

**INDUTORES DE RESISTÊNCIA CONTRA A
VASSOURA-DE-BRUXA NO CACAUEIRO:
MECANISMOS DE AÇÃO E AVALIAÇÃO EM
CAMPO**

FABRICIO RABELO CAMILO

2009

FABRICIO RABELO CAMILO

**INDUTORES DE RESISTÊNCIA CONTRA A VASSOURA-DE-BRUXA
NO CACAUEIRO: MECANISMOS DE AÇÃO E AVALIAÇÃO EM
CAMPO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, área de concentração em Fisiologia do Parasitismo, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. Mário Lucio V. Resende, PhD

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

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

Camilo, Fabricio Rabelo.

Indutores de resistência contra a vassoura-de-bruxa no cacauero
: mecanismos de ação e avaliação em campo / Fabricio Rabelo
Camilo. – Lavras : UFLA, 2009.

53 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende.

Bibliografia.

1. *Crinipellis perniciosa*. 2. *Theobroma cacao*. 3. Indutores de
resistência. 4. Vassoura-de-bruxa. 5. Marcadores bioquímicos. 6.
Aplicação em campo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.7494

FABRICIO RABELO CAMILO

**INDUTORES DE RESISTÊNCIA CONTRA A VASSOURA-DE-BRUXA
NO CACAUEIRO: MECANISMOS DE AÇÃO E AVALIAÇÃO EM
CAMPO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, área de concentração em Fisiologia do Parasitismo, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 24 de setembro de 2009.

Prof. Dr. Marco Antonio Galeas Aguilar	MAPA/CEPLAC
Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu	UFLA

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

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

DEDICO

*A Deus,
que esteve sempre comigo em toda a minha caminhada,
dando-me força, paciência e coragem quando em mim já não
havia e que sempre me estimulou a seguir em frente.*

*A meus pais e irmãos,
Ali, Círia, Matozalém, José Rabelo e Adalberto, que muito amo,
que compartilharam de meus ideais, compreenderam-me,
incentivaram-me, viveram comigo meus problemas
e sempre tentaram solucioná-los, dando-me apoio
incondicional, até mesmo quando a distância nos
separava, ajudando-me a superar todos os obstáculos,
dividindo comigo minhas dificuldades.
A meu filho, Gustavo e minha esposa, Dayana, pela
paciência e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos meus familiares, pelo incentivo, amor e por estarem sempre ao meu lado, em todos os momentos, dando-me boas oportunidades.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade e auxílios concedidos para a realização do curso de agronomia.

À Capes, pela bolsa de estudos.

Ao professor Mário Lúcio Vilela de Resende, pela amizade, orientação e compreensão.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, pela convivência e amizade.

Aos graduandos Lucas e Manoel que muito contribuíram para a realização dos trabalhos.

Aos colegas de mestrado Rodrigo, Dani, Ana Cristina, Luiz Henrique, Vanessa e Stélio.

Aos amigos da Fitopatologia, Bruno e Moisés, pelas conversas e amizade.

Aos pós-doutores Pedro, Daniel e Ricardo, pelo apoio e auxílio.

A todos os servidores técnico-administrativos do Departamento de Fitopatologia, em especial a Eloísa Leite, Ruth, Eliana e Ana, pela paciência e amizade.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, em especial para o Dr. Mário Sobral de Abreu, pelos ensinamentos e pelo exemplo de profissionais comprometidos com a pesquisa e a educação.

Aos amigos Dr. João de Cássia e Dr. Marco Antonio, pelas contribuições ao trabalho.

Aos amigos da CEPLAC Bahia e Espírito Santo e das fazendas onde montamos os experimentos, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

À Improcrop do Brasil Ltda., por financiar e acreditar no meu trabalho.

À CEPLAC, por ter contribuído para o desenvolvimento do trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para o cumprimento dessa importante etapa da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Cacauero	3
2.2 <i>Crinipellis pernicioso</i>	3
2.3 Vassoura-de-bruxa.....	4
2.3 Indução de resistência.....	8
2.3.1 Quitinases (CHI; EC 3.2.1.14).....	9
2.3.2 β -1, 3-glucanases (GLU; EC 3.2.1.6)	10
2.3.3 Peroxidases (POX; EC 1.11.1.7)	10
2.3.4 Polifenoloxidasas (PPO; EC 1.10.3.2).....	11
2.4 Produtos naturais e sintéticos no controle de fitopatógenos	11
2.4.1 Acibenzolar-S-metil (ASM)	11
2.4.2 Agro-Mos [®] (mananoligossacarídeo fosforilado).....	12
2.4.3 Fulland [®] (fosfito de cobre).....	13
3 HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Experimento 1. Caracterização de mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa de mudas de cacau pulverizadas com Agro-Mos [®] , comparadas com aquelas pulverizadas com ASM (acibenzolar-S-metil).....	17
4.1.1 Preparação do material vegetal e estabelecimento das condições para crescimento em casa de vegetação.....	17
4.1.2 Produção de inóculo e inoculação das mudas.....	17
4.1.3 Determinações enzimáticas.....	18
4.2 Experimento 2. Avaliação de Agro-Mos [®] e Fulland [®] na proteção de plantas de cacauero contra a vassoura-de-bruxa em campo, no estado do Espírito Santo.....	22
4.3 Experimento 3. Avaliação de Agro-Mos [®] na proteção de plantas de cacauero contra a vassoura-de-bruxa em campo, na região sul do estado da Bahia.....	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26

5.1 Experimento 1. Caracterização de mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa de mudas de cacau pulverizadas com Agro-Mos [®] , comparadas com aquelas pulverizadas com ASM (Acibenzolar-S-Metil)	26
5.2 Experimento 2. Avaliação de Agro-Mos [®] e Fulland [®] na proteção de plantas de cacauero contra a vassoura-de-bruxa em campo, no estado do Espírito Santo.....	34
5.3 Experimento 3. Avaliação de Agro-Mos [®] na proteção de plantas de cacauero contra a vassoura-de-bruxa em campo, na região sul do estado da Bahia.....	40
6 CONCLUSÕES	45
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Épocas de coleta de amostras de tecidos de cacaueteiro para análises bioquímicas.21
- FIGURA 2 Atividade de peroxidases de guaiacol (A) em mudas de cacaueteiro não inoculadas com *C. pernicioso*, aos 0; 0,5; 2; 4; 7; 7,5; 9 e 11 dias após pulverização (DAP). Tratamentos: ASM – Acibenzolar-S-Metil, Agro-Mos[®] e água (testemunha). Atividade de peroxidases de guaiacol (B) em mudas de cacaueteiro inoculadas com *C. pernicioso*, aos 7; 7,5; 9 e 11 DAP. Tratamentos: ASM (+) – Acibenzolar-S-Metil, Agro-Mos[®] (+) e água (+) (testemunha inoculada). A inoculação ocorreu aos 7 DAP. O sinal (+) indica tratamentos inoculados. A sigla (ns) significa que os tratamentos não diferiram entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Médias com mesma letra, em cada época de avaliação, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Barras de erros indicam o erro padrão da média.27
- FIGURA 3 Atividade de polifenoloxidasas (A) em mudas de cacaueteiro não inoculadas com *C. pernicioso*, aos 0; 0,5; 2; 4; 7; 7,5; 9 e 11 dias após pulverização (DAP). Tratamentos: ASM – Acibenzolar-S-Metil, Agro-Mos[®] e água (testemunha). Atividade de polifenoloxidasas (B) em mudas de cacaueteiro inoculadas com *C. pernicioso*, aos 7; 7,5; 9 e 11 DAP. Tratamentos: ASM (+) – Acibenzolar-S-Metil, Agro-Mos[®] (+) e água (+) (testemunha inoculada). A inoculação ocorreu aos 7 DAP. O sinal (+) indica tratamentos inoculados. A sigla (ns) significa que os tratamentos não diferiram entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Médias com mesma letra, em cada época de avaliação, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Barras de erros indicam o erro padrão da média. .29
- FIGURA 4 Atividade de quitinasas (A) em mudas de cacaueteiro não inoculadas com *C. pernicioso*, aos 0; 0,5; 2; 4; 7; 7,5; 9 e 11 dias após pulverização (DAP). Tratamentos: ASM – Acibenzolar-S-Metil, Agro-Mos[®] e água (testemunha). Atividade de quitinasas (B) em mudas de cacaueteiro inoculadas com *C. pernicioso*, aos 7; 7,5; 9 e 11 DAP. Tratamentos: ASM (+) – Acibenzolar-S-Metil, Agro-Mos[®] (+) e água (+) (testemunha inoculada). A inoculação ocorreu aos 7 DAP. O sinal (+) indica tratamentos inoculados. A sigla (ns) significa que os tratamentos não diferiram entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Médias com mesma letra, em cada época de avaliação, não diferem, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Barras de erros indicam o erro padrão da média.31

