



**PROSPECÇÃO DE INDUTORES DE
RESISTÊNCIA PARA O MANEJO DA
VASSOURA-DE-BRUXA DO CACAUEIRO**

JOÃO DE CÁSSIA DO BOMFIM COSTA

2008

JOÃO DE CÁSSIA DO BOMFIM COSTA

**PROSPECÇÃO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA PARA O MANEJO
DA VASSOURA-DE-BRUXA DO CACAUEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Curso de Doutorado em
Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para
obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende

LAVRAS
MINAS GERAIS –BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Costa, João de Cássia do Bomfim.

Prospecção de indutores de resistência para o manejo da vassoura-de-bruxa do cacauero / João de Cássia do Bomfim Costa. – Lavras: UFLA, 2008.
86p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende.

Bibliografia.

1. *Crinipellis pernicioso*. 2. *Theobroma cacao*. 3. Vassoura-de-bruxa. 4. Indutores de resistência. 5. Marcadores bioquímicos. 6. Extratos vegetais. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.74949

JOÃO DE CÁSSIA DO BOMFIM COSTA

**PROSPECÇÃO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA PARA O MANEJO
DA VASSOURA-DE-BRUXA DO CACAUEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2008.

Prof. Dr. Eduardo Alves	UFLA
Prof. Dr. Marco Antonio Galeas Aguilar	MAPA/CEPLAC
Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu	UFLA
Pesquisadora Dra. Sônia Maria de Lima Salgado	EPAMIG

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS –BRASIL

A Deus,

Ofereço

Aos meus pais, Altamirando Ribeiro do Bomfim Costa (*in memoriam*) e Dirce Ferreira Costa, pelo amor, perseverança e pelo exemplo de vida. Aos meus irmãos Francisco Miguel e Jaqueline, pelo amor. A meu sogro, Alcantaro Corrêa e sogra, Zumira Corrêa (*in memoriam*), pelo apoio e exemplo de determinação e a todos amigos, pela consideração e pelo incentivo. A minha esposa, Larissa Corrêa do Bomfim Costa, pelo amor, apoio, compreensão e incentivo durante todos esses anos e aos meus queridos e amados filhos, Lucas Corrêa do Bomfim Costa e Matheus Corrêa do Bomfim Costa, razão do meu viver.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Fitopatologia (DFP), e à Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), órgão pertencente ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pela oportunidade de realizar o doutorado.

Ao orientador, Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende, pela amizade, incentivos e conhecimentos transmitidos.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos transmitidos, especialmente ao Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu, pela amizade, conselhos e cessão da casa de vegetação. Também agradeço, particularmente, aos professores doutores José da Cruz Machado e Ludwig Heinrich Pfenning, pela atenção e ensinamentos.

Aos membros da banca professores doutores Eduardo Alves, Marco Antonio Galeas Aguilar e Mário Sobral de Abreu e à pesquisadora Dra. Sônia Maria de Lima Salgado, pelas valiosas sugestões, indispensáveis à realização deste trabalho.

Aos funcionários do DFP, Ana, Bruno, Eloísa (Elô), Dilurdes, Heloisa, Renata, Rute, Carsinho e Tarlei, pelas inúmeras contribuições.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo: Carla, Fernanda, Jerônimo, Jéssica, Joelma, Livia, Lucas, Márcia, Renato, Rodrigo, Valquíria e Vanessa pela convivência e colaboração. Especiais agradecimentos aos amigos: Ana Monteiro, Angelo Sussel, Ariana, Carla Leite, Daniel, Fabrício, Jadir, Moisés, Pedro e Ricardo, pelo auxílio nas diversas etapas de realização deste trabalho.

Aos meus colegas de turma, Carolina, Dejânia, Fátima, Josimar, Júlio e Marcelo Alves, pela convivência durante a realização deste trabalho.

Ao Prof Dr. Fábio Rossi Cavalcanti, ex-aluno de doutoramento do DFP, pelas importantes contribuições referentes às análises bioquímicas, que foram deixadas solidariamente no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo.

A engenheira florestal Josina Aparecida de Carvalho e ao funcionário Geson, do Parque Ecológico Quedas do Rio Bonito - Fundação Abraham Kasinski, pelo apoio nas pesquisas dos extratos vegetais.

Aos professores doutores Raimundo Vicente de Sousa e Luiz David Solis Murgas, do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA; à doutoranda Gilmara Junqueira Machado Pereira e à mestranda Mariana Martins, pelo apoio essencial nas análises bioquímicas.

Ao Prof. Luciano Vilela de Paiva e ao funcionário Anderson, pelo apoio essencial no Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA.

Aos professores Telde e José Eduardo Brasil, do Departamento de Agricultura da UFLA, pelo apoio nas análises estatísticas e laboratorial, respectivamente. À Dra. Magnólia, pela colaboração nas análises enzimáticas.

Aos meus amigos da CEPLAC, doutores Bezerra, Cordeiro, Edna e Marco Antônio, pelo apoio durante o meu doutoramento. Ao pesquisador Gilson Melo e ao Dr Carlos Spaggiari, pela importante colaboração no envio das sementes autopolinizadas de cacauzeiros, sem as quais este trabalho não poderia se tornar realidade. Às doutoras Stela e Karina, pelo fornecimento do inóculo de *Crinipellis pernicioso*. A Claudionor, Euvaldo, Hugo, Kátia e ao pesquisador Laureano, pelo apoio administrativo e técnico. Aos amigos Lindolfo e Cristina (querida bibliotecária), pelas informações técnicas sobre a cacauicultura.

Em especial, a minha esposa, Profa. Dra. Larissa Corrêa do Bomfim Costa, pela incansável ajuda na condução deste trabalho, incentivo na luta diária e exemplo de força, persistência e competência.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

JOÃO DE CÁSSIA DO BOMFIM COSTA, filho de Altamirando Ribeiro do Bomfim Costa e Dirce Ferreira Costa, nasceu em 22 de maio de 1958, na cidade do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro (RJ).

Em março de 1983, graduou-se em Engenharia Agrônômica na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em Seropédica, RJ.

Em 1984, concluiu o curso de aperfeiçoamento em Fitossanitarismo, pela UFRRJ.

Em 1985, foi contratado pela CEPLAC-MAPA. Participou, de 1986 até 1987, do Projeto Internacional de Vassoura-de Bruxa (convênio firmado entre a CEPLAC e o International Office of Cocoa, Chocolate and Sugar Confectionery, IOCCC). Em 1992, iniciou a coordenação e a execução das pesquisas sobre o controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero em Ilhéus, BA, com apoio do convênio firmado entre a CEPLAC/SEAGRI/FUNDECAU. Em 1999, coordenou a implantação da Unidade de Biocontrole da CEPLAC em Ilhéus, BA.

Em 1992, obteve o título de “Mestre” em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, UFV, como bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), sob a orientação do Prof. Dr. Luiz Antônio Maffia.

Em 25 de fevereiro de 2008 submeteu-se à defesa de Tese para a obtenção do título de “Doutor” em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, na Universidade Federal de Lavras, UFLA, sob orientação do Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1: Generalidades sobre a cultura do cacaueteiro e indução de resistência	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1 Cacaueteiro	5
2.2 Vassoura-de-bruxa	5
2.3 Etiologia.....	6
2.4 Hospedeiros	7
2.5 Sintomas	8
2.6 Epidemiologia.....	10
2.7 Manejo integrado da vassoura-de-bruxa	12
2.8 Indução de resistência.....	13
2.8.1 Quitinases (CHI; EC 3.2.1.14).....	15
2.8.2 β -1,3-glucanases (GLU; EC 3.2.1.6)	15
2.8.3 Peroxidase (POX; EC 1.11.1.7)	16
2.8.4 Oxidase de polifenóis (PPO; EC 1.10.3.2)	16
2.8.5 Lignina solúvel	17
2.8.6 Fenóis solúveis totais	17
2.9 Produtos naturais e sintéticos no controle de fitopatógenos	18
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
CAPÍTULO 2: Produtos naturais e sintéticos na proteção de mudas de cacaueteiro contra <i>Crinipellis perniciosa</i>	31
RESUMO.....	32
ABSTRACT	33
INTRODUÇÃO.....	34
MATERIAL E MÉTODOS	35
Material vegetal e condições de crescimento em casa-de-vegetação	35
Produção do inóculo de <i>C. perniciosa</i> e inoculação das mudas de cacaueteiro	35
Avaliação de doença	36
Delineamento experimental e análises estatísticas	36
Experimento 1. Efeito de extratos vegetais na proteção de mudas de cacaueteiro cv. Catongo contra <i>C. perniciosa</i>	37
Experimento 2. Efeito de produtos sintéticos na proteção de mudas de cacaueteiro cv. Catongo contra <i>C. perniciosa</i>	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39

Experimento 1. Efeito de extratos vegetais na proteção de mudas de cacaueteiro contra <i>C. pernicioso</i>	39
Experimento 2. Efeito de produtos sintéticos na proteção de mudas de cacaueteiro contra <i>C. pernicioso</i>	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
CAPÍTULO 3: Indução de resistência em mudas de cacaueteiro contra <i>Crinipellis pernicioso</i> por produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado	48
RESUMO.....	49
ABSTRACT	50
INTRODUÇÃO.....	51
Material vegetal e condições de crescimento em casa de vegetação	53
Produção do inóculo de <i>C. pernicioso</i> e inoculação das mudas de cacaueteiro	54
Experimento 1. Proteção de mudas de cacaueteiro contra <i>C. pernicioso</i> por mananoligossacarídeo fosforilado em função de doses e épocas de aplicação...55	55
Avaliação de doença	55
Delineamento experimental e análises estatísticas	55
Experimento 2. Toxidez direta de produtos contendo mananoligossacarídeo fosforilado com e sem cobre e zinco sobre <i>C. pernicioso</i>	56
Delineamento experimental e análises estatísticas	57
Experimento 3. Caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa de mudas de cacaueteiros tratadas com Agro-Mos [®] , Agro-Mos [®] Experimental e ASM	58
Determinações bioquímicas.....	58
Preparo de extratos foliares para a avaliação de proteínas totais e atividade de peroxidases de guaiacol, oxidases de polifenóis, quitinases e β -1,3-glucanases	58
Proteínas totais.....	59
Peroxidases de guaiacol (POX; EC 1.11.1.7).....	59
Oxidases de polifenóis (PPO; EC 1.10.3.2).....	59
Quitinases (CHI; EC 3.2.1.14).....	60
β -1,3-glucanases (GLU; EC 3.2.1.6)	60
Preparo de extratos foliares para avaliação de lignina solúvel e fenóis solúveis totais.....	60
Determinação de lignina solúvel.....	61
Determinação de fenóis solúveis totais.....	62
Delineamento experimental e análise estatística.....	62
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
Experimento 1. Proteção de mudas de cacaueteiro contra <i>C. pernicioso</i> por mananoligossacarídeo fosforilado, em função de doses e épocas de aplicação..	64
Experimento 2. Toxidez direta de produtos contendo mananoligossacarídeo fosforilado, com e sem cobre e zinco, sobre <i>C. pernicioso</i>	67

Experimento 3. Caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa de mudas de cacauzeiros tratadas com Agro-Mos [®] , Agro-Mos [®] Experimental e ASM	71
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

RESUMO GERAL

COSTA, João de Cássia do Bomfim. **Prospecção de indutores de resistência para o manejo da vassoura-de-bruxa do cacauero**. 2008. 86p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG¹.

A vassoura-de-bruxa (VB) do cacauero, causada pelo fungo *Crinipellis pernicioso* (CP), é um dos principais problemas fitossanitários da cacauicultura mundial. O manejo integrado da doença preconiza o controle genético, cultural, químico e biológico. A aplicação de fungicidas naturais, à base de extratos vegetais, além do estudo da resistência induzida, constitui alternativa a ser avaliada neste patossistema. Este trabalho foi realizado com os objetivos de verificar o efeito de produtos naturais e sintéticos, além do efeito de doses e de épocas de aplicação de um produto composto à base de mananoligossacarídeo fosforilado (Agro-Mos[®] - AM), na proteção de mudas de cacauero contra CP, bem como a toxidez direta deste produto sobre o patógeno e a caracterização de alguns mecanismos bioquímicos envolvidos na possível resposta de defesa da planta. Os extratos vegetais à base de folhas de café suscetível e resistente à ferrugem e à base de casca de fruto de cacau suscetível e resistente à VB não apresentaram efeito de proteção sobre as mudas de cacauero contra CP. O AM, por sua vez, apresentou redução da incidência da vassoura-de-bruxa semelhante à do Recop[®] (oxicloreto de cobre), independente das doses testadas. A ineficiência de ação protetora do Agro-Mos[®] Experimental (AME), formulação sem Cu⁺⁺ e Zn⁺⁺, possivelmente, é ser atribuída à ausência dos componentes cobre e zinco na sua formulação. Não foram verificados efeitos de dose e época, mas o AM conferiu maior proteção às mudas de cacauero contra a VB, comparado ao ASM. O crescimento micelial de CP *in vitro* foi completamente inibido pelo AM e o Recop[®], nas doses de 3,6 a 7,0 mL L⁻¹ de solução e 0,1 a 0,2 g L⁻¹, respectivamente. Em plantas tratadas com ASM, AM e AME, observou-se aumento da atividade de quitinases, β -1,3-glucanases, peroxidases de guaiacol e oxidases de polifenóis, sem alteração do conteúdo de lignina solúvel e fenóis solúveis totais. A redução da incidência de doença provocada pelo AM, associada com o seu efeito tóxico *in vitro* e a ativação de algumas enzimas relacionadas às respostas de defesa da planta, evidencia que o AM, possivelmente, está atuando duplamente sobre o patógeno por meio de um efeito direto de proteção e pela ativação de mecanismos de indução de resistência.

¹**Comitê de Orientação:** Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Orientador)

ABSTRACT

COSTA, João de Cássia do Bomfim. **Search for inducers of resistance aiming at the management of witches' broom in cacao.** 2008. 86p. Thesis (Doctorate Program in Phytopathology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG¹.

Cacao witches' broom (*Theobroma cacao* L.) caused by *Crinipellis perniciosa* is one of the main phytosanitary problems of cacao in the world. The disease integrated management advocates genetic, cultural, chemical and biological control. The application of natural fungicides, based on plant extracts, are alternatives to be evaluated in this patosystem, in addition to the study of induced resistance. This study was aimed at determining the effect of natural and synthetic products, in addition to the effect of doses and times of application of a phosphorilated manannoligosacharide compound (Agro-Mos[®]), in order to protect seedlings of cacao against *C. perniciosa*, and to evaluate the direct toxicity of this product on the pathogen as well as to characterize some biochemical mechanisms involved in the possible plant defense response. Plant extracts based on coffee leaves and bark of cacao fruit susceptible and resistant to witches' broom, showed no effect on cacao seedlings protection against *C. perniciosa*. Agro-Mos[®], in turn, presented reduction in the incidence of witches' broom, similarly to Recop[®] (copper oxichoride), independent of tested doses. The inefficiency of the Experimental Agro-Mos[®] protective action (formulation without Cu⁺⁺ and Zn⁺⁺), possibly can be attributed to the absence of copper and zinc components in its formulation. There were verified effects of dose and time, but Agro-Mos[®] conferred greater protection for cacao seedlings against witches' broom when compared to ASM. The mycelial growth of *C. perniciosa in vitro* was completely inhibited by Agro-Mos[®] and Recop[®] at doses of 3.6 to 7.0 mL L⁻¹ solution, and 0.1 to 0.2 g L⁻¹, respectively. There was increased activity of chitinases, β -1,3-glucanases, guaiacol peroxidases, polyphenol oxidases, without changes at the content of soluble lignin and total soluble phenolics in plants treated with ASM, Agro-Mos[®] or Experimental Agro-Mos[®]. The disease incidence reduction caused by Agro-Mos[®], associated with its *in vitro* toxic effect and the activation of some enzymes related to plant defense response, shows that Agro-Mos[®], possibly, is working on the pathogen through a direct effect and is also activating plant defense mechanisms.

¹ **Guidance Committee:** Mário Lúcio V. de Resende - UFLA (Major Professor).

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES SOBRE A CULTURA DO CACAUEIRO E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

1 INTRODUÇÃO GERAL

A vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, é considerada uma das mais importantes enfermidades do cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) (Purdy & Schmidt, 1996; Griffith, 2004). Na região amazônica brasileira, esta doença chega a causar perdas de até 70% na produção de frutos em plantios comerciais com mais de seis anos de idade, especialmente no estado de Rondônia (Bastos, 1990).

No continente africano, ainda isento da doença, concentra-se 70,6% da produção mundial de cacau, concentrada, principalmente na Costa do Marfim (37,3%) (Quality bakery & Catering services, 2006/07). Na década de 1970, o Brasil era o segundo maior produtor mundial de cacau, mas, atualmente, está em sexto lugar, com 140.000 toneladas, correspondendo a 4,1% do total (Agrianual, 2008).

A produção brasileira de cacau está concentrada nos estados do Mato Grosso (0,1%), Amazonas (0,7%), Espírito Santo (4,1%), Rondônia (6,9%), Pará (19%) e Bahia (70%) que, durante décadas, teve a cacauicultura como principal atividade agrícola (Okabe et al., 2004; Agrianual, 2008). A partir de 1989 a vassoura-de-bruxa disseminou-se por toda a região cacaueteira, provocando decréscimo acentuado na produtividade dos cacauetes e grande impacto econômico, ambiental e social, transformando o Brasil, antes exportador, em importador de cacau (Agrianual, 2000) (Figura 1).

O fungo *C. pernicioso* atua principalmente em tecidos meristemáticos em crescimento, tais como brotos vegetativos, almofadas florais e frutos do cacaueteiro, com sintomas característicos, resultantes do desequilíbrio hormonal presente na interação hospedeiro-patógeno (Aguilar, 1999).

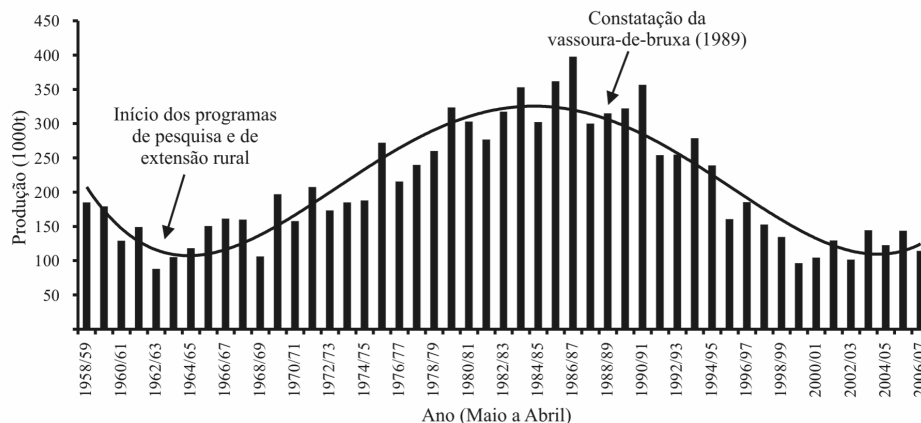


FIGURA 1. Produção de cacau em amêndoas (sacas de 60 kg) no estado da Bahia, no período de 1958/59 a 2006/2007. (Adaptado de ASSOCIAÇÃO COMERCIAL DA BAHIA. Comissão do Comércio do Cacau da Bahia, 2007).

As primeiras formas de controle da doença com a utilização da poda fitossanitária mostraram-se muito onerosas e o controle químico pouco eficiente na proteção das plantas, além de causar grande prejuízo ao ambiente. Atualmente, as medidas para o controle da vassoura-de-bruxa preconizam a necessidade do manejo integrado da doença.

Em vista disso, as pesquisas para a obtenção de variedades resistentes, a busca de fungos antagonistas à *C. pernicioso* e a indução de resistência baseada na ativação de mecanismos de defesa latentes no cacau constituem as linhas de pesquisa atuais mais promissoras para o controle da vassoura-de-bruxa, de forma mais econômica e com menor impacto ambiental.

Objetivou-se, com a realização deste trabalho: a) testar eliciadores bióticos na indução de resistência em mudas de cacau a *C. pernicioso*; b) estudar

os mecanismos envolvidos na indução de resistência em cacauero a *C. pernicioso* e c) fornecer métodos alternativos para o manejo integrado da vassoura-de-bruxa do cacauero, com a disponibilização de produtos menos tóxicos ao homem e ao ambiente e compatíveis com outras metodologias já empregadas no manejo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cacaueiro

O cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta da família Malvaceae, gênero *Theobroma* (Alverson et al. 1999; APG II, 2003), originária do continente sul-americano, provavelmente das bacias dos rios Amazonas e Orinoco, onde foi encontrado em condições naturais, sob dossel de grandes árvores da floresta tropical. Pode atingir de 5 a 8 metros de altura e de 4 a 6 metros de diâmetro da copa, quando proveniente de semente. Dentre as 22 espécies do gênero, apenas o cacaueiro e o cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) são explorados comercialmente no Brasil, para a fabricação de chocolate e derivados. O cacaueiro possui frutos com pericarpo carnoso, composto por três partes distintas: o epicarpo, que é carnoso e espesso, cujo extrato epidérmico exterior pode estar pigmentado; o mesocarpo delgado e duro, mais ou menos lignificado e o endocarpo, que é carnoso mais ou menos espesso (Silva Neto, 2001; Monteiro & Ahnert, 2007).

