentes aos compostos fenólicos identificados nas folhas infestadas, em laboratório, por bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e as não infestadas (testemunhas)

| Pico | Fenóis | Não Infestada | | Infestada | | |
|------|----------|---------------|---------------|-----------|---------------|--------|
| | | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | |
| 1 | CGA | 87883 | a | 16759 | 31767 b | 13704 |
| 2 | Ácido | ... | b | ... | 320250 a | 31480 |
| 3 | CGA | 3241585 | a | 142210 | 2013367 b | 155569 |
| 4 | Ácido | 3401455 | a | 177965 | 3213105 a | 79642 |
| 5 | CGA | ... | | ... | ... | ... |
| 6 | Ácido | 117065 | a | 26480 | 153323 a | 30321 |
| 7 | CGA | 59693 | a | 7398 | 19122 b | 8433 |
| 8 | Ácido | 746681 | a | 86035 | 532215 b | 61272 |
| 9 | Flavonol | 2447129 | a | 177237 | 1939427 b | 107867 |
| 10 | Flavonol | 339560 | a | 28209 | 268786 b | 15651 |
| 11 | Flavonol | 829952 | a | 69291 | 569971 b | 65103 |
| 12 | Flavonol | 506068 | a | 63434 | 411603 a | 32847 |
| 13 | Flavonol | 1130160 | a | 160008 | 865141 a | 87520 |
| 14 | CGA | 173037 | a | 11124 | 170061 a | 18305 |
| 15 | CGA | 491895 | a | 59053 | 465246 a | 42486 |
| 16 | CGA | 439152 | a | 39220 | 449518 a | 47068 |

* Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%
 (...) Dado numérico não disponível

Pesquisas recentes mostraram que insetos utilizam flavanóides presentes em algumas espécies de plantas para melhorar seu desempenho, os quais são sequestrados durante a herbivoria e muitas vezes metabolizados pelo inseto (SIMMONDS, 2003). Já os ácidos clorogênicos são oxidados, no momento do ataque, por algumas enzimas foliares como a polifenoxidase (PFO) e peroxidase (PER) (FELTON et al., 1989).

O teor de ácido clorogênico (CGA) referente ao pico 1 diminuiu nas folhas infestadas, enquanto que o ácido (pico 2) foi observado pela primeira vez nestas folhas. Há evidências de que este ácido seja um fragmento do pico 1 (CGA), oxidado no momento do ataque.

Os picos 8 (ácido), 14 (CGA) e 16 (CGA) apresentaram interação com nível de infestação e com as cultivares, pela análise de variância. Nas plantas da cv. Obatã os três fenóis tendem a diminuir as concentrações quando as folhas foram atacadas pelo bicho-mineiro, enquanto que na cv. Catuaí o pico 14 (CGA) manteve-se constante, o pico 16 (CGA) apresentou um leve aumento na concentração e o teor do ácido (pico 8) diminuiu acentuadamente nas folhas infestadas (Figura 32).

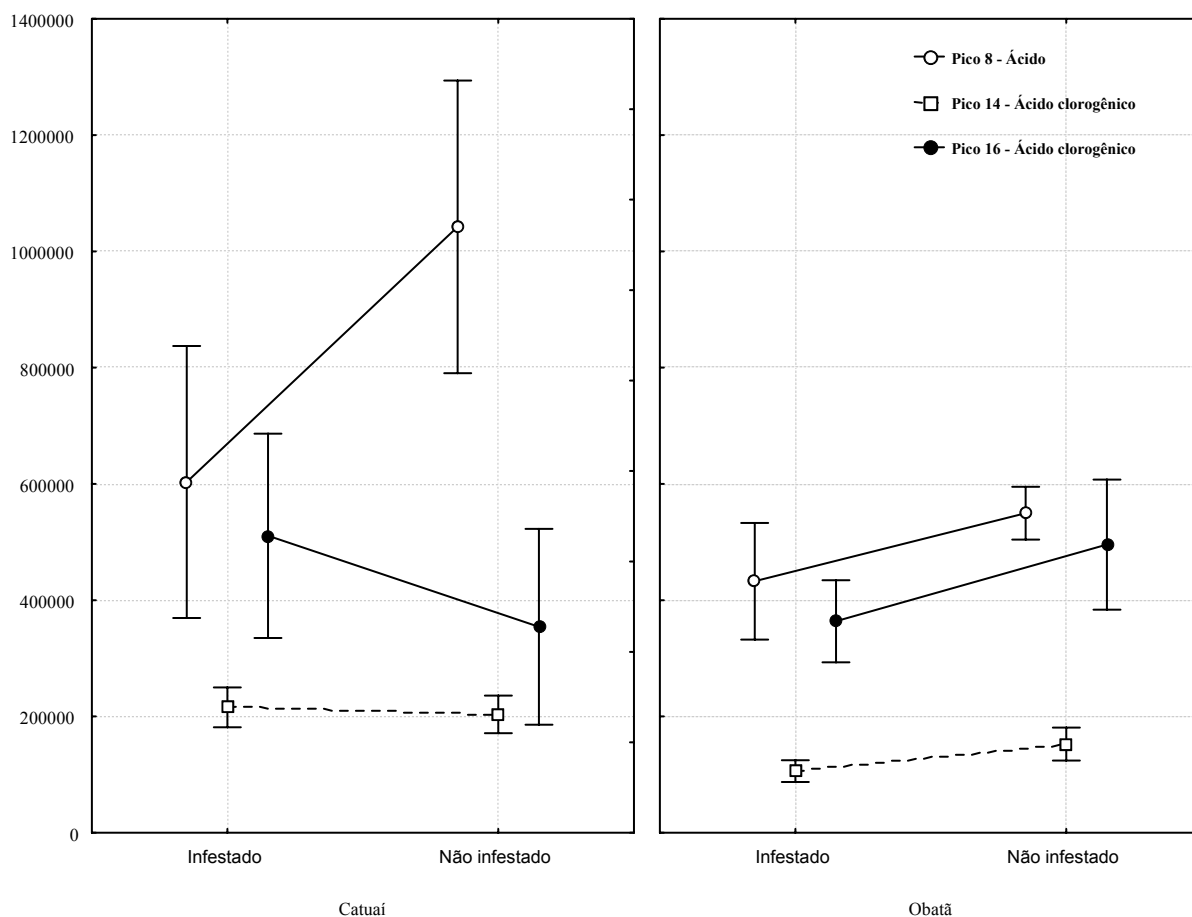


Figura 32 - Valores médios das áreas dos picos 8 - ácido (—○—), 14 - ácido clorogênico (—□—) e 16 - ácido clorogênico (—●—) correspondentes à interação entre o nível de infestação por bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e as cultivares - Catuaí e Obatã

A expressão de resistência das duas cultivares não diferiram estatisticamente nos testes em laboratório e o mesmo ocorreu na variável duração do ovo à lagarta (Tabela 3). No entanto, a incidência de bicho-mineiro no campo foi superior nas plantas cv. Obatã em relação à cv. Catuaí, na ordem de 36% e 7,8%.