FIGURA 5	Atividade da β -1, 3-glucanase (A) em mudas de cacaueteiro não inoculadas com <i>C. pernicios</i> a, aos 0; 0,5; 2; 4; 7; 7,5; 9 e 11 dias após pulverizaoo (DAP). Tratamentos: ASM – Acibenzolar-S-Metil, Agro-Mos [®] e água (testemunha). Atividade da β -1, 3-glucanase (B) em mudas de cacaueteiro inoculadas com <i>C. pernicios</i> a, aos 7; 7,5; 9 e 11 DAP. Tratamentos: ASM (+) – Acibenzolar-S-Metil, Agro-Mos [®] (+) e água (+) (testemunha inoculada). A inoculaoo ocorreu aos 7 DAP. O sinal (+) indica tratamentos inoculados. A sigla (ns) significa que os tratamentos não diferiram entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Médias com mesma letra, em cada época de avaliaoo, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Barras de erros indicam o erro padrão da média.	33
FIGURA 6	Número de vassouras vegetativas em funoo das doses de Agro-Mos [®] (A) e Fulland [®] (B).	35
FIGURA 7	Número de almofadas florais infectadas para as safras 2007/08 e 2008/09. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).	36
FIGURA 8	Número de vassouras totais encontradas nos tratamentos. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).	37
FIGURA 9	Avaliaoo do número de vassouras totais em relaoo às safras 2007/08 e 2008/09. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).	37
FIGURA 10	Número de vassouras totais em funoo das doses de Agro-Mos [®]	38
FIGURA 11	Porcentagem de controle dos tratamentos em relaoo  testemunha para o número de vassouras totais.	38
FIGURA 12	Avaliaoo do número de frutos maduros infectados em relaoo às safras 2007/08 e 2008/09. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).	39
FIGURA 13	Número de almofadas florais infectadas em funoo das dosagens do produto Agro-Mos [®] . Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).	40
FIGURA 14	Número de vassouras total em relaoo às dosagens do produto Agro-Mos [®] . Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).	41
FIGURA 15	Porcentagem de controle dos tratamentos em relaoo  testemunha para o número de vassouras totais.	42
FIGURA 16	Número de frutos maduros infectados em relaoo aos períodos avaliados. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).	42

FIGURA 17	Número de frutos maduros sadios em relação aos tratamentos. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	43
FIGURA 18	Número de frutos maduros totais em relação aos tratamentos. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	44

RESUMO

CAMILO, Fabricio Rabelo. **Indução de resistência contra a vassoura-de-bruxa do cacauero**: mecanismos de ação e avaliação em campo. 2009. 53p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar métodos alternativos de controle da vassoura-de-bruxa do cacauero, baseados na indução de resistência de amplo espectro, compatíveis com outras estratégias já empregadas no manejo integrado dessa enfermidade, no campo. Os mecanismos bioquímicos de defesa induzida em cacauero também foram estudados nos casos dos eliciadores de resistência mais efetivos. Para cumprir os objetivos propostos, foram realizados os seguintes experimentos: 1. Caracterização de mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa de mudas de cacau pulverizadas com Agro-Mos[®], comparadas com aquelas pulverizadas com Acibenzolar-S-Metil (ASM); 2. Avaliação de Agro-Mos[®] e Fulland[®] na proteção de plantas de cacauero contra a vassoura-de-bruxa, em campo, no estado do Espírito Santo e 3. Avaliação de Agro-Mos[®] na proteção de plantas de cacauero contra a vassoura-de-bruxa em campo, na região sul do estado da Bahia. Em mudas de cacauero tratadas com o Agro-Mos[®] observou-se o aumento da síntese de peroxidases de guaiacol, polifenoloxidasas, quitinases e β -1, 3-glucanase, quando comparadas com a testemunha pulverizada com água. No estado do Espírito Santo, o Agro-Mos[®] reduziu a incidência de vassoura-de-bruxa em cacaueros adultos, na dosagem de 5 mL L⁻¹ (68,5% de controle em relação à testemunha). O Fulland[®] e o ASM não apresentaram resultados consistentes no controle da vassoura-de-bruxa do cacauero em campo. A aplicação dos produtos não interferiu na produção de amêndoas de cacau. Já no estado da Bahia, o Agro-Mos[®] reduziu a incidência de vassoura-de-bruxa em plantas de cacauero na dosagem de 10 mL L⁻¹, com 54,1% de controle em relação à testemunha.

* Orientador: Mário Lucio V. Resende, PhD - UFLA

ABSTRACT

CAMILO, Fabricio Rabelo. **Resistance induction against cacao witch's broom**: modes of action and field performance. 2009. 53p. Dissertation (Master in Agronomy / Plant pathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The present work aimed at evaluating alternative methods for witch's broom control, based on the broad spectrum resistance induction, compatible with other strategies already employed in the disease integrated management in the field. The biochemical mechanisms of defense induced in cacao were also studied for the most effective resistance elicitors. To achieve the established objectives, the following experiments were performed: 1. Characterize the biochemical mechanisms involved in cacao seedling defense responses when sprayed with Agro-Mos[®], compared to those sprayed with ASM (Acibenzolar-S-Methyl); 2. Evaluate Agro-Mos[®] and Fulland[®] in the protection of cacao plants against witch's broom in a field at Espírito Santo State; 3. Evaluate Agro-Mos[®] in the protection of cacao plants against witch's broom in afield at South Bahia State. In cacao seedlings treated with Agro-Mos[®] an increase in the synthesis of guaiacol peroxidase, polyphenoloxidases, chitinases and β -1, 3-glucanases was observed when compared to water control plants. In Espírito Santo State, Agro-Mos[®] reduced the witch's broom incidence in adult cacao trees, when used at the 5 mL L⁻¹ rate (68.5% disease reduction compared to the control). Fulland[®] and ASM did not present consistent results in disease control in the field. In Bahia State's experiments, Agro-Mos[®] reduced witch's broom incidence in cacao plants at the 10 mL L⁻¹ rate with 54.1% disease control compared to the control. None of the tested products interfered on cacao bean yield.

* Advisor: Mário Lucio V. Resende, PhD - UFPA

1 INTRODUÇÃO

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, essa 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, principalmente na Costa do Marfim (37,3%) citado por Costa (2008). 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 (Anuário..., 2008).

A produção brasileira de cacau está concentrada nos estados do Bahia (70%), Pará (19%), Rondônia (6,9%), Espírito Santo (4,1%), Amazonas (0,7%) e Mato Grosso (0,1%) e que, durante décadas, teve a cacauicultura como principal atividade agrícola (Okabe et al., 2004; Anuário..., 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 (Anuário..., 2000).

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).

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 antagônicos à *C. perniciosa* e a indução de resistência baseada na ativação de mecanismos de defesa latentes no cacaueteiro 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, no patossistema cacaueteiro x *C. perniciosa*, os seguintes indutores de resistência:
 - 1) Agro-Mos[®];
 - 2) Fulland[®];
- b) Caracterizar reações de defesa do cacaueteiro desenvolvidas em função do estímulo de indução de resistência pelo Agro-Mos[®], utilizando-se as seguintes ferramentas: avaliação da atividade das enzimas peroxidase, quitinase, glucanase e polifenoloxidasas;
- c) Fornecer métodos alternativos para o manejo integrado da vassoura-de-bruxa do cacaueteiro, com a disponibilização de produtos menos tóxicos ao homem e ao ambiente e compatível com outras metodologias já empregadas no manejo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cacaueiro

O cacaueiro, *Theobroma cacao* L., é uma espécie de porte arbóreo, originária das florestas tropicais úmidas da América do Sul.

O cacaueiro pertencente à família Malvaceae é uma árvore típica de sub-bosque e perene. As primeiras atividades extrativistas dessa cultura eram restritas à região norte do Brasil, tendo sido introduzido no sul da Bahia em 1746. Posteriormente, o cacau foi disseminado para África, constituindo os plantios de São Tomé, Príncipe, Nigéria e Costa do Marfim (Silva Neto, 2001).

A produção mundial de cacau no ano agrícola 2004/2005 foi de três milhões de toneladas, sendo 72,4% oriunda de países africanos e o restante do sudoeste da Ásia e das Américas do Sul e Central citado por Costa (2008).

O cultivo do cacau necessita da sombra de árvores nativas da Mata Atlântica, em um sistema de produção agroflorestal denominado “cabruca”.

Até a década de 1980, o cultivo do cacau constituía a base da economia do estado da Bahia, com produção de, aproximadamente, 400.000 toneladas de sementes secas, em 1986 (Bastos & Andebrhan, 1986). Entretanto, a lavoura no sul da Bahia mudou drasticamente a partir de 1989, com a chegada da vassoura-de-bruxa (Pereira et al., 1989). A doença, ao encontrar condições ambientais favoráveis na região, disseminou-se rapidamente, atingindo proporções epidêmicas e acarretando a redução drástica na produção, da ordem de 75%, levando o país da condição de exportador para a importador.

2.2 *Crinipellis perniciosa*

A vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, foi observada, em 1885, no Suriname. No Brasil, o relato mais antigo da doença data de 1785, na Amazônia, onde foi descrita como “lagartão”. Até 1988,

a doença não havia sido detectada em cacauais distantes da região amazônica, mas, em 1989, foi relatada na região cacaueira baiana (Bastos, 1990).

O fungo *C. pernicioso* pertence à classe Basiodimicetes, ordem Agaricales e família Agaricaceae, apresentando duas fases fisiológicas e morfológicas distintas: uma fase parasítica, monocariótica, de crescimento intercelular, com ausência de grampos de conexão, encontrada em tecidos vivos e outra fase, a saprofítica, dicariótica, com crescimento intracelular e presença de grampos de conexão, encontrada somente em tecidos mortos (Bastos, 1990). Esse fungo ataca, principalmente, os tecidos jovens, meristemáticos, como brotos, almofadas florais e frutos, provocando sintomas característicos de desequilíbrio hormonal que ocorre em interações patógeno-hospedeiro (Bastos, 1990).