2.2 Vassoura-de-bruxa

A vassoura-de-bruxa do cacaueiro foi observada cientificamente, pela primeira vez, no Suriname, em 1895 (Holliday, 1952). Esta enfermidade apresenta ampla distribuição geográfica nos países produtores de cacau da América do Sul e Central, como Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Venezuela, Panamá e nas Ilhas do Caribe, Trinidad, Tobago, Granada, Santa Lucia e São Vicente (Bastos, 1990; Silva et al., 2002). O primeiro registro da doença na Bahia ocorreu no município de Uruçuca, em 22 de maio de 1989 (Pereira et al., 1989) e em fevereiro de 2001, em Linhares, ES (Silva et al., 2002).

2.3 Etiologia

A doença é causada por um fungo pertencente à classe Basidiomycetes, ordem Agaricales e família Tricholomataceae. O agente etiológico foi descrito, primeiramente, por Stahel como *Marasmius perniciosus* (Stahel, 1915), sendo revisado posteriormente por Singer como *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer (Singer, 1942). Em 2005, após análises filogenéticas moleculares, o fungo foi reclassificado como *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, (Aime & Phillips-Mora, 2005). A ausência de marcadores morfológicos que permitam separar os gêneros *Crinipellis* e *Moniliophthora* representa uma dificuldade para a aplicação do binômio proposto por Aime & Phillips-Mora (2005). Assim, mantém-se, neste trabalho, o binômio recomendado por Singer (1942) (Luz et al., 2006).

O patógeno apresenta duas fases fisiológicas e morfológicas distintas. Uma delas é parasítica, monocariótica, de crescimento intercelular, com ausência de grampos de conexão, encontrada em tecidos vivos, enquanto a outra é saprofítica, dicariótica, com crescimento intracelular e presença de grampos de conexão, encontrada somente em tecidos mortos (Luz et al., 1997). Os basidiomas são produzidos em todos os tecidos afetados depois de mortos e mumificados, tanto na planta como na serrapilheira. Segundo Bastos (1990), o micélio secundário do fungo não é infectivo; somente os basidiósporos de coloração hialina e dimensões de 10-14 μm x 4-5 μm , que são produzidos no interior dos basidiomas, são capazes de induzir a doença (Figura 2).

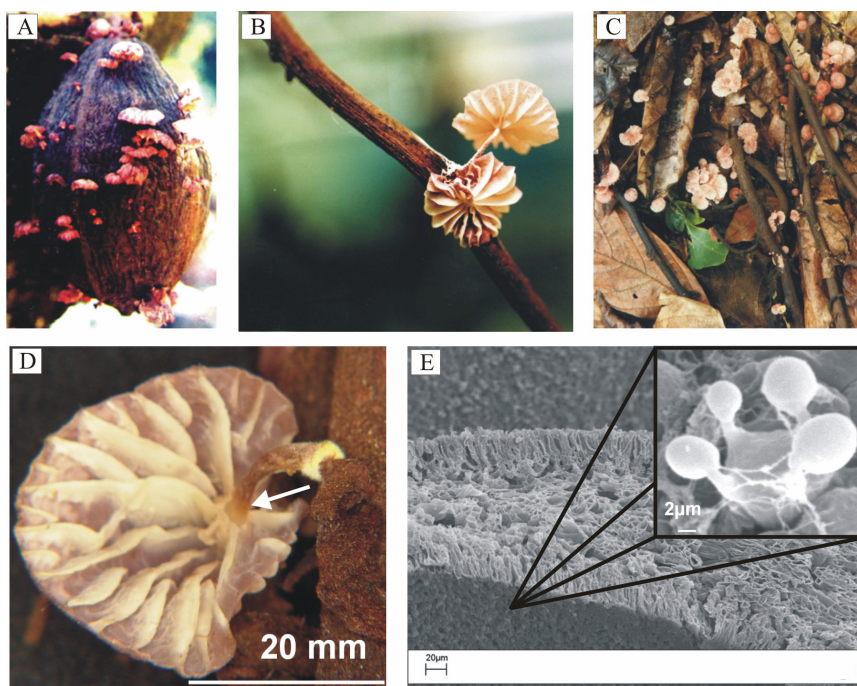


FIGURA 2. Basidiomas de *C. perniciosus* em fruto de cacau (A), em vassouras (B, C), himenóforo de *C. perniciosus* com lamelas e lamélulas esparsas (note o estipe excêntrico do basidioma, seta) (D) e eletromicrografia de varredura da projeção de corte transversal de lamela de *C. perniciosus* e basídio em vista frontal com quatro basidiósporos presos aos esterigmas (E).

2.4 Hospedeiros

O fungo *C. perniciosus*, endêmico na bacia Amazônica (Bastos, 1990), além de afetar o cacaueiro, também atinge outras espécies do gênero *Theobroma* e *Herrania*, como *T. grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum. (cupuaçu), *T. bicolor* Humb. & Bompl. (cacau-do-pará), *T. microcarpum* Mart. (cacau-jacaré), *T. subincanum* Mart. (cupuí), *T. obovatum* Klotzsch ex Bernoulli (cacau-cabeça-de-urubu), *T. speciosum* Willd. ex Spreng. (cacauí); *H. albiflora* Goudot, *H. nitida* (Poepp.) R.E. Schult. e *H. purpurea* (Pittier) R.E. Schult. Também infecta

espécies da família *Solanaceae* pertencentes, principalmente, aos gêneros *Solanum* e *Capsicum*, como *S. lycocarpum* St. Hil. (lobeira), *S. paniculatum* L. (jurubeba), *S. gilo* Raddi (jiló), *S. stipulaceum* Willd ex Roem. & Schult. (caiçara), *S. melongena* L. (berinjela), *S. lasiantherum* Van Heurck & Müll. Arg. (sem nome comum), *S. rugosum* Dunal (juçara), *C. annuum* L. (pimentão), *C. frutescens* L. (pimenta malagueta) e *Athanaea* aff. *pogogena* (Moric) Sendth (sem nome comum) e membros da família Bixaceae, como *Bixa orellana* (urucum). Existem relatos sobre este fungo com colonização de lianas das famílias *Fabaceae*, como *Entada gigas* (L.) Fawc. & Rendle e *Malpighiaceae*, como *Mascagnia sepium* (A. Juss.) Griseb., *Heteropterys acutifolia* A. Juss. e *Stigmatophyllum* sp. (cipó-silvestre) (Thorold, 1975; Evans, 1978; Bastos & Evans, 1985; Wood & Lass, 1985; Bastos & Andebrhan, 1986; Bastos et al., 1991; Silva et al., 1992; Luz et al., 1997; Resende et al., 1997; Bastos et al., 1998; Resende et al., 1998; Resende et al., 2000; Bastos & Albuquerque, 2006; Oliveira & Luz, 2007).

2.5 Sintomas

A sintomatologia da vassoura-de-bruxa em mudas (Silva et al., 2002) e em plantas adultas já foi detalhadamente descrita por diversos autores, como Holliday (1952), Baker & Holliday (1957), Thorold (1975), Evans (1981), Rudgard (1989), Tovar (1991) e Bastos & Albuquerque (2006), entre outros. A infecção ocorre, principalmente, nos tecidos meristemáticos em crescimento, como brotos vegetativos, almofadas florais e frutos com variação de sintomas e envolvem hipertrofia e outras anormalidades (Figura 3).

Nos lançamentos foliares, a hipertrofia é acompanhada de brotação intensa de gemas laterais, dando-lhe características de uma vassoura. Os lançamentos infectados são de diâmetro maior que os sadios, com entrenós curtos e folhas geralmente grandes, curvadas e retorcidas. Inicialmente, as

vassouras são verdes - vassouras vegetativas (Figuras 3C) – e, posteriormente, secam, morrem e adquirem coloração marrom-escura – vassouras necróticas (Figuras 3D).

As almofadas florais infectadas transformam-se em agrupamentos de flores anormais, hipertrofiadas, de pedicelo alongado e inchado e originam frutos deformados, que podem exibir variedade de sintomas em função do tipo de infecção e da idade. A infecção é indireta quando ocorre por meio do pedicelo das flores e direta, por esporos através do epicarpo.

Os frutos são partenocárpicos, quando originados de flores afetadas, com aspecto de “morango”, que não evoluem em tamanho e dependendo da variedade de cacau, são verdes ou avermelhados, tornando-se negros e petrificados quando secos (Figura 3E). Quando os frutos são infectados diretamente ainda jovens, com cerca de 1 cm de comprimento, adquirem a forma de “cenoura” e paralisam o crescimento com, aproximadamente, 15 cm de comprimento, antes de se tornarem negros e petrificados.

Quando a infecção ocorre em frutos jovens (2 a 5 cm de comprimento) estes se tornam inchados e deformados, com amadurecimento precoce. Nos frutos infectados tardiamente (2 a 3 meses de idade), desenvolvem-se manchas negras, brilhantes, de formato mais ou menos circular quando maduros, tornando-se secos e petrificados com o desenvolvimento da infecção. A colonização de *C. pernicioso* ocorre, primeiramente, nos tecidos internos do fruto e as sementes ficam fortemente aderidas. A partir do aparecimento dos sintomas, as sementes tornam-se inúteis para o consumo (Figuras 3G e H).

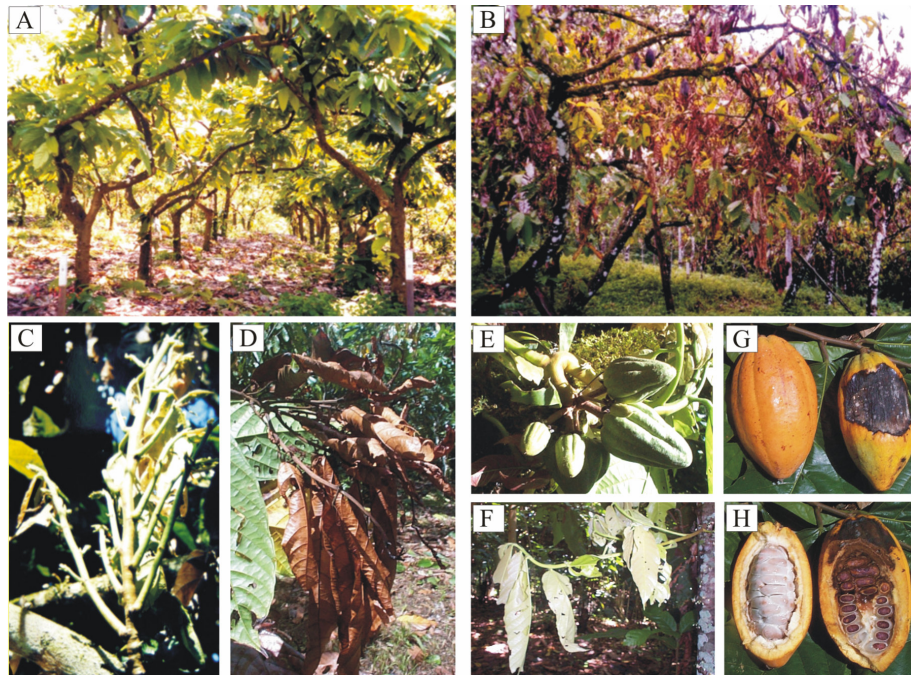


FIGURA 3. Área isenta de sintomas da vassoura-de-bruxa (VB) (*C. pernicioso*) do cacauero (A) e área severamente afetada pela enfermidade (B), tipos de vassouras em lançamentos foliares (C, D), VB em almofadas florais: frutos partenocárpicos (morangos) (E) e vassoura vegetativa (F), fruto sadio (esquerda) e fruto com sintoma da VB (direita) (G), secção longitudinal de fruto sadio (esquerda) e de fruto com sintoma da VB (direita) (H).

2.6 Epidemiologia

A frequência e a duração das chuvas são fatores importantes na produção de basidiomas. A precipitação anual entre 1.500 e 2.000 mm, a temperatura de 24 °C a 26 °C e a umidade relativa do ar de 80 % a 90 %, são condições ideais para o fungo. Precipitações mensais menores que 100 mm e maiores de 300 mm reduzem a produção de basidiomas (Andebrhan, 1985; Costa et al., 1997). Chuvas contínuas e fortes ou períodos secos prolongados inibem a produção de

basidiomas (Thorold, 1975; Holliday, 1970). Os basidiomas mantêm-se ativos entre cinco a oito dias, em média, com liberação de milhares de esporos nas primeiras horas do dia (Rudgard, 1987). Com a umidade relativa baixa, eles perdem a turgidez e voltam a produzir esporos depois que a umidade se eleva novamente até a saturação.

A disseminação de *C. pernicioso* é feita por basidiósporos, únicas unidades infectivas do patógeno, que são produzidos na superfície de lamelas situadas na parte inferior do píleo dos basidiomas, em células especializadas denominadas basídios, de onde são liberados ativamente (ejetados).

A principal forma de disseminação do patógeno é pelo ar, embora chuvas não deixem de exercer importante papel (Evans, 1981; Andebrhan, 1988). Os basidiósporos cuja liberação ocorre, geralmente, entre 18h00 e 6h00, são disseminados pelas correntes aéreas. Para que ocorra infecção, é preciso que os basidiósporos sejam depositados sobre regiões meristemáticas, como gemas vegetativas, florais e ou frutos em formação até os três meses de idade, onde penetram diretamente ou através dos estômatos. Nas gemas dormentes, a infecção torna-se latente, assumindo o aspecto de pequenos cancrs ou pontos necróticos que entram em atividade quando a planta reinicia a brotação. Essas infecções latentes têm importância epidemiológica, pois permitem a sobrevivência do fungo entre os períodos sucessivos de crescimento (lançamentos foliares) e de frutificação (safra) da planta. A quantidade de basidiósporos no ar cai sensivelmente a distâncias superiores a 300 m da fonte de inóculo, embora possa ocorrer alguma deposição de esporos e infecções em plantas situadas a alguns quilômetros da fonte de inóculo, quando as condições atmosféricas são favoráveis à disseminação (Luz et al., 1997).

Segundo Luz et al. (1997), nos tecidos infectados, ocorrem intensa multiplicação (hipertrofia), que dura algumas semanas e, em seguida, morte das células e necrose generalizada dos tecidos. Nos tecidos necrosados (frutos e

vassouras secas), após um período de dormência, durante o qual o micélio saprofítico cresce e acumula energia, dá-se o aparecimento dos basidiomas ou frutificações do patógeno. Esse ciclo de basidioma a basidioma ocorre uma vez por ano, na Amazônia, entretanto, na Bahia, pode ocorrer até duas vezes: uma na safra temporã (1º semestre) e outra na safra principal (2º semestre). A vassoura-de-bruxa é, portanto, uma doença monocíclica, pois os tecidos infectados não produzem novos esporos capazes de iniciar novas infecções na mesma estação (safra). Embora esporos possam ser liberados durante toda a estação, eles provêm de basidiomas desenvolvidos em tecidos infectados em estações anteriores.

Os períodos médios de duração das diferentes fases do ciclo vital de *C. pernicioso* foram estudados, na Bahia, por Luz et al. (1994) e são apresentados a seguir:

- a) período de incubação: 4 semanas;
- b) período entre o aparecimento de vassouras verdes e o seu secamento: 7,5 semanas;
- c) período de dormência do fungo em vassouras secas: 13 semanas, com variação para mais ou para menos, em função do tamanho e da localização da vassoura;
- d) período de atividade do fungo em vassoura seca: 22 meses;
- e) período de atividade do fungo em fruto mumificado: 24 meses;
- f) período de liberação de esporos: o ano todo (na Bahia), na dependência de chuvas, com picos maiores nos meses mais frios (julho, agosto e setembro) e menores em função da época e ano (Almeida & Luz, 1995).

2.7 Manejo integrado da vassoura-de-bruxa

O manejo da doença é feito mediante a poda fitossanitária de todos os tecidos infectados antes da estação chuvosa, porém, esta prática é de custo

elevado, além de trabalhosa. A aplicação de fungicidas é um complemento à poda fitossanitária, pois protege os frutos contra infecções. No entanto, o uso de fungicidas representa custo adicional expressivo. O controle genético é medida de médio e longo prazo, duradoura, porém, não definitiva, devido à variabilidade do fungo, que acarreta a necessidade permanente do desenvolvimento de novas variedades resistentes. O controle biológico com microrganismos antagônicos, por sua vez, também representa uma opção ainda sem produtos com registro oficial para a cultura do cacaueteiro. A indução de resistência baseada na ativação de mecanismos de defesa latentes no cacaueteiro, em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos, vem se tornando importante estratégia de controle alternativo, com as vantagens do baixo custo e de constituir uma tecnologia mais segura para o ambiente e para o ser humano.

2.8 Indução de resistência

Indução de resistência é definida como o aumento da capacidade de defesa da planta contra amplo espectro de organismos fitopatogênicos, incluindo fungos, bactéria e viroses (Van Loon et al., 1998). A resistência resultante é proporcionada por um agente indutor (biótico ou abiótico) que aciona mecanismos de defesa na planta, os quais se encontram na forma latente (Hammerschmidt & Kuc, 1982). Essa ativação pode ser obtida pelo tratamento com agentes bióticos, ou seja, formas avirulentas de patógenos, raças incompatíveis, em determinadas circunstâncias por formas virulentas de patógenos, extratos vegetais, extratos de fungos e outros (Stangarlin & Pascholati, 1992), ou por ativadores químicos, como ácido aminobutírico (Cohen, 1996), ácido 2,6-dicloroisonicotínico e acibenzolar-S-metil (Ciba, 1995).

A resistência induzida (RI) ativa mecanismos de defesa representados por barreiras bioquímicas e ou estruturais, com aumento da resistência geral da

planta (Oliveira et al., 1997). A proteção obtida contra determinado patógeno pode ser local ou sistêmica, dependendo do intervalo de tempo entre o tratamento inicial (indutor) e a inoculação do patógeno (desafiador) (Pascholati & Leite, 1995). A sua duração pode ser de poucos dias a algumas semanas ou, mesmo, durar todo o ciclo de vida da planta (Misaghi, 1982; Pascholati & Leite, 1995), passando, assim, a funcionar como seu mecanismo de defesa constitutivo.

A RI foi subdividida em duas categorias, a resistência sistêmica adquirida, ou RSA (Sticher et al., 1997) e a resistência sistêmica induzida, ou RSI (Van Loon et al., 1998). Na primeira, a resistência se desenvolve sistêmica ou localizadamente, em resposta a um patógeno que causa lesão necrótica (RH) ou por aplicação exógena de ácido salicílico ou compostos sintéticos, como o estér S-metil do ácido benzo [1,2,3] tiadiazol-7-carbotióico (BTH) e o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA). A RSA, geralmente, é efetiva contra amplo espectro de patógenos e, geralmente, está associada com a produção de proteínas relacionadas à patogênese (PRP's), muitas das quais possuem atividade antimicrobiana e são excelentes marcadores moleculares para a avaliação da resposta de resistência (Hammerschmidt & Smith-Becker, 1999). Na RSI, o desenvolvimento sistêmico da resposta de resistência está relacionado à colonização de raízes por rizobactérias promotoras de crescimento em plantas, conhecidas como PGPRs. Neste tipo de resistência, a molécula sinalizadora é mediada pelo ácido jasmônico e o etileno, sem envolver a expressão de PR proteínas (Van Loon et al., 1998).

Geralmente, a indução de resistência ocorre pela ativação de genes que codificam uma série de PRP's e enzimas envolvidas na síntese de fitoalexinas e lignina (Vidhyasekaran, 1988; Van Loon et al., 1997; Moraes, 1998; Resende et al., 2002). A detecção e a quantificação da expressão de genes que levam a essas substâncias seriam formas de separar o efeito indutor de resistência do efeito tóxico direto de determinado produto. As PRP's abrangem famílias de proteínas

com características variadas, como quitinases, β -1,3-glucanases, lisozimas, peroxidases, osmotinas, mas com o fato em comum de estarem todas relacionadas aos processos de defesa durante a patogênese, apresentando, dessa forma, potencial para serem exploradas nos programas de indução de proteção em plantas (Van Loon & Van Strien, 1999)

2.8.1 Quitinases (CHI; EC 3.2.1.14)

Essas enzimas são monômeros com massa molecular entre 25 e 35 kDa. As quitinases de plantas possuem atividade de lisozima, podendo hidrolisar ligações β -1,4 entre ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina no peptideoglicano bacteriano. Certas quitinases podem agir como quitosanases, além do fato de existirem também quitosanases específicas induzidas em plantas em resposta a fitopatógenos. Embora as quitinases hidrolisem eficientemente a quitina, que é o principal componente do exoesqueleto de insetos e da parede celular de muitos fungos, essas enzimas também têm sido encontradas em plantas de fumo em resposta ao *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Ponstein et al., 1994).

2.8.2 β -1,3-glucanases (GLU; EC 3.2.1.6)

As β -1,3-glucanases são enzimas que hidrolisam polímeros de β -1,3-glucana, compostos que, junto com a quitina, são os principais componentes que dão resistência à parede celular dos fungos (Cornelissen & Melchers, 1993).

Na indução de resistência, quitinases e β -1,3-glucanases agem de forma conjunta. Uma pequena quantidade de β -1,3-glucanases é sintetizada e excretada para a lamela média (espaço intercelular) e, com o crescimento fúngico neste espaço, esta enzima começa a degradar o tecido da parede celular do fungo e os fragmentos liberados pela ação da enzima funcionam como eliciadores,

induzindo a síntese de grande quantidade de quitinases e β -1,3-glucanases que são acumuladas nos vacúolos. A partir do momento em que o fungo consegue penetrar na célula, os vacúolos são rompidos e ocorre a liberação de grande quantidade destas enzimas, reprimindo a ação do patógeno (Mauch & Staehelin, 1989).