4.3.2.2 Grupo II

A conservação das folhas resistentes ao bicho-mineiro (H14954-46-R), em laboratório, para os testes de resistência foi difícil, o que explica a perda de repetições, sendo necessário utilizar a ferramenta estatística de análise em componentes principais (ACP).

Essa análise foi realizada com os dados referentes às áreas dos 16 picos e os fenóis totais, obtidos na cromatografia líquida, com valores individuais do genótipo H14954-46-R (resistente ao bicho-mineiro) e a média das plantas H14954-46-S (suscetível ao bicho-mineiro) (Figura 33).

As folhas suscetíveis ao bicho-mineiro (H14954-46-S) que não foram submetidas à infestação (SNI) apresentaram maiores concentrações de flavanol (picos 11 e 13) e de fenóis totais (FT), em relação às folhas infestadas (SI). Por outro lado, as folhas SI tiveram elevados teores de ácido (pico 2) e baixas concentrações de CGA (pico 1). De maneira geral, pode-se atribuir a queda na concentração do pico 1 nas folhas infestadas (SI) ao ataque do bicho-mineiro, onde ocorreu a oxidação deste composto o que resultou no aumento do fragmento referente ao pico 2 (Figura 33).

O ácido clorogênico (pico 5) comum apenas nas plantas resistentes (H14954-46-R) não foi observado nas folhas infestadas (RI). A concentração de CGA (pico 1) foi superior nas folhas não infestadas (RNI) em relação às RI, que por sua vez apresentou elevados valores de ácido (pico 2) (Figura 33).

Tanto nas plantas resistentes quanto nas suscetíveis o ácido clorogênico (pico 1) é oxidado em resposta ao ataque do bicho-mineiro, em que o nível do ácido clorogênico é superior nas plantas resistentes. Dessa forma, não se pode atribuir a resistência apenas à presença deste fenol, embora haja há grandes indícios de que o pico 5 (CGA) confira às plantas (H14954-46-R) esta expressão de resistência.

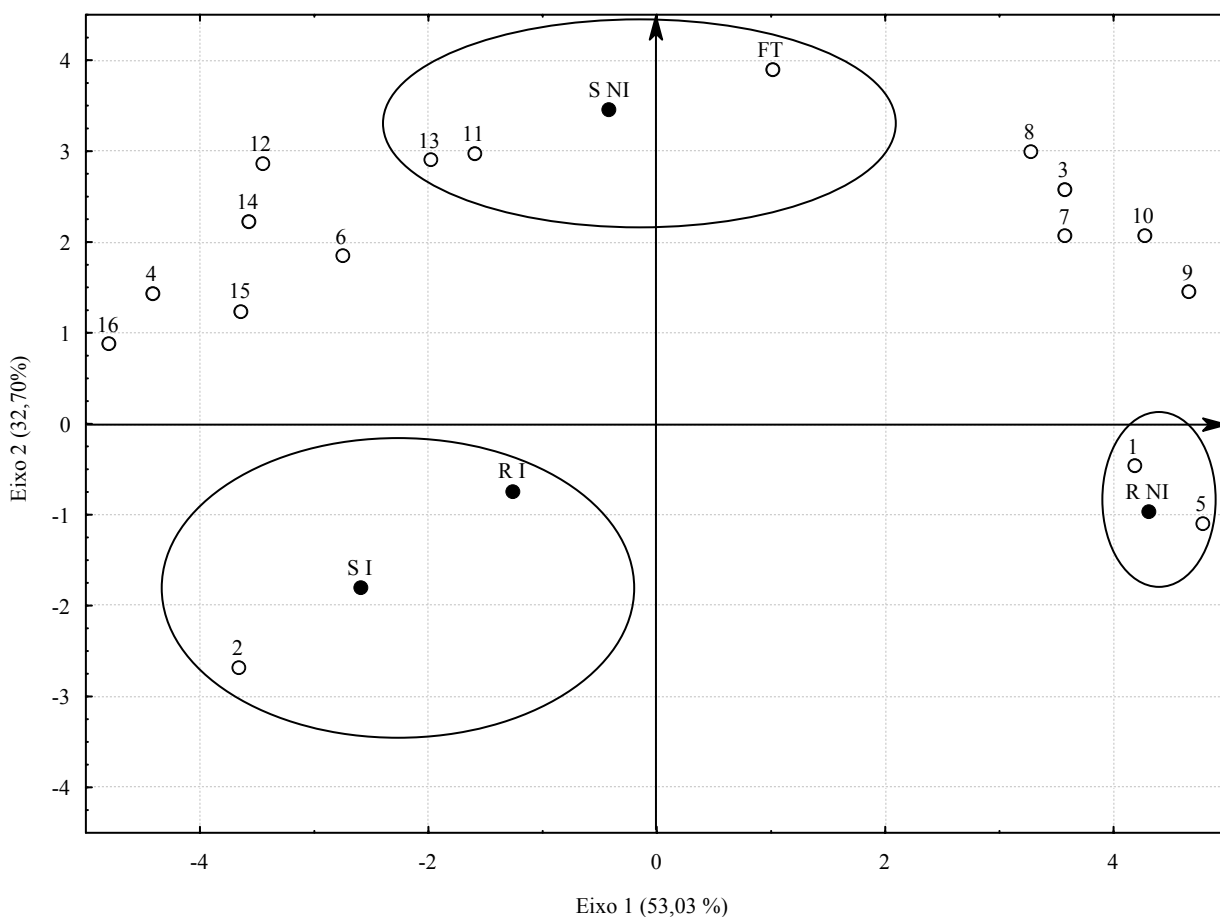


Figura 33 - Análise em componentes principais. Associação entre os picos de 1 a 16 e fenóis totais (FT). Representação no plano 1-2 dos cafeeiros H14954-46- resistente infestadas (RI), resistente não infestadas (RNI), suscetível infestadas (SI) e suscetível não infestadas (SNI)

As evidências relatadas, em algumas pesquisas, de que os flavanóides favorecem o ataque do inseto em espécies de plantas (SIMMONDS, 2003) também puderam ser observadas no presente experimento. As plantas suscetíveis não infestadas (SNI) apresentaram altos teores de flavonol (pico 11), enquanto que as plantas resistentes apresentaram menores concentrações destes compostos. De um modo geral, as plantas suscetíveis foram mais adequadas para o desenvolvimento do bicho-mineiro, uma vez que os insetos são capazes de identificar o tipo e o nível de flavanóides nas plantas hospedeiras (SIMMONDS, 2003).

