



Indução de resistência em mudas de cacauero contra *Moniliophthora perniciosa* por produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado

João de Cássia B. Costa¹, Mário Lúcio Vilela de Resende², Pedro Martins Ribeiro Júnior², Fabrício Rabelo Camilo², Ana Cristina Andrade Monteiro² & Ricardo Borges Pereira²

¹Centro de Pesquisa do Cacau/Ceplac/Mapa, Seção de Fitopatologia, 45650-000, Itabuna, BA, Brasil; ²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brasil

Autor para correspondência: João de Cássia B. Costa, e-mail: jcbioctrl@ceplac.gov.br

RESUMO

A proteção do cacauero com o uso de produtos de natureza biótica ou abiótica visando à indução de resistência é uma estratégia importante, que pode ampliar a eficácia de controle da vassoura-de-bruxa, causada por *Moniliophthora perniciosa*. Objetivou-se 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 cacauero contra *M. perniciosa* 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 cacauero contra a vassoura-de-bruxa em relação ao indutor de resistência padrão, acibenzolar S-metil (ASM). O crescimento micelial de *M. perniciosa 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 e 0,1 a 0,2 g.L⁻¹, respectivamente. Em plantas tratadas com ASM, Agro-Mos[®] e Agro-Mos[®] Experimental (sem Cu⁺⁺), observou-se aumento das atividades de quitinases, β-1,3-glucanases, peroxidases de guaiacol e oxidases de polifenóis, sem alteração do conteúdo de lignina e fenóis solúveis totais. A redução da incidência da doença propiciada 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 cacauero.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*, *Moniliophthora perniciosa*, vassoura-de-bruxa, proteínas PR, acibenzolar-S-metil, Agro-Mos[®].

ABSTRACT

Induction of resistance in cacao seedlings against *Moniliophthora perniciosa* by a phosphorilated mannanoligosaccharide based product

Protecting the cacao crop by using biotic and abiotic products, seeking to induce plant resistance, 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 mannanoligosaccharide based product (Agro-Mos[®]) on cacao seedlings against *Moniliophthora perniciosa*, 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 acibenzolar S-methyl, ASM. The *in vitro* mycelial growth of *M. perniciosa* was completely inhibited by Agro-Mos[®] and Recop[®] (copper oxichloride) at dose intervals of 3.6 to 7.0 mL.L⁻¹, and 0.1 to 0.2 g.L⁻¹, respectively. There were increased activities of chitinases, β-1,3-glucanases, guaiacol peroxidases, polyphenol oxidases, without changes in the content of lignin and total soluble phenolics in plants treated with ASM, Agro-Mos[®] or Experimental Agro-Mos[®] (without Cu⁺⁺). The disease incidence reduction due to Agro-Mos[®], associated with its *in vitro* toxic effect and the activation of some enzymes related to plant defense response, suggests that Agro-Mos[®] has a direct effect against the fungus and is also activating plant defense mechanisms.

Key words: *Theobroma cacao*, *Moniliophthora perniciosa*, PR proteins, acibenzolar-S-methyl, Agro-Mos[®].

INTRODUÇÃO

A vassoura-de-bruxa do cacauero (*Theobroma cacao* L.), causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, é um dos principais problemas fitossanitários da cacauicultura mundial. Na Bahia, região responsável por cerca de

70% da produção nacional de cacau, esta doença é o principal fator associado ao declínio na produção. Este patógeno infecta os tecidos meristemáticos em desenvolvimento: brotos vegetativos, almofadas florais e frutos, provocando sintomas característicos da doença com hipertrofia dos tecidos infectados (Albuquerque et al., 2005).

Apesar da existência de várias medidas para o manejo integrado dessa doença, esforços são necessários visando a busca de novos métodos para ampliar a eficácia do 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, são estratégias importantes que podem apresentar menor impacto ambiental. Tais produtos também seriam capazes de propiciar melhora na produtividade agrícola, com a redução de perdas e, até mesmo, 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 de patógenos em seus tecidos, por meio de mecanismos de defesa próprios (Durrant & Dong, 2004). 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 (Van Loon, 1997). Dentre estes, ocorre a ativação de genes que codificam uma série de proteínas relacionadas à patogênese (PRP's) (Van Loon, 1997) e enzimas envolvidas na síntese de fitoalexinas e lignina (Anterola & Lewis, 2002). 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 (Durrant & Dong, 2004).

Avanços nas pesquisas envolvendo RI em plantas vêm sendo acompanhados pelo surgimento de novos produtos comerciais (Resende et al., 2006). Os compostos sintéticos, como o acibenzolar-S-metil (ASM), agem de forma semelhante ao ácido salicílico, induzindo respostas de defesa em plantas, inclusive no cacau, contra patógenos (Resende et al., 2002; Cavalcanti et al., 2008).

Além de produtos químicos e eliciadores específicos, tem sido demonstrado que as plantas podem reconhecer muitos compostos derivados de microrganismos que induzem respostas de defesa em plantas. Dentre estes, incluem-se peptídeos, carboidratos, glicoproteínas e lipídios (Nürnberg e Brunner, 2002). O produto constituído à base de um mananoligossacarídeo fosforilado proveniente da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen tem sido utilizado na proteção de plantas contra doenças, como em videira contra o míldio (Resende et al., 2006; Rosa et al., 2007), contra antracnose em goiabeira (Soares Pessoa et al., 2007) e em mamoeiro na pós-colheita (Dantas et al., 2004). O presente trabalho objetivou avaliar o efeito de doses e de épocas de aplicação de produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado na proteção de mudas de

cacau contra *M. perniciosa*, a toxicidade 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 do conteúdo de lignina e de fenóis solúveis totais.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de cacau cv. Catongo, provenientes do Centro de Pesquisas do Cacau (Ceplac/Cepec), Ilhéus-BA, e da Estação Experimental Filogônio Peixoto (Ceplac/Esfp), Linhares-ES, 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) e 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), Lavras-MG, com temperatura de 25±5°C e umidade relativa do ar em torno de 90%, controladas por meio de um sistema automatizado de nebulização.