2.8.3 Peroxidase (POX; EC 1.11.1.7)

A peroxidase não só oxida os compostos fenólicos como também aumenta a sua velocidade de polimerização em substâncias similares à lignina, que se depositam nas paredes e nas papilas celulares e interferem no posterior crescimento e desenvolvimento do patógeno (Agrios, 2005).

As peroxidases representam um conjunto de dezenas de isoenzimas capazes de catalisar a oxidação de vários substratos, como substâncias aromáticas, ácido ascórbico e compostos fenólicos, na presença de peróxido de hidrogênio, formando quinonas e água. Os produtos gerados pela ação das peroxidases estão envolvidos na formação da parede celular vegetal, suberização e lignificação (Kolattukudy et al., 1992). Em plantas infectadas por patógenos, ou em plantas induzidas, as respostas de defesa estão também ligadas à oxidação de compostos fenólicos, que são tóxicos a patógenos (Sutic & Sinclair, 1991). Estas enzimas estão também envolvidas na geração de H_2O_2 , que, por sua vez, pode gerar outros radicais ativos de oxigênio, além de apresentar atividade antimicrobiana direta (Peng & Kuc, 1992).

2.8.4 Oxidase de polifenóis (PPO; EC 1.10.3.2)

As oxidases de polifenóis são também enzimas importantes na defesa de plantas contra patógenos. Estão envolvidas em reações de oxidação, assim como as peroxidases, oxidando compostos como ácido ascórbico e fenóis, porém, usando oxigênio (Sutic & Sinclair, 1991, Vidhyasekaran, 1997).

A atividade da maioria das oxidases de polifenóis quase sempre é maior nos tecidos infectados de variedades resistentes do que em plantas suscetíveis infectadas ou plantas sadias não infectadas. Uma maior atividade das oxidases de polifenóis possivelmente incrementa as concentrações de produtos tóxicos resultantes da oxidação, aumentando, portanto, o grau de resistência à infecção (Agrios, 2005).

2.8.5 Lignina solúvel

Depois da celulose, a substância orgânica mais abundante nas plantas é a lignina, um polímero de grupos fenilpropanóides, altamente ramificado que apresenta funções primária e secundária. Além de proporcionar suporte mecânico, a lignina desempenha funções protetoras importantes nos vegetais. A lignificação bloqueia o crescimento de patógenos e é uma resposta freqüente à infecção ou à lesão (Taiz & Zeiger, 2004).

A lignina, juntamente com a celulose e outros polissacarídeos que ocorrem na parede celular das plantas superiores, funciona como uma barreira física à penetração fúngica (Vance et al., 1980). A lignificação pode impedir o desenvolvimento do fungo nos tecidos vegetais de várias maneiras: estabelecimento de barreira mecânica ao avanço e crescimento do patógeno; modificação da parede celular, tornando-a mais resistente ao ataque de enzimas hidrolíticas; aumento da resistência das paredes à difusão de toxinas produzidas pelos patógenos, impedindo que nutrientes do hospedeiro sejam utilizados pelo invasor (Cavalcanti et al., 2005).

2.8.6 Fenóis solúveis totais

Os níveis de fenóis solúveis totais foram mais elevados em clones de cacaueteiro com resistência a *C. pernicioso* e podem estar contribuindo na resposta de defesa contra o patógeno. A atividade de polifenoloxidasas e de

peroxidases foi menor nos clones resistentes. Os níveis de fenóis e a atividade das enzimas oxidativas correlacionaram-se de forma inversa, o que pode indicar uma inibição das enzimas peroxidases e polifenoloxidasas pelos compostos fenólicos (Nojosa et al., 2003).

2.9 Produtos naturais e sintéticos no controle de fitopatógenos

A flora brasileira possui grande diversidade de espécies com propriedades químicas e biológicas, que não foram investigadas, sendo que, para 99,6% dessas plantas, estimadas entre 40 e 55 mil espécies, não se conhece a composição química (Ming, 1996).

No estudo do efeito *in vitro* de óleo de *Piper aduncum* sobre *C. pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos, Bastos (1997) constatou 100% de inibição do crescimento micelial e da germinação de basidiósporos de *C. pernicioso*, nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Em campo, os tratamentos com óleo reduziram, significativamente, as perdas causadas por *C. pernicioso*. Bastos et al. (2003), em outro experimento, *in vitro*, com o óleo essencial de *Cymbopogon nardus*, observaram 100 % de inibição da germinação de basidiósporos e do crescimento micelial de *C. pernicioso*, nas concentrações de 1000 e 500 ppm, respectivamente. E, em casa de vegetação, os autores observaram 100 % de proteção contra a infecção deste patógeno com pulverização da emulsão do óleo 15 e 30 minutos imediatamente após a inoculação das mudas de cacaueteiro. Análises químicas do óleo em cromatografia gasosa e espectrofotometria de massa (CG-EM) revelaram a presença de monoterpênicos oxigenados geraniol (29,5 %), citronel (22,5 %), citronelol (14,6 %), neral (6,3 %) e geraniol (4,3%). Em outro trabalho com *C. pernicioso*, Silva (2003) observou que os extratos metanólicos de *Glechoma hederaceae* e *Ilex brasiliensis* causaram 100% de inibição na germinação de *C. pernicioso*, *in vitro*.

Em tomateiros inoculados com *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, Cavalcanti et al. (2006) observaram que plantas tratadas com extrato de vassoura-de-lobeira (*Solanum lycocarpum* infectado com *C. perniciosa*) apresentaram maiores níveis de lignina solúvel, em avaliações realizadas aos 9 e 12 dias após a aplicação do extrato. Além disso, este mesmo extrato promoveu menor valor da AACPL (área abaixo da curva de progresso da lesão causada por *X. campestris* pv. *vesicatoria*), inferior apenas ao acibenzolar-S-metil (ASM) e Ecolife® e superior a frações parciais de extração de quitosana, provenientes de quitina de carapaça de carangueijo e de micélio de *C. perniciosa* (Pereira et al., 2004). Aguilar et al. (2004) observaram, com a aplicação de extratos naturais, redução na área abaixo da curva de progresso da lesão (AACPL) no patossistema cacaueiro e *Verticillium dahliae* em relação à testemunha inoculada. Segundo Cavalcanti et al. (2006), o mesmo extrato de vassoura de lobeira (*S. lycocarpum* infectado com *C. perniciosa*) também induziu aumento na atividade de guaiacol-peroxidase (GPX) e no acúmulo de lignina, no patossistema cacaueiro e *V. dahliae*.

Após a identificação, na década de 1990, do éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7 carbotióico (ASM, Bion®), como indutor de resistência em diversas espécies vegetais, observou-se considerável avanço nas pesquisas com resistência. Desde então, vários produtos surgiram, alguns deles de natureza biótica, com capacidade de ativação de diversos mecanismos de defesa na planta (Resende et al., 2006). O acibenzolar-S-metil interfere nos processos fisiológicos/bioquímicos das plantas, com ativação da resistência sistêmica aos agentes patogênicos. Este ingrediente ativo pertence à classe química benzothiadiazole e é o primeiro representante de uma nova categoria de produtos utilizados na proteção de plantas, também chamados de ativadores de plantas ou indutores de resistência (Knight et al., 1997). O ASM é capaz de atender às necessidades de uma agricultura sustentável, com maior

produtividade, qualidade e menor impacto econômico e ambiental (Soares et al., 2004).

O Agro-Mos[®], produzido pela Improcrop do Brasil, é indutor sistêmico de resistência, totalmente natural, cujo princípio ativo é um manano-oligossacarídeo fosforilado proveniente da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. A sua formulação contém um biocomplexo de cobre totalmente disponível para as plantas. O produto é aplicado via pulverização foliar, com duas formas de atuação no controle de doenças de plantas: impedir a fixação de patógenos sobre os tecidos das plantas, por meio do filme formado pelo princípio ativo e promover a reação não específica a patógenos (Fazenda Arizona, 2008).

O Agro-Mos[®] é utilizado com bons resultados para diversas culturas. A Fazenda Arizona (2008), produtora de uva e manga no estado da Bahia, utiliza o produto com duas finalidades: impedir a entrada de patógenos e aumentar a resistência de plantas. Oliveira et al. (2005) obtiveram proteção do algodoeiro contra a ramulose com aplicação de Agro-Mos[®], obtendo 41 % de controle da doença, semelhante ao efeito do Ecolife[®], mas inferior ao ASM, que controlou 82 % da enfermidade. Dantas et al. (2004) avaliaram o potencial do ASM e Agro-Mos[®] na proteção de frutos de mamão contra antracnose, podridão de *Lasiodiplodia* e podridão-de-fusarium. Os dois indutores foram eficazes no controle dessas podridões, entretanto, com a aplicação do ASM, houve aumento na incidência das doenças após quatro aplicações, o que não ocorreu nos tratamentos com Agro-Mos[®].

Resultados promissores com a aplicação do Agro-Mos[®] também foram observados nos patossistemas oídio x meloeiro (Mesquita et al., 2005) e tangerina murcote x mancha-de-alternaria, quando esse produto foi intercalado com fungicida (Johnston et al., 2005). Tosun (2005) demonstrou que programas

de controle que associaram Agro-Mos 2000[®] e fungicidas promoveram melhor controle de doenças, como requeima e podridão-cinza, em tomateiro. A associação de pulverizações com Agro-Mos[®] e Crop Set (Improcrop) também foi eficaz, ao suprimir essas doenças na cultura do tomate. Crop Set[®] é um bioestimulante vegetal baseado em extrato, que contém saponinas associadas a micronutrientes atuando na divisão celular, promovendo crescimento vegetativo e auxiliando a planta a se proteger contra fatores externos de estresse. Em alguns países, existe a formulação de Agro-Mos[®] + Crop Set[®], comercializada sob o nome ISR-2000 (Resende et al., 2006).

Agro-Mos[®] aplicado semanalmente em videiras da cultivar Merlot, na dose de 3 mL L⁻¹, reduziu a incidência do míldio (*Plasmopara viticola*), cujo efeito foi similar ao das melhores doses de produtos à base de fosfito de potássio (Resende et al., 2006).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, M.A.G. **Influência do manganês sobre aspectos bioquímicos e fisiológicos da tolerância de cacau (*Theobroma cacao* L.) à vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer)**. 1999. 199p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

AGUILAR, M.A.G.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; PEREIRA, R.B.; CAVALCANTI, F.R.; SONEGHETI, S.; RESENDE, M.L.V. Extratos naturais na proteção de mudas de cacauzeiro contra *Verticillium dahliae* Kleb. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.263, ago. 2004.

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2000.

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2008.

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. San Diego: Academic, 2005. 922 p.

AIME, M.C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v.97, p.1012–1022, 2005.

ALMEIDA, H.A.; LUZ, E.D.M.N. Influência da chuva, temperatura e umidade do ar na produção de basidiomas de *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.374, ago. 1995. Suplemento.

ALVERSON, W.S.; WHITLOCK, B.A.; NYFFELER, R.; BAYER, C.; BAUM, D.A. Phylogeny of the core Malvales: evidence from *ndhF* sequence data. **American Journal of Botany**, v.86, p.1474-1486, 1999.

ANDEBRHAN, T. **Epidemiologia da vassoura-de-bruxa nos pólos cacauzeiros da Amazônia brasileira**. Belém, PA: CEPLAC/DEPEA, 1985. p.46-56. (Informe de Pesquisa).

ANDEBRHAN, T. Rain water as a factor in the dissemination of basidiospores of *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer within cacao tree. In: INTERNATIONAL COCOA CONFERENCE, 10., 1988, Santo Domingo. **Proceedings...** Lagos, Nigéria, Cocoa Producer's Alliance 1988. p.367-369.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. The Linnean Society of London. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.141, p.399-436, 2003.

ASSOCIAÇÃO COMERCIAL DA BAHIA. Comissão do Comércio do Cacau da Bahia. **Boletins de comercialização de cacau da Bahia, 1958-2007**. Salvador, 2007.

BAKER, R.E.D.; HOLLIDAY, P. Witches' broom disease of cacao (*Marasmius perniciosus* (Stahel). Commonwealth Mycological Institute, Richmond. **Phytopathology Papers**, v.2, p.42. 1957.

BASTOS, C.N. **Epifitiologia, hospedeiro e controle da vassoura-de-bruxa *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer**. Ilhéus, BA: CEPLAC/CEPEC, 1990. 21 p. (CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico, 168).

BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.441-443, Sept. 1997.

BASTOS, C.N.; ALBUQUERQUE, P.S.B. **Doenças fúngicas do cacauero na Amazônia Brasileira**. Belém, PA: CEPLAC/ Superintendência da Amazônia Oriental, 2006.

BASTOS, C. N.; ANDEBRHAN, T. Urucu (*Bixa orellana*): nova espécie hospedeira de vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 4, p. 963-965, dez. 1986.

BASTOS, C.N.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S. Atividade fungicida do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* para *Crinipellis perniciosa* isolado do cacauero. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA-MANEJO INTEGRADO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 36, 2003, Uberlândia. **Resumos...** Uberlândia, Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2003. CD-Room.

BASTOS, C.N.; EVANS, H.C. A new pathotype of *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. **Plant Pathology**, Oxford, v.34, p.306-312, 1985.

BASTOS, C.N.; FONSECA, S.E.A.; MELO, W.F. *Mascagnia cf sepium*, cipó nativo da Amazônia brasileira hospedeiro de *Crinipellis perniciosa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.504, 1998.

BASTOS, C.N.; SILVA, S.D.V.M.; ALMEIDA, O.C. Ocorrência de vassoura-de-bruxa em solanácea silvestre na região produtora de cacau da Bahia. **Agrotropica**, Ilhéus, v.3, p.109-110, 1991.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S. et al. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.81-124.

CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; CARVALHO, C.P.S.; SILVEIRA, J.A.G.; OLIVEIRA, J.T.A. Induced defence responses and protective effects on tomato against *Xanthomonas vesicatoria* by an aqueous extract from *Solanum lycocarpum* infected with *Crinipellis pernicioso*. **Biological Control**, v.39, p. 408-417, 2006.

CIBA TECHNICAL DATA SHEET. **CGA 245704**: a plant activator for disease protection. Basel, 1995. 9p.

COHEN, Y. Induced resistance against fungal diseases by aminobutyric acids. In: LYR, H.; RUSSEL, P.E.; SISLER, H.D. (Ed.). **Modern fungicides and antifungal compounds**. Andover: Intercept, 1996. p.461-466.

CORNELISSEN, B.J.C.; MELCHERS, L.S. Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, p.709-712, 1993.

COSTA, J.C.B.; MAFFIA, L.A.; ANDEBRHAN, T.; CARVALHO, A.L.P. Produção de basidiomas de *Crinipellis pernicioso* em diferentes fontes de inóculo na região Amazônica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, p.507-512, 1997.

DANTAS, S.A.F.; OLIVEIRA, S.M.A.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R.S.B.; SILVA, R.L.X. da. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, v.30, p.314-319, 2004.

EVANS, H.C. Witches' broom disease of Cocoa (*Crinipellis pernicioso*) in Ecuador. I. The Fungus. **Annals of Applied Biology**, v.89, p.185-192, 1978.

EVANS, H.C. Witches' broom disease. A case study. **Cocoa Growers' Bulletin**, v.32, p.5-9, 1981.

FAZENDA ARIZONA. **AgroMos 2000** – Entendendo o modo de ação.
Disponível em: <<http://www.fazendaarizona.com/textos/agromos2000.htm>>. Acesso em: 27 jan. 2008.

GRIFFITH, G.W. Witches' brooms and frosty pods: threats to world cacao production. **The Biologist**, v.51, p.71-75, 2004.

HAMMERSCHMIDT, D.; KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology**, London, v.20, n.1, p.61-71, 1982.

HAMMERSCHMIDT, R.; SMITH-BECKER, J.A. The role of salicylic acid in disease resistance. In: AGRAWAL, A.A.; TUZUN, S.; BENT, E. (Ed.). **Induced plant defenses against pathogens and herbivores: biochemistry, ecology and agriculture**. Saint Paul: APS, 1999. p.37-53.

HOLLIDAY, P. **Witches' broom of cacao (*Marasmius perniciosus* Stahel)**. London: H.M. Stationery Office, 1952.

HOLLIDAY, P. ***Crinipellis perniciososa*. CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria**. Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 1970. 233p.

JOHNSTON, T.; REIS, R.F.; TIMMER, L.W. **Evaluation of products for control of alternaria brown spot on murcott tangor**. Florida: IFAS, 2005. 3p. (Boletim Técnico).

KOLATTUKUDY, P.E.; MOHAN, R.; BAJAR, M.A.; SHERF, B.A. Plant peroxidase gene expression and function. **Biochemical Society Transactions**, v.20, p.333-337, 1992.

KNIGHT, S.C.; ANTHONY, V.M.; BRADY, A.M.; GREENLAND, A.J.; HEANEY, MURRAY, D.C.; POWELL, K.A.; SCHULTZ, M.A.; SPINKS, C.A.; WORTHINGTON, P.A.; YOULE, D. Rationale and perspectives on the development of fungicides. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.349-372, 1997.

LUZ, E.D.M.N.; BEZERRA, J.L.; RESENDE, M.L.V.; OLIVEIRA, M.L. de. Cacao (*Theobroma cacao* L.) - controle de doenças. In: VALLE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 1997. v.2, p.611-655.

LUZ, E.D.M.N.; MACHADO, R.C.R.; ALMEIDA, H.A. Períodos de incubação, secamento de vassouras, produção de basidioma e atividades de *Crinipellis pernicioso* em ramos e frutos de cacauzeiros na Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, p.341, 1994. Suplemento. Resumo.

LUZ E.D.M.N.; SOUZA, J.T.; OLIVEIRA, M.L.; BEZERRA, J.L.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Vassoura-de-bruxa do cacauzeiro: novos enfoques sobre uma velha doença. **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo, v.14, p.59-111, 2006.

MAUCH, F; STAEBELIN, L.A. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. **Plant Cell**, Baltimore, v.1, p. 447-457, 1989.

MESQUITA, L.X.; SALES-JÚNIOR, R.; NASCIMENTO, M.T.; CORREIA, K.C.; FREITAS, L.S.; FERREIRA, H.A. Efeito de diferentes elicitores no controle do oídio do meloeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, p.103, 2005. Suplemento. Resumo.

MING, L.C. Coleta de plantas medicinais. In: DI STASI, L.C. (Ed.). **Plantas medicinais: arte e ciências – guia de estudos multidisciplinares**. São Paulo: Universidade Paulista, 1996. p.69-86.

MISAGHI, I.J. Induced resistance. In: MISAGHI I.J. (Ed.). **Physiology and biochemistry of plant – pathogen interactions**. Tucson, AZ: University of Arizona, 1982. p.183-187.

MONTEIRO, W.R.; AHNERT, D. Melhoramento genético do cacauzeiro. In: VALLE, R.R. **Ciência, tecnologia e manejo do cacauzeiro**. Itabuna BA: Vital, 2007. p.189-198.

MORAES, M.G. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.6, p.261-284, 1998.

NOJOSA, G. B. A.; RESENDE, M.L.V.; AGUILAR, M.A.G.; BEZERRA, K.M.T.; ANHERT, D.E. Componentes fenólicos e enzimas oxidativas em clones de *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia brasileira**. Brasília, v. 28; n. 2; p. 148-154, 2003.

OKABE, E.T.; ALMEIDA, C.M.V.C.; ALMEIDA, L.C.; DIAS, L.A.S. Desempenho de clones de cacauzeiro em Ouro Preto do Oeste, Rondônia, Brasil. **Bioscience Journal**, v.20, p.113-143, 2004.

OLIVEIRA, E.P.; COELHO, R.S.B.; MICHEREFF, S.J. Controle alternativo da ramulose do algodoeiro pelo uso de indutores de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30. p.90, 2005. Suplemento. Resumo.

OLIVEIRA, M.L.; LUZ, E.D.M.N. Identificação e manejo das principais doenças do cacaueteiro no Brasil. In: VALLE, R.R. (Ed.). **Ciência, tecnologia e manejo do cacaueteiro**. Itabuna, BA: Vital, 2007. p.123-188.

OLIVEIRA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Papilla formation and peroxidase activity in *Mimosa scabrella* hypocotyls inoculated with the non-pathogen *Colletotrichum graminicola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.195-197, jun. 1997.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap.22, p.417-454.

PENG, M.; KUC, J. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. **Phytopathology**, v. 82, p. 696-698, 1992.

PEREIRA, J.L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J.M.; ALMEIDA, L.C.C. Primeira ocorrência da vassoura-de-bruxa na principal região produtora do Brasil. **Agrotropica**, Ilhéus, v.1, p.79-81, 1989.

PEREIRA, R.B.; ZACCARONI, A.B.; RIBEIRO JUNIOR, P.M.; CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L. Produtos comerciais e extratos naturais no controle da mancha bacteriana causada por *Xanthomona campestris* pv. *visicatoria* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.260, ago. 2004. Suplemento.

PONSTEIN, A.S.; BRES-VLOEMANS, S.A.; SELA-BUURLAGE, M.B.; VAN DEN ELZEN, P.J.; MELCHERS, L.S.; CORNELISSEN, B.J. A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. **Plant Physiology**, v.104, n.1, p.109-118, 1994.

PURDY, L.H.; SCHMIDT, R.A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. **Annual Review of Phytopathology**, v.34, p.573-594, 1996.

QUALITY BAKERY & CATERING SERVICES. Quarterly bulletin of cocoa statistics. London: ICCO, 2006/07. n.33:2.