4.3.2.3 Grupo III

Da mesma forma que as folhas das plantas H14954-46-R (Grupo II) apresentaram dificuldades de conservação, as folhas do genótipo H20049 também tiveram perdas de repetições, sendo que as plantas da testemunha (não infestadas) das plantas resistentes ao bicho-mineiro (RR e RS) foram totalmente destruídas. Dessa maneira, utilizou-se a estatística de análise em componentes principais (ACP), a partir da média dos tratamentos (Figura 34).

As plantas suscetíveis ao bicho-mineiro e resistentes à ferrugem (SR), infestadas em laboratório pelo inseto, apresentaram maiores teores dos fenóis referentes aos picos 3 (CGA) e 7 (CGA) em relação às não infestadas. Já o genótipo suscetível ao bicho-mineiro e à ferrugem (SS) não diferiu quando foram comparadas as folhas infestadas e as não infestadas, no entanto apresentaram maiores concentrações do flavonol, pico 11 (Figura 34).

As plantas resistentes ao bicho-mineiro, tanto as RR quanto as RS apresentaram maiores concentrações dos picos 1 (CGA), 2 (ácido) e 5 (CGA) quando comparados com os outros tratamentos (Figura 34). A teoria de que os dois ácidos clorogênicos (picos 1 e 5) estejam ligados à expressão de resistência das plantas ao ataque desta praga se verifica também neste grupo III.

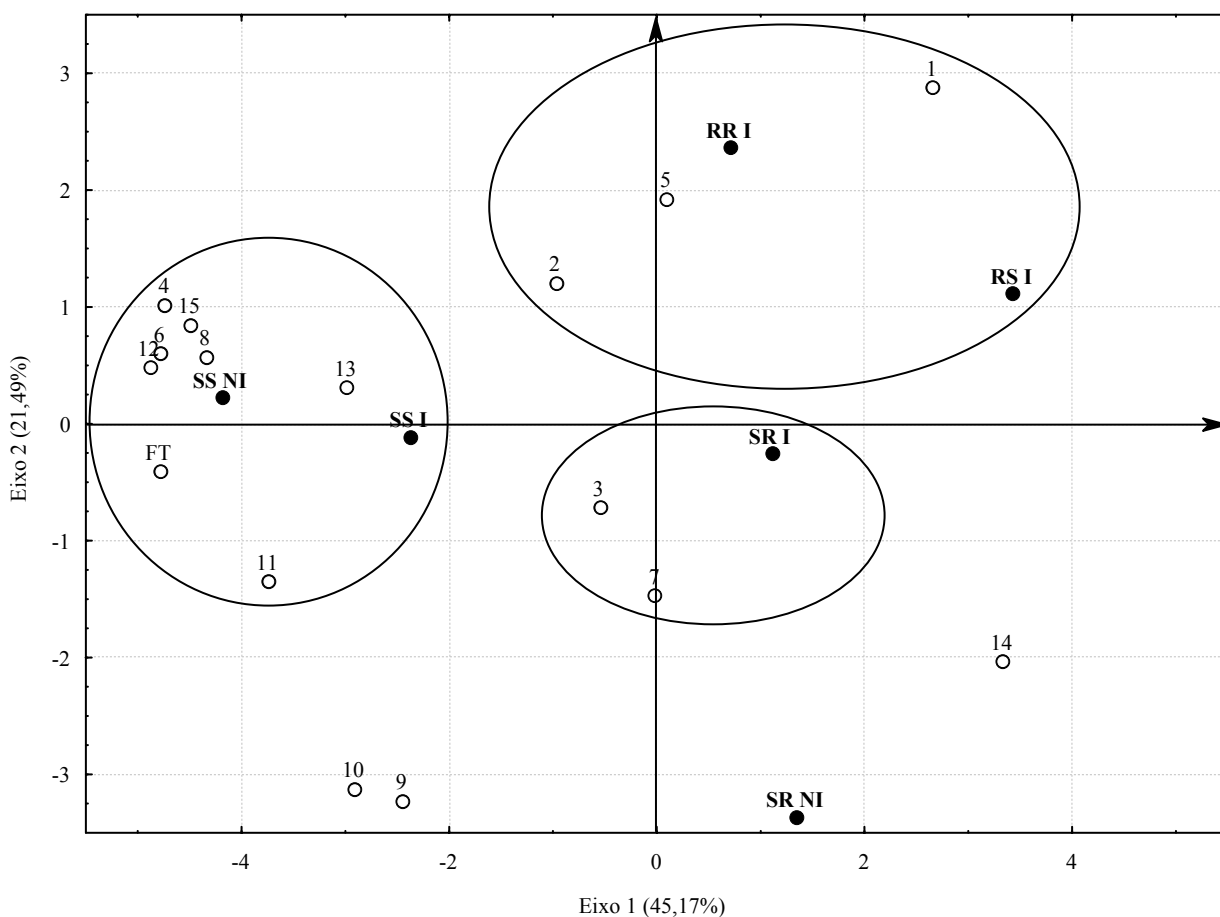


Figura 34 - Análise em componentes principais. Associação entre os picos de 1 a 16 e fenóis totais (FT). Representação no plano 1-2 dos cafeeiros H20049- suscetível ao bicho-mineiro e resistente à ferrugem infestadas (SRI) e não infestadas (SRNI); resistente ao bicho-mineiro e à ferrugem infestadas (RRI) e não infestadas (RRNI), suscetível ao bicho-mineiro e à ferrugem infestadas (SSI) e não infestadas (SSNI); resistente ao bicho-mineiro e suscetível à ferrugem infestadas (RSI) e não infestadas (RSNI)

Com os resultados analisados dos Grupos I, II e III, pôde-se observar que as plantas atacadas pelo bicho-mineiro tenderam a diminuir as concentrações dos fenóis totais (FT) e de alguns compostos fenólicos, enquanto que nos outros os teores mantiveram-se constantes.

4.3.3 Resistência à ferrugem (*Hemileia vastatrix*)

4.3.3.1 Grupo I

Nos testes de resistência à ferrugem utilizou-se a cv. Catuaí sem produção e com dois níveis de produção (50 % e 100 %) e a cv. Obatã, resistente ao patógeno. O nível de incidência de

ferrugem está relacionado com a produção do cafeeiro, em que as plantas com alta carga de frutos são mais infectadas por esse patógeno, conforme observado nos resultados de laboratório (Tabela 3) e de campo (Tabela 6).