Produção do inóculo e inoculação

O inóculo foi obtido no Laboratório de Fitopatologia Molecular do Cepec/Ceplac, Ilhéus, BA, a partir de ramos infectados (vassouras secas) coletadas no biênio 2005-2006. Para a produção dos basidiomas de *M. perniciosa*, 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 e 15 dias após a pulverização dos tratamentos, executadas ao final da tarde, com a deposição de uma gota da suspensão de basidiósporos na concentração de 1x10⁵ basidiósporos viáveis mL⁻¹ no meristema apical de cada muda com 30 dias de idade. Durante 24 horas após a 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. Foram utilizadas, na inoculação, suspensões de esporos com viabilidade superior a 80%.

Proteção de mudas de cacau contra *M. perniciosa* por mananoligossacarídeo fosforilado em função de doses e épocas de aplicação

Neste experimento foi utilizado produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado proveniente da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen e de um biocomplexo de cobre e zinco (Agro-Mos[®] da Improcrop[®] do Brasil Ltda). Os tratamentos testados foram: i. Agro-Mos[®], nas doses de 2,5, 5 e 10 mL.L⁻¹; ii. acibenzolar-S-metil (ASM) (Bion[®] 500WG, Syngenta Proteção de Cultivos) nas

doses de 0,1; 0,2 e 0,4 g.L⁻¹; iii. testemunha inoculada com *M. perniciosa* e iv. testemunha absoluta (plantas pulverizadas somente com água). Foram pulverizados 250 mL de cada tratamento nas folhas de 12 mudas de cacaueteiro, sete e 15 dias antes da inoculação, até o ponto de escorrimento por meio de pulverizador manual.

O experimento foi conduzido no delineamento de blocos casualizados, com quatro 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 sete dias e testemunha inoculada com 15 dias). Foi realizada avaliação da incidência de vassoura-de-bruxa nas mudas aos 60 dias após inoculação. A percentagem de mudas doentes foi então calculada para cada tratamento. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância, as médias comparadas pelos testes de Tukey ($p \leq 0,05$) e as testemunhas foram comparadas aos demais tratamentos utilizando-se o teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Toxicidade direta dos produtos sobre *M. perniciosa*

Foram utilizados os produtos: i. produto comercial Agro-Mos[®]; ii. Agro-Mos[®] Experimental, produto especialmente formulado sem o íon Cu⁺⁺, cedidos pelo próprio fabricante; iii. Recop[®] (Atar do Brasil Defensivos Agrícolas LTDA, 840 g.Kg⁻¹ de oxiclureto de cobre equivalente a 500 g.Kg⁻¹ de cobre metálico) e iv. ASM.

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: i. Agro-Mos[®], nas doses de 0; 0,8906; 1,7813; 3,5625; 7,125; 14,25; 28,5 e 57,0 mL.L⁻¹ do produto comercial (doses equivalentes a 0; 26,7; 53,4; 106,8; 213,6; 427,2; 854,4; 1708,8 ppm de Cu⁺⁺, respectivamente); ii. Agro-Mos[®] Experimental nas doses de: 0; 0,8906; 1,7813; 3,5625; 7,125; 14,25; 28,5 e 57,0 mL.L⁻¹ de produto; iii. 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); iv. ASM nas doses de: 0; 0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 g.L⁻¹ e v. Testemunha absoluta, representada pelo meio de cultura puro, sem adição de produto.

Foram depositados, no centro de cada placa, discos de 6 mm do micélio do fungo *M. perniciosa*, 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 dois 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). Além disso, foram avaliadas também a percentagem de inibição do crescimento micelial, a concentração mínima inibitória (CMI), que é o intervalo entre concentrações do produto testado capaz de

inibir totalmente o crescimento micelial do fungo e a DL₅₀, que é a concentração de ingrediente ativo capaz de inibir 50% do crescimento micelial. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e oito repetições. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância e análise de regressão.

Caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa de mudas de cacaueteiro 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) e proteínas totais, nos tempos de 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 7, 7,25, 7,5, 8, 10 e 14 dias após pulverização (DAP), e os teores de lignina solúvel e fenóis solúveis totais nos tempos de quatro, sete, 11 e 14 DAP, utilizando-se os 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 *M. perniciosa*, além de duas testemunhas: uma inoculada com *M. perniciosa* e outra absoluta (plantas pulverizadas somente com água).

Cada amostra de tecido vegetal coletada 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 enzimáticos, 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 três minutos (10 mL de tampão/g de amostra) sobre um banho de gelo. O extrato obtido foi centrifugado (12.000 g por 15 min) e o sobrenadante foi coletado em microtubos e armazenado a -80°C, para posterior análise. Todos os passos foram executados entre 0-4°C. Para a determinação da atividade específica, a concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976), ajustando-se uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA).

A atividade de peroxidases de guaicol (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 guaicol 20 mM e 500 µL de peróxido de hidrogênio 60 mM. Após incubação (30°C, por 10 minutos) a absorbância foi medida a 480 nm (Urbanek et al., 1991). A atividade de oxidases de polifenóis (PPO) 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 (30°C, por 10 minutos) foi medido o acréscimo da absorbância a 410 nm (Gauillard et al., 1993).