RESENDE, M.L.V.; ARAÚJO, D.V.; COSTA, J.C.B.; DEUNER, C.C.; FERREIRA, J.B.; MUNIZ, M.F.; REIS, S.N.; MIRANDA, J.C.; SANTOS, F.S. Produtos comerciais à base de bioindutores de resistência em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.14, p.363-382, 2006.

RESENDE, M.L.V.; BARRETI, P.B.; DIAS, W.P. Percepção, transdução e tradução de sinais para respostas de defesa contra patógenos em plantas. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PATÓGENOS: aplicações no manejo integrado de fitodoenças, 1., 2002, Lavras. Lavras, MG: 2002. p.9-35.

RESENDE, M.L.V.; JUNQUEIRA, N.T.V.; DIANESE, J.C. *Crinipellis pernicioso* causando vassoura-de-bruxa em lobeira, *Solanum lycocarpum* no Distrito Federal e no Estado de Goiás. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22 p.301, 1997. Suplemento. (Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 30, 1997, Poços de Caldas. Resumos).

RESENDE, M.L.V.; NIELLA, G.R.; CARVALHO, G.A.; SILVA, L.H.C.P. Comparação de diferentes técnicas para criopreservação de basidiósporos de *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.266, 1998. Suplemento. Resumo.

RESENDE, M.L.; NOJOSA, G.B.A.; AGUILAR, M.G.; SILVA, L.H.C.P.; NIELLA, G.R.; CARVALHO, G.A.; GIOVANI, G.R.; CASTRO, R.M. *Crinipellis pernicioso* proveniente de um novo hospedeiro, *Heteropteys acutifolia*, é patogênico ao cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.88-91, 2000.

RUDGARD, S.A Interpreting the epidemiology of cocoa which'es' broom for the better disease management in Rondonia, Brasil, **Cocoa Growers' Bulletin**, v. 8, p.28-38, 1987.

RUDGARD, S.A. Detailed description of symptoms of which'es' broom disease of cocoa caused by *Crinipellis pernicioso*. **Cocoa Growers' Bulletin**, v.41, p.1-32. 1989.

SILVA, I.L.S.S. **Produtos sintéticos e naturais na proteção de *Theobroma cacao* L. contra *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer agente etiológico da vassoura-de-bruxa.** 2003. 66p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVA, S.D.V.M.; GRAMACHO, K.P.; ALMEIDA, O.C. *Solanum paniculatum* hospedeiro de *Crinipellis perniciosa* na região sul da Bahia. **Agrotropica**, Ilhéus, v.4, p.17-20, 1992.

SILVA, S.D.V.M.; LUZ, E.D.M.N.; ALMEIDA, O.C.; GRAMACHO, K.P.; BEZERRA, J.L. Redescritção da sintomatologia causada por *Crinipellis perniciosa* em cacauzeiro. **Agrotropica**, Ilhéus, v.14, p.1-24, 2002.

SILVA NETO, P.J. **Sistema de produção de cacau para a Amazônia Brasileira.** Belém, PA: CEPLAC, 2001.

SINGER, R. A monographic study of the genera *Crinipellis* and *Chaetocalathus*. **Lilloa**, v.8, p.441-534, 1942.

SOARES, R.M.; MARINGONI, A.C.; LIMA, G.P.P. Ineficiência de acibenzolar-S-methyl na indução de resistência de feijoeiro à murcha-de-*Curtobacterium*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.373-377, 2004.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.2, n.3, p.240-245, 1992.

STAHEL, G. ***Marasmius perniciosus* nov. spec., the cause of Krulloten disease of cocoa in Suriname.** Paramarimbo: Dept. Van Den Landbouw, 1915. p.1-27. (Bulletin, 33).

STICHER, L.; MAUCH MANI, B.; METRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.35, p.235-270, 1997.

SUTIC, D.D.; SINCLAIR, J.B. **Anatomy and physiology of diseased plants.** Boston: CRC, 1991. 232p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

THOROLD, C.A. **Diseases of cocoa.** Oxford: Clarendon, 1975.

- TOSUN, N. O papel dos ativadores de plantas no controle de doenças em estufas. In: SIMPÓSIO AGRONÔMICO BRASILEIRO, 2005, Curitiba. Curitiba: Improcrop, 2005. 10p.
- TOVAR, G. La escoba de bruja del cacao [*Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer]: descripción de síntomas de la enfermedad. **Agronomia Colombiana**, v.8, p.227-239, 1991.
- VANCE, C.P.; KIRK, T.K.; SHERWOOD, R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Plant Pathology**, v.18, p.259-288, 1980.
- VAN LOON, L.C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, p. 753-765, 1997.
- VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.36, p.453-483, 1998.
- VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85-97, 1999.
- VIDHYASEKARAN, P. Lignin and disease resistance. In: VIDHYASEKARAN, P. (Ed.). **Physiology of disease resistance in plants**. Boca Ratón: CRC, 1988. p.121-135.
- VIDHYASEKARAN, P. **Fungal pathogenesis in plant and crops**. New York: M. Decker, 1997. 553p.
- WOOD, G.R.A.; LASS, R.A. **Cocoa**. 4thed. London: Longman. 1985.

CAPÍTULO 2

Produtos Naturais e Sintéticos na Proteção de Mudas de Cacaueiro Contra *Crinipellis pernicioso*

(Preparado de acordo com as normas da revista “Tropical Plant Pathology”
exceto as citações (NBR 10520) e as referências bibliográficas (NBR 6023)

**João de C. do B. Costa¹, Mário L. V. de Resende², Fabrício R. Camilo²; Ana
Cristina Andrade Monteiro²; Jadir Borges Pinheiro; Moisés A. Pádua²**

¹CEPEC/CEPLAC/MAPA, Seção de Fitopatologia, Cx. Postal 07, CEP 45650-000, Itabuna, BA. e-mail: jbcosta@uolcom.br; ²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG.

(Aceito para publicação em / /)

Autor para correspondência: João de Cássia do Bomfim Costa

COSTA, J. C. B.; RESENDE, M.L.V.; CAMILO, F.R., MONTEIRO, A.C.A; PINHEIRO, J.B.; PÁDUA, M.A. Produtos naturais e sintéticos na proteção de mudas de cacauero contra *Crinipellis pernicioso*. "Tropical Plant Pathology".

RESUMO

Atualmente, o controle da vassoura-de-bruxa exige um manejo integrado da doença, que abrange o controle genético, cultural, químico e biológico. Métodos alternativos, como a busca de resistência induzida e de fungicidas naturais, principalmente à base de extratos vegetais, surgem como opções promissoras, contudo, pesquisas nesse sentido ainda são escassas. Este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar o efeito de produtos naturais e sintéticos na proteção de mudas de cacauero contra *Crinipellis pernicioso*. Como produtos naturais, foram testados extratos vegetais à base de folhas de café suscetível e resistente à ferrugem e casca de fruto de cacau suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa, bem como de produtos sintéticos à base de mananoligossacarídeo fosforilado (Agro-Mos[®]), com duas formulações (com e sem Cu⁺⁺ e Zn⁺⁺), comparativamente à testemunha inoculada e ao Recop[®] (oxicloreto de cobre) - protetor convencional. Os extratos vegetais não apresentaram efeito de proteção sobre as mudas de cacauero contra *C. pernicioso*, entretanto, o Agro-Mos[®] apresentou o mesmo efeito de redução da incidência da vassoura-de-bruxa que o Recop[®], independente das doses testadas. A ineficiência do Agro-Mos[®] Experimental, possivelmente, é atribuída à ausência do componente cobre e zinco na formulação.

Palavras-chave adicionais: *Theobroma cacao*, *Crinipellis pernicioso*, extratos vegetais, controle alternativo.

ABSTRACT

Natural and Synthetic Products on the Protection of Cocoa Seedlings Against *Crinipellis pernicios*. "Tropical Plant Pathology".

Currently, the control of witch's broom disease needs the adoption of the integrated disease management, which includes the genetic, cultural, chemical and biological methods. Alternative methods such as induced resistance and natural fungicides, mainly produced from plant extracts, are promising, although research on this area is sparing. The objective in the present study was to verify the effect of natural and synthetic products on the protection of cocoa seedlings against *Crinipellis pernicios*. As natural products, plant extract based on coffee leaves obtained from rust susceptible and resistant coffee trees, and from the peel of cocoa fruits obtained from witch's broom susceptible and resistant cocoa trees were tested. Synthetic products were based on phosphorilated mananoligosacharide (Agro-Mos[®]) with two formulations (with and without Cu⁺⁺ and Zn⁺⁺) and Recop[®] (copper oxichoride), a conventional protective fungicide were also tested. The treatments were compared with an inoculated-only control treatment. The plant extracts were not efficient on the protection of cocoa seedlings against *C. pernicios*, however the Agro-Mos[®] treatment showed the same effect on the reduction of witch's broom disease incidence as observed for the treatment with Recop[®], in all tested doses. The inefficiency of the Experimental Agro-Mos[®] is likely to be due to the absence of a copper component in the formulation.

Additional keywords: *Theobroma cacao*, *Crinipellis pernicios*, plant extracts, alternative control.

INTRODUÇÃO

A vassoura-de-bruxa é a principal doença do cacaueteiro no Brasil, causando perdas de até 90% da produção. Esta doença é causada pelo agente etiológico *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, fungo que ataca, principalmente, os tecidos meristemáticos em crescimento, com sintomas característicos de desequilíbrio hormonal na interação patógeno-hospedeiro (Bastos,1990).

As medidas recomendadas para o controle da vassoura-de-bruxa estão inseridas no manejo integrado da doença, adotando-se métodos de controle genético, cultural, químico e biológico. Métodos alternativos mais recentes incluem a resistência induzida e a busca de fungicidas naturais, principalmente à base de extratos vegetais.

O Agro-Mos[®] é um mananoligossacarídeo fosforilado derivado da parede da levedura *Saccharomyces cerevisiae* 1026 (Hansen) Improcrop Brasil, Curitiba, PR, e apresenta eficiência no controle de doenças de outras fruteiras, como mamoeiro (Dantas et al., 2004), goiabeira (Soares Pessoa et al., 2007) e videira (Rosa et al., 2007; Gomes et al., 2007). Extratos aquosos de folhas de café suscetível e resistente a *Hemileia vastatrix* Berk et Br. são ricos em compostos eliciadores, como componentes da parede celular da planta ou do patógeno e também demonstraram boa performance em experimentos realizados com *H. vastatrix*, *Cercospora coffeicola* e *Phoma tarda* em cafeeiro (Amaral, 2005; Santos et al., 2007). Da mesma forma, acredita-se que cascas de frutos de cacaueteiro, material disponível e abundante nas regiões de cultivo, poderiam ser aproveitadas como possíveis fontes de proteção contra a vassoura-de-bruxa.

Pesquisas para a seleção de produtos sintéticos e naturais para a proteção do cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa ainda são escassos, mas promissores,

despertando a necessidade da busca de novos produtos (Bastos, 1997; Bastos et al., 2003; Silva, 2003).

Objetivou-se, com a realização deste trabalho, verificar o efeito de extratos vegetais à base de folhas de cafeeiro suscetível e resistente à ferrugem e de casca de fruto de cacau suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa, bem como de produtos à base de mananoligossacarídeo fosforilado (Agro-Mos[®]), em duas formulações (com e sem Cu⁺⁺ e Zn⁺⁺), na proteção de mudas de cacau contra *Crinipellis perniciosa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de crescimento em casa-de-vegetação

Sementes de cacau da cultivar Catongo, provenientes do Centro de Pesquisas do Cacau e da Estação Experimental Filogônio Peixoto (CEPLAC/MAPA), foram distribuídas em bandejas de isopor com 72 células contendo o substrato Plantmax[®] Hortaliças (HT). As mudas produzidas foram adubadas semanalmente, com adubo foliar Yogen[®] (10 g L⁻¹) intercalado com Dacafé Sul de Minas[®] (10 mL L⁻¹) e mantidas em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), com temperatura de 25±3 °C e umidade relativa do ar em torno de 90 %, controladas por meio de um sistema automatizado de nebulização.

Produção do inóculo de *C. perniciosa* e inoculação das mudas de cacau

O inóculo foi obtido no Laboratório de Fitopatologia Molecular da CEPLAC, Ilhéus, BA, a partir de ramos infectados (vassouras secas) coletados no biênio 2005-2006. Para a produção dos basidiomas, essas vassouras foram mantidas em câmara, sob regime de nebulização periódica, denominada de vassoureiro. A partir dos basidiomas produzidos, foram coletados os

basidiósporos em solução de glicerol 16 %, conforme Frias et al. (1995) e armazenados em nitrogênio líquido, para uso posterior. As inoculações foram realizadas sete dias após a pulverização dos tratamentos, executadas ao final da tarde, com a deposição de uma gota da suspensão de basidiósporos na concentração de 1×10^5 basidiósporos viáveis mL^{-1} no meristema apical de cada muda com 30 dias de idade. Durante vinte e quatro horas após o processo de inoculação, a umidade relativa do ar foi mantida próximo a 100 %, para favorecer penetração fúngica, mantendo-se gotículas de água livre no ápice de cada muda. A percentagem de germinação (viabilidade) dos basidiósporos foi quantificada antes e depois da inoculação, em lâminas escavadas com três cavidades. Para tal, lâminas contendo a suspensão de basidiósporos foram mantidas em câmara úmida, por 24 horas. Após este período, foram adicionados 30 μL do corante azul de lactofenol em cada cavidade e, posteriormente, foi determinada a percentagem de esporos germinados com amostras de 200 basidiósporos por cavidade (contagem realizada na linha do diâmetro da cavidade, marcada com caneta na parte posterior da lâmina). Foram utilizadas na inoculação suspensões de esporos com viabilidade superior a 80%.

Avaliação de doença

A avaliação da incidência de vassoura-de-bruxa nas mudas de cacauzeiros foi realizada aos 60 dias após a inoculação com *C. pernicioso*, com a percentagem de mudas doentes calculada para cada tratamento.

Delineamento experimental e análises estatísticas

Os experimentos foram instalados em delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições e doze plantas por parcela, totalizando 48 plantas por tratamento. Para o primeiro experimento, efeito de extratos vegetais

na proteção de mudas de cacau cv. Catongo contra *C. pernicioso*, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). No segundo experimento, efeito de produtos sintéticos na proteção de mudas de cacau cv. Catongo contra *C. pernicioso*, foi utilizado esquema fatorial (3 produtos x 3 doses + 2 adicionais: acibenzolar-S-metil (ASM) e testemunha inoculada sem tratamento). Os dados coletados foram submetidos à análise de variância e testes de médias, utilizando-se os testes de Tukey e de Dunnett ($P \leq 0,05$).

Experimento 1. Efeito de extratos vegetais na proteção de mudas de cacau cv. Catongo contra *C. pernicioso*

Os extratos vegetais foram processados no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, no DFP/UFLA. Para isso, 100 g (massa seca) de tecido vegetal moído foram adicionados a um litro de água destilada (10 % p/v). O processo de extração ocorreu pelo aquecimento do material na temperatura de ebulição da água, por duas horas, em condensador de refluxo. Logo após, a mistura foi filtrada a vácuo e armazenada em congelador, a -20 °C.

Folhas de cafeeiro suscetível e resistente à ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.), são ricas em compostos eliciadores, alguns deles certamente derivados da parede celular da planta ou do fungo. Formulação à base de extratos de folhas de café foi objeto de pedido de patente por parte do grupo de pesquisa em interação planta-patógeno da UFLA (INPI, Privilégio de Inovação PI 0603575-2, FORMULAÇÃO PARA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA. 02 de agosto de 2006). Além disso, incluíram-se no experimento extratos aquosos de casca de fruto de cacau suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa.

Neste experimento, foram utilizados os seguintes tratamentos: extrato aquoso de casca de fruto de cacau resistente (EACFCR) a 10 %; extrato aquoso

de casca de fruto de cacau suscetível (EACFCS) a 10 %; extrato aquoso de folha de café resistente (EAFCR) a 10 %; extrato aquoso de folha de café suscetível (EAFCS) a 10 %; testemunha inoculada (mudas não pulverizadas com os tratamentos e inoculadas com *C. pernicioso*); testemunha absoluta (mudas não pulverizadas com indutor e não inoculadas), Recop[®] (produto à base de oxiclureto de cobre, registrado no MAPA sob número 01308704) a 0,3 g L⁻¹ e acibenzolar-S-metil (ASM) (Bion[®] 500WG), produzido pela empresa Syngenta, registro no MAPA número 05801, como ativador de plantas, na dose de 0,2 g L⁻¹. Duzentos e cinquenta mililitros de cada produto foram aplicados, via pulverização foliar, nas 12 mudas de cacauzeiros (4 repetições), 7 e 15 dias antes da inoculação, até o ponto de escorrimento.

Experimento 2. Efeito de produtos sintéticos na proteção de mudas de cacauzeiro cv. Catongo contra *C. pernicioso*

Mudas de cacauzeiro foram tratadas com Agro-Mos[®] (produto comercial à base de um manano-oligossacarídeo fosforilado proveniente da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, registrado no MAPA, sob número PR 08869 10003-9, como fertilizante foliar), utilizado em duas formulações, cedidas pela Improcrop do Brasil Ltda.: 1) produto comercial Agro-Mos[®], nas doses de 2,5 mL L⁻¹; 5,0 mL L⁻¹ e 10,0 mL L⁻¹; 2) Agro-Mos[®] Experimental, produto especialmente formulado sem os elementos Cu⁺⁺ e Zn⁺⁺, nas doses de 2,5 mL L⁻¹; 5,0 mL L⁻¹ e de 10,0 mL L⁻¹; 3) Recop[®], nas doses de 0,15 g L⁻¹; 0,3 g L⁻¹ e 0,6 g L⁻¹; 4) testemunha inoculada (TI) com *C. pernicioso* e não pulverizada com os produtos; 5) testemunha absoluta (sem inoculação e sem pulverização) e 6) ASM, na dose de 0,2 g L⁻¹. Duzentos e cinquenta mililitros de cada produto

foram aplicados, via pulverização foliar, nas 12 mudas de cacauzeiros (4 repetições), 7 e 15 dias antes da inoculação, até o ponto de escorrimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1. Efeito de extratos vegetais na proteção de mudas de cacauzeiro contra *C. pernicioso*

Os extratos vegetais e o ASM não apresentaram efeito de proteção nas mudas de cacauzeiro contra *C. pernicioso*, em relação à testemunha inoculada, mas foi observada diferença significativa entre estes e o Recop[®], considerado como padrão de proteção (Figura 1). Este produto é um fungicida bactericida cúprico com amplo espectro de ação, registrado para o controle de várias doenças, inclusive para a vassoura-de-bruxa do cacauzeiro. Fungicidas deste tipo atuam na formação de uma barreira tóxica capaz de inibir a germinação dos esporos e a penetração de fungos no tecido foliar. O cobre possui vários sítios de ação nas células do fungo, atuando em várias etapas do seu metabolismo (Souza & Dutra, 2003).

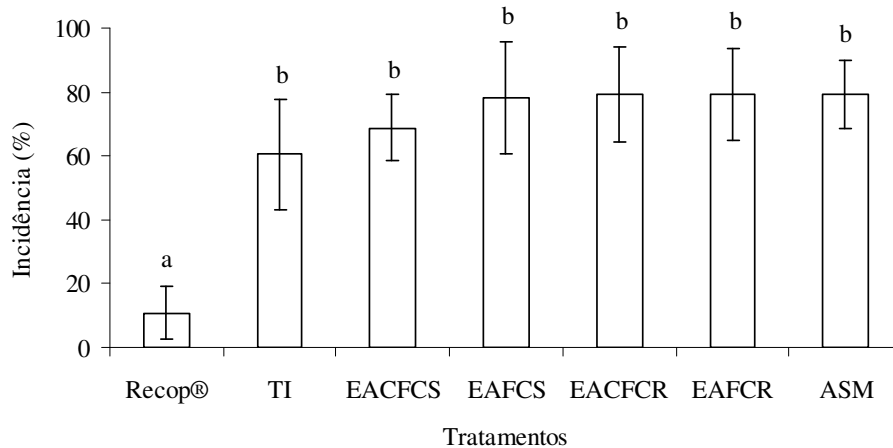


FIG. 1 - Incidência da vassoura-de-bruxa em mudas de cacaueteiro, aos 60 dias após inoculação com *C. perniciosa*, em função dos tratamentos: TI (testemunha inoculada - mudas não pulverizadas com os tratamentos e inoculadas com *C. perniciosa*), Recop® a 0,3 g L⁻¹, EACFCR (extrato aquoso de casca de fruto de cacau resistente) a 10 %, EACFCS (extrato aquoso de casca de fruto de cacau suscetível) a 10 %, EAFCR (extrato aquoso de folha de café resistente) a 10 %, EAFCS (extrato aquoso de folha de café suscetível) a 10% e ASM (Acibenzolar-S-metil) 0,2 g L⁻¹. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (P≤0,05). As barras verticais representam o desvio padrão das médias.

A ausência de efeito protetor dos extratos vegetais testados em cacaueteiro contradiz resultados de pesquisas obtidos em outros patossistemas no cafeeiro (Amaral, 2005; Santos et al., 2007; Costa et al., 2007). Extrato aquosos de folhas de café proporcionou proteção contra *Cercospora coffeicola* com redução de 37 % na área abaixo da curva de progresso da doença, quando comparada à testemunha inoculada (Amaral, 2005). Este mesmo extrato reduziu a infecção causada por *H. vastatrix* em mais de 77 % (Costa et al., 2007). Enquanto, o extrato aquoso de folha de café com ferrugem reduziu a incidência da ferrugem, da cercosporiose e da mancha de Phoma, em relação aos percentuais de doença

observados nas testemunhas pulverizadas com água e Viça-café (Santos et al., 2007).