2.3 Vassoura-de-bruxa

A vassoura-de-bruxa do cacauero foi observada cientificamente, pela primeira vez, no Suriname, em 1895 (Holliday, 1952). 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, Espírito Santo (Silva et al., 2002). Essa enfermidade tem 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 Lúcia e São Vicente (Bastos, 1990; Silva et al., 2002).

O fungo *C. pernicioso* é considerado endêmico na bacia Amazônica (Bastos, 1990). Além de afetar o cacauero, também atinge outras espécies, como *T. grandiflorum* (cupuaçu), *T. bicolor* (cacau-do-pará), *T. obovatum* (cacau-cabeça-de-urubu), *T. microcarpum* (cacau-jacarê), *T. subincanum* (cupuí) *T. speciosum* (cacaui) e *T. subincanum* (cupuí), bem como membros da família

Solanaceae, *Solanum laseantherum* e *S. rugosum* (juçara) (Bastos & Evans, 1985) e membros da família Bixaceae, como *Bixa orellana* (urucunzeiro) (Bastos & Andebrhan, 1986). Recentemente, *Heteropteres acutifolia*, pertencente à família Malpighiaceae, foi reportado como novo hospedeiro alternativo de *C. pernicioso* em Minas Gerais, estado não produtor de cacau (Resende et al., 2000).

C. pernicioso é um fungo que 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, quer estejam presos à planta, quer se achem no solo. O micélio secundário do fungo não é infectivo; somente os basidiósporos de coloração hialina e dimensões de 10-14 μ x 4-5 μ , que são produzidos no interior dos basidiomas, são capazes de induzir a doença (Bastos, 1990).

A infecção ocorre, principalmente, em tecidos jovens, meristemáticos, como brotos vegetativos, almofadas florais e frutos, provocando sintomas característicos de desequilíbrio hormonal que ocorrem em interações patógeno-hospedeiro. Os ramos vegetativos infectados tornam-se hipertrofiados e com intensa proliferação lateral de outros brotos, apresentando aspecto de vassoura. Os brotos infectados têm diâmetros maiores que os normais, encurtamento de entrenós e folhas geralmente grandes, retorcidas ou curvadas e com pulvinos hipertrofiados (Bastos, 1990; Aguilar, 1999).

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 basídias, de onde são liberados ativamente (ejetados). Após a

liberação, que ocorre geralmente entre 18h00 e 6h00, os basidiósporos são levados pelas correntes aéreas (disseminação), necessitando serem depositados rapidamente sobre os locais (sítios de infecção) do hospedeiro. Nesses locais, os esporos germinam e penetram, uma vez que, após uma hora de exposição ao ar livre, submetidos à radiação solar e ao dessecamento, perdem a viabilidade rapidamente. 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). Para que haja infecção é preciso que os basidiósporos sejam depositados sobre regiões meristemáticas (gemas vegetativas, florais e/ou frutos em formação até os 3 meses de idade), onde penetram diretamente ou através dos estômatos.

Nas gemas dormentes, a infecção torna-se latente, assumindo o aspecto de pequenos cancos 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 (safras) da planta. Nos tecidos infectados ocorre intensa multiplicação (hipertrofia), que dura algumas semanas e, em seguida, sobrevêm a morte das células e a 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, se dá o aparecimento dos basidiomas ou frutificações do patógeno. Esse ciclo de basidioma a basidioma ocorre uma vez por ano na Amazônia, mas, na Bahia, pode ocorrer até duas vezes, sendo uma na safra temporã (1º semestre) e outra na safra principal (2º semestre).

A vassoura-de-bruxa é, assim, uma doença monocíclica, pois os tecidos infectados não produzem novos esporos capazes de iniciar novas infecções na

mesma estação (safra). Embora esporos possam estar sendo liberados durante toda a estação, estes provêm de basidiomas desenvolvidos em tecidos infectados em estações anteriores.

Os períodos de duração das diferentes fases do ciclo vital de *C. pernicioso* foram estudados, na Bahia, por Luz et al. (1994) e são as seguintes: período de incubação - 4 semanas em média; período entre o aparecimento de vassouras verdes e o seu secamento - 7,5 semanas em média; período de dormência das vassouras secas - 13 semanas em média, podendo variar para mais ou para menos, dependendo do tamanho e da localização da vassoura; período de atividade da vassoura seca - 22 meses, em média; período de atividade do fruto mumificado - 24 meses, em média; 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 picos menores variando de época, de ano para ano (Almeida & Luz, 1995). Um basidioma se mantém ativo durante cinco dias, em média, liberando milhões de esporos nas primeiras horas do dia durante a sua vida útil (Luz et al., 1997).

O manejo da doença é feito mediante a poda fitossanitária de todos os tecidos infectados antes da estação chuvosa, porém, essa prática é trabalhosa e cara. A aplicação de fungicidas é um complemento à poda fitossanitária, visando proteger os frutos contra infecções. No entanto, o uso de fungicidas representa um custo adicional expressivo. O controle genético é uma medida de médio e longo prazo, duradoura, porém, não definitiva, devido ao provável surgimento de novos patótipos do fungo e à necessidade permanente do desenvolvimento de novas variedades resistentes. O controle biológico por meio de microorganismos antagonistas é mais uma opção para o manejo integrado da doença, com as vantagens do baixo custo e de se constituir numa tecnologia mais segura para o meio ambiente, em comparação ao controle químico. Até o presente momento, a

prática ideal tem sido a adoção conjunta de todas essas técnicas no manejo integrado da doença.

2.3 Indução de resistência

Indução de resistência é definida como um aumento da capacidade de defesa da planta contra um amplo espectro de organismos fitopatogênicos, incluindo fungos, bactéria e viroses (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 (Stangarlin & Pascholati, 1992; Stadnik, 1999), ou por ativadores químicos, como ácido aminobutírico (Cohen, 1996), ácido 2,6-dicloroisonicotínico e acibenzolar-S-metil, ASM, (Ciba Technical Data Sheet, 1995).

A resistência induzida (RI) ativa mecanismos de defesa representados por barreiras bioquímicas e/ou estruturais, aumentando a 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 um mecanismo de defesa constitutivo da mesma.

A RI foi subdividida em duas categorias, a resistência sistêmica adquirida (RSA) (Sticher et al., 1997) e a resistência sistêmica induzida (RSI) (Loon et al., 1998). Na primeira, a resistência se desenvolve sistemicamente ou

localizadamente em resposta a um patógeno que causa uma lesão necrótica (RH) ou por aplicação exógena de ácido salicílico ou compostos sintéticos, como o éster S-metil do ácido benzo [1,2,3] tiadiazol-7-carbotioico (BTH) e o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA). Nesta, a resistência expressada, geralmente, é efetiva contra um amplo espectro de patógenos e, geralmente, está associada com a produção de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs), muitas das quais possuem atividade antimicrobianas e são excelentes marcadores moleculares para a resposta de resistência (Hammerschmidt & Smith-Becker, 1999). Já 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 proteína relacionada à patogênese (Loon et al., 1998).

2.3.1 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 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).

2.3.2 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, essa 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 dessas enzimas, reprimindo a ação do patógeno (Mauch & Staehelin, 1989).

2.3.3 Peroxidases (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 H₂O₂ que, por sua vez, podem gerar outros radicais ativos de oxigênio, além de apresentar atividade antimicrobiana direta (Peng & Kuc, 1992).

2.3.4 Polifenoloxidasas (PPO; EC 1.10.3.2)

As polifenoloxidasas 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 polifenoloxidasas 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 polifenoloxidasas possivelmente incrementa as concentrações de produtos tóxicos resultantes da oxidação, aumentando, portanto, o grau de resistência à infecção (Agrios, 2005).

2.4 Produtos naturais e sintéticos no controle de fitopatógenos

2.4.1 Acibenzolar-S-metil (ASM)

Identificado na década de 1990, o éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7 carbotioico (ASM, Bion[®]) foi caracterizado como indutor de resistência em diversas espécies vegetais, gerando 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 fisiológico/bioquímicos das plantas, com ativação da resistência sistêmica aos agentes patogênicos. Esse 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).

2.4.2 Agro-Mos[®] (mananoligossacarídeo fosforilado)

O Agro-Mos[®], produzido pela Improcrop do Brasil, é um fertilizante foliar registrado no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob nº PR 08869 10003-9, E.P./PR 08869-2, para as seguintes culturas: alho, batata, cebola, citros, mamão, manga, melão, melancia, tomate, pimentão, uva e pêssegos e aprovado pelo Instituto Biodinâmico (IBD), sob nº AI0049/08, para uso em sistemas de produção orgânica, totalmente natural, cujo princípio ativo é um mananoligossacarídeo fosforilado proveniente da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* 1026 (Hansen). 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; Costa 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 do 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-cinzenta, 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.

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

Costa (2008) demonstrou que o referido produto atua duplamente sobre o patógeno, por meio do efeito direto na proteção e pela ativação de mecanismos de indução de resistência, com o aumento das atividades das enzimas quitinase, β -1, 3-glucanase, peroxidase de guaiacol e oxidase de polifenóis.