A atividade de quitinases foi determinada pela adição de 100 µL 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 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). Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

Para a determinação dos teores de lignina e fenóis solúveis totais, amostra de tecidos vegetais da região próxima ao meristema apical (2 g) foi triturada em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 12 horas. 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 de lignina solúvel. A determinação destes teores de lignina foi realizada utilizando-se ácido tioglicólico e a determinação dos teores de fenóis solúveis totais foi realizada utilizando-se metodologia descrita por Rodrigues et al. (2005). Para os ensaios bioquímicos, foi utilizado o delineamento

experimental de blocos casualizados, com quatro blocos e parcela experimental composta de três mudas de cacaueteiro por parcela em cada coleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Proteção de mudas de cacaueteiro contra *M. perniciosa* 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 após inoculação, o Agro-Mos[®] proporcionou menor incidência da doença, média das duas épocas de aplicação, nas mudas de cacaueteiro (24,6%) comparado ao ASM (61,7%) (Tabela 1). 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 pepineiro apresentam respostas de defesas efetivas ativadas em um curto período (três a sete dias), quando induzidas pela aplicação de químicos ou por meio da pré-inoculação com patógenos não virulentos (Benhamou & Bélanger, 1998). Em cacaueteiro, este período parece ser mais longo uma vez que, maior redução na incidência da vassoura-de-bruxa em plantas pulverizadas com ASM foi observada aos 30 dias antes da inoculação do patógeno (Resende et al., 2002). Porém, a ineficiência da redução da incidência da vassoura-de-bruxa por ASM neste trabalho, pode estar relacionada à alta pressão de inóculo do patógeno (100.000 basidiósporos viáveis mL⁻¹). Vale

TABELA 1 - Efeito do Agro-Mos[®] e ASM na incidência da vassoura-de-bruxa em mudas de cacaueteiro cv. Catongo, 60 dias após inoculação com *Moniliophthora perniciosa*, comparados com as testemunhas inoculadas aos 7 e 15 dias após pulverização

Produtos	Doses	Pulverização (DAI)	Incidência da doença (%)	Significância	
Agro-Mos [®]	2,5 mL L ⁻¹		20,8	*	*
Agro-Mos [®]	5,0 mL L ⁻¹		14,6	*	*
Agro-Mos [®]	10,0 mL L ⁻¹	7	12,5	*	*
ASM	0,1 g L ⁻¹		60,0	ns	ns
ASM	0,2 g L ⁻¹		60,4	ns	ns
ASM	0,4 g L ⁻¹		64,6	ns	ns
Agro-Mos [®]	2,5 mL L ⁻¹		37,5	ns	ns
Agro-Mos [®]	5,0 mL L ⁻¹		39,6	ns	ns
Agro-Mos [®]	10,0 mL L ⁻¹	15	29,9	*	*
ASM	0,1 g L ⁻¹		62,5	ns	ns
ASM	0,2 g L ⁻¹		66,7	ns	ns
ASM	0,4 g L ⁻¹		56,2	ns	ns
Incidência (%) das testemunhas inoculadas				63,8	68,8
				(7 DAP)	(15 DAP)

DAI: dias antes da inoculação; DAP: dias após pulverização; * = Significativo, pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) na coluna quando comparados com a testemunha inoculada ao 7 ou aos 15 DAP; ns = não significativo.

ressaltar, que naturalmente esta condição não é facilmente encontrada. Por outro lado, a aplicação do Agro-Mos[®] 7 dias antes da inoculação com *M. 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.

Pesquisas realizadas em outros patossistemas comprovaram a eficiência do Agro-Mos[®] na proteção contra doenças. Cerca de 70% redução da incidência da antracnose em frutos de 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) e na severidade do míldio da videira (Rosa et al., 2007). O Agro-Mos[®], também aplicado aos sete 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 cacauero na maior dose de 10 mL.L⁻¹ (Tabela 1).

Toxicidade direta de produtos contendo mananoligossacarídeo fosforilado sobre *M. perniciosa*

Os produtos testados exerceram efeito diferenciado sobre o índice de crescimento micelial (ICM) de *M. perniciosa* (Figura 1). O Agro-Mos[®] Experimental estimulou o crescimento do fungo até a dose de 7,125 mL.L⁻¹ de produto comercial (Tabela 2), possivelmente, devido

à sua composição rica em açúcares e aminoácidos e pela ausência de Cu⁺⁺ em sua formulação.

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 concentração mínima inibitória (CMI) pois a maior dose utilizada não promoveu inibição total do crescimento micelial, enquanto que, para o Agro-Mos[®] o crescimento micelial do fungo foi completamente inibido em dose superior a 3,6 mL.L⁻¹ de produto comercial e o Recop[®] em dose superior a 0,1 g.L⁻¹ (Tabela 2). Possivelmente, a diferença nestas respostas de intervalo de concentração foi devido à fonte de Cu⁺⁺ que, no Agro-Mos[®], é o sulfato de cobre, enquanto no Recop[®] é o oxiclreto de cobre. Conforme estes resultados pode-se inferir que, provavelmente, houve efeito tóxico do Agro-Mos[®] sobre *M. perniciosa*, que pode ser atribuído à presença do cobre na sua composição e à ausência do mesmo no Agro-Mos[®] Experimental.