Extratos vegetais obtidos a partir de tecidos de cafeeiro, testados em comparação com ASM, não apresentaram efeito de proteção contra vassoura-de-bruxa em cacauieiro, provavelmente em decorrência da alta pressão de inóculo. Contudo, extratos provenientes de vassoura-de-lobeira (*Solanum lycocarpum*) proporcionaram proteção semelhante ao tratamento padrão com ASM (Resende et al., 2007). Por outro lado, foi constatada ineficiência do ASM no controle da murcha-de-curtobacterium (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*), em feijoeiro comum (Soares et al., 2004).

Extratos de folhas de cafeeiro têm sido eficazes contra doenças do próprio cafeeiro, revelando que a diferença entre estas respostas e o presente trabalho, possivelmente, encontra-se na especificidade dos patossistemas testados. A eficácia de alguns eliciadores pode ser afetada pela espécie ou até mesmo genótipo da planta, pois há muitos casos em que o eliciador é mais efetivo em algumas espécies do que em outras (Lyon, 2007).

Experimento 2. Efeito de produtos sintéticos na proteção de mudas de cacauieiro contra *C. pernicioso*

Os produtos e as suas respectivas doses não apresentaram interação, entretanto, observou-se efeito isolado para os produtos testados (Figura 2). O Agro-Mos[®] e o Recop[®] não diferiram estatisticamente entre si, com médias de 11,81 % e 2,08 % de incidência, respectivamente, sendo mais eficientes do que o Agro-Mos[®] Experimental (73,99 %) na proteção de mudas de cacauieiro contra *C. pernicioso*. A diferença de resposta entre as duas formulações de Agro-Mos[®] pode ser atribuída à presença dos sulfatos de cobre e zinco na composição do Agro-Mos[®] e à sua ausência no produto experimental.

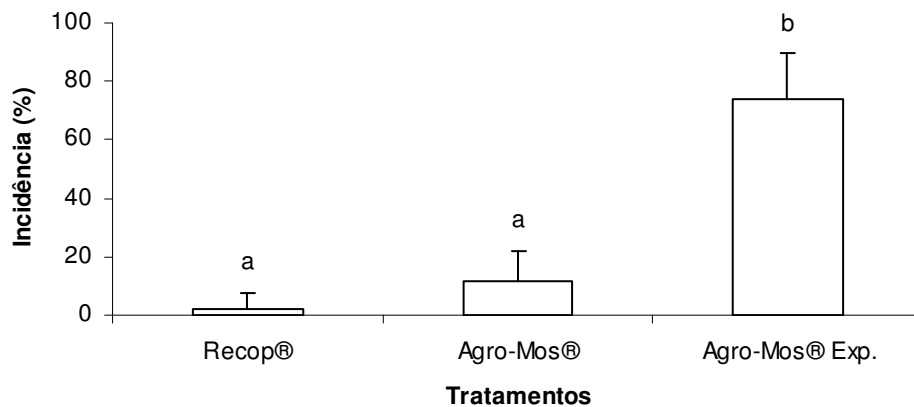


FIG. 2 - Incidência da vassoura-de-bruxa em mudas de cacaueteiro, aos 60 dias após inoculação com *C. perniciosa*, em função dos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). As barras verticais representam o desvio padrão das médias.

O Cu^{++} está envolvido nos processos de fotossíntese, respiração, regulação hormonal, fixação do nitrogênio e no metabolismo de compostos secundários (Malavolta et al., 2006). O nutriente pode ainda atuar como co-fator na síntese de enzimas, inclusive aquelas ligadas à patogênese, com evidência da atuação destas substâncias no processo de defesa das plantas (Marschner, 1995).

O Zn^{++} , por sua vez, está envolvido nos processos de fotossíntese, respiração, sínteses (proteínas, amido) e controle hormonal (Malavolta et al., 2006). Em muitas enzimas, como anidrase carbônica, dismutase de superóxido, juntamente com o cobre e dehidrogenase de álcool, o zinco é exigido no sítio ativo (Fraústo da Silva & Williams, 1991). Superóxido dismutases (SOD's) são consideradas importantes agentes antioxidantes e são enzimas catalisadoras da dismutação do O_2^- e HO_2^+ a H_2O_2 e podem estar ligadas a um metal (Cu/Zn, Mn e Fe). As plantas, normalmente, têm Cu/Zn-SOD no citosol, Cu/Zn e ou Fe-SOD no cloroplasto e Mn-SOD na mitocôndria. Espécies ativas de oxigênio, incluindo

O₂⁻, H₂O₂ e OH⁻, podem afetar potencialmente muitos processos celulares envolvidos nas interações planta/patógeno (Baker & Orlandi, 1995).

O Agro-Mos[®] e o Recop[®] apresentaram o mesmo efeito de redução da incidência da vassoura-de-bruxa em mudas de cacaueteiro, independente das doses testadas (Figura 2).

Em relação à testemunha inoculada com *C. pernicioso* e ao ASM, o Agro-Mos[®] e o Recop[®] apresentaram média de incidência da doença significativamente inferior ($P \leq 0,05$), em todas as doses testadas, confirmando o seu efeito de proteção (Tabela 1).

Pesquisas realizadas com outras fruteiras apresentaram respostas de proteção do Agro-Mos[®] contra doenças. O Agro-Mos[®] associado ao Crop Set[®] reduziu a severidade do míldio da videira em 37,46 %, 35,97 % e 18,57 %, nas áreas estudadas de São Vicente Férrer (PE), Natuba (PB) e Macaparana (PE), respectivamente (Rosa et al., 2007). O tratamento com Agro-Mos[®] também foi eficiente no controle da antracnose do mamoeiro, com reduções de cerca de 70% na incidência da doença com níveis mais elevados nos tratamentos pós-colheita (Dantas et al., 2004). Resultados semelhantes foram obtidos no patossistema goiaba x *Colletotrichum gloeosporioides*, tendo sido verificada menor severidade da antracnose nos frutos tratados com Agro-Mos[®] (Soares Pessoa et al., 2007). O fungo *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen, do qual o produto Agro-Mos[®] é derivado, também apresentou bom desempenho no campo para o controle de antracnose e da mancha-foliar em sorgo (Piccinin et al., 2005).

TABELA 1 - Efeito do Agro-Mos[®], Agro-Mos[®] Experimental, Recop[®] e ASM e dose na incidência da vassoura-de-bruxa em mudas de cacaueteiro cv. Catongo, aos 60 dias após inoculação com *C. pernicioso*.

Produtos	Doses	Incidência da doença (%)	Testemunha inoculada
Agro-Mos [®]	2,5 mL L ⁻¹	14,6*	70,8
Agro-Mos [®]	5,0 mL L ⁻¹	18,8*	
Agro-Mos [®]	10,0 mL L ⁻¹	2,1*	
Agro-Mos [®] Experimental	2,5 mL L ⁻¹	64,6 ^{ns}	
Agro-Mos [®] Experimental	5,0 mL L ⁻¹	79,2 ^{ns}	
Agro-Mos [®] Experimental	10,0 mL L ⁻¹	78,2 ^{ns}	
Recop [®]	0,15 g L ⁻¹	6,3*	
Recop [®]	0,3 g L ⁻¹	0,0*	
Recop [®]	0,6 g L ⁻¹	0,0*	

Produtos	Doses	Incidência da doença (%)	ASM (0,2 g L ⁻¹)
Agro-Mos [®]	2,5 mL L ⁻¹	14,6*	87,5
Agro-Mos [®]	5,0 mL L ⁻¹	18,8*	
Agro-Mos [®]	10,0 mL L ⁻¹	2,1*	
Agro-Mos [®] Experimental	2,5 mL L ⁻¹	64,6 ^{ns}	
Agro-Mos [®] Experimental	5,0 mL L ⁻¹	79,2 ^{ns}	
Agro-Mos [®] Experimental	10,0 mL L ⁻¹	78,2 ^{ns}	
Recop [®]	0,15 g L ⁻¹	6,3*	
Recop [®]	0,3 g L ⁻¹	0,0*	
Recop [®]	0,6 g L ⁻¹	0,0*	

• = Significativo, pelo teste de Dunnett ($P \leq 0,05$); ^{ns} = não significativo.

Com base nos resultados obtidos e nas condições experimentais adotadas, pode-se inferir que o Agro-Mos[®] e o Recop[®], independente da dose utilizada, apresentaram efeito protetor nas mudas de cacaueteiro contra *C. pernicioso*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, D.R. **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais**. 2005. 96p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BAKER, C.J.; ORLANDI, E.W. Active oxygen in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v.33, p.299-321, 1995.

BASTOS, C.N. Epifitologia, hospedeiro e controle da vassoura-de-bruxa *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. Ilhéus, BA: CEPLAC/CEPEC, 1990. 21p. (CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico 168).

BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.441-443, set. 1997.

BASTOS, C.N.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S. Atividade fungicida do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* para *Crinipellis pernicioso* isolado do cacaueiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA-MANEJO INTEGRADO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 36., 2003, Uberlândia. **Resumos...** Uberlândia, Sociedade Brasileira de Fitopatologia 2003. CD-Room.

COSTA, M.J.N.; ZAMBOLIM, L.; RODRIGUES, F.A. Avaliação de produtos alternativos no controle da ferrugem do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.2, p.150-155, 2007.

DANTAS, S.A .F.; OLIVEIRA, S.M.A.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R.S.B.; SILVA, R.L.X. da. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, v.30, p.314-319, 2004.

FRAÚSTO DA SILVA, J.J.R., WILLIAMS, R.J. P. **The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life**. Oxford, Clarendon Press, 1991. 575p.

FRIAS, G.A.; PURDY, L.H.; SCHMIDT, R.A. An inoculation method for evaluate resistance of cocoa to *Crinipellis pernicioso*. **Plant Disease**, v.79, p.787-791, 1995.

GOMES, E.C.S.; PEREZ, J.O.; BARBOSA, J.; NASCIMENTO, E.F.; MOREIRA, A.N.; CAVALCANTI, L.S.; AGUIAR, I.F. Efeito de indutores de resistência na proteção de uva “Itália” e de vinho “Cabernet Sauvignon” contra oídio e o míldio na vale do São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.S256, 2007. Suplemento.

LYON, G. Agents that can elicit induced resistance. In: WALTER, D.; NEWTON, A.; LYON, G. **Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell, 2007. p.9-30.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. New York: Academic, 1995. 889p.

PICCININ, E.; DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n.1, p.5-9, 2005.

RESENDE, M.L.; COSTA, J.C.B.; CAVALCANTI, F.R.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; CAMILO, F.R. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, p.213-221, 2007.

ROSA, R.C.T. da; COELHO, R.S.B.; TAVARES, S.C.C.H.; CAVALCANTI, V.; BEZERRA, A.L. Efeito de indutores no controle de míldio em *Vitis labrusca*. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.1, p.68-73, 2007.

SANTOS, F.S.; SOUZA, P.E.; RESENDE, M.L.V.; POZZA, E.A.; MIRANDA, J.C.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; MANERBA, F.C. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, p.59-63, 2007.

SILVA, I.L.S.S. **Produtos sintéticos e naturais na proteção de *Theobroma cacao* L. contra *Crinipellis pernicios* (Stahel) Singer agente etiológico da vassoura-de-bruxa**. 2003. 66p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SOARES, R.M.; MARINGONI, A.C.; LIMA, G.P.P. Ineficiência de Acibenzolar-S-Methyl na Indução de Resistência de Feijoeiro Comum à

Murcha-de-Curtobacterium. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.4, p.373-377, 2004.

SOARES PESSOA, W.; LOPES, A.; OLIVEIRA COSTA, V.; OLIVEIRA, S. Efeito do tratamento hidrotérmico associado a indutores de resistência no manejo da antracnose da goiaba em pós-colheita. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.20, n.3, p.129-135, 2007.

SOUZA, P.E.; DUTRA, M.R. **Fungicidas no controle e manejo de doenças de plantas**. Lavras, MG: UFLA, 2003. 174p.

CAPÍTULO 3

Indução de Resistência em Mudanças de Cacaueiro Contra *Crinipellis pernicios* por Produto à Base de Mananoligossacarídeo Fosforilado

(Preparado de acordo com as normas da revista “Tropical Plant Pathology” exceto as citações (NBR 10520) e as referências bibliográficas (NBR 6023))

João de C. do B. Costa¹, Mário L. V. de Resende², Pedro M. Ribeiro Júnior², Fabrício R. Camilo²; Ana Cristina Andrade Monteiro²; Ricardo Borges Pereira²

¹CEPEC/CEPLAC/MAPA, Seção de Fitopatologia, Cx. Postal 07, CEP 45650-000, Itabuna, BA. e-mail: jbcosta@uolcom.br ; ²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG.

(Aceito para publicação em / /)

Autor para correspondência: João de Cássia do Bomfim Costa

COSTA, J. C. B.; RESENDE, M.L.V.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M., CAMILO, F.R., MONTEIRO, A.C.A.; PEREIRA, R.B. Indução de resistência em mudas de cacaueteiro contra *Crinipellis pernicioso* por produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado. “Tropical Plant Pathology”

RESUMO

A proteção do cacaueteiro com o uso de produtos de natureza biótica ou abiótica visando à indução de resistência é uma estratégia importante, que pode ampliar a eficiência de controle da vassoura-de-bruxa. Objetivou-se, com a realização deste trabalho, investigar o efeito de doses e épocas de aplicação de um produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado (Agro-Mos[®]) sobre a proteção de mudas de cacaueteiro contra *C. pernicioso*, bem como a sua toxicidade direta sobre o patógeno e caracterizar alguns mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa da planta. Verificou-se que o Agro-Mos[®] conferiu maior proteção às mudas de cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa em relação ao ASM. O crescimento micelial de *C. pernicioso* *in vitro* foi completamente inibido pelo Agro-Mos[®] e o Recop[®] (oxicloreto de cobre), nos intervalos de 3,6 a 7,0 mL L⁻¹ de solução e 0,1 a 0,2 g L⁻¹, respectivamente. Em plantas tratadas com ASM, Agro-Mos[®] e Agro-Mos[®] Experimental (sem Cu⁺⁺ e Zn⁺⁺), observou-se aumento da atividade de quitinases, β-1,3-glucanases, peroxidases de guaiacol e oxidases de polifenóis, sem alteração do conteúdo de lignina solúvel e fenóis solúveis. A redução da incidência da doença provocada pelo Agro-Mos[®], associada com o seu efeito tóxico *in vitro* e com a ativação de algumas enzimas relacionadas às respostas de defesa da planta, sugere que o Agro-Mos[®] possui efeito de proteção e indução de resistência contra vassoura-de-bruxa em mudas de cacaueteiro.

Palavras-chave adicionais: indução de resistência, *Theobroma cacao*, *Crinipellis pernicioso*, Agro-Mos[®].

ABSTRACT

Induction of resistance in seedlings of cacao against *Crinipellis pernicioso* by a phosphorilated mannanoligosacharide based product.

Protecting cacao crop by using products of biotic and abiotic source, seeking plant resistance induction is an important strategy, which can broaden the effectiveness of cacao witches' broom control. The objective of this work was to investigate the effect of doses and times of application of a mannanoligosacharide based product (Agro-Mos[®]) on cacao seedlings protection against *C. pernicioso*, as well as its direct toxicity to the pathogen and to characterize some biochemical mechanisms involved in plant defense response. It was found that Agro-Mos[®] conferred greater protection for cacao seedlings against witches' broom in relation to ASM. The *in vitro* mycelial growth of *C. pernicioso* was completely inhibited by Agro-Mos[®] and Recop[®] (copper oxichoride) at intervals of 3.6 to 7.0 mL L⁻¹ solution, and 0.1 to 0.2 g L⁻¹, respectively. There was increased activity of chitinases, β -1,3-glucanases, guaiacol peroxidases, polyphenol oxidases, without changes at the content of soluble lignin and total soluble phenolics in plants treated with ASM, Agro-Mos[®] or Experimental Agro-Mos[®]. The disease incidence reduction caused by Agro-Mos[®], associated with its *in vitro* toxic effect and the activation of some enzymes related to plant defense response, shows that Agro-Mos[®], possibly, is working on the pathogen through a direct effect and is also activating plant defense mechanisms.

Additional keywords: induction of resistance, *Theobroma cacao*, *Crinipellis pernicioso*, Agro-Mos[®].

INTRODUÇÃO

A vassoura-de-bruxa do cacau (Theobroma cacao L.), causada pelo fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, é um dos principais problemas fitossanitários da cacauicultura mundial. Na Bahia, região responsável por 70% da produção nacional de cacau, esta doença é o principal fator do declínio na produção.

Esse patógeno infecta os tecidos meristemáticos em desenvolvimento: brotos vegetativos, almofadas florais e frutos, provocando sintomas característicos da doença com hipertrofia dos tecidos infectados e tornando os frutos imprestáveis para o consumo. Ele foi o responsável por um desastre sócio-econômico, evidenciado pelo fechamento de fazendas de cacau, queda vertiginosa do preço das terras, falência geral do comércio e derrubada dos remanescentes da Mata Atlântica.

Apesar da existência de várias medidas para o manejo integrado dessa doença, esforços são necessários visando à busca de novos métodos para ampliar a eficiência de controle da vassoura-de-bruxa. Neste contexto, a proteção das plantas com o uso de produtos naturais à base de extratos vegetais, bem como a indução de resistência com produtos de natureza biótica ou abiótica, é uma estratégia importante que pode apresentar maior eficácia, estabilidade e menor impacto ao ambiente. Também é capaz de propiciar melhora na produtividade agrícola, com a redução de perdas e, até mesmo, de incrementos no desenvolvimento vegetativo (Resende et al., 2006).

A resistência induzida (RI) em plantas pode ser ativada por uma série de substâncias, evitando ou atrasando a entrada ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos, por meio de mecanismos de defesa próprios (Athayde Sobrinho et al., 2005; Nojosa et al., 2005). Vários agentes podem induzir a

produção de “sinais” no tecido vegetal, disparando reações para proteção contra fitopatógenos. A percepção do sinal se dá quando moléculas do agente indutor se ligam a moléculas receptoras situadas, provavelmente, na membrana plasmática da célula vegetal. Essas reações desencadeiam a ativação de vários mecanismos de defesa (Resende et al., 2002 a, b).

A indução de resistência ocorre pela ativação de genes que codificam uma série de PRP's e enzimas envolvidas na síntese de fitoalexinas e lignina (Vidhyasekaran, 1988; Van Loon, 1997; Moraes, 1998; Resende et al., 2002a). A detecção e a quantificação da expressão de genes que levam a essas substâncias seriam formas de separar o efeito indutor de resistência do efeito tóxico direto de determinado produto sobre o patógeno. As PRP's incluem famílias de proteínas com características variadas, como quitinases, β -1,3-glucanases, lisozimas, peroxidases e osmotinas, dentre outras, mas, com o fato em comum de estarem todas relacionadas aos processos de defesa durante a patogênese, apresentando, dessa forma, potencial para serem exploradas na indução de proteção em plantas (Van Loon & Van Strien, 1999).

Avanços nas pesquisas envolvendo RI em plantas vêm sendo acompanhados pelo surgimento de novos produtos comerciais (Resende et al., 2006). O produto Agro-Mos[®], constituído à base de um mananoligossacarídeo fosforilado proveniente da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* 1026 (Hansen), está registrado no MAPA como fertilizante foliar. Entretanto, tem sido amplamente pesquisado na proteção da videira contra o míldio (*Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.) Curt. & de Toni.) e oídio (*Uncinula necator* (Schwein.) Burrill) (Gomes et al., 2007; Resende et al., 2006; Rosa et al., 2007) da goiabeira contra antracnose [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.], em pós-colheita (Soares Pessoa et al., 2007) e como indutor de resistência. Já foi demonstrada sua eficiência no controle da antracnose do

mamoeiro causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., proporcionando reduções na incidência da doença em torno de 70%, com níveis mais elevados nos tratamentos pós-colheita, coincidindo com o aumento da atividade da β -1,3-glucanases (Dantas et al., 2004).

No presente trabalho foi investigado o efeito de doses e de épocas de aplicação de um produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado sobre a proteção de mudas de cacauero contra *C. pernicioso*, bem como a toxidez direta deste produto sobre o patógeno e a caracterização de mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa com base na atividade das enzimas peroxidases de guaicol, oxidases de polifenóis, quitinases, β -1,3-glucanases, além da lignina solúvel e fenóis solúveis totais.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de crescimento em casa de vegetação

Sementes de cacau da cultivar Catongo, provenientes do Centro de Pesquisas do Cacau e da Estação Experimental Filogônio Peixoto (CEPLAC/MAPA), foram distribuídas em bandejas de isopor com 72 células contendo o substrato Plantmax[®] Hortaliças (HT). As mudas produzidas foram adubadas semanalmente com adubo foliar Yogen[®] (10 g L⁻¹), intercalado com Dacafé Sul de Minas[®] (10 mL L⁻¹) e mantidas em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), com temperatura de 25±3 °C e umidade relativa do ar em torno de 90 %, controladas por meio de um sistema automatizado de nebulização.