2.4.3 Fulland[®] (fosfito de cobre)

O Fulland[®] é um fertilizante foliar fabricado pela Sudoeste Agropecus Indústria e Comércio Ltda., localizada na cidade de Araxá, MG. Contém em sua

formulação fósforo (P_2O_5) e cobre (Cu^{++}). É registrado no MAPA sob o nº MG 09147 10118 – 6, E.P./MG 09147 – 2, para as seguintes culturas: café, batata, cenoura, videira, hortaliças e leguminosas.

O fosfito é comercializado há algum tempo na forma de etil fosfanato (Fosetyl-Al) e, mais recentemente, como sal de potássio, sendo indicado no controle de fungos do gênero *Phytophthora* e dos fungos de podridões do colo, raiz, tronco e frutos. Alguns autores acreditam que o fosfito, além da ação direta sobre o patógeno, também apresente ação indireta e induz resposta de defesa na planta (Smillie et al., 1989; Jackson et al., 2000).

O Cu está envolvido nos processos de fotossíntese, respiração, regulação hormonal e fixação do nitrogênio, de forma indireta e no metabolismo de compostos secundários. A deficiência de Cu causa alterações morfológicas ou bioquímicas que favorecem a infecção de patógenos (Malavolta et al., 1997). Sob deficiência deste micronutriente, existe menor lignificação dos tecidos. Essa alteração da redução da lignificação da parede celular é a alteração anatômica mais típica da deficiência de Cu em plantas superiores, com deformações de folhas novas e aumento da susceptibilidade de cereais a patógenos, particularmente em combinação com altos suprimentos de nitrogênio.

Além da redução da lignina, a deficiência do Cu pode, ainda, causar, por questão nutricional, perda do seu efeito direto como fungicida. O nutriente pode também atuar como cofator na síntese de enzimas, inclusive aquelas ligadas à patogênese, mais uma evidência da atuação destas substâncias no processo de defesa das plantas. O Cu está também envolvido na enzima Cu-Zn superóxido dismutase (CuZnSOD), que está diretamente envolvida no mecanismo de detoxificação do superóxido gerado na fotossíntese. Esta enzima está localizada, além dos cloroplastos, na mitocôndria e nos glioxissomos. Neste último, a CuZnSOD possui função de controle da peroxidação dos lipídios na membrana e, portanto, na senescência. Outras enzimas importantes de que o Cu

faz parte são a ascorbato oxidase, a lacase (responsável pela síntese de plastoquinonas) e a fenolase (responsável pela síntese de lignina, alcaloides e outras) (Marschner, 1995).

3 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- a) É possível induzir resistência à vassoura-de-bruxa em cacau mediante aplicação de indutor em condições de campo.
- b) A ativação temporal de mecanismos de defesa dos cacauzeiros contra *C. pernicioso* pode ser obtida pelo tratamento com agentes bióticos e/ou abióticos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para o cumprimento dos objetivos propostos foram realizados três ensaios, os quais estão descritos a seguir.

4.1 Experimento 1. Caracterização de mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa de mudas de cacau pulverizadas com Agro-Mos[®], comparadas com aquelas pulverizadas com ASM (acibenzolar-S-metil)

4.1.1 Preparação do material vegetal e estabelecimento das condições para crescimento em casa de vegetação

Neste experimento foram utilizadas mudas de cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.), cultivar Catongo, provenientes de autofecundação. Portanto, eram sementes brancas, cedidas pelo Centro de Pesquisas do Cacau, CEPEC-CEPLAC, Itabuna, BA e ou Estação Experimental Filogônio Peixoto, ESFIP-CEPLAC, Linhares, ES suscetíveis à vassoura-de-bruxa, cultivadas em bandejas de isopor contendo o substrato Plantmax[®] e adubadas semanalmente com adubo foliar Yogen[®] (10 g.L⁻¹), intercalado com Dacafé Sul de Minas[®] (10 mL L⁻¹). Durante os experimentos, essas mudas foram mantidas em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA), à temperatura de 25±3°C e umidade relativa do ar em torno de 90%, controladas por meio de um sistema automatizado de nebulização (condições ajustáveis em casa de vegetação).

4.1.2 Produção de inóculo e inoculação das mudas

O inóculo foi obtido a partir de vassouras infectadas (ramos secos) provenientes do CEPEC/CEPLAC, Ilhéus, BA. Essas vassouras foram mantidas em vassoureira sob regime de nebulização periódica, para induzir a formação de basidiocarpos. Os basidiósporos coletados em solução de glicerol 16%,

conforme Frias et al. (1995), foram armazenados em nitrogênio líquido, para uso posterior.

As inoculações foram procedidas ao final da tarde, com a deposição de uma gota da suspensão de basidiósporos na concentração de 1×10^5 basidiósporos viáveis/mL no meristema apical de cada muda com 30 dias de idade. Durante 48 horas após o processo de inoculação, a umidade relativa do ar foi mantida próxima a 100%, para propiciar condições à 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. As lâminas contendo a suspensão de basidiósporos foram mantidas em câmara úmida por 24 horas. Após esse período, foram adicionados 30 μ L do corante azul de lactofenol em cada cavidade e, posteriormente, foi determinada a percentagem de esporos germinados, sendo amostrados 200 basidiósporos/cavidade (contagem realizada na linha do diâmetro da cavidade, marcada com caneta na parte posterior da lâmina).

4.1.3 Determinações enzimáticas

Os tecidos vegetais foram coletados (corte da parte acima do cotilédone, acondicionamento em papel alumínio, identificação, imersão em nitrogênio líquido e armazenamento em “deep freezer” a -80°C), para posterior utilização.

Cada amostra foi triturada em nitrogênio líquido, ± 2 g de material vegetal congelado, por meio de almofariz e pistilo até se conseguir uma granulometria tipo pó fino. Posteriormente, adicionou-se o tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 durante 3 minutos (10mL de tampão para cada grama de amostra) sobre um banho de gelo. Após filtração em malha flexível de polietileno, a solução foi centrifugada a 12.000 x g, por 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado como fonte enzimática. Proteína solúvel contida nos

extratos foi aferida pelo ensaio de Bradford (1976), utilizando soluções de albumina sérica bovina (BSA) para fazer a calibração da curva padrão do reagente de Bradford.

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 20mM e 500 μL peróxido de hidrogênio 60 mM. Após incubação, a 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 ($\Delta_{480\text{nm}} \text{mgP}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

A atividade da polifenoloxidase (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 ultrapura. Após incubação a 30°C, por 10 minutos, foi medido o acréscimo da absorbância a 410 nm (Gauillard et al., 1993). A atividade da PPO foi expressa pela variação de 1 OD₄₁₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{410\text{nm}} \text{mgP}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

A atividade de quitinases (CHI) 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 CHI foi expressa

pela variação de 1 OD₄₉₂ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{492\text{nm}}$ mgP⁻¹ min⁻¹).

A atividade da β -1,3-glucanase (GLU) foi medida seguindo método 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. As amostras foram submetidas à agitação por 5 segundos e, posteriormente, medidas fotometricamente, em filtro de 600 nm de um leitor EIA. A atividade da GLU foi expressa pela variação de 1 OD₆₂₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{620\text{nm}}$ mgP⁻¹ min⁻¹). Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

Os tempos de coleta das amostras para a verificação das respostas de defesa estão descritos na Figura 1 (quatro repetições de três plantas cada/tempo de coleta/tratamento). A inoculação de *C. pernicioso* foi realizada sete dias após a aplicação dos tratamentos. As amostras de tecidos tenros coletados foram armazenadas em deep-freezer, a -80°C.

Foi utilizado o delineamento experimental de blocos casualizados, com quatro blocos e parcela experimental composta de três mudas de cacauzeiros por parcela em cada coleta. Foram realizadas oito coletas (Figura 1).

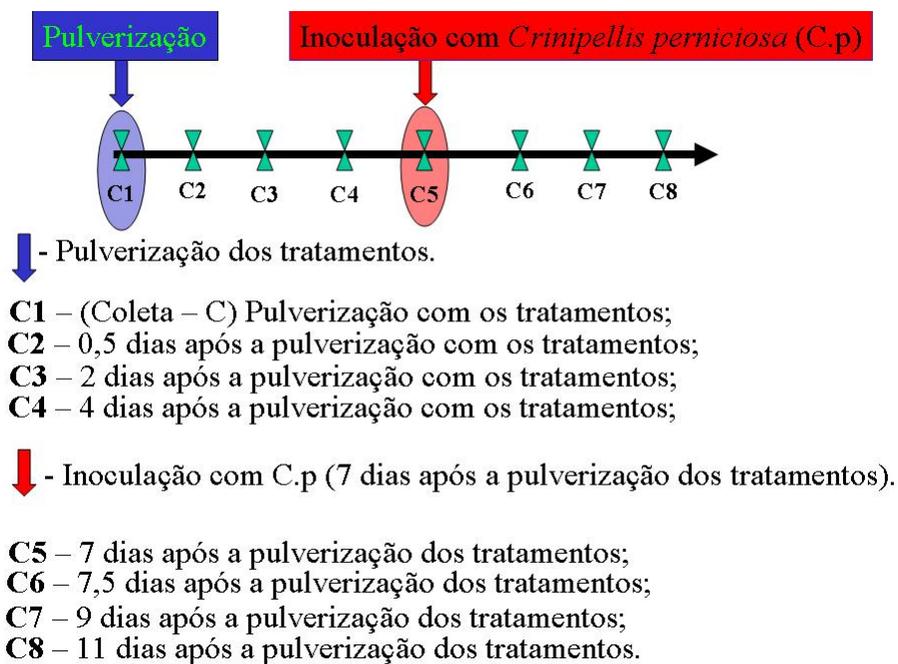


FIGURA 1 Épocas de coleta de amostras de tecidos de cacaueteiro para análises bioquímicas.