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

Na determinação da atividade enzimática e dos teores de lignina solúvel e fenóis solúveis totais, utilizou-se a dose de 10 mL.L⁻¹ do produto Agro-Mos[®] (com Cu⁺⁺) por ter apresentado, tanto aos sete como aos 15 dias antes da inoculação, menor incidência da vassoura-de-bruxa em

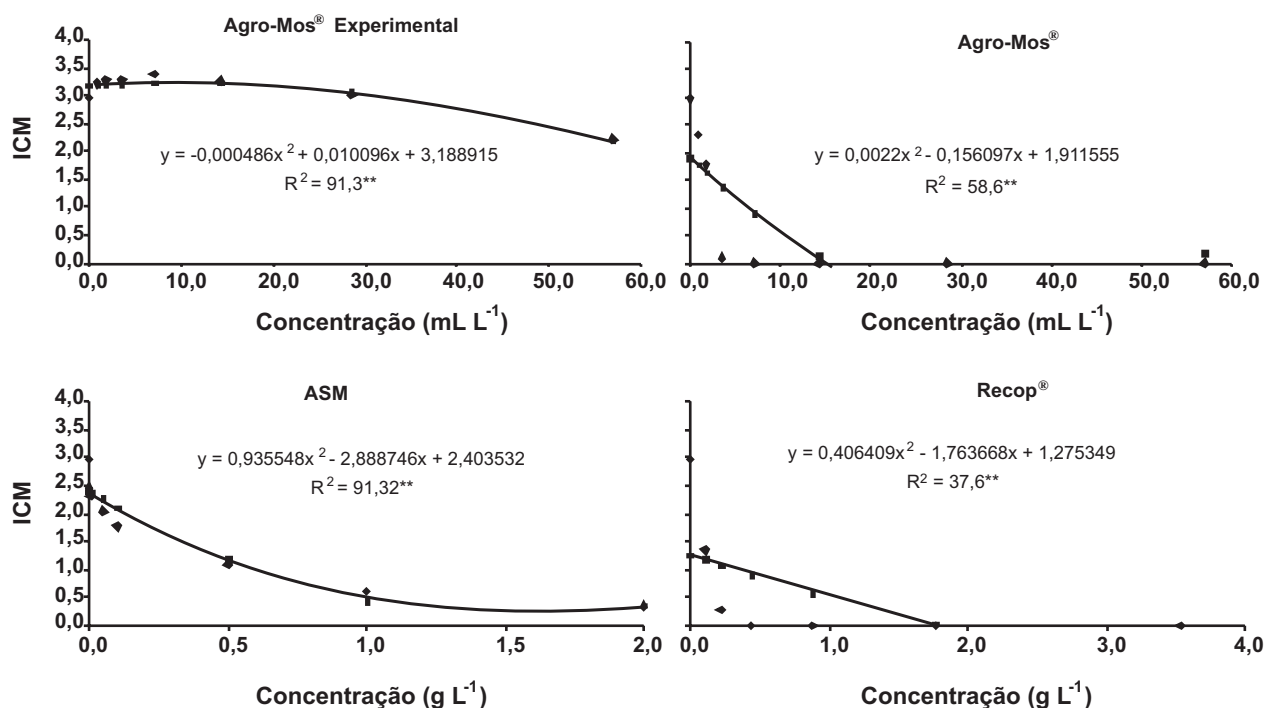


FIGURA 1 - Efeito dos produtos e doses sobre o índice de crescimento micelial (ICM) de *Moniliophthora perniciosa*. Agro-Mos[®] Experimental nas doses de: 0; 0,8906; 1,7813; 3,5625; 7,125; 14,25; 28,5 e 57,0 mL de produto L⁻¹ de solução; Agro-Mos[®] nas doses de: 0; 0,8906; 1,7813; 3,5625; 7,125; 14,25; 28,5 e 57,0 mL de produto L⁻¹ de solução; ASM nas doses de: 0; 0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 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.

mudas de cacaueteiro. Além disso, foi utilizado também o produto Agro-Mos[®] Experimental (sem Cu⁺⁺) na mesma dosagem.

A atividade de quitinases em mudas tratadas com ASM foi 62% superior em relação à testemunha, 6 horas após pulverização (0,25 dia após pulverização – d.a.p.) com pico de atividade 92% maior, 24 horas (1 d.a.p.) após a pulverização, mantendo-se superior à testemunha até dois d.a.p. Aos oito d.a.p., 24 horas após inoculação com *M. 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 2A). Incrementos na atividade de quitinases aos 8 d.a.p., em mudas de cacaueteiro 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 – *Hemileia vastatrix* (Guzzo et al., 2004) e tomateiro – *Xanthomonas vesicatoria* (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 2). Em tratamento com Agro-Mos[®], a atividade de quitinases foi 101% maior que a testemunha, 24 horas (1 d.a.p.) após a pulverização. Seis horas após inoculação (7,25 d.a.p.), 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 d.a.p.) (Figura 2B). Em tratamento com o

Agro-Mos[®] Experimental, também foi observado aumento na atividade desta enzima 6 horas após pulverização (0,25 d.a.p.), pico aos quatro e oito d.a.p., de 55 e 107%, respectivamente, e maiores que a testemunha (Figura 2C).

A atividade de β-1,3-glucanases em mudas tratadas com Agro-Mos[®] foi maior do que na testemunha absoluta, até os quatro d.a.p., apresentando pico às 6 horas (0,25 d.a.p.), para o Agro-Mos[®], enquanto, para o Agro-Mos[®] Experimental, o pico de atividade ocorreu às 12 horas (0,5 d.a.p.), com aumento na atividade de 162% e 102%, respectivamente. Novos incrementos na atividade desta enzima foram observados aos oito e 14 d.a.p., e um e sete dias após inoculação, respectivamente. (Figuras 2E-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 et al., 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 seis horas (0,25 DAP) até quatro d.a.p. Vinte e quatro horas após a inoculação com *M. perniciosa* (8 d.a.p.), a atividade voltou a aumentar, em relação à testemunha, tanto para mudas inoculadas como para não inoculadas, mantendo-se até 14 d.a.p. (Figura 2D). O aumento da atividade dessa enzima até o 14 d.a.p. também foi observado por Cavalcanti et al. (2008), em mudas de cacaueteiro inoculadas e não inoculadas com *Verticillium dahliae* Kleb. A ativação da β-1,3-glucanase também foi obtida com tratamento com ASM em macieira, pimentão, tomateiro e cafeeiro (Brisset et al., 2000; Guzzo et al., 2004; Baysal et al., 2005; Cavalcanti et al., 2007).