Produção do inóculo de *C. pernicioso* e inoculação das mudas de cacaueteiro

O inóculo foi obtido no Laboratório de Fitopatologia Molecular da CEPLAC, Ilhéus, BA, a partir de ramos infectados (vassouras secas) coletadas no biênio 2005-2006. Para a produção dos basidiomas, essas vassouras foram mantidas em câmara sob regime de nebulização periódica, denominada de vassoueteiro. A partir dos basidiomas produzidos foram coletados os basidiósporos em solução de glicerol 16 %, conforme Frias et al. (1995) e armazenados em nitrogênio líquido, para uso posterior. As inoculações foram realizadas sete dias após a pulverização dos tratamentos, executadas ao final da tarde, com a deposição de uma gota da suspensão de basidiósporos na concentração de 1×10^5 basidiósporos viáveis mL^{-1} no meristema apical de cada muda com 30 dias de idade. Durante 24 horas após o processo de inoculação, a umidade relativa do ar foi mantida próxima a 100 %, para favorecer a penetração fúngica, mantendo-se gotículas de água livre no ápice de cada muda. A percentagem de germinação (viabilidade) dos basidiósporos foi quantificada antes e depois da inoculação, em lâminas escavadas com três cavidades. Para tal, lâminas contendo a suspensão de basidiósporos foram mantidas em câmara úmida por 24 horas. Após este período, foram adicionados 30 μL do corante azul de lactofenol em cada cavidade e, posteriormente, foi determinada a percentagem de esporos germinados, com amostras de 200 basidiósporos por cavidade (contagem realizada na linha do diâmetro da cavidade, marcada com caneta na parte posterior da lâmina). Foram utilizadas, na inoculação, suspensões de esporos com viabilidade superior a 80 %.

Experimentos realizados

Experimento 1. Proteção de mudas de cacaueteiro contra *C. pernicioso* por mananoligossacarídeo fosforilado em função de doses e épocas de aplicação

Neste experimento foi utilizado o produto comercial Agro-Mos[®], à base de um mananoligossacarídeo fosforilado proveniente da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e de um biocomplexo de cobre e zinco, produzido pela empresa Improcrop[®] do Brasil Ltda, registrado no MAPA sob número PR 08869 10003-9 como fertilizante foliar.

Os tratamentos testados foram: 1) Agro-Mos[®], nas doses de 2,5; 5,0 e 10,0 mL L⁻¹; 2) acibenzolar-S-metil (ASM) (Bion[®] 500WG), produzido pela empresa Syngenta, registro no MAPA número 05801 como ativador de plantas, nas doses de 0,1; 0,2 e 0,4 g L⁻¹; 3) testemunha inoculada com *C. pernicioso* e 4) testemunha absoluta (plantas pulverizadas somente com água) .

Duzentos e cinquenta mililitros de cada produto foram aplicados, via pulverização foliar, nas 12 mudas de cacaueteiros (4 repetições), 7 e 15 dias antes da inoculação, até o ponto de escoamento.

Avaliação de doença

Foi realizada avaliação da incidência de vassoura-de-bruxa nas mudas aos 60 dias após as inoculações. A percentagem de mudas doentes foi, então, calculada para cada tratamento.

Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi conduzido no delineamento de blocos casualizados, com 4 repetições, sendo utilizadas 12 plantas por parcela, totalizando 48 plantas por tratamento, em esquema fatorial (2 produtos x 3 doses x 2 épocas + 2

adicionais: testemunha inoculada com 7 dias e testemunha inoculada com 15 dias). Os dados coletados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelos testes de Tukey e Dunnett ($P \leq 0,05$).

Experimento 2. Toxicidade direta de produtos contendo mananoligossacarídeo fosforilado com e sem cobre e zinco sobre *C. pernicioso*

Utilizaram-se os produtos: 1) produto comercial Agro-Mos[®] e 2) Agro-Mos[®] Experimental, produto especialmente formulado sem os elementos Cu^{++} e Zn^{++} , cedidos pelo próprio fabricante.

O teste de crescimento micelial foi conduzido em placa de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), ao qual foram adicionados os seguintes tratamentos: 1) Agro-Mos[®], nas doses de 0; 0,8906; 1,7813; 3,5625; 7,1250; 14,2500; 28,5000 e 57,0000 mL L⁻¹ de produto (doses equivalentes a 0; 26,7; 53,4; 106,8; 213,6; 427,2; 854,4; 1708,8 ppm de Cu^{++} , respectivamente); 2) Agro-Mos[®] Experimental nas doses de: 0; 0,8906; 1,7813; 3,5625; 7,1250; 14,2500; 28,5000 e 57,0000 mL L⁻¹ de produto; 3) Recop[®] nas doses de 0; 0,0554; 0,1107; 0,2214; 0,4429; 0,8857; 1,7714 e 3,5429 g L⁻¹ (doses equivalentes a 0; 26,7; 53,4; 106,8; 213,6; 427,2; 854,4; 1708,8 ppm de Cu^{++} , respectivamente); 4) ASM nas doses de: 0; 0,0010; 0,0100; 0,0500; 0,1000; 0,5000; 1,0000 e 2,0000 g L⁻¹ (doses equivalentes a 0, 1, 10, 50, 100, 500, 1000 e 2000 ppm, respectivamente) e 5) Testemunha absoluta, representada pelo meio de cultura puro, sem aplicação de produto.

Foram depositados, no centro de cada placa, discos de 6 mm do micélio do fungo *C. pernicioso*, retirados da margem da colônia em crescimento. As placas foram mantidas a 25 ± 1 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. O crescimento do diâmetro micelial correspondente à média de duas medidas diametralmente opostas da colônia fúngica foi medido a cada 2 dias, até que a colônia crescida

na testemunha absoluta ocupasse toda a placa, para o cálculo do índice de crescimento micelial (ICM), adaptado da fórmula proposta por Maguire (1962):

$$\text{ICM} = \frac{C_1}{N_1} + \frac{C_2}{N_2} + \dots + \frac{C_n}{N_n}, \text{ sendo:}$$

C_1 , C_2 e C_n = diâmetro da colônia (mm) do crescimento micelial do fungo, na primeira, segunda e última avaliação (C_n);

N_1 , N_2 e N_n = número de dias após a inoculação.

Além disso, foram calculadas:

a) porcentagem de inibição do crescimento micelial por meio da fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{crescim. test.} - \text{crescim. trat.})}{\text{crescim. test.}} \times 100;$$

b) concentração mínima inibitória (CMI), que é o intervalo entre concentrações do produto testado, capaz de inibir totalmente o crescimento micelial do fungo;

c) DL_{50} , que é a concentração de ingredientes ativo capaz de inibir 50% do crescimento micelial.

Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 8 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância e análise de regressão.

Experimento 3. Caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa de mudas de cacauzeiros tratadas com Agro-Mos[®], Agro-Mos[®] Experimental e ASM

Neste experimento, foram avaliadas as atividades das enzimas peroxidases de guaicol (POX; EC 1.11.1.7), oxidases de polifenóis (PPO; EC 1.10.3.2), quitinases (CHI; EC 3.2.1.14), β -1,3-glucanases (GLU; EC 3.2.1.6), proteínas totais, lignina solúvel e fenóis solúveis totais nos seguintes tratamentos: Agro-Mos[®] (10 mL L⁻¹), Agro-Mos[®] Experimental (10 mL L⁻¹) e ASM (0,2 g L⁻¹) inoculados e não inoculados com *C. perniciosa*, além de duas testemunhas: uma inoculada com *C. perniciosa* e não pulverizada com os tratamentos e outra absoluta (plantas pulverizadas somente com água).

Determinações bioquímicas

Preparo de extratos foliares para a avaliação de proteínas totais e atividade de peroxidases de guaiacol, oxidases de polifenóis, quitinases e β -1,3-glucanases

Cada amostra coletada ao final da tarde, na região próxima ao meristema apical, foi acondicionada em papel alumínio, identificada, congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80 °C. Para o preparo dos extratos, cada amostra congelada foi pesada (2 g) e triturada em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, adicionou-se o tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, durante 3 minutos (10 mL de tampão para cada grama de amostra) sobre um banho de gelo. Após filtração em pano de trama fina, a solução foi centrifugada a 12.000 g, por 15 minutos e o sobrenadante (usado como fonte enzimática) foi coletado em microtubos

plásticos e armazenado a -80 °C, para posterior análise. Todos os passos foram executados em 0-4 °C.

Proteínas totais

Para a determinação da atividade específica, a concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976), ajustando-se uma curva padrão, determinada previamente com o uso de soluções com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA), correlacionando-se a concentração de proteínas com leituras de absorbância, em espectrofotômetro a 595 nm.

Peroxidasas de guaiacol (POX; EC 1.11.1.7)

A atividade de peroxidases de guaiacol (POX) foi determinada pela adição de 10 µL do extrato enzimático ajustado para 2 mL de uma solução contendo 990 µL de acetato de sódio 50 mM pH 5,2, 500 µL de guaiacol 20 mM e 500 µL peróxido de hidrogênio 60 mM. Após incubação em 30 °C, por 10 minutos, a absorbância foi medida a 480 nm (Urbanek et al., 1991). Uma unidade POX foi expressa como variação de 1 OD₄₈₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{480\text{nm}} \text{ mgP}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

Oxidases de polifenóis (PPO; EC 1.10.3.2)

A atividade de oxidases de polifenóis foi determinada pela adição de 10 µL do extrato enzimático ajustado para 2 mL de uma solução contendo 990 µL de tampão fosfato de potássio pH 6,5, 500 µL de catecol 20 mM e 500 µL de água ultra-pura. Após incubação a 30 °C, por 10 minutos, foi medido o acréscimo da absorbância a 410 nm (Gauillard et al., 1993). A atividade PPO foi expressa pela variação de 1 OD₄₁₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{410\text{nm}} \text{ mgP}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

Quitinases (CHI; EC 3.2.1.14)

Atividade de quitinases foi determinada pela adição de 100µL do extrato enzimático ajustado para 320 µL de uma solução contendo acetato de sódio 50 mM pH 5,2 e 70 µL de CM-Chitin-RBV (2 mg mL⁻¹), um substrato específico para quitinases fornecido por Loewe Biochemica GmbH, em microplacas de 96 cavidades, com volume de 350 µL por cavidade. Após incubação a 35 °C, por 80 minutos, as misturas foram acidificadas com 50 µL de HCl 0,5N, resfriadas em banho de gelo por 10 minutos e centrifugadas, durante 10 minutos, a 1.450 g e 4 °C.

Uma alíquota de 200 µL do sobrenadante de cada amostra foi transferida para uma nova microplaca, para leitura em 492 nm em um leitor EIA-compatível (Wirth & Wolf, 1990). A atividade CHI foi expressa pela variação de 1 OD₄₉₂ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{492nm} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

β-1,3-glucanases (GLU; EC 3.2.1.6)

A atividade da β-1,3-glucanases foi medida seguindo modo análogo ao da quitinase, apenas trocando o substrato para CM-Curdlan-RBB (4 mg mL⁻¹; LOEWE Biochemica GmbH) (Wirth & Wolf, 1990). Para promover ação hidrolítica de β-1,3-glucanase, foi adotado um tempo de incubação de 35 °C, por 80 minutos. Amostras foram submetidas à agitação por 5 segundos e, posteriormente, medidas fotometricamente em filtro de 600 nm de um leitor EIA. A atividade GLU foi expressa pela variação de 1 OD₆₂₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{600nm} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

Preparo de extratos foliares para avaliação de lignina solúvel e fenóis solúveis totais

Amostra de tecidos vegetais da região próxima ao meristema apical foi acondicionada em papel alumínio, devidamente identificada, congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80 °C. Para o preparo dos extratos, cada amostra congelada foi pesada (2 g) e triturada em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 12 horas (liofilizador condensador L101, marca Liobras). Uma alíquota de 30 mg do material liofilizado foi transferida para microtubo de 2 mL e homogeneizada com 1,5 mL de metanol a 80 % e mantida sob agitação, por 15 horas, em agitador rotativo, protegido da luz à temperatura ambiente. A solução foi centrifugada a 12.000 g, por 5 minutos. O sobrenadante (extrato metanólico) foi transferido para novo microtubo, com o qual se realizou a determinação de fenóis solúveis totais, enquanto o resíduo sólido foi utilizado para determinação lignina solúvel.

Determinação de lignina solúvel

Foi adicionado ao resíduo sólido 1,5 mL de metanol 80%, homogeneizado e centrifugado, a 12.000 g, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi secado, a 65 °C, por 15 horas. Posteriormente, acrescentou-se 1,5 mL de solução contendo ácido tioglicólico:HCl 2M (1:10), agitando suavemente os microtubos para hidratar o resíduo, em seguida, mantendo-se em banho-maria, a 100 °C, por 4 horas.

Depois, os microtubos foram centrifugados, a 10.000 g, por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,5 mL de água ultrapura e, novamente, centrifugado, a 10.000 g, por 10 minutos.

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 1,5 mL de NaOH 0,5 M e mantido em agitador rotativo por 15 horas à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada, a 10.000 g, por 10 minutos e o sobrenadante transferido para novo microtubo, ao qual foram

adicionados 200 μL de HCl concentrado, mantido em câmara fria (4 °C) por 4 horas, para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico.

A seguir, a mistura foi centrifugada, a 10.000 g, por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensão em 2 mL de NaOH 0,5 M.

A absorvância desta solução foi determinada a 280 nm e os valores calculados com base na curva de lignina, sendo expresso em μg de lignina solúvel por miligrama de matéria seca (adaptado de Doster & Bostock, 1988).

Determinação de fenóis solúveis totais

Uma alíquota de 150 μL do extrato metanólico foi misturada a 150 μL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25N, por 5 minutos, homogeneizada com 150 μL de Na_2CO_3 1M, por 10 minutos e diluída com 1 mL de água ultrapura, à temperatura ambiente, por uma hora.

Os valores de absorvância desta reação foram determinados a 725 nm em espectrofotômetro e calculados com base na curva de catecol. Os compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente μg de catecol por miligrama de matéria seca (Spanos & Wrolstad, 1990).

Delineamento experimental e análise estatística

Foi utilizado o delineamento experimental de blocos casualizados, com 4 blocos e parcela experimental composta de 3 mudas de cacaueiros cv. Catongo, por parcela em cada coleta. Foram realizadas 12 coletas para análise de proteínas totais, atividade de peroxidases de guaicol, oxidases de polifenóis, quitinases, β -1,3-glucanases (Figura 1) e 5 coletas para análise de lignina solúvel e fenóis solúveis totais (Figura 2).

Foi determinada a área abaixo de curva do progresso da atividade (AACPA) das enzimas estudadas no presente trabalho, antes e depois da inoculação das mudas com *C. perniciosa* (adaptado de Shaner & Finney, 1977). A análise de variância foi realizada pelo teste F. Quando os tratamentos foram diferentes, as médias foram separadas, pelo teste Scott-Knott, com o auxílio do SISVAR, a 5 % de probabilidade.

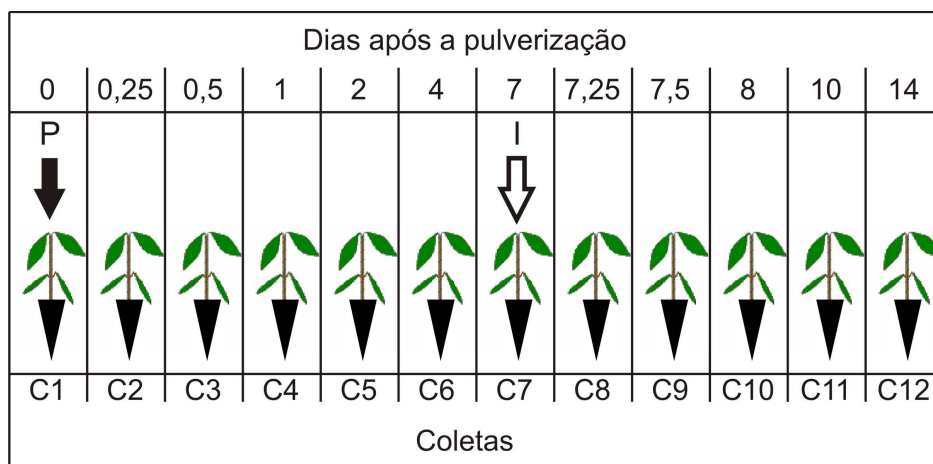


FIG. 1 - Esquema das coletas (C1 a C12) de tecido vegetal das mudas de cacaueteiro cv. Catongo, para análise de proteínas totais, atividade de peroxidase de guaicol, oxidases de polifenóis, quitinases, β -1,3-glucanases. (P) pulverização dos tratamentos e (I) inoculação de *C. perniciosa*.

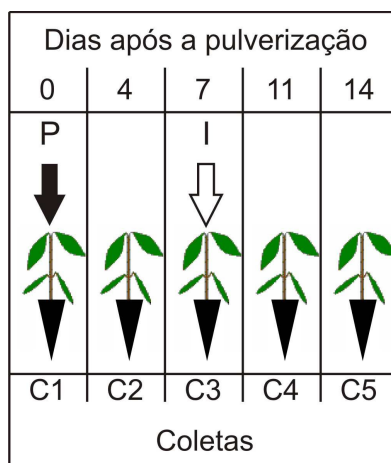


FIG. 2 - Esquema das coletas (C1 a C5) de tecido vegetal das mudas de cacaueteiro cv. Catongo, para análise de lignina solúvel e fenóis solúveis totais. (P) pulverização dos tratamentos e (I) inoculação de *C. pernicioso*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1. Proteção de mudas de cacaueteiro contra *C. pernicioso* por mananoligossacarídeo fosforilado, em função de doses e épocas de aplicação

Embora não tenha ocorrido interação entre dose e época de aplicação, houve diferença significativa entre os produtos testados. Aos 60 dias, o AgroMos[®] proporcionou menor incidência da doença nas mudas de cacaueteiro comparado ao ASM, com médias de 24,6 % e 61,74 %, respectivamente.

Pascholati & Leite (1995) relatam que a proteção induzida é dependente do intervalo de tempo entre o tratamento com o indutor e a subsequente inoculação da planta. Contudo, o período entre a aplicação indutora e a desafiadora difere significativamente entre plantas. Espécies herbáceas como

tomateiro e pepino apresentam respostas de defesas efetivas ativadas em um curto período (3 a 7 dias), quando induzidas pela aplicação de químicos ou por meio da pré-inoculação com patógenos não virulentos (Benhamou & Bélanger, 1998 a;b). Em cacaueteiro, este período parece ser mais longo uma vez que, maior redução na incidência da vassoura-de-bruxa dessa plantas pulverizadas com ASM foi observada aos 30 dias antes da inoculação do patógeno (Resende et al., 2000). Porém, a ineficiência da redução da incidência da vassoura-de-bruxa neste trabalho, provavelmente está relacionada à alta pressão de inóculo do patógeno (100.000 basidiósporos viáveis mL⁻¹). Vale ressaltar, que naturalmente esta condição não é facilmente encontrada. Por outro lado, a aplicação do Agro-Mos[®] 7 dias antes da inoculação com *C. perniciosa* foi suficiente para reduzir a incidência da doença, provavelmente devido ao produto conter em sua formulação o sulfato de cobre, o que promoveu ação inibitória do patógeno e/ou indução de resistência.

Pesquisas realizadas em outros patossistemas comprovaram a eficiência do Agro-Mos[®] na proteção contra doenças. Cerca de 70 % redução da incidência da antracnose do mamoeiro foi obtida com a aplicação de Agro-Mos[®] (Dantas et al., 2004). Resultados semelhantes foram obtidos na redução da severidade da antracnose nos frutos de goiabeira (Soares Pessoa et al., 2007). O Agro-Mos[®] associado ao Crop Set[®] também reduziu a severidade do míldio da videira (Rosa et al., 2007).

O Agro-Mos[®], também aplicado aos 7 dias antes da inoculação, foi eficiente na redução da incidência em qualquer dose, mas, quando aplicado 15 dias antes da inoculação, só reduziu a incidência da vassoura-de-bruxa em mudas de cacaueteiro na maior dose de 10 mL L⁻¹ (Tabela 1).

TABELA 1 - Efeito do Agro-Mos[®] e ASM na incidência da vassoura-de-bruxa em mudas de cacaueteiro cv. Catongo, aos 60 dias após inoculação com *C. pernicioso*.

Produtos	Doses	Época de pulverização (dias)	Incidência da doença (%)
Agro-Mos [®]	2,5 mL L ⁻¹	7	20,8*
Agro-Mos [®]	5,0 mL L ⁻¹		14,6*
Agro-Mos [®]	10,0 mL L ⁻¹		12,5*
ASM	0,1 g L ⁻¹		60,0 ^{ns}
ASM	0,2 g L ⁻¹		60,4 ^{ns}
ASM	0,4 g L ⁻¹		64,6 ^{ns}
Agro-Mos [®]	2,5 mL L ⁻¹	15	37,5 ^{ns}
Agro-Mos [®]	5,0 mL L ⁻¹		39,6 ^{ns}
Agro-Mos [®]	10,0 mL L ⁻¹		29,9*
ASM	0,1 g L ⁻¹		62,5 ^{ns}
ASM	0,2 g L ⁻¹		66,7 ^{ns}
ASM	0,4 g L ⁻¹		56,2 ^{ns}
Testemunha inoculada aos 7 dias			63,8
Produtos	Doses	Época de pulverização (dias)	Incidência da doença (%)
Agro-Mos [®]	2,5 mL L ⁻¹	7	20,8*
Agro-Mos [®]	5,0 mL L ⁻¹		14,6*
Agro-Mos [®]	10,0 mL L ⁻¹		12,5*
ASM	0,1 g L ⁻¹		60,0 ^{ns}
ASM	0,2 g L ⁻¹		60,4 ^{ns}
ASM	0,4 g L ⁻¹		64,6 ^{ns}
Agro-Mos [®]	2,5 mL L ⁻¹	15	37,5 ^{ns}
Agro-Mos [®]	5,0 mL L ⁻¹		39,6 ^{ns}
Agro-Mos [®]	10,0 mL L ⁻¹		29,9*
ASM	0,1 g L ⁻¹		62,5 ^{ns}
ASM	0,2 g L ⁻¹		66,7 ^{ns}
ASM	0,4 g L ⁻¹		56,2 ^{ns}
Testemunha inoculada aos 15 dias			68,8

* = Significativo, pelo teste de Dunnett ($P \leq 0,05$); ^{ns} = não significativo.