As folhas das cultivares destinadas ao teste de laboratório apresentaram diferenças nas concentrações dos picos 6, 7, 8, 11, 14 e 15, em que as plantas da cv. Catuaí sem produção apresentou os maiores valores, enquanto as plantas da cv. Obatã os menores, com exceção do pico 11 (flavonol) (Tabela 19).

Tabela 19 - Médias seguidas de desvio padrão das áreas dos picos correspondentes aos compostos fenólicos identificados nas folhas, das cultivares Catuaí sem produção e com 50 % e 100 % de produção e Obatã, destinadas aos testes de resistência à ferrugem (*Hemileia vastatrix*), em laboratório

| Pico | Fenóis | Catuaí 0% | | Catuaí 50% | | Catuaí 100% | | Obatã | |
|------|----------|-----------|---------------|------------|---------------|-------------|---------------|---------|---------------|
| | | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão |
| 1 | CGA | 98958 | a 39851 | 88979 | a 40206 | 102201 | a 16407 | 103491 | a 57074 |
| 2 | Ácido | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| 3 | CGA | 3697889 | a 615358 | 3429602 | a 712875 | 3150319 | a 507662 | 3206779 | a 442660 |
| 4 | Ácido | 3802821 | a 386798 | 3540183 | a 545951 | 3315934 | a 497732 | 3611864 | a 532028 |
| 5 | CGA | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| 6 | Ácido | 393190 | a 228390 | 300106 | ab 173859 | 294425 | ab 166793 | 204109 | b 134975 |
| 7 | CGA | 100679 | a 26343 | 80166 | ab 18599 | 88078 | ab 21250 | 76410 | b 33226 |
| 8 | Ácido | 1082117 | a 233950 | 980731 | a 210073 | 968351 | a 203136 | 636837 | b 106817 |
| 9 | Flavanol | 2978678 | a 834154 | 2695204 | a 629290 | 2700858 | a 448903 | 2791935 | a 734180 |
| 10 | Flavanol | 416434 | a 129958 | 366676 | a 91781 | 381366 | a 74543 | 382325 | a 110976 |
| 11 | Flavonol | 739751 | ab 151956 | 803695 | ab 260394 | 617234 | b 135225 | 951543 | a 246993 |
| 12 | Flavonol | 593938 | a 110352 | 605730 | a 182697 | 524815 | a 128301 | 462793 | a 220926 |
| 13 | Flavonol | 1152847 | a 303619 | 1089149 | a 425466 | 1231814 | a 293656 | 823453 | a 432728 |
| 14 | CGA | 230052 | a 71580 | 195297 | ab 89687 | 233635 | a 45100 | 158481 | b 44528 |
| 15 | CGA | 818871 | a 348053 | 670922 | ab 278955 | 759845 | a 290242 | 465587 | b 142260 |
| 16 | CGA | 581866 | a 160197 | 499136 | a 182161 | 474167 | a 140502 | 459678 | a 131917 |

* Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%
 (...) Dado numérico não disponível

As folhas inoculadas com *Hemileia vastatrix* quando comparada com as não inoculadas apresentaram concentrações maiores nos picos 6 (ácido), 7 (CGA), 14 (CGA) e 15 (CGA), enquanto que os outros fenóis permaneceram constantes (Tabela 20).

Tabela 20 - Médias seguidas de desvio padrão das áreas dos picos correspondentes aos compostos fenólicos identificados nas folhas inoculadas, em laboratório, por ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e as não inoculadas (testemunhas)

| Pico | Fenóis | Não Inoculada | | Inoculada | | |
|------|----------|---------------|---------------|-----------|---------------|--------|
| | | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | |
| 1 | CGA | 87102 | a | 45467 | 109197 a | 33430 |
| 2 | Ácido | ... | ... | ... | ... | ... |
| 3 | CGA | 3508094 | a | 564086 | 3243246 a | 590796 |
| 4 | Ácido | 3506551 | a | 479887 | 3623724 a | 531715 |
| 5 | CGA | ... | ... | ... | ... | ... |
| 6 | Ácido | 172754 | b | 133096 | 397026 a | 161667 |
| 7 | CGA | 69768 | b | 23737 | 100389 a | 21218 |
| 8 | Ácido | 880191 | a | 266689 | 926931 a | 251311 |
| 9 | Flavanol | 2581714 | a | 521319 | 2977704 a | 729225 |
| 10 | Flavanol | 356557 | a | 81811 | 414023 a | 112303 |
| 11 | Flavanol | 799725 | a | 207621 | 764354 a | 255608 |
| 12 | Flavanol | 550676 | a | 198109 | 532295 a | 148872 |
| 13 | Flavanol | 1154292 | a | 452277 | 995407 a | 320657 |
| 14 | CGA | 180142 | b | 66103 | 223565 a | 65372 |
| 15 | CGA | 504657 | b | 186030 | 814427 a | 303990 |
| 16 | CGA | 483824 | a | 164963 | 518823 a | 146995 |

* Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%
 (...) Dado numérico não disponível

O ácido clorogênico (CGA) correspondente ao pico 5 não esteve presente nas folhas das cultivares Catuaí e Obatã, durante as fases de frutificação, bem como nas folhas destinadas aos testes de resistência ao bicho-mineiro e à ferrugem, feitos em laboratório. O pico 2 (ácido) também não foi observado nas plantas das cvs. Catuaí e Obatã, no entanto apenas as folhas infestadas pelo bicho-mineiro apresentaram o pico 2.

No geral, as folhas inoculadas apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos que as folhas testemunhas, entretanto foram observadas concentrações semelhantes de fenóis totais entre os dois tratamentos (Tabela 21). Já os valores de fenóis totais foram diferentes quando comparadas entre as cultivares (Tabela 22).

Tabela 21 - Valores médios e desvio padrão dos fenóis totais (área dos picos) nas folhas inoculadas, em laboratório, por ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e não inoculadas (testemunha)

| Variável | Inoculada | | Não Inoculada | | |
|---------------|-----------|---------------|---------------|---------------|---------|
| | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | |
| Fenóis Totais | 20490918 | a | 3208484 | 19681965 a | 2879539 |

* Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%

Tabela 22 - Valores médios e desvio padrão dos fenóis totais (área dos picos) nas folhas, das cultivares Catuaí sem produção e com 50 % e 100 % de produção e Obatã, destinadas aos testes de resistência à ferrugem (*Hemileia vastatrix*) em laboratório

| Variável | Catuaí 0 % | | Catuaí 50 % | | Catuaí 100 % | | Obatã | |
|---------------|------------|---------------|-------------|---------------|--------------|---------------|----------|---------------|
| | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão |
| Fenóis Totais | 22550383 | a 3301166 | 20537359 | ab 3753025 | 19200726 | b 1803351 | 18473950 | b 1764961 |

* Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%

A produção dos ácidos clorogênicos (pico 7, 14 e 15) aumenta em resposta à infecção do patógeno. Dessa forma, as plantas da cv. Obatã, resistentes à ferrugem, apresentaram os menores teores desses compostos, bem como dos fenóis totais. Por sua vez, as plantas da cv. Catuaí sem produção apresentaram a maior síntese de compostos fenólicos, uma vez que a demanda por carboidrato no metabolismo primário foi inferior em relação aos outros tratamentos. Dessa forma uma quantidade maior de carboidrato disponível foi direcionado ao metabolismo secundário na síntese de substâncias protetoras.