As respostas de defesa induzidas, na presença ou não do patógeno, foram avaliadas nas amostras coletadas dos seguintes tratamentos:

1. Agro-Mos[®] (10 mL L⁻¹), sem inoculação;
2. Agro-Mos[®] (10 mL L⁻¹), com inoculação;
3. ASM (0,2 g L⁻¹), sem inoculação;
4. ASM (0,2 g L⁻¹), com inoculação;
5. Testemunha sem inoculação;
6. Testemunha inoculada.

4.2 Experimento 2. Avaliação de Agro-Mos[®] e Fulland[®] na proteção de plantas de cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa em campo, no estado do Espírito Santo

Testou-se o efeito do Agro-Mos[®] (mananoligossacarídeo fosforilado mais biocomplexo de cobre e zinco) e do Fulland[®] (fosfito de cobre) em campo, como indutores de resistência contra a vassoura-de-bruxa (*C. pernicioso*). Este ensaio foi realizado devido ao bom desempenho desses produtos em experimentos realizados com mudas de cacaueteiro, no período 2005-2007, em casa de vegetação na Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG (Costa, 2008).

O experimento foi ser realizado, com o apoio da Estação Experimental Filogônio Peixoto/Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (ESFIP/CEPLAC), em área com incidência de nível três de vassoura-de-bruxa, fazenda Maria Bonita, escolhida na região da cidade de Linhares, ES (onde se localiza a referida estação experimental da CEPLAC).

O delineamento adotado foi de blocos ao acaso, com oito tratamentos e quatro repetições de 20 cacaueteiros úteis cada, separados por duas fileiras de plantas, como bordadura. A análise foi realizada em esquema fatorial 2 x 8 (duas safras e oito tratamentos).

Após a demarcação da área, foi efetuada a colheita de todos os frutos visivelmente infectados, além dos frutos maduros sadios. Houve o cuidado de se marcar com tinta os frutos já formados antes da instalação do experimento, que foram subtraídos nas avaliações seguintes. Também foi procedida uma limpeza cuidadosa das plantas. Outras práticas culturais foram adotadas, como roçagem, adubação, rebaixamento e individualização das copas, conforme preconiza a CEPLAC.

Os tratamentos utilizados foram:

- 1) Testemunha (removido e sem interferência química);

- 2) Agro-Mos[®] (2,5 mL L⁻¹) = AM2,5 mL L⁻¹;
- 3) Agro-Mos[®] (5,0 mL L⁻¹) = AM5,0 mL L⁻¹;
- 4) Agro-Mos[®] (10,0 mL L⁻¹) = AM10,0 mL L⁻¹;
- 5) Fulland[®] (2,5 mL L⁻¹);
- 6) Fulland[®] (5,0 mL L⁻¹);
- 7) Fulland[®] (10,0 mL L⁻¹);
- 8) ASM (0,2 g L⁻¹);

Foram realizadas aplicações trimestrais (fevereiro, maio, agosto e novembro) com pulverizador costal motorizado. O volume médio de calda por planta, em se tratando de cacauzeiros com aproximadamente 20 anos de idade, foi estimado em 400 mL. Mensalmente, os frutos maduros sadios e todos os infectados foram colhidos, a fim de se determinar a incidência da doença nos frutos e a produção (número de frutos). Também foi avaliado o número de vassouras vegetativas e de almofadas florais visivelmente infectadas por *C. pernicioso* em cada planta de cada tratamento.

O ensaio foi conduzido, durante as safras 2007/08 e 2008/09, na Fazenda Maria Bonita, localizada no município de Linhares, ES, no intuito de demonstrar a eficiência dos fertilizantes foliares Agro-Mos[®] e Fulland[®] como indutores de resistência para o controle da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro.

4.3 Experimento 3. Avaliação de Agro-Mos[®] na proteção de plantas de cacauzeiro contra a vassoura-de-bruxa em campo, na região sul do estado da Bahia

Testou-se o efeito do Agro-Mos[®] em campo, como indutor de resistência contra *C. pernicioso*, tendo em vista o excelente desempenho deste produto em experimentos realizados com mudas de cacau, no período 2005-2007, em casa de vegetação, na UFPA, em Lavras, MG (Costa, 2008).

O experimento foi realizado, com o apoio da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), em quatro áreas (fazendas de produtores) com alta incidência da vassoura-de-bruxa (Fazenda São José, Grupo Canta Galo; Fazenda São José, Grupo M. Libânio; Fazenda Itapissuma, Dr. Renato Baiardi e Fazenda Ubirajara, adm. José Celso), que foram escolhidas na região sul do estado da Bahia (Camacã, Itabuna e Gandu). Cada fazenda recebeu os três tratamentos propostos. O delineamento adotado foi de blocos casualizados, com quatro repetições (cada fazenda foi considerada como uma repetição), sendo a área útil de cada parcela composta por vinte plantas, separadas por duas fileiras de plantas, como bordadura.

O ensaio foi conduzido de maio de 2007 a outubro de 2008, em quatro fazendas produtoras de cacau situadas na região sul do estado da Bahia. Para análise dos dados, o tempo de execução do experimento foi dividido em três períodos de seis meses cada.

Após a demarcação da área e antes da aplicação dos tratamentos, foi efetuada a colheita de todos os frutos visivelmente infectados, além dos maduros sadios. Houve o cuidado de se marcar com tinta os frutos já formados antes da instalação do experimento, que foram subtraídos nas avaliações seguintes. Também foi feita a limpeza cuidadosa das plantas, procurando remover possíveis fontes de inóculo, como brotos e almofadas florais infectadas. Outras práticas culturais foram adotadas, como roçagem, adubação, rebaixamento e individualização das copas, conforme preconizadas pela CEPLAC.

Os tratamentos foram:

- 1) Testemunha (removido e sem interferência química);
- 2) Agro-Mos[®] (5 mL L⁻¹);
- 3) Agro-Mos[®] (10 mL L⁻¹).

Foram realizadas aplicações trimestrais com pulverizador costal motorizado. O volume médio de calda por planta, em se tratando de cacauzeiros com aproximadamente 20 anos de idade, foi estimado em 400 mL. Mensalmente, os frutos maduros sadios e todos os infectados foram colhidos, a fim de se determinar a incidência da doença nos frutos e a produção (número de frutos). Também foi avaliado o número de vassouras vegetativas e de almofadas florais visivelmente infectadas por *C. perniciosa*, em cada planta de cada tratamento.

O experimento foi conduzido no período de maio de 2007 a outubro de 2008.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento 1. Caracterização de mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa de mudas de cacau pulverizadas com Agro-Mos[®], comparadas com aquelas pulverizadas com ASM (Acibenzolar-S-Metil)

A atividade de peroxidases de guaiacol em plantas tratadas com Agro-Mos e não inoculadas com *C. perniciosa* foi maior em relação à testemunha aos 0,5; 2;4 e 11 dias após a pulverização. Em plantas tratadas com ASM e não inoculadas, a atividade foi superior à testemunha aos 0,5; 2 e 9 dias após a pulverização (Figura 2A). Para plantas inoculadas, os tratamentos Agro-Mos[®] e ASM diferiram entre si e da testemunha, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, aos 7 e 11 dias após a pulverização, tendo o ASM apresentado maior atividade em relação ao Agro-Mos[®] (Figura 2B).

Resultados semelhantes foram observados por Resende et al. (2007) em mudas de cacaueiro, nas quais o ASM apresentou maiores atividades desta enzima em relação à testemunha, no intervalo de 4 a 14 dias após a pulverização. Cavalcanti et al. (2004), trabalhando com mudas de cacaueiro inoculadas com *Verticillium dahliae* e pulverizadas com ASM, observaram pico de atividade de peroxidases aos 13 dias após a pulverização.

Metabolismos de auxina, biossíntese de etileno, formação de lignina, respiração, processos intermediados por luz, defesa de plantas contra patógenos, crescimento e senescência são alguns exemplos de processos fisiológicos nos quais existe a participação de peroxidases de plantas (Datta & Muthukrishnam, 1999).