TABELA 2 - Porcentagem média da inibição do crescimento micelial (ICM) de *Moniliophthora perniciosa*, concentração mínima inibitória (CMI) e concentração capaz de inibir 50 % do crescimento micelial (DL₅₀), em função dos produtos e doses

Produtos	ICM							CMI (mL pc L ⁻¹)	DL ₅₀ (mL L ⁻¹)
	Concentrações (mL pc L ⁻¹) ^c								
	0,8906	1,7813	3,5625	7,125	14,25	28,5	57,0		
Agro-Mos ^{®a}	20,3	39,9	96,1	100	100	100	100	3,5625-7,125	2,96
Agro-Mos ^{®b} Experimental	-0,3	-0,1	-1,0	-2,9	0,7	7,0	18,2	>57	70,55
	ICM							CMI (g pc L ⁻¹)	DL ₅₀ (g L ⁻¹)
	Concentrações (g pc L ⁻¹) ^d								
	0,0554	0,1107	0,2214	0,4429	0,8857	1,7714	3,5429		
Recop ^{®a}	46,6	88,1	100	100	100	100	100	0,1107-0,2214	0,06
	ICM							CMI (g ia L ⁻¹)	DL ₅₀ (g L ⁻¹)
	Concentrações (g ia L ⁻¹)								
	0,001	0,01	0,05	0,1	0,5	1,0	2,0		
ASM	7,4	11,4	22,5	33,3	59,6	75,0	79,2	>2	0,36

^a = doses equivalentes a 26,7; 53,4; 106,8; 213,6; 427,2; 854,4 e 1708,8 ppm de Cu⁺⁺; ^b = valores negativos referem-se ao estímulo ao crescimento do fungo *M. perniciosa*; ^c = mL pc L⁻¹ - mililitro de produto comercial por litro; ^d = g ia L⁻¹ - grama de ingrediente ativo por litro.