4.3.3.2 Grupo II

Na análise em componentes principais utilizaram-se as médias das concentrações dos fenóis nas plantas H14954-46- suscetíveis ao bicho-mineiro (inoculadas e não inoculadas) e os valores individuais das plantas H14954-46- resistentes ao bicho-mineiro, devido à perda de dados (conforme mencionado no item 4.3.2.2).

As folhas das plantas suscetíveis (H14954-46-S) inoculadas com *H. vastatrix* não diferiram estatisticamente das folhas não inoculadas pela análise em componentes principais e pela análise de variância. Já as plantas resistentes (H14954-46-R) inoculadas diferiram das não inoculadas pela análise em componentes principais. As folhas resistentes não inoculadas apresentaram maiores concentrações dos picos 3 (CGA) e 5 (CGA) (Figura 35).

Os picos que diferenciaram as plantas resistentes das suscetíveis foram os picos 1 (CGA), 12 (flavonol) e 13 (flavonol), onde o ácido clorogênico (CGA) apresentou maiores concentrações nas resistentes e os picos 12 e 13 nas suscetíveis. A porcentagem de área foliar lesionada nas folhas resistentes (H14954-46-R) inoculada por ferrugem, em laboratório foi de 0,1 %, enquanto que as suscetíveis apresentaram valor igual a 5,0 %. Mesmo o genótipo H14954-46-R não sendo resistente à ferrugem expressou níveis de resistência, justificando as diferenças encontradas nas concentrações de fenóis (Figura 35).

Tanto os fenóis totais quanto alguns fenóis aumentaram a concentração nas folhas inoculadas, uma evidência de que o cafeeiro aumenta a produção de compostos fenólicos em resposta à infecção do patógeno *H. vastatrix* (Figura 35).

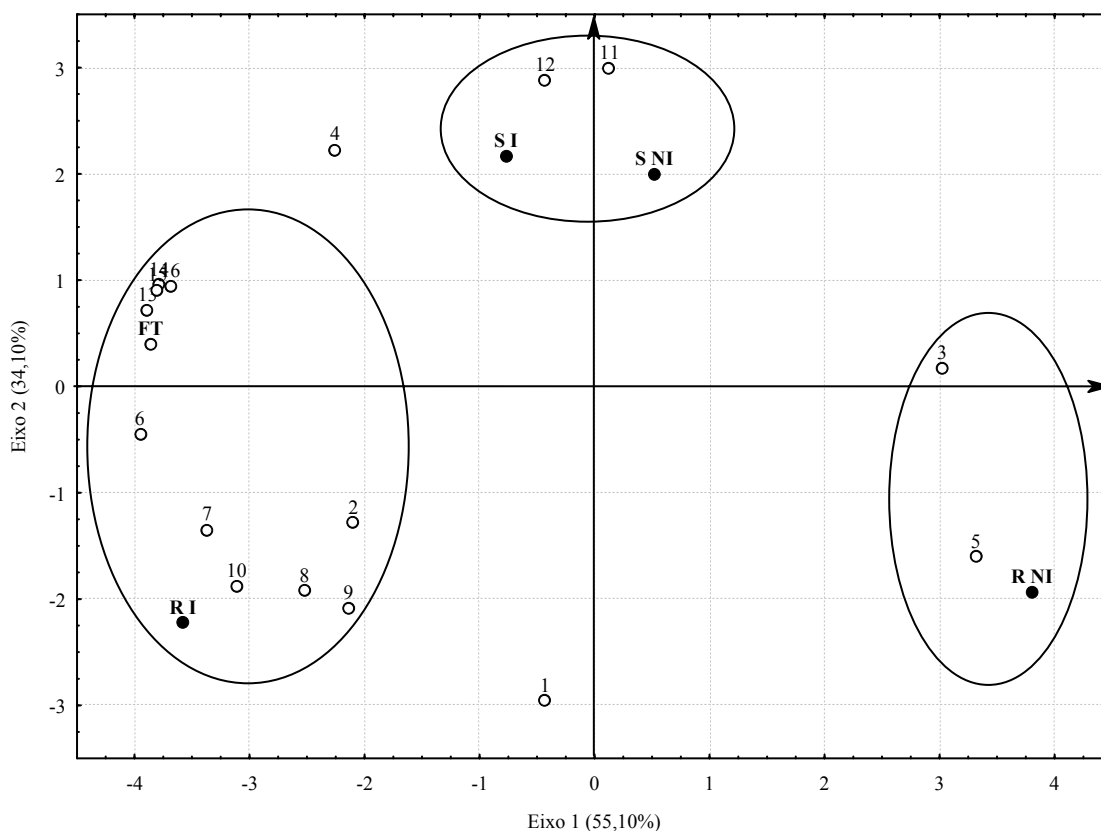


Figura 35 - Análise em componentes principais. Associação entre os picos de 1 a 16 e fenóis totais (FT). Representação no plano 1-2 dos cafeeiros H14954-46- resistente inoculadas por *Hemileia vastatrix* (RI), resistente não inoculadas (RNI), suscetível inoculadas por *Hemileia vastatrix* (SI) e suscetível não inoculadas (SNI)

4.3.3.3 Grupo III

A perda de dados ocorrida com as folhas do genótipo H20049-RR e RS não inoculados fizeram com que fosse necessário realizar a análise em componentes principais.

As plantas do genótipo H20049 suscetíveis à ferrugem, RS e SS inoculadas com o patógeno apresentaram maiores concentrações de ácido clorogênico (CGA) correspondente aos picos 1 e 16, enquanto que as folhas das plantas SS não inoculadas tiveram maiores concentrações de flavonol relacionados aos pico 11, 12 e 13, bem como de fenóis totais. Já no

genótipo H20049 resistente à ferrugem - SR não houve diferença estatística entre as folhas inoculadas e não inoculadas.