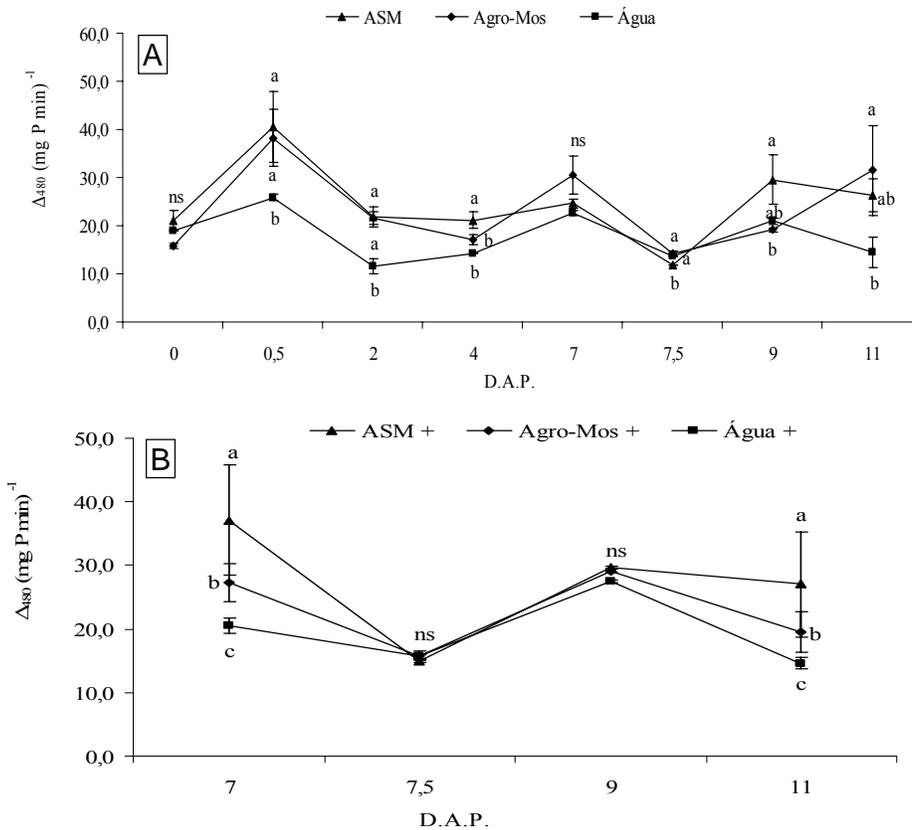


FIGURA 2 Atividade de peroxidases de guaiacol (A) em mudas de cacaueteiro não inoculadas com *C. perniciosa*, aos 0; 0,5; 2; 4; 7; 7,5; 9 e 11 dias após pulverização (DAP). Tratamentos: ASM – Acibenzolar-S-Metil, Agro-Mos[®] e água (testemunha). Atividade de peroxidases de guaiacol (B) em mudas de cacaueteiro inoculadas com *C. perniciosa*, aos 7; 7,5; 9 e 11 DAP. Tratamentos: ASM (+) – Acibenzolar-S-Metil, Agro-Mos[®] (+) e água (+) (testemunha inoculada). A inoculação ocorreu aos 7 DAP. O sinal (+) indica tratamentos inoculados. A sigla (ns) significa que os tratamentos não diferiram entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Médias com mesma letra, em cada época de avaliação, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Barras de erros indicam o erro padrão da média.

A atividade de polifenoloxidasas na plantas não inoculadas só apresentou diferença significativa aos 11 dias após a pulverização, quando o Agro-Mos[®] diferiu estatisticamente da testemunha e do ASM, promovendo maior atividade desta enzima (Figura 3A). Costa (2008) observou maior atividade desta enzima em mudas tratadas com Agro-Mos[®] e não inoculadas com *C. pernicioso*, aos 0,25; 2; 4 e 7,25 dias após a pulverização do produto.

Para plantas tratadas e inoculadas com o patógeno, o Agro-Mos[®] e o ASM diferiram da testemunha, mas não diferiram entre si, aos 7 e 11 dias após a pulverização (Figura 3B). Em mudas tratadas com ASM e inoculadas, Costa (2008) encontrou um pico de atividade da enzima aos 10 dias após a pulverização com os tratamentos.

Segundo Leatham et al. (1980), as polifenoloxidasas 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 exibir atividade antimicrobiana.

A capacidade desta enzima em catalisar a produção de quinonas tóxicas a insetos e patógenos fez os pesquisadores acreditarem que esta enzima está envolvida em processos de defesa contra microrganismos e parasitas, a partir de rompimento de tecido celular.

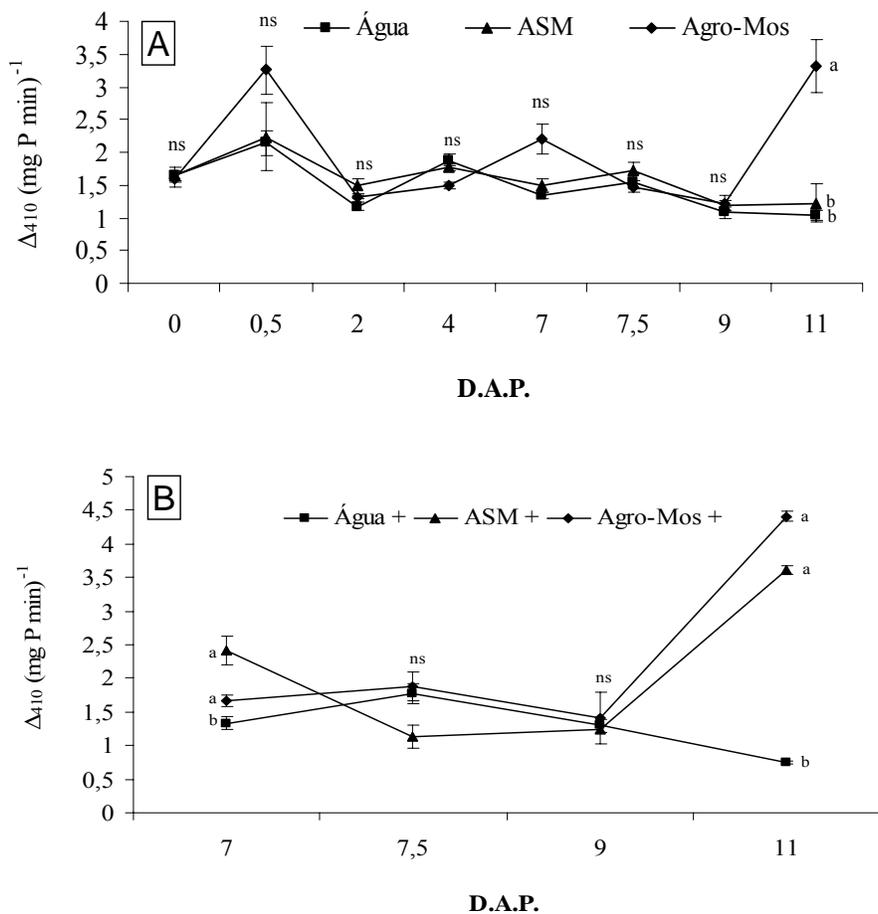


FIGURA 3 Atividade de polifenoloxidasas (A) em mudas de cacauero não inoculadas com *C. pernicioso*, aos 0; 0,5; 2; 4; 7; 7,5; 9 e 11 dias após pulverização (DAP). Tratamentos: ASM – Acibenzolar-S-Metil, Agro-Mos[®] e água (testemunha). Atividade de polifenoloxidasas (B) em mudas de cacauero inoculadas com *C. pernicioso*, aos 7; 7,5; 9 e 11 DAP. Tratamentos: ASM (+) – Acibenzolar-S-Metil, Agro-Mos[®] (+) e água (+) (testemunha inoculada). A inoculação ocorreu aos 7 DAP. O sinal (+) indica tratamentos inoculados. A sigla (ns) significa que os tratamentos não diferiram entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Médias com mesma letra, em cada época de avaliação, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Barras de erros indicam o erro padrão da média.

Plantas não inoculadas e tratadas com Agro-Mos[®] apresentaram maior atividade de quitinases aos 2, 4 e 9 dias após a pulverização, quando comparadas com a testemunha. Já para o ASM foi observado que a atividade da enzima foi superior aos 4, 7 e 9 dias após a pulverização (Figura 4A). Resende et al. (2007) observaram maior da atividade de quitinases aos 8 dias após a pulverização, em plantas de cacauzeiro tratadas com ASM, quando comparadas à testemunha.

Para plantas tratadas e inoculadas, o Agro-Mos[®] diferiu da testemunha e do ASM, apresentando maior atividade de quitinases somente aos 7 dias após a pulverização. Já o ASM diferiu significativamente dos demais tratamentos somente aos 9 dias após a pulverização, promovendo maior atividade desta enzima (Figura 4B). Costa (2008) observou que, em mudas tratadas com Agro-Mos[®] e inoculadas, a atividade de quitinases foi maior que a testemunha aos 7,25 dias após a pulverização dos tratamentos.

Certas quitinases podem agir como quitosanases, além do fato de existirem também quitosanases específicas induzidas em plantas em resposta a fitopatógenos.