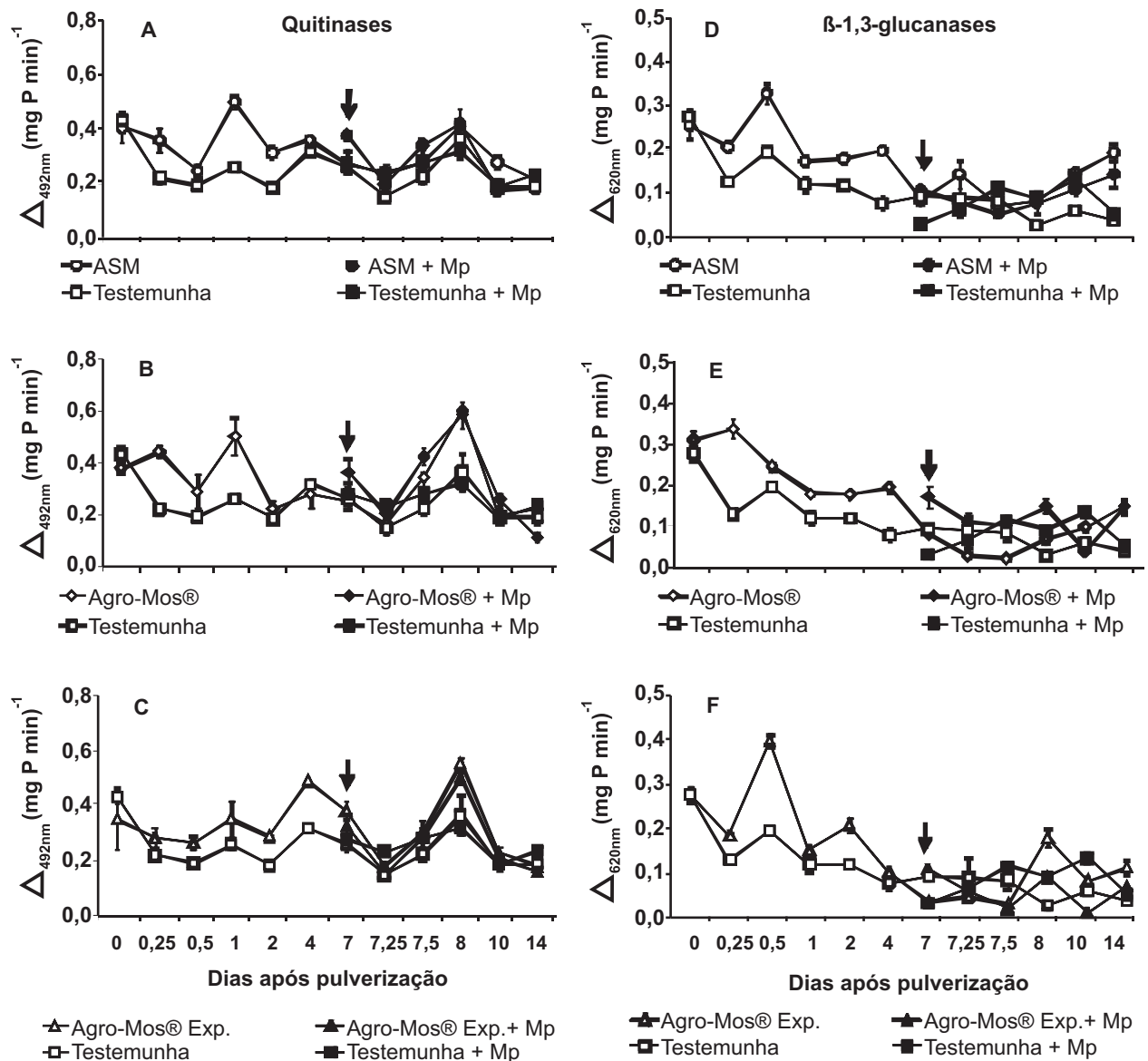


FIGURA 2 A, B e C - atividades de quitinases (CHI) e D, E e F: de β-1,3-glucanases (GLU), em mudas de cacauero cv. Catongo, após tratamentos com: acibenzolar-S-metil (ASM), Agro-Mos® e Agro-Mos® Experimental (Exp.), comparada com a testemunha. Setas indicam inoculação com *Moniliophthora perniciosa* (MP), sete dias após pulverização. Barras de erros indicam erro padrão da média.

As quitinases e as β-1,3-glucanases apresentam ação direta contra patógenos, degradando a parede celular, com o objetivo de impedir o estabelecimento do patógeno na planta. Neste processo, polímeros de N-acetilglucosamina e β-1,3-glucana, provenientes da parede celular de fungos ou bactérias degradadas por estas enzimas, podem funcionar como eliciadores e ativar outros mecanismos de defesa (Okinaka et al., 1995).

Mudas tratadas com Agro-Mos® e não inoculadas expressaram maior atividade de peroxidases um d.a.p. (113% maior que a testemunha), enquanto que mudas inoculadas apresentaram maiores atividades aos 7,25 e 10 d.a.p. (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 d.a.p. (Figura 3C).

As peroxidases de guaiacol em mudas tratadas com ASM e não inoculadas apresentaram maiores atividades aos 0,25, 7,25 e oito d.a.p., 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 d.a.p.) após a inoculação com o patógeno (70%) (Figura 3A). As atividades de peroxidases de guaiacol em mudas de cacauero 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). As peroxidases de plantas participam de diversos processos fisiológicos, dentre eles a formação de lignina e são frequentemente utilizadas como marcadores enzimáticos para os estudos da resistência sistêmica adquirida. A atividade desta enzima é frequentemente aumentada em resposta aos estresses, ao ataque de patógenos e aos tratamentos com indutores, sendo a proteção celular contra reações oxidativas também uma das suas principais funções (Cakmak & Horst, 1991). Confirmando os resultados do presente estudo, Pereira (2008), utilizando a técnica de RT – qPCR, observou um aumento na expressão dos genes que codificam peroxidases e quitinases em plantas de cacau, devido à pulverização de plantas de cacau com Agro-Mos® e ASM.

Com relação à atividade de oxidases de polifenóis das mudas tratadas com ASM e não inoculadas detectou-se incremento de 63%, 57% e 61%, aos 0,25, 2 e 4 d.a.p., respectivamente em relação à testemunha não inoculada. Aos 10 d.a.p., tanto mudas inoculadas como não inoculadas apresentaram um pico desta enzima (Figura 3D). Nas mudas pulverizadas com Agro-Mos® e não inoculadas, foi observada maiores atividades desta enzima aos 0,25, 2, 4 e 7,25 d.a.p., enquanto que, em mudas inoculadas, o pico foi observado somente aos 7,25 d.a.p. (Figura 3E). Para mudas tratadas com Agro-Mos® Experimental, foi observado maior aumento na atividade a partir da inoculação (7 d.a.p.), com pico aos 10 d.a.p. (Figura 3F). 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 exibirem atividade antimicrobiana (Leatham et al., 1980).

Os teores de lignina solúvel e de fenóis solúveis totais em mudas tratadas com o ASM, Agro-Mos® e Agro-Mos® Experimental não diferiram em relação aos das testemunhas, em todas as épocas de avaliação (11 e 14 DAP) (Tabela 3). Resultado semelhante foi obtido por Cavalcanti et al. (2008) em mudas de cacau inoculadas e não inoculadas com *V. dahliae* e tratadas com ASM, que, aos 13 d.a.p., não apresentaram diferenças significativas em relação às testemunhas. Entretanto, diferenças entre os tratamentos ASM e testemunha, para estes compostos, foram observadas aos 18 d.a.p. 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 a lignina induzida (acumulada ao redor do ponto de penetração do patógeno, por exemplo) e a lignina constitutiva (encontrada naturalmente na parede celular dos tecidos vegetais) (Taiz & Zeiger, 2004; Agrios, 2005). Assim, certamente não foram detectadas diferenças significativas entre os produtos testados e a testemunha, neste e em outros trabalhos, pelo fato de a lignina induzida ser uma pequena fração da lignina total.