Experimento 2. Toxidez direta de produtos contendo mananligossacarídeo fosforilado, com e sem cobre e zinco, sobre *C. pernicioso*

Os produtos testados exerceram efeito diferenciado sobre o índice de crescimento micelial (ICM) de *C. pernicioso* (Figuras 3 e 4). O Agro-Mos[®] Experimental estimulou o crescimento do fungo até a dose de 7,125 mL de produto comercial L⁻¹ de solução (Tabela 2), possivelmente, devido à sua composição rica em açúcares e aminoácidos.

O Agro-Mos[®] e o Recop[®] apresentaram efeito inibitório diretamente proporcional à dose. Para o ASM, as doses testadas não foram suficientes para definir a CMI, enquanto que, para o Agro-Mos[®] e o Recop[®], o crescimento micelial do fungo foi completamente inibido nos intervalos de 3,6 a 7,1 mL de produto comercial L⁻¹ de solução e 0,1 a 0,2 g de produto comercial L⁻¹, respectivamente (Tabela 2). Possivelmente, a diferença nestas respostas de intervalo de concentração foi devido às fonte de Cu⁺⁺ que, no Agro-Mos[®], é o sulfato de cobre, enquanto no Recop[®] é o oxiclureto de cobre. Conforme estes resultados pode-se inferir que, provavelmente, houve efeito tóxico do Agro-Mos[®] sobre *C. pernicioso*, que pode ser atribuído à presença do cobre na sua composição e à ausência do mesmo no Agro-Mos[®] Experimental.

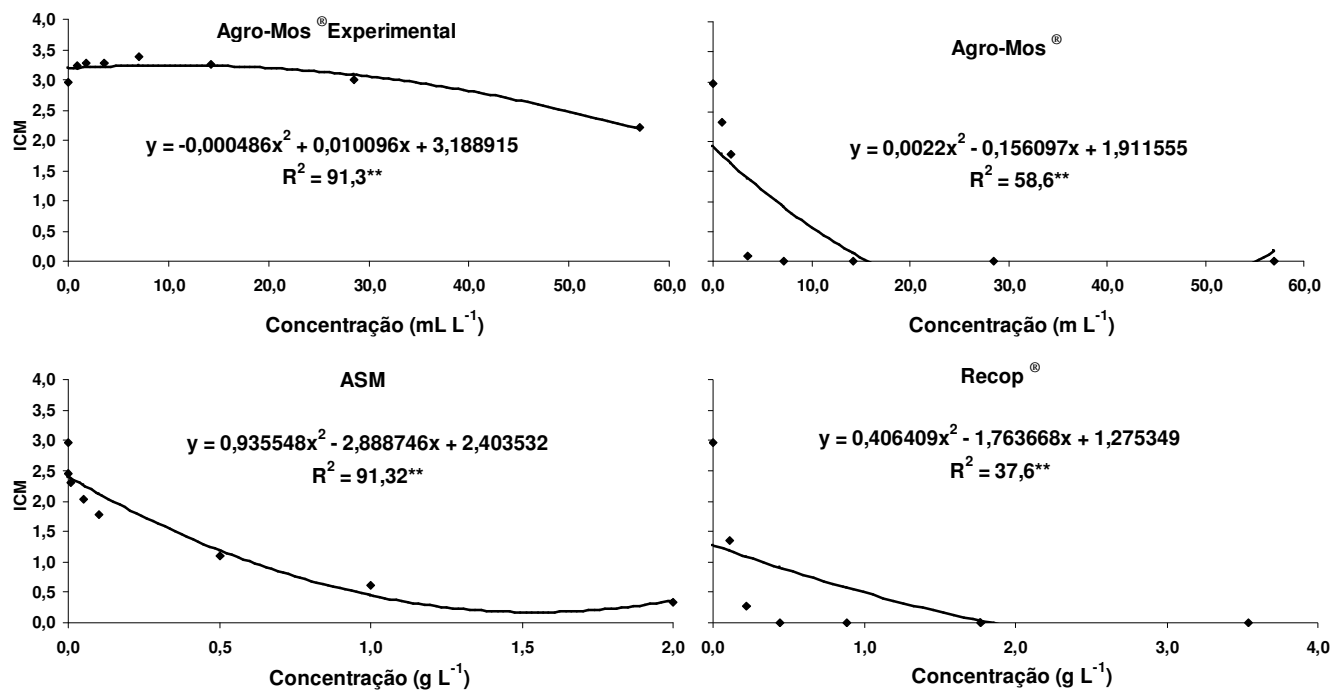


FIG. 3 - Efeito dos produtos e doses sobre o índice de crescimento micelial (ICM) de *C. perniciosus*. **Agro-Mos[®] Experimental** nas doses de: 0; 0,8906; 1,7813; 3,5625; 7,1250; 14,2500; 28,5000 e 57,0000 mL de produto L⁻¹ de solução; **Agro-Mos[®]** nas doses de: 0; 0,8906; 1,7813; 3,5625; 7,1250; 14,2500; 28,5000 e 57,0000 mL de produto L⁻¹ de solução; **ASM** nas doses de: 0; 0,0010; 0,0100; 0,0500; 0,1000; 0,5000; 1,0000 e 2,0000 g L⁻¹ de solução e **Recop[®]** nas doses de: 0; 0,0554; 0,1107; 0,2214; 0,4429; 0,8857; 1,7714 e 3,5429 g de produto L⁻¹ de solução.

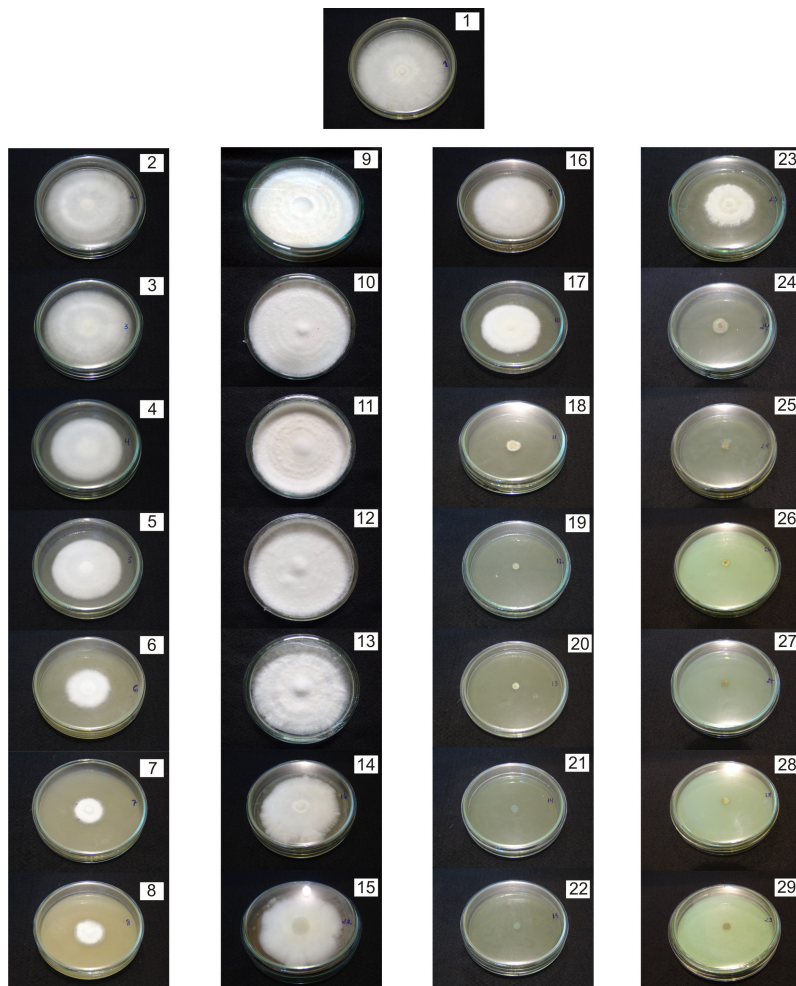


FIG. 4 - Efeito dos produtos e doses sobre o crescimento micelial de *C. perniciosus*: 1) **Testemunha**; **ASM** nas doses (g L^{-1}) de: 2) 0,0010; 3) 0,0100; 4) 0,0500; 5) 0,1000; 6) 0,5000; 7) 1,0000 e 8) 2,0000; **Agro-Mos[®] Experimental** nas doses (mL L^{-1}) de: 9) 0,8906; 10) 1,7813; 11) 3,5625; 12) 7,1250; 13) 14,2500; 14) 28,5000 e 15) 57,0000; **Agro-Mos[®]** nas doses (mL L^{-1}) de: 16) 0,8906; 17) 1,7813; 18) 3,5625; 19) 7,1250; 20) 14,2500; 21) 28,5000 e 22) 57,0000 e **Recop[®]** nas doses (g L^{-1}) de: 23) 0,0554; 24) 0,1107; 25) 0,2214; 26) 0,4429; 27) 0,8857; 28) 1,7714 e 29) 3,5429.

TABELA 2 – Porcentagem média da inibição do crescimento micelial (ICM) de *C. pernicioso*, concentração mínima inibitória (CMI) e DL₅₀, em função dos produtos e doses.

Produtos	ICM ³							CMI ⁴	DL ₅₀ ⁵ (mL L ⁻¹)
	Concentrações (mL de produto comercial L ⁻¹)								
	0,8906	1,7813	3,5625	7,1250	14,2500	28,5000	57,0000		
Agro-Mos ^{® 1}	20,3	39,9	96,1	100,0	100,0	100,0	100,0	3,5625- 7,1250	2,96
Agro-Mos ^{® 2} Experimental	-0,3	-0,1	-1,0	-2,9	0,7	7,0	18,2	>57	70,55
	ICM ³							CMI ⁴	DL ₅₀ ⁵ (g L ⁻¹)
	Concentrações (g de produto comercial L ⁻¹)								
	0,0554	0,1107	0,2214	0,4429	0,8857	1,7714	3,5429		
Recop ^{® 1}	46,6	88,1	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,1107- 0,2214	0,06
	ICM ³							CMI ⁴	DL ₅₀ ⁵ (g L ⁻¹)
	Concentrações (g L ⁻¹)								
	0,0010	0,0100	0,0500	0,1000	0,5000	1,0000	2,0000		
ASM	7,4	11,4	22,5	33,3	59,6	75,0	79,2	>2	0,36

¹ = doses equivalentes a 26,7; 53,4; 106,8; 213,6; 427,2; 854,4 e 1708,8 ppm de Cu⁺⁺;

² = valores negativos referem-se ao estímulo ao crescimento do fungo *C.pernicioso*;

³ = ICM, crescimento micelial: diâmetro da colônia (mm) do crescimento micelial do fungo, na primeira, na segunda; e na última avaliação, em relação ao número de dias após a inoculação, na primeira, na segunda e na última avaliação;

⁴ = CMI, concentração mínima inibitória: intervalo entre concentrações do produto testado, capaz de inibir totalmente o crescimento micelial do fungo;

⁵ = DL₅₀, concentração de ingredientes ativo capaz de inibir 50 % do crescimento micelial.

Experimento 3. Caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa de mudas de cacauzeiros tratadas com Agro-Mos[®], Agro-Mos[®] Experimental e ASM

Utilizou-se, na determinação das atividades de algumas enzimas, no acúmulo de lignina solúvel e fenóis solúveis totais, a dose de 10 mL L⁻¹ do produto Agro-Mos[®], que contém 0,3 g de Cu⁺⁺ e por ter apresentado, tanto aos 7 como aos 15 dias, menor incidência da vassoura-de-bruxa em mudas de cacauzeiro. Além disso, foi utilizado o produto Agro-Mos[®] Experimental, sem os elementos Cu⁺⁺ e Zn⁺⁺, na dosagem de 10 mL L⁻¹.

A atividade de quitinases em mudas tratadas com ASM foi 62% superior em relação à testemunha, às 6 horas (0,25 dias após pulverização ou DAP) com pico de atividade 92 % maior, 24 horas (1 DAP) após a pulverização, mantendo-se superior à testemunha até 2 dias após pulverização. Aos 8 DAP, 24 horas após inoculação com *C. perniciosa*, foi observado, em mudas tratadas com ASM, inoculadas e não inoculadas, atividade de quitinases cerca de 57 % superior àquelas não tratadas, tanto para mudas inoculadas como para não inoculadas (Figura 5A). Incremento na atividade de quitinases aos 8 DAP, em mudas de cacauzeiro tratadas com ASM (0,2 g L⁻¹), também foram observados por Resende et al. (2007). Há relatos, na literatura, em outros patossistemas, do aumento da atividade de quitinases, proporcionado pelo ASM em pimentão – *Phytophthora capsici* (Baysal et al., 2005), cafeeiro – *Hemilleia vastatrix* (Guzzo et al, 2004) e tomateiro – *Xanthomonas vesicatoria* (Cavalcanti, 2005; Cavalcanti et al., 2006 a; b; c; d; Cavalcanti et al., 2007).

Mudas tratadas com Agro-Mos[®] e Agro-Mos[®] Experimental apresentaram atividade de quitinases semelhantes a partir do sétimo dia após a pulverização (Figura 5). Em tratamento com Agro-Mos[®], a atividade de quitinases foi 101 % maior que a testemunha, 24 horas (1 DAP) após a

pulverização. Seis horas após inoculação (7,25 DAP), essa atividade voltou a aumentar, tanto em mudas inoculadas como não inoculadas, com pico de atividade em torno de 120 % em relação às testemunhas, 24 horas após a inoculação (8 DAP) (Figura 5B). Em tratamento com o Agro-Mos[®] Experimental, também foi observado aumento na atividade desta enzima 6 horas após pulverização (0,25 DAP), pico aos 4 e 8 DAP, de 55 % e 107 %, respectivamente, e maiores que a testemunha (Figura 5C).

A atividade de β -1,3-glucanases em mudas tratadas com Agro-Mos[®] foi maior do que na testemunha absoluta, até os 4 DAP, apresentando pico às 6 horas (0,25 DAP), para o Agro-Mos[®], enquanto, para o Agro-Mos[®] Experimental, o pico de atividade ocorreu às 12 horas (0,5 DAP), com aumento na atividade de 162% e 102 %, respectivamente. Novos incrementos na atividade desta enzima foram observados aos 8 e 14 DAP, e 1 e 7 dias após inoculação, respectivamente. (Figura 5E e F). O efeito da aplicação de Agro-Mos[®] sobre o aumento na atividade de β -1,3-glucanases também já foi verificado em mamão, coincidindo com a redução na incidência de antracnose (Dantas, 2004).

Para a atividade de β -1,3-glucanases, observou-se maior atividade dessa enzima nas mudas tratadas com ASM, em relação à testemunha a partir das 6 horas (0,25 DAP) até 4 DAP. Vinte e quatro horas após a inoculação com *C. perniciosa* (8 DAP), a atividade voltou a aumentar, em relação à testemunha, tanto para mudas inoculadas como para não inoculadas, mantendo-se até 14 DAP (Figura 5D). O aumento da atividade dessa enzima até o 14 DAP também foi observado por Cavalcanti (2005), em mudas de cacauete inoculadas e não inoculadas com *Verticillium dahliae*. A ativação da β -1,3-glucanases também foi obtida com tratamento com ASM em macieira, pimentão, tomateiro e cafeeiro (Brisset et al., 2000; Baysal et al., 2005; Cavalcanti et al., 2006a; Cavalcanti et al., 2007; Guzzo et al., 2004).

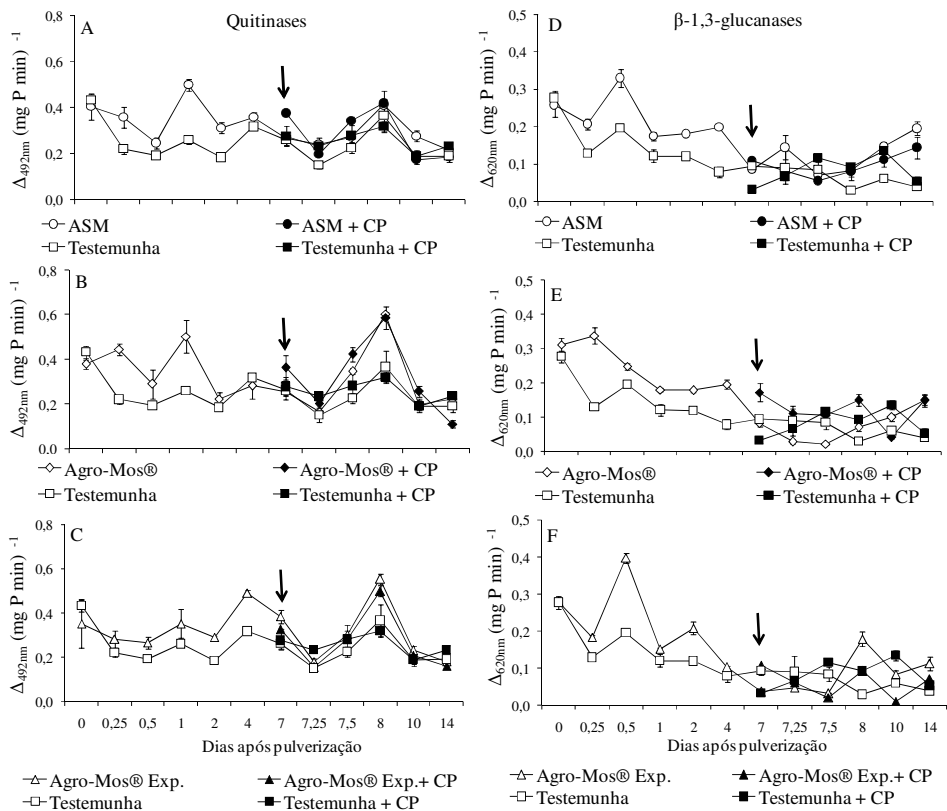


FIG. 5 - Atividade de quitinases (CHI), A, B e C, e de β -1,3-glucanases (GLU), D, E e F, em mudas de cacauero cv. Catongo, após tratamentos com: acibenzolar-S-metil (ASM), Agro-Mos[®] e Agro-Mos[®] Experimental (Exp.), comparada com a testemunha. Setas indicam inoculação com *C. pernicioso* (CP) 7 dias após pulverização. Barras de erros indicam erro padrão da média.

Mudas tratadas com Agro-Mos[®] e não inoculadas expressaram maior atividade de peroxidases 1 DAP (113 % maior que a testemunha), enquanto que mudas inoculadas apresentaram maior atividade aos 7,25 e 10 DAP (86 % e 60 %, respectivamente). A aplicação de Agro-Mos[®] Experimental não proporcionou aumento significativo da atividade de peroxidases nas mudas não inoculadas em relação à testemunha. Em mudas inoculadas, verificou-se aumento de 74% na atividade da enzima aos 10 DAP (Figura 6 C).

As peroxidases de guaiacol em mudas tratadas com ASM e não inoculadas apresentaram maior atividade aos 0,25, 7,25 e 8 DAP, correspondendo a 78 %, 150 % e 83 % em relação à testemunha, respectivamente, enquanto que, em mudas inoculadas, a maior atividade desta enzima ocorreu 6 horas (7,25 DAP) após a inoculação com o patógeno (70 %) (Figura 6A). As atividades de peroxidases de guaiacol em mudas de cacauzeiro foram maiores nos tratamentos, em todo o intervalo estudado (de 4 a 14 dias após aplicação do produto), comparadas à da testemunha (Resende et al., 2007). A atividade desta enzima é frequentemente aumentada em resposta aos estresses, sendo a proteção celular contra reações oxidativas uma das principais funções desta enzima, além de ser considerada boa marcadora de resistência (Cakmak & Horst, 1991).

O comportamento da atividade de oxidases de polifenóis das mudas tratadas com ASM e não inoculadas promoveu incremento de 63 %, 57 % e 61 %, aos 0,25, 2 e 4 DAP, respectivamente em relação à testemunha não inoculada. Aos 10 DAP, tanto mudas inoculadas como não inoculadas apresentaram um pico desta enzima (Figura 6D). Nas mudas pulverizadas com Agro-Mos[®] e não inoculadas, foi observada maior atividade desta enzima aos 0,25, 2, 4 e 7,25 DAP, enquanto que, em mudas inoculadas, o pico foi observado somente aos 7,25 DAP (Figura 6E). Para mudas tratadas com Agro-Mos[®] Experimental, foi observado maior aumento na atividade a partir da inoculação

(7 DAP), com pico aos 10 DAP (Figura 6F). Oxidases de polifenóis representam um componente de resposta de defesa, possivelmente mediada por seus produtos, tais como quinonas oxidadas, algumas das quais podem inativar enzimas pectolíticas produzidas por patógenos e exibem atividade antimicrobiana (Leatham et al., 1980).