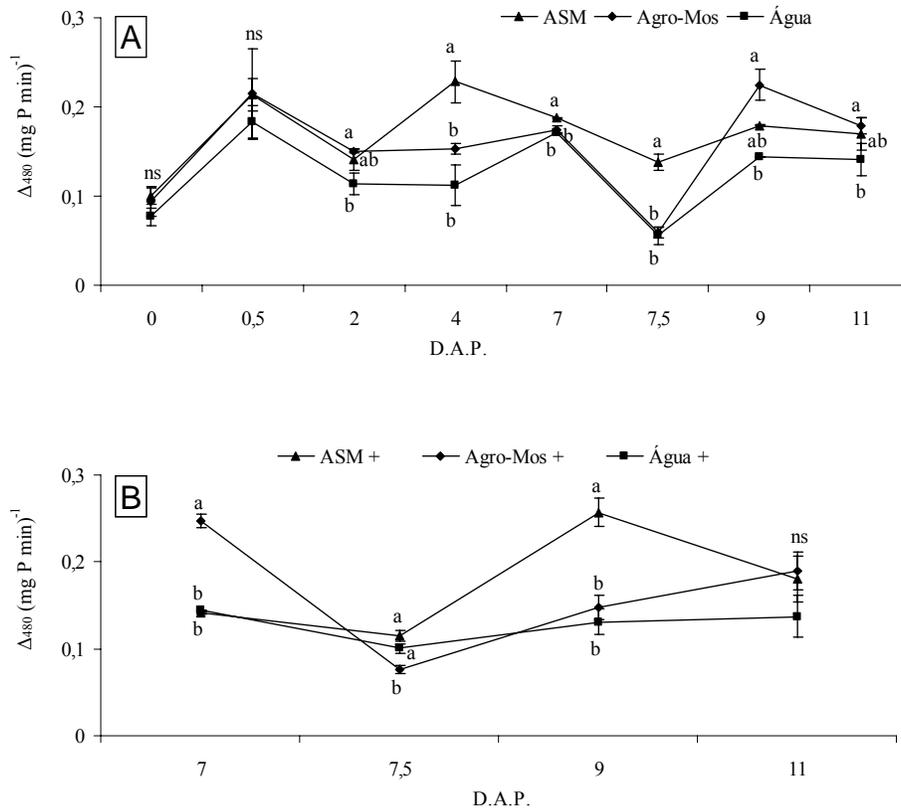


FIGURA 4 Atividade de quitinasas (A) em mudas de cacaueteiro não inoculadas com *C. pernicioso*, aos 0; 0,5; 2; 4; 7; 7,5; 9 e 11 dias após pulverização (DAP). Tratamentos: ASM – Acibenzolar-S-Metil, Agro-Mos[®] e água (testemunha). Atividade de quitinasas (B) em mudas de cacaueteiro inoculadas com *C. pernicioso*, aos 7; 7,5; 9 e 11 DAP. Tratamentos: ASM (+) – Acibenzolar-S-Metil, Agro-Mos[®] (+) e água (+) (testemunha inoculada). A inoculação ocorreu aos 7 DAP. O sinal (+) indica tratamentos inoculados. A sigla (ns) significa que os tratamentos não diferiram entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Médias com mesma letra, em cada época de avaliação, não diferem, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Barras de erros indicam o erro padrão da média.

A atividade da β -1, 3-glucanase em plantas não inoculadas e tratadas com Agro-Mos[®] foi superior à da testemunha aos 0,5; 2; 4; 7 e 11 dias após a pulverização do produto. Já para plantas tratadas com ASM a maior atividade em relação à testemunha foi observada aos 2; 4; 7; 9 dias após a pulverização (Figura 5A).

Para plantas inoculadas, só foi observada diferença estatística significativa em relação aos demais tratamentos aos 9 dias após a pulverização, quando o ASM proporcionou maior atividade desta enzima (Figura 5B). Dantas (2004) verificou, em mamoeiro, o aumento da atividade desta enzima após a aplicação de Agro-Mos[®] em pré e pós-colheita.

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).

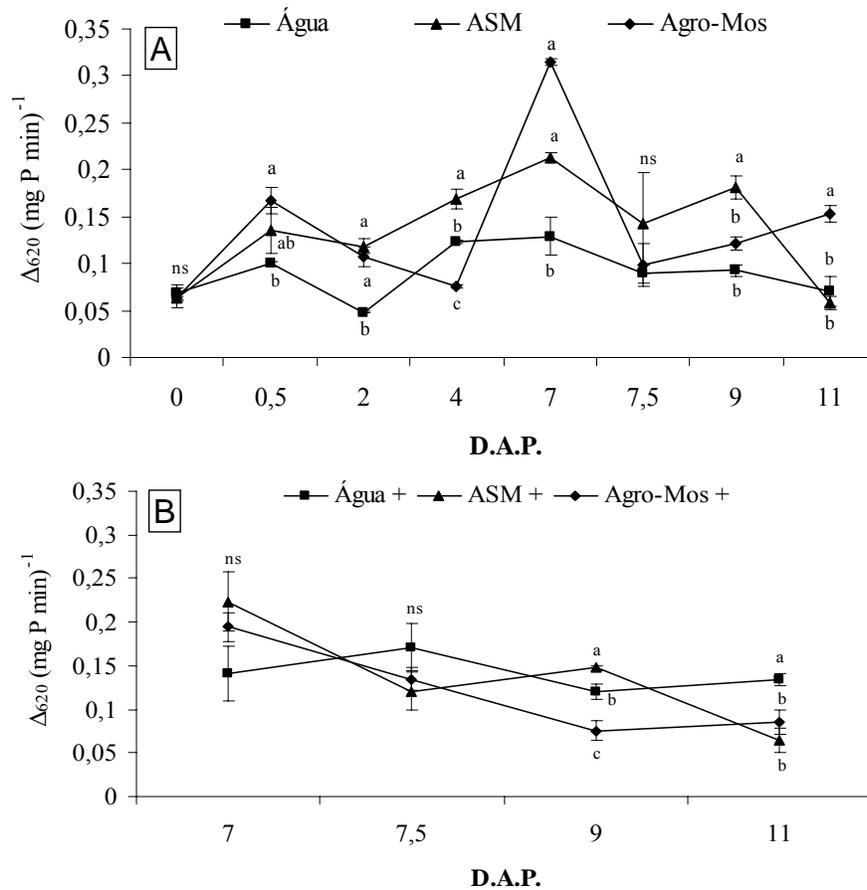


FIGURA 5 Atividade da β -1, 3-glucanase (A) em mudas de cacauero não inoculadas com *C. pernicioso*, aos 0; 0,5; 2; 4; 7; 7,5; 9 e 11 dias após pulverização (DAP). Tratamentos: ASM – Acibenzolar-S-Metil, Agro-Mos[®] e água (testemunha). Atividade da β -1, 3-glucanase (B) em mudas de cacauero inoculadas com *C. pernicioso*, aos 7; 7,5; 9 e 11 DAP. Tratamentos: ASM (+) – Acibenzolar-S-Metil, Agro-Mos[®] (+) e água (+) (testemunha inoculada). A inoculação ocorreu aos 7 DAP. O sinal (+) indica tratamentos inoculados. A sigla (ns) significa que os tratamentos não diferiram entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Médias com mesma letra, em cada época de avaliação, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Barras de erros indicam o erro padrão da média.

5.2 Experimento 2. Avaliação de Agro-Mos[®] e Fulland[®] na proteção de plantas de cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa em campo, no estado do Espírito Santo

Com relação à avaliação da incidência de ramos infectados (vassouras vegetativas), observou-se que, na safra 2007/08, não houve diferença estatística entre os tratamentos, enquanto na safra 2008/09 os tratamentos Agro-Mos[®] e Fulland[®], em todas as suas dosagens, diferiram estatisticamente da testemunha (Tabela 1).

Costa (2008) observou que o Agro-Mos[®], nas dosagens de 2,5; 5,0 e 10 mL L⁻¹, apresentaram redução significativa da incidência de vassoura-de-bruxa em mudas de cacaueteiro cultivadas em casa de vegetação. O tratamento padrão de indução de resistência, ASM, não diferiu dos demais produtos testados em nenhuma das safras. Ao se comparar as duas safras, observa-se maior incidência da doença na safra 2008/09. Durante a safra 2008/09, o ASM não diferiu estatisticamente de todas as doses do Agro-Mos[®] e Fulland[®], assim como da testemunha (Tabela 1).

TABELA 1 Número de ramos infectados (vassouras vegetativas), em função dos tratamentos aplicados e das safras avaliadas.

Vassouras vegetativas								
TRATAMENTOS								
Saфра	TEST.	Agro-Mos [®] (mL/L)			Fulland [®] (mL/L)			ASM (g/L)
		2,5	5	10	2,5	5	10	0,2
2007/08	79,5 bA	86 aA	51,5 aA	69,5 aA	71 aA	85,5 aA	78,2 aA	82,7 bA
2008/09	429,7 aA	130,75 aB	65,25 aB	128 aB	151,5 aB	189,25 aB	103,7 aB	239,0 aAB

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Ao se realizar a análise de regressão para os produtos Agro-Mos[®] e Fulland[®] (Figura 6) relacionando-os com a incidência de vassouras vegetativas, observa-se que a dose 5 mL L⁻¹ do Agro-Mos[®] promove redução do número de

vassouras vegetativas, enquanto para o Fulland[®] a dose 10 mL L⁻¹ apresentou melhor controle.