Nas condições experimentais adotadas, a redução da incidência da vassoura-de-bruxa em mudas de cacau tratadas com Agro-Mos®, associada ao efeito tóxico *in vitro* deste produto sobre *M. perniciosa* e ao aumento das atividades de quitinases, β -1,3-glucanases, peroxidases de guaiacol e oxidases de polifenóis, evidencia que o Agro-Mos®, possivelmente, atua duplamente sobre o patógeno, por meio de um efeito direto de proteção e pela ativação de mecanismos de indução de resistência. A indicação desse produto como indutor de resistência, já testado em casa-

TABELA 3 - Teores de lignina solúvel em ácido tioglicólico ($\mu\text{g mg}^{-1} \text{MS}^{-1}$) e de fenóis solúveis totais (μg de catecol $\text{mg}^{-1} \text{MS}^{-1}$) em mudas de cacau cv. Catongo, após tratamentos com: acibenzolar-S-metil (ASM), Agro-Mos® e Agro-Mos® Experimental, comparados com a testemunha

Tratamentos	Lignina sdúvel em ácido tioglicólico ($\mu\text{g mg}^{-1} \text{MS}^{-1}$)		Fenóis solúveis totais (μg de catecol $\text{mg}^{-1} \text{MS}^{-1}$)	
	Dias após pulverizações (DAP)			
	11	14	11	14
ASM	17,50 a	15,25 a	6,63a	3,96 a
ASM + MP	16,75 a	13,00 a	6,41 a	5,81 a
Agro-Mos®	14,25 a	14,75 a	7,99 a	4,80 a
Agro-Mos® + MP	14,75 a	17,50 a	7,37 a	4,77 a
Agro-Mos® Experimental	14,50 a	10,00 a	6,19 a	4,72 a
Agro-Mos® Experimental +MP	15,00 a	12,25 a	6,14 a	4,72 a
Testemunha	16,50 a	14,00 a	6,44 a	4,26 a
Testemunha +MP	15,00 a	11,25 a	6,72 a	5,18 a

+ MP: representa a inoculação com *Moniliophthora perniciosa* sete dias após pulverização (DAP) com respectivos tratamentos.

Colunas com as mesmas letras não apresentam diferença significativa pelo teste de Scott-Knott ($P=0,05$).

$\mu\text{g mg}^{-1} \text{MS}^{-1}$ = micrograma por miligrama de massa seca.

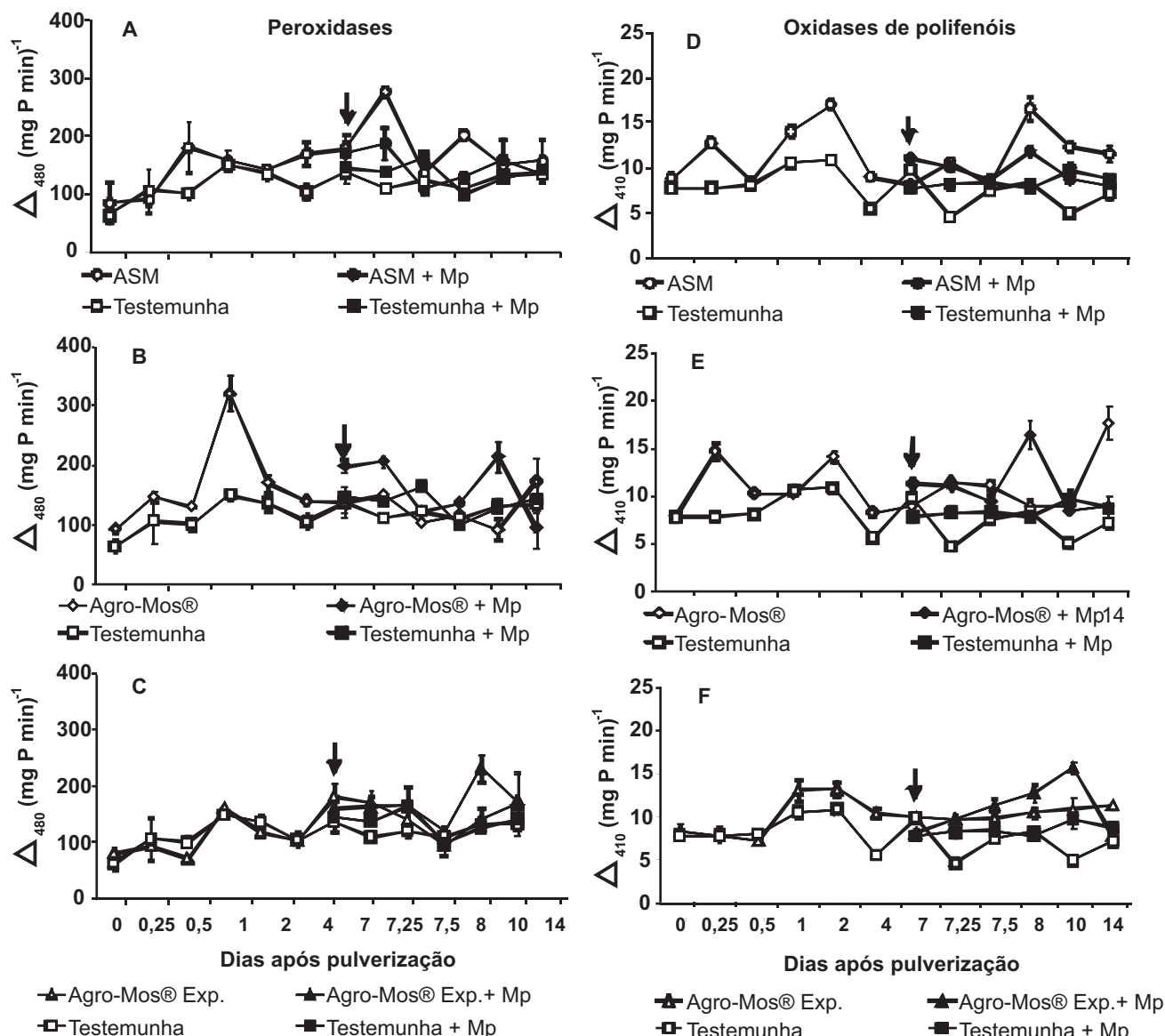


FIGURA 3 A, B e C - Atividades de peroxidases de guaiacol (POX) e D, E e F: de oxidases de polifenóis (PPO), em mudas de cacauero cv. Catongo, após tratamentos com: acibenzolar-S-metil (ASM), Agro-Mos® e Agro-Mos® Experimental (Exp.) comparada com a testemunha. Setas indicam inoculação com *Moniliophthora perniciosa* (MP), sete dias após pulverização. Barras de erros indicam erro padrão da média.

de-vegetação, merece maiores estudos em condições de campo, uma vez que ele possui potencial econômico para o controle da vassoura-de-bruxa, reduzindo, principalmente, a frequência da poda fitossanitária e a dosagem e/ou o número de aplicações de fungicida no manejo integrado da enfermidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrios GN (2005) Plant Pathology. 5th Ed. Amsterdam. Elsevier Academic Press.