De modo geral, observou-se que as áreas abaixo da curva do progresso da atividade de quitinases (AACPACHI) e de β -1,3-glucanases (AACPAGLU) não diferiram significativamente entre os tratamentos ASM, Agro-Mos[®] e Agro-Mos[®] Experimental, mas foram maiores que as da testemunha antes da inoculação (0 a 7 DAP) (Figura 7A e B). Após a inoculação (7 a 14 DAP), a AACPACHI foi maior para os tratamentos com ASM inoculado, Agro-Mos[®] inoculado e não inoculado e Agro-Mos[®] Experimental inoculado (Figura 7A). Para AAPAGLU após a inoculação, os tratamentos com ASM inoculado e não inoculado foram superiores aos demais (Figura 7B). O tratamento que apresentou maior valor da área abaixo da curva do progresso da atividade das peroxidases (AACPAPOX), antes da inoculação, foi o Agro-Mos[®], seguido pelo ASM e, após a inoculação, os tratamentos ASM inoculado e não inoculado, Agro-Mos[®] e Agro-Mos[®] Experimental inoculados apresentaram maior área para esta enzima (Figura 7C). A área abaixo da curva do progresso da atividade das oxidases de polifenóis (AACPAPPO) antes da inoculação foi maior em mudas tratadas com ASM, seguida pelas dos tratamentos com Agro-Mos[®] e Agro-Mos[®] Experimental, não diferindo entre si. Entretanto, após a inoculação do patógeno, todos os tratamentos apresentaram AACPAPPO superiores às das testemunhas (Figura 7D).

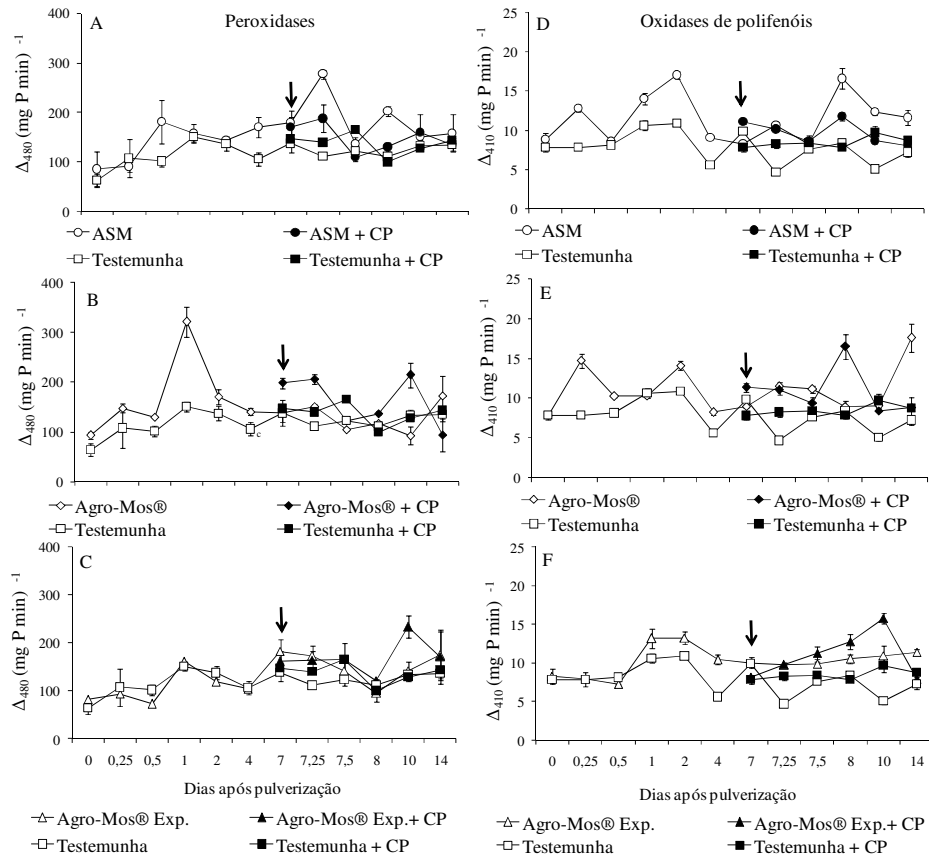


FIG. 6 - Atividade de peroxidases de guaiacol (POX), A, B e C, e de oxidases de polifenóis (PPO), D, E e F, em mudas de cacaueiro cv. Catongo, após tratamentos com: acibenzolar-S-metil (ASM), Agro-Mos® e Agro-Mos® Experimental (Exp.) comparada com a testemunha. Setas indicam inoculação com *C. perniciosus* (CP) 7 dias após pulverização. Barras de erros indicam erro padrão da média.

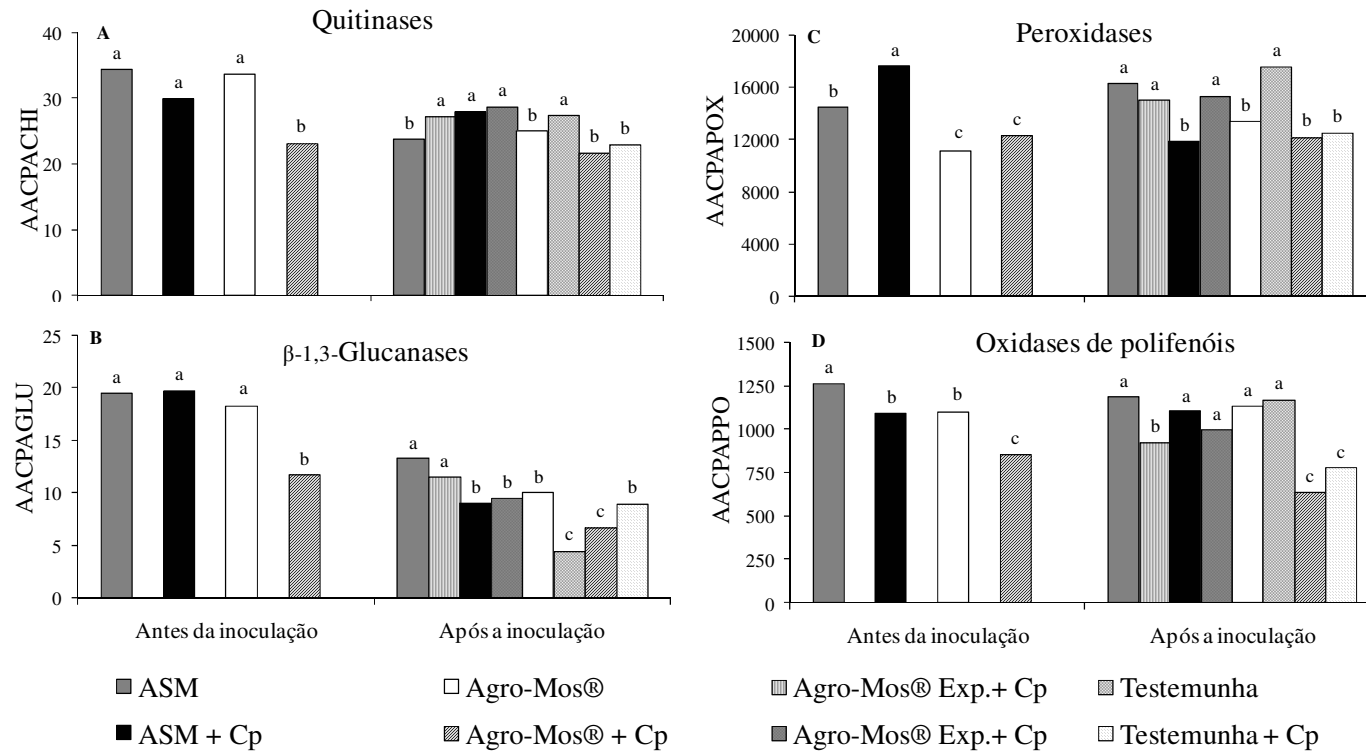


FIG. 7 - Área abaixo da curva do progresso da atividade das enzimas quitinases – AACPACHI (A), de β-1,3-glucanases – AACPAGLU (B), peroxidases de guaiacol – AACPAPOX (C) e de oxidases de polifenóis – AACPAPPO (D), em mudas de cacauero cv. Catongo, após tratamentos com: acibenzolar-S-metil (ASM), Agro-Mos® e Agro-Mos® Experimental (Exp.), comparada com a testemunha, antes (0 a 7 DAP) e depois (7 a 14 DAP) da inoculação com *C. perniciosa*. Barras com mesma letra, em cada enzima e época (antes e após inoculação), não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

A deposição de lignina solúvel e a quantidade de fenóis solúveis totais em mudas tratadas com o ASM, Agro-Mos[®] e Agro-Mos[®] Experimental não diferiram em relação às das testemunhas, em todas as épocas de avaliação (0 a 14 DAP) (Figura 8). Resultado semelhante foi obtido por Cavalcanti (2005) que verificou, em mudas de cacaueiro inoculadas e não inoculadas com *V. dahliae* e tratadas com ASM, que, aos 13 DAP, não apresentaram diferenças significativas em relação às testemunhas, para lignina solúvel e fenóis solúveis totais. Entretanto, diferenças entre os tratamentos ASM e testemunha, para estes compostos, foram observadas aos 18 DAP. Possivelmente, o tempo de avaliação do presente estudo não foi suficiente para detectar incremento de compostos fenólicos induzidos pelos tratamentos ASM, Agro-Mos[®] e Agro-Mos[®] Experimental. Além disso, o que se avaliou foi a lignina total, correspondente à lignina induzida (acumulada localizadamente ao redor do ponto de penetração do patógeno, por exemplo) e à lignina constitutiva (encontrada naturalmente nos tecidos vegetais entre a parede celular e as células adjacentes) (Agrios, 2005; Moraes, 2004 e Taiz & Zeiger, 2004). Assim, possivelmente, não foram detectadas diferenças significativas entre os produtos testados e a testemunha neste trabalho, pelo fato de a lignina induzida ser uma pequena fração da lignina total.

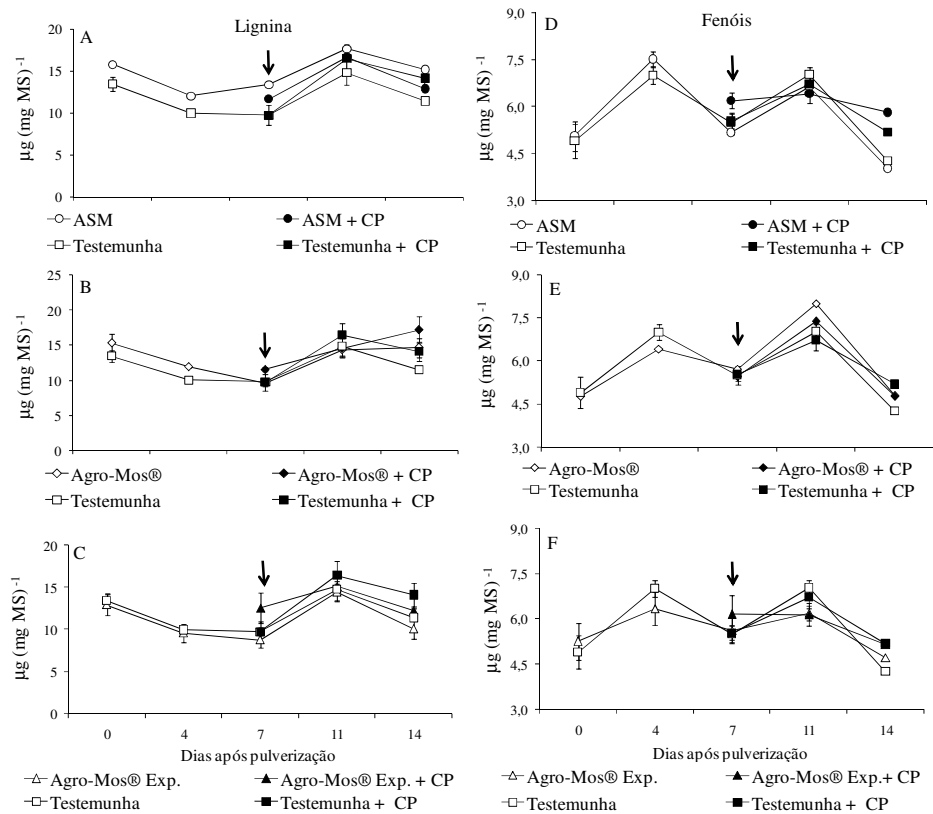


FIG. 8 - Quantidade de lignina solúvel em ácido tioglicólico ($\mu\text{g mg}^{-1} \text{MS}^{-1}$), A, B e C, e de fenóis solúveis totais ($\mu\text{g de catecol mg}^{-1} \text{MS}^{-1}$), D, E e F, em mudas de cacaueiro cv. Catongo, após tratamentos com: acibenzolar-S-metil (ASM), Agro-Mos® e Agro-Mos® Experimental comparados com a testemunha. Setas indicam inoculação com *C. perniciosa* (CP) 7 dias após pulverização. Barras de erros indicam desvio padrão da média.

Nas condições experimentais adotadas, a redução da incidência da vassoura-de-bruxa em mudas de cacaueteiro tratadas com Agro-Mos[®], associada ao efeito tóxico *in vitro* deste produto sobre *C. pernicioso* e ao aumento da atividade de quitinases, β -1,3-glucanases, peroxidases de guaiacol e oxidases de polifenóis, evidencia que o Agro-Mos[®], possivelmente, está atuando duplamente sobre o patógeno, por meio de um efeito direto de proteção e pela ativação de mecanismos de indução de resistência.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo avaliou um produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado (Agro-Mos[®]) para a proteção de mudas de cacaueteiro contra *C. pernicioso*. Demonstrou-se que, possivelmente, ele está atuando duplamente sobre o patógeno, por meio do efeito direto na proteção, considerando o seu efeito tóxico *in vitro* sobre fungo e pela ativação de mecanismos de indução de resistência, com o aumento das atividades das enzimas de quitinase, β -1,3-glucanase, peroxidase de guaiacol e oxidase de polifenóis.

Contudo, apesar dos resultados alcançados, é necessária a realização de novos experimentos, nos quais se determine, periodicamente, o nível de Cu^{++} nas folhas, pois a sua deficiência/excesso pode ter causado alterações morfológicas e bioquímicas no tecido vegetal. É preciso investigar o efeito isolado também dos micronutrientes Cu^{++} e Zn^{++} , presentes no produto Agro-Mos[®], para que, juntamente com outros marcadores bioquímicos, não contemplados no presente trabalho, seja possível obter informações suficientes e conclusivas a respeito do modo de ação do Agro-Mos[®] como um efetivo indutor de resistência.

Finalizando, sugere-se que se conduzam experimentos em condições de campo, em período não inferior a três anos, nos diferentes agroecossistemas cacaueteiros, para que este ou outros produtos de natureza biótica ou abiótica possam se tornar componente efetivo num sistema de manejo integrado da vassoura-de-bruxa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. San Diego: Academic, 2005. 922p.

ATHAYDE SOBRINHO, C.; FERREIRA, P.T.O.; CAVALCANTI, L.S.C. **Indutores abióticos**. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba, SP: FEALQ. 2005. p.51-80.

BAYSAL, Ö.; TURGUT, C.; MAO, G. Acilbenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves. Acilbenzolar-S-methyl induces. **Biologia Plantarum**, v.49, n.4, p.599-604, 2005.

BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R.R. Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Plant Journal**, v. 14, p. 13-41, 1998a.

BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R.R. Benzothiadiazole-mediated induced to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. **Plant Physiology**, v.118, p.1203-1212, 1998b.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Washington, v.72, n.1/2, p.248-254, 1976.

BRISSET, M-N.; CESBRON, S.; THOMSON, S. V.; PAULIN, J-P. Acilbenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, p.529-536, 2000.

CAKMAK, I.; HORST, J.H. Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v.83, n.3, p.463-468, 1991.

CAVALCANTI, F. R. **Resistência Induzida a *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro e *Verticillium dahliae* em cacauero por extratos naturais: caracterização bioquímica, fisiológica e purificação parcial de eliciadores protéicos**. 2005. 192p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; PEREIRA, R.B.; COSTA, J.C.B.; CARVALHO, C.P.S. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1721-1730. 2006a.

CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; CARVALHO, C.P.S.; SILVEIRA, J.A.G.; OLIVEIRA, J.T.A. Induced defence responses and protective effects on tomato against *Xanthomonas vesicatoria* by an aqueous extract from *Solanum lycocarpum* infected with *Crinipellis pernicioso*. **Biological Control**, v.39, p.408-417, 2006b.

CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; LIMA, J.P.M.S.; SILVEIRA, J.A.G.; OLIVEIRA, J.T.A. Activities of antioxidant enzymes and photosynthetic responses in tomato pre-treated by plant activators and inoculated by *Xanthomonas vesicatoria*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.68, p.198-208, 2006c.

CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; PEREIRA, R.B.; COSTA, J.C.B.; CARVALHO, C.P.S. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.12, p.1721-1730, 2006d.

CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; CARVALHO, C.P.S.; SILVEIRA, J.A.G.; OLIVEIRA, J.T.A. An aqueous suspension of *Crinipellis pernicioso* mycelium activates tomato defence responses against *Xanthomonas vesicatoria*. **Crop Protection**, v. 26, n. 5, p.729-738, 2007.

DANTAS, S.A.F.; OLIVEIRA, S.M.A.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R.S.B.; SILVA, R.L.X. da. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, v.30, p.314-319, 2004.

DOSTER, M.A.; BOSTOCK, R. M. Quantification of lignin formation in almond bark in response to wounding and infection by *Phytophthora* species. **Phytopathology**, v.78, p.473-477, 1988.

FRIAS, G.A.; PURDY, L.H.; SCHMIDT, R.A. An inoculation method for evaluate resistance of cocoa to *Crinipellis pernicioso*. **Plant Disease**, v.79, p.787-791, 1995.

- GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F.; NICOLAS, J. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. **Analytical Biochemistry**, Washington, v.215, n.1, p.59-65, Nov. 1993.
- GOMES, E.C.S.; PEREZ, J.O.; BARBOSA, J.; NASCIMENTO, E.F.; MOREIRA, A.N.; CAVALCANTI, L.S.; AGUIAR, I.F. Efeito de indutores de resistência na proteção de uva “Itália” e de vinho “Cabernet Sauvignon” contra oídio e o míldio na vale do São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.S256, 2007. Suplemento.
- GUZZO, S.D.; HARAKAVA, R.; LUCON, C.M.M.; TSAI, S.M. Resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* e indução local e sistêmica de quitinases e b-1,3-glucanases por acibenzolar-S-metil. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v.30, n.3, p.376-381, 2004.
- LEATHAM, G.F.; KING, M.; SYAHMANN, M.A. *In vitro* protein polymerization by quinines or free radical generated by plant or fungal oxidative enzymes. **Phytopathology**, v.70, p.1134-1140, 1980.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and avaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177, 1962.
- MORAES, M.G. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 261-284. 1998.
- MORAES, S.R.G. **Fontes e doses de silício na intensidade da antracnose so feijoeiro**. 2004. 89p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Univerisadade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- NOJOSA, G.B.A.; RESENDE, M.L.V.; RESENDE, A.V. Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba, SP: FEALQ, 2005. p.139-153.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap. 22, v.1, p.417-454.

RESENDE, M.L.; COSTA, J.C.B.; CAVALCANTI, F.R.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; CAMILO, F.R. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, p.213-221, 2007.

RESENDE, M.L.V.; ARAUJO, D.V.; COSTA, J.C.B.; DEUNER, C.C.; FERREIRA, J.B.; MUNIZ, M. F.S.; REIS, S.N.; SANTOS, F.S.; CAVALCANTI, L.S.; NOJOSA, G.B.A. Produtos comerciais à base de bioindutores de resistência em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.14, p.361-380, 2006.

RESENDE, M.L.V.; BARRETI, P.B.; DIAS, W.P. Percepção, transdução e tradução de sinais para respostas de defesa contra patógenos em plantas. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PATÓGENOS: aplicações no manejo integrado de fitodoeças. 1., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras, MG: UFLA, 2002a. p.9-35.

RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, L.H.C.P.; NIELLA, G.R.; CARVALHO, G.A.; GIOVANINI, G.R.; CASTRO, R.M. Perspectivas da indução de resistência em cacaueteiro contra *Crinipellis perniciosa* através do benzoatiazole (BTH). **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.149-156, 2000.

RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; CAVALCANTI, L.S.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, L.H.C.P.; PEREZ, J.O.; ANDRADE, G.C.G.; CARVALHO, G.A.; CASTRO, R.M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis perniciosa* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, v.51, p.621- 628, 2002b.

ROSA, R.C.T. da; COELHO, R.S.B.; TAVARES, S.C.C.H.; CAVALCANTI, V.; BEZERRA, A.L. Efeito de indutores no controle de míldio em *Vitis labrusca*. **Summa Phytopathology**, v.33, n.1, p.68-73, 2007.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v.70, n.1, p.1183-1186, 1977.

SOARES PESSOA, W.; LOPES, A.; OLIVEIRA COSTA, V.; OLIVEIRA, S. Efeito do tratamento hidrotérmico associado a indutores de resistência no manejo da antracnose da goiaba em pós-colheita. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.20, n.3, p.129-135, 2007.

SPANOS, G.A.; WROLSTAD, R.E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, Washington, v.38, n.7, p.1565-1571, July 1990.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologia Plantarum**, Warsaw, v.13, n.1, p.43-50, 1991.

VAN LOON, L.C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.753-765, 1997.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.85-97, 1999.

VIDHYASEKARAN, P. Lignin and disease resistance. In: VIDHYASEKARAN, P. (Ed.). **Physiology of disease resistance in plants**. Boca Ratón: CRC, 1988. p.121-135.

WIRTH, S.J.; WOLF, G.A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.12, n.3/4, p.197-205, Dec. 1990.