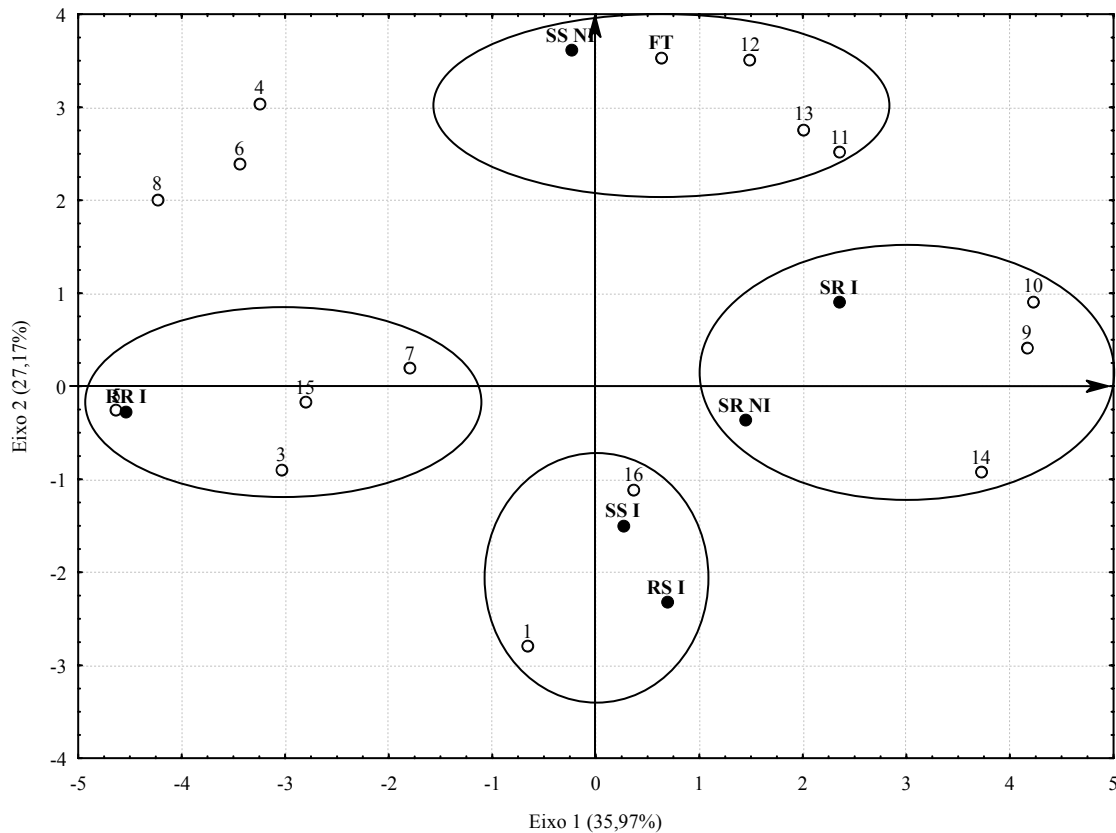


Figura 36 - Análise em componentes principais. Associação entre os picos de 1 a 16 e fenóis totais (FT). Representação no plano 1-2 dos cafeeiros H20049- suscetível ao bicho-mineiro e resistente à ferrugem inoculadas (SRI) e não inoculadas (SRNI); resistente ao bicho-mineiro e à ferrugem inoculadas (RRI) e não inoculadas (RRNI), suscetível ao bicho-mineiro e à ferrugem inoculadas (SSI) e não inoculadas (SSNI); resistente ao bicho-mineiro e suscetível à ferrugem inoculadas (RSI) e não inoculadas (RSNI)

5 CONCLUSÕES

1. O ácido clorogênico referente ao pico 5 foi sintetizado apenas nas plantas da população H14954-46-R, resistentes ao bicho-mineiro, e no genótipo H20049;
2. As concentrações de alguns ácidos clorogênicos e flavanóides nas folhas infestadas, em laboratório, por *Leucoptera coffeella* diminuíram, bem como as dos fenóis totais;
3. As concentrações de alguns ácidos clorogênicos e flavanóides nas folhas inoculadas, em laboratório, por *Hemileia vastatrix* aumentaram, bem como as dos fenóis totais;
4. As concentrações dos fenóis totais e de alguns compostos fenólicos diminuíram, acentuadamente, na fase de granação;

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nessa pesquisa, decorrentes da hipótese proposta, não foram conclusivas, devido a problemas operacionais e de disponibilização do equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência. Assim sendo, fortes evidências foram observadas durante as discussões dos resultados, o que levou a formação de algumas hipóteses relevantes à novas pesquisas.

HIPÓTESE 1: O ácido clorogênico referente ao pico 5 pode ser responsável pela característica de resistência ao bicho-mineiro do genótipo H14954-46-R;

HIPÓTESE 2: O ácido clorogênico correspondente ao pico 1 associado ao pico 2 (ácido) pode estar diretamente ligado ao processo de defesa natural do cafeeiro contra o ataque do bicho-mineiro;

HIPÓTESE 3: O flavonol referente ao pico 11 pode estar diretamente relacionado com a suscetibilidade do cafeeiro ao desenvolvimento do bicho-mineiro;

HIPÓTESE 4: Os ácidos clorogênicos, em geral, podem ter um papel importante no mecanismo de defesa do cafeeiro contra a infecção de ferrugem.

REFERÊNCIAS

AERTS R.J.; BAUMANN T.W. Distribution and utilization of chlorogenic acid in *Coffea* seedlings. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 45, p. 497-503, 1994

ALMEIDA, P.R. O bicho mineiro do cafeeiro, *Perileuoptera coffeella* (Guérin-Méneville, 1842) (Lepidoptera-Lyonetiidae) como fator de restrição do cafeeiro. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE ENTOMOLÓGICA DO BRASIL, 1., Viçosa. **Resumos...** Viçosa: SEB, 1973. p. 31.

ALVIN, P.T. Fisiologia del crecimiento y de la floración del cafeto. **Café**, San José, v. 2, n. 6, p. 57-64, 1960

BALDWIN, I.T. An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 127, p. 1449-1458, Dec. 2001.

BECKMAN, C.H. Phenolics-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in disease resistance and in general defence responses in plants? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, p. 101-110, 2000.

BI, J.L.; FELTON, G.W. Foliar oxidative stress and insect herbivory: primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. **Journal of Chemical Ecology**, New York v. 21, p. 1511-1530, 1995.

BIGGER, M. Partial resistance of arabica coffee to the coffee leaf miner *Leucoptera meyricki* Ghesp. (Lepidoptera-Lyonetiidae). **East African Agricultural and Forest Journal**, Nairobi, v. 34, n. 4, p. 41-445, 1969.