Albuquerque PSB, Bastos CN, Luz EDMN, Silva SDVM (2005) Doenças do cacauero. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds.) Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas v.2. São Paulo SP. Agronômica Ceres. pp. 151-164.

Anterola AM, Lewis NG (2002) Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* 61:221-294.

Baysal Ö, Turgut C, Mao G (2005) Acilbenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves. *Biologia Plantarum* 49:599-604.

Benhamou N, Bélanger RR (1998) Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*

- in tomato. *Plant Physiology* 118:1203-1212.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Brisset MN, Cesbron S, Thomson SV, Paulin JP (2000) Acilbenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European Journal of Plant Pathology* 106:529-536.
- Cakmak I, Horst JH (1991) Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* 83:463-468.
- Cavalcanti FR, Resende MLV, Carvalho CPS, Silveira JAG, Oliveira JTA. (2007) An aqueous suspension of *Crinipellis pernicioso* mycelium activates tomato defence responses against *Xanthomonas vesicatoria*. *Crop Protection* 26:729-738.
- Cavalcanti FR, Resende MLV, Ribeiro Júnior PM, Pereira RB, Oliveira JTA (2008) Induction of resistance against *Verticillium dahliae* in cacao by a *Crinipellis pernicioso* suspension. *Journal of Plant Pathology* 90:271-278.
- Dantas SAF, Oliveira SMA, Bezerra Neto E, Coelho RSB, Silva RLX (2004) Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. *Summa Phytopathologica* 30:314-319.
- Durrant WE, Dong X (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42:185-209.
- Frias GA, Purdy LH, Schmidt RA (1995) An inoculation method for evaluate resistance of cocoa to *Crinipellis pernicioso*. *Plant Disease* 79:787-791.
- Gauillard F, Richard-Forget F, Nicolas J (1993) New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. *Analytical Biochemistry* 215:59-65.
- Guzzo SD, Harakava R, Lucon CMM, Tsai SM (2004) Resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* e indução local e sistêmica de quitinases e β -1,3-glucanases por acilbenzolar-S-metil. *Summa Phytopathologica* 30:376-381.
- Leatham GF, King M, Syahmann MA (1980) *In vitro* protein polymerization by quinines or free radical generated by plant or fungal oxidative enzymes. *Phytopathology* 70:1134-1140.
- Maguire JD (1962) Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2:176-177.
- Nürnberg T, Brunner F (2002) Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecules. *Current Opinion in Plant Biology* 5:1-7.
- Okinaka Y, Mimori K, Takeo K, Kitamura S, Takeuchi Y, Yamaoka N, Yoshikawa M (1995) A structural model for the mechanisms of elicitor release from fungal cell walls by plant β -1,3-endoglucanase. *Plant Physiology* 109:839-845.
- Pascholati SF, Leite B (1995) Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L (Eds.) *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos v.1*. São Paulo SP. Agronômica Ceres. pp. 417-454.
- Pereira LM (2008) Expressão Quantitativa de Genes Relacionados à Defesa Induzida em *Theobroma cacao* por Bion® e Agro-Mos® contra *Crinipellis pernicioso*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras. Lavras MG.
- Resende ML, Costa JCB, Cavalcanti FR, Ribeiro Júnior PM, Camilo FR (2007) Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacauero contra a vassoura-de-bruxa. *Fitopatologia Brasileira* 32:213-221.
- Resende MLV, Araujo DV, Costa JCB, Deuner CC, Ferreira JB, Muniz MFS, Reis SN, Santos FS, Cavalcanti LS, Nojosa GBA (2006) Produtos comerciais à base de bioindutores de resistência em plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 14:361-380.
- Resende MLV, Nojosa GBA, Cavalcanti LS, Aguilar MAG, Silva LHCP, Perez JO, Andrade GCG, Carvalho GA, Castro RM (2002) Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acilbenzolar-S-methyl (ASM). *Plant Pathology* 51:621-628.
- Rodrigues FA, Jurick WM, Datnoff LE, Jones JB, Rollins JA (2005) Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66:144-159.
- Rosa RCT, Coelho RSB, Tavares SCCH, Cavalcanti V, Bezerra AL (2007) Efeito de indutores no controle de mildio em *Vitis labrusca*. *Summa Phytopathologica* 33:68-73.
- Soares Pessoa W, Lopes A, Oliveira Costa V, Oliveira S (2007) Efeito do tratamento hidrotérmico associado a indutores de resistência no manejo da antracnose da goiaba em pós-colheita. *Revista Caatinga* 20:129-135.
- Taiz L, Zeiger E (2004) *Fisiologia vegetal*. 3.ed. Porto Alegre RS. Artmed.
- Urbanek H, Kuzniak-Gebarowska E, Herka H (1991) Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. *Acta Physiologia Plantarum* 13:43-50.
- Van Loon LC (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103:753-765.
- Wirth SJ, Wolf GA (1990) Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. *Journal of Microbiological Methods* 12:197-205.