BIRKETT, M.A.; CAMPBELL, C.A.M.; CHAMBERLAIN, K.; GUERRIERI, E.; HICK, A.J.; MARTIN, J.L.; MATTHES, M.; NAPIER, J.A.; PETERSSON, J.; PICKETT, J.A.; POPPY, G.M.; POW, E.M.; PYE, B.J.; SMART, L.E.; WADHAMS, G.H.; WADHAMS, L.J.; WOODCOCK, C.M. New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 9329-9334, 2000.

CAROLLO, C.A. **Análise fitoquímica e avaliação dos efeitos dos tipos de adubação, da radiação solar e do estresse híbrido, no acúmulo de metabólitos secundários em espécies do gênero *Mikania***. 2008. 229 p. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

CARTER, M. FEENY, P.; HARIBAL, M. An oviposition stimulant for spicebush swallowtail butterfly, *Papilio troilus*, from leaves of *Sassafras albidum*. **Journal of Chemical Ecology**, New York v. 25, n. 6, p. 1233-1245, 1999.

CHAVES, J.C.D; SARRUGE, J.R. Alterações nas concentrações de macronutrientes nos frutos e folhas do cafeeiro durante o ciclo produtivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 4, p. 427-432, 1984.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids. In: CLARKE, R.J., MACRAE, R. (Ed.). **Coffee**. London: Elsevier Applied Science, 1985. v. 1: Chemistry, chap. 5, p. 153-202.

_____. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, p. 362-372, 1999.

_____. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, p. 1033-1042, 2000.

CLIFFORD, M.N.; JOHNSTON, K.L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for LC-MS indentification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 2900-2911, 2003.

CLIFFORD, M.N.; KNIGHT, S.; SURUCU, B.; KUHNERT, N. Characterization by LC-MSⁿ of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 1957-1969, 2006.

COSTA, M.J.N.; ZAMBOLIM, L.; RODRIGUES, F.A. Efeito de níveis de desbaste de frutos do cafeeiro na incidência da ferrugem, no teor de nutrientes, carboidratos e açúcares redutores. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 6, p. 564-571, 2006.

ESKES, A.B.; SOUZA, E.Z. Ataque de ferrugem em ramos com e sem produção, de plantas da cultivar Catuaí. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 9., 1981, São Lourenço: **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, GERCA, 1981. p. 186-188.

FELTON, G.W.; WORKMAN, J.; DUFFEY, S.S. Avoidance of antinutritive plant defense: Role of midgut pH in Colorado potato beetle. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 18, p. 571-583, 1992.

FELTON, G.W.; DONATO, K.; DEL VECCHIO, R.J.; DUFFEY, S.S. Activation of plant polyphenol oxidases by insect feeding damage reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, New York, n. 15, p. 2667-2694, 1989.

FORDYCE, J.A.; AGRAWAL, A.A. The role of plant trichomes and caterpillar group size on growth and defense of the pipevine swallowtail *Battus philenor*. **Journal of Animal Ecology**, Oxford, v. 70, p. 997-1005, 2001.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p

GATEHOUSE, J.A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. **New phytologist**, Cambridge, v. 156, p. 145-169, 2002

GOODMAN, R.N.; KIRALY, Z.; WOOD, K.R. **The biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia: University of Missouri Press, 1986. 443 p.

GRACE, S.C.; LOGAN, B.A.; ADAMS III, W.W. Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 21, p. 513-521, 1998.

GUERREIRO FILHO, O.; MAZZAFERA, P. Caffeine does not protect coffee against the leaf miner *Perileucoptera coffeella*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, p. 1447-1464, 2000.

GUERREIRO FILHO, O.; SILVAROLLA, M.B.; ESKES, A.B. Expression and mode of inheritance of resistance in coffee to leaf miner *Perileucoptera coffeella*. **Euphytica**, Dordrecht, v. 105, n. 1, p. 7-15, 1999.

GUZZO, S.D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 2004. 236 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

HARIBAL, M.; FENNY, P. Combined roles of contact stimulant and deterrents in assessment of host-plant quality by ovipositing zebra swallowtail butterflies. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 29, n. 3, p. 653-670, 2003.

HARUTA, M.; MAJOR, I.T.; CHRISTOPHER, M.E.; PATTON, J.J.; CONSTABEL, C.P. A Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 46, p. 347-359, 2001.

KUC, J. Induced immunity to plant disease. **Bioscience**, Washington, v. 32, n. 11, p. 854-860, 1982.

LARA, F.M. **Princípios de resistência de plantas aos insetos**. 3. ed. São Paulo: Ícone, 1991. 336 p.

MANSK, Z.; MATIELLO, J.B. Efeito da produção, nível de desfolha e inóculo residual sobre a evolução da ferrugem do cafeeiro no Estado do Espírito Santo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 11., 1984. Londrina: **Resumos...** Rio de Janeiro, IBC, GERCA, 1984. p. 128-130.

MARKHAM, K.R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982. 38 p.

MATIELLO, J.B.; ALVES, D.P.; PINHEIRO, M.R.; MANSK, Z. Efeito da carga pendente e do inóculo residual sobre a evolução da ferrugem do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 11., 1984. Londrina: **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, GERCA, 1984. p. 304-306.

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

MATOS, J.W. **Expressão da resistência ao bicho mineiro em *C. canephora* e *C. congensis***. 2001. 75 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agronômico, Campinas, 2001.

MATSUDA, F.; MORINO, K.; MIYASHITA, M.; MIYAGAWA, H. Metabolic flux analysis of the phenylpropanoid pathway in wound-healing potato tuber tissue using stable isotope-labeled tracer and LC-MS spectroscopy. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 44, p. 510-517, 2003.

MAZZAFERA, P.; ROBINSON, S.P. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. **Phytochemistry**, New York, v. 55, p. 285-296, 2000.

MEDINA-FILHO, H.P.; CARVALHO, A.; MONACO, L.C. Melhoramento do cafeeiro. 27. Observações sobre a resistência do cafeeiro ao bicho mineiro. **Bragantia**, Campinas, v. 36, p. 131-137, 1977.

MELLO, M.O.; SILVA-FILHO, M.C. Plant interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 14, n. 2, p. 71-81, 2002.

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

METRAUX, J.P.; RASKIN, I. Role of phenolics in plant disease resistance. Wiley series in ecological and applied microbiology. In: CHET, I. (Ed.). **Biotechnology in plant disease control**. New York: John Wiley, 1993. p. 191-109.

MISAGHI, I.J. **Physiology and biochemistry of plant-pathogen interactions**. New York: Plenum Press, 1980. 205 p.

MOLGAARD, P.; RAVN, A. Evolutionary aspects of caffeoyl ester distribution in dicotyledonous. **Phytochemistry**, New York, v. 27, p. 2411-2421, 1988.

MORAES, S.A. **A ferrugem do cafeeiro: importância, condições pré-disponíveis, evolução e situação no Brasil**. Campinas: IAC, 1983. 50 p. (IAC. Circular, 119).

MOSLI, W.S.S.; BAUMANN, T.W. Compartmentation of caffeine and related purine alkaloids depends exclusively on the physical chemistry of their vacuolar complex formation with chlorogenic acids. **Phytochemistry**, New York, v. 42, p. 985-996, 1996.

MURRAY, J.R.; HACKETT, W.P. Dihydroflavonol reductase activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix* L. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 97, p. 343-351, 1991.

NATES, J.F.D.; PARRA, J.R.P. Avaliações de danos causados por *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1843) (Lepidoptera: Lyonetiidae), em três variedades de café (*Coffea* spp.). **O Solo**, Piracicaba, v. 69, n. 2, p. 26-29, 1977.

NIEMANN, G.P.; KERK, A. VAN-DER; NIESSEN, W.M.A.; VERSLUIS, K. Free and cell wall-bound phenolics and other constituents from healthy and fungus - infected carnation. (*Dianthus caryophyllus* L.). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 38, p. 417-432, 1991.

OLIVEIRA, J.R. de; ROMEIRO, R. da S. Compostos fenólicos, idade da folha e resistência do cafeeiro a *Pseudomonas cichorii* e *Pseudomonas syringae*, pv. *garcae*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 38, n. 220, p. 445-452, nov./dez. 1991.

OLIVEIRA NETTO, A.A. de. **Metodologia da pesquisa científica**: guia prático para a apresentação de trabalhos acadêmicos. 3. ed. Florianópolis: Visual Books, 2008. 192 p.

OLIVEIRA, R.F. de. A planta sob estresse. In: CURSO DE ATUALIZAÇÃO EM CAFÉ, 3., 2003, Campinas. Campinas: IAC, 2003.

PARRA, J.R.P. **Bioecologia de *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera – Lyonetiidae) em condições de campo**. 1975. 114 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1975.

_____. **Biologia comparada de *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera – Lyonetiidae), visando ao seu zoneamento ecológico no Estado de São Paulo**. 1981. 96 p. Tese (Livre-Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1981.

_____. Biologia comparada de *Perileucoptera coffeella* visando ao seu zoneamento ecológico no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 45-76, 1985.

PAUL, N.D.; HATCHER, P.E; TAYLOR, J.E. Coping with multiple enemies: an integration of molecular and ecological perspectives. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 220-225, 2000.

PEZZOPANE, J.R.M.; PEDRO JÚNIOR, M.J.; THOMAZIELLO, R.A.; CAMARGO, M.B.P. Escala para avaliação de estádios fenológicos do cafeeiro Arábica. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 3, p. 499-505, 2003.

RAMIRO, D.A.; GUERREIRO FILHO, O.; MAZZAFERA, P. Phenol contents, oxidase activities, and the resistance of coffee to the leaf miner *Leucoptera coffeella*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 32, p. 1977-1988, 2006.

REIS JUNIOR, R.; LIMA, E.R.; VILELA, E.F.; BARROS, R.S. Method of maintenance of Coffee Leaves *In Vitro* for Mass Rearing of *Leucoptera coffeellum* (Guérin-Méneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 849-854, dez. 2000.

RENA, A.B, MAESTRI, M. Ecofisiologia do cafeeiro. In: CASTRO, P.R.C.; FERREIRA, S.O.; YAMADA, T. **Ecofisiologia da produção agrícola**. Piracicaba: Potafos, 1987. cap 8, p. 119-145.

RUUHOLA, T; TIKKANEN, O.; TAHVANAINEN, J. Differences in host use efficiency of larvae of generalist moth, *Operophtera brumata* on three chemically divergent *Salix* species. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 27, n. 8, p. 1595-1615, 2001

SALGADO, P.R.; FAVARIN, J.L.; LEANDRO, R.A.; LIMA FILHO, O.F. de. Total phenol concentration in coffee tree leaves during fruit development. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 4, p. 354-359, July/Aug. 2008.

SCHIEBER, E. Present status of coffee rust in South America. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 13, p. 375-382, 1975

SCHOCH, G.; GOEPFERT, S.; MORANT, M.; HEHN, A.; MEYER, D.; ULLMANN, P. CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, p. 36566-36574, 2001.

SILVA, M.C.; NICOLE, M.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RODRIGUES JUNIOR, C.J. Hypersensitive cell death and post-haustorial defense responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, n. 4, p. 169-183, 2002.

SMITH, H. **Phytochrome**. London: Academic Press, 1972. 433 p.

SIMMONDS, M.S.J. Flavanoid-insect interactions: recent advances in our knowledge. **Phytochemistry**, New York, v. 64, p. 21-30, 2003.

SOUZA, J.C.; REIS, P.R.; RIGITANO, R.L. **O bicho mineiro do cafeeiro**: biologia, danos e manejo integrado. Belo Horizonte: EPAMIG, 1998. 48 p. (Boletim Técnico, 54).

VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E. I.; LIBERATO, J.R. **Software para quantificação de doenças**: quant versão 1.0. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002.

VENDRAMIM, J.D.; CASTIGLIONI, E. Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas. In: GUEDES, J.C.; COSTA, I.D.; CASTIGLIONI, E. (Org.). **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: UFSM, CCR, DFS; Pallotti, 2000. p.113-135.

VICKERY, M.L.; VICKERY, B. **Secondary plant metabolism**. London: The Macmillan Press, 1981. 335 p.

WALKER, D.W.; QUINTANA, V. Mating and oviposition behavior of the coffee miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera - Lyonetiidae). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, Washington, v. 71, n. 1, p. 88-90, 1969.

ZAMBOLIM, L.; ACUÑA, R.S.; VALE, F.X.R. do; MACABEU, A.J.; CHAVES, G.M. Influência da carga pendente sobre o desenvolvimento da ferrugem do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 12., 1985 Caxambu: **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, GERCA, 1985. p. 123-125.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R. do; PEREIRA, A.A.; CHAVES, G.M. Café (*Coffea arabica* L.): controle de doenças. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas**: grandes culturas. Viçosa: UFV, 1997. v. 1, p. 83-140.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R. do; COSTA, H.; PEREIRA, A.A.; CHAVES, G.M.
Epidemiologia e controle integrado da ferrugem do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologia na produção de café**. Viçosa: UFV, 2002. cap. 10, p. 364-450.