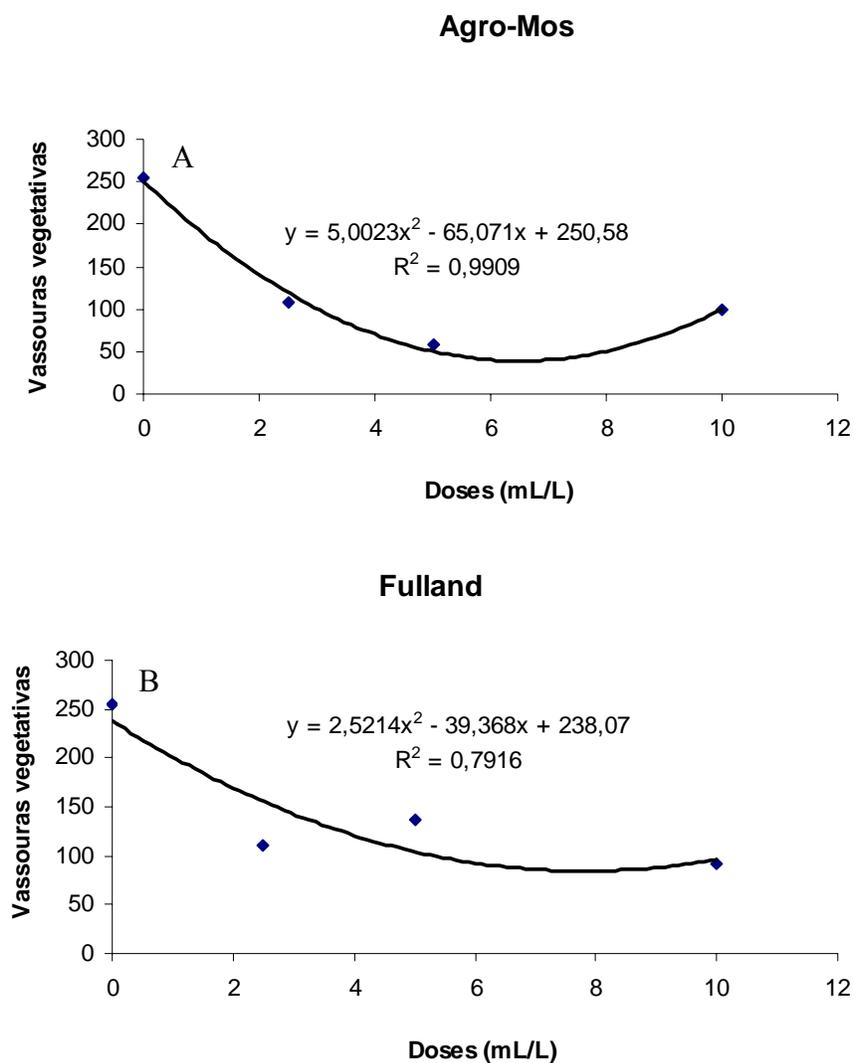


FIGURA 6 Número de vassouras vegetativas em função das doses de Agro-Mos[®] (A) e Fulland[®] (B).

Com relação à incidência da doença em almofadas florais, não houve interação significativa entre as safras e os tratamentos. Os tratamentos não

diferiram entre si e nem da testemunha. Na safra 2008/09, foi observada um maior número de almofadas florais infectadas (Figura 7).

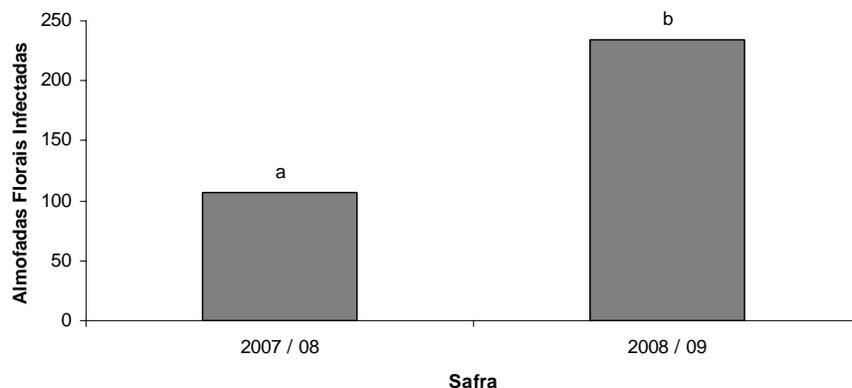


FIGURA 7 Número de almofadas florais infectadas para as safras 2007/08 e 2008/09. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Ao analisar a incidência de vassoura-de-bruxa, tanto nos ramos quanto nas almofadas florais (vassouras totais), observou-se que o produto Agro-Mos[®], na dosagem de 5mL L^{-1} , diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, apresentando menor incidência da doença (Figura 8). Também foi observada diferença significativa entre as safras, das quais a safra 2008/09 foi mais favorável ao desenvolvimento da doença (Figura 9).

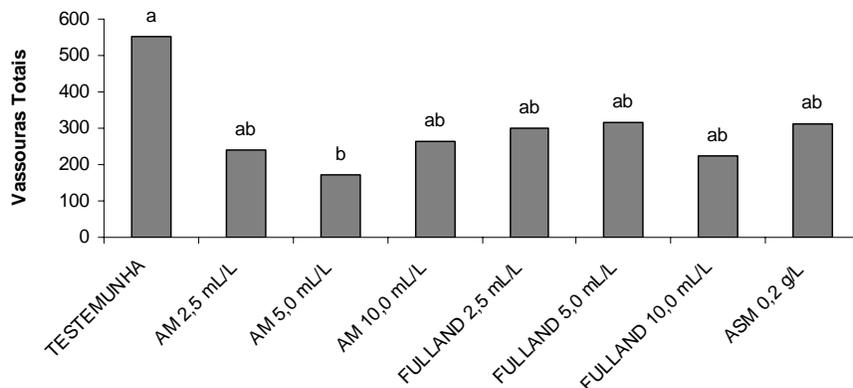


FIGURA 8 Número de vassouras totais encontradas nos tratamentos. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

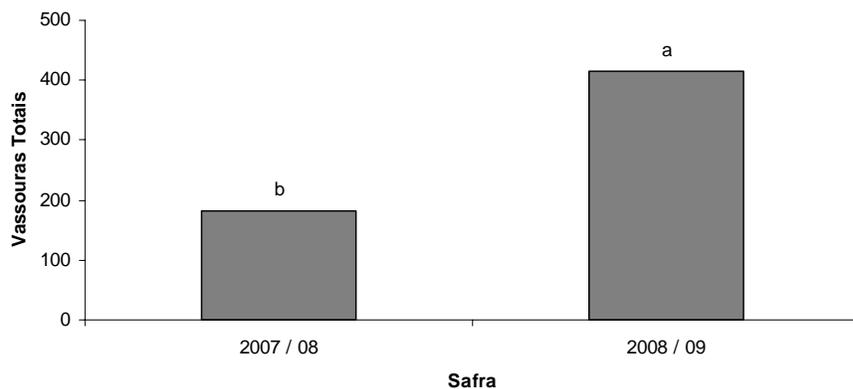


FIGURA 9 Avaliação do número de vassouras totais em relação às safras 2007/08 e 2008/09. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Ao realizar a análise de regressão para as doses do produto Agro-Mos[®], relacionando com o número de vassouras totais, observou-se que a dose 5,0 mL L⁻¹ promoveu maior redução da incidência da doença (Figura 10).

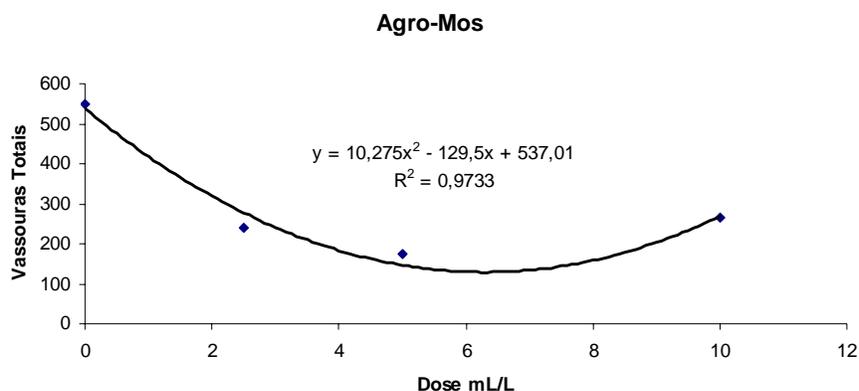


FIGURA 10 Número de vassouras totais em função das doses de Agro-Mos[®].

Com relação à eficiência dos tratamentos para o número de vassouras totais, observa-se que o tratamento Agro-Mos[®], na dosagem de 5 mL L⁻¹, foi o mais eficiente, com controle de 68,5% em relação à testemunha (Figura 11). O Fulland[®] 10 mL L⁻¹ e o ASM, apesar de não diferirem da testemunha, apresentaram 59,1% e 46,3% de controle em relação à testemunha, respectivamente.

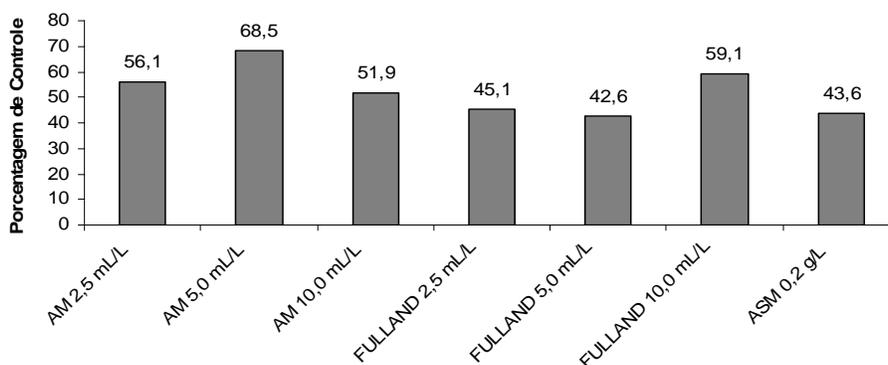


FIGURA 11 Porcentagem de controle dos tratamentos em relação à testemunha para o número de vassouras totais.

Não foi observada diferença significativa em relação ao número de frutos maduros infectados com o fungo em nenhum dos tratamentos.

A safra 2008/09 apresentou maior número de frutos maduros infectados em relação à safra 2007/08, devido às condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da doença (Figura 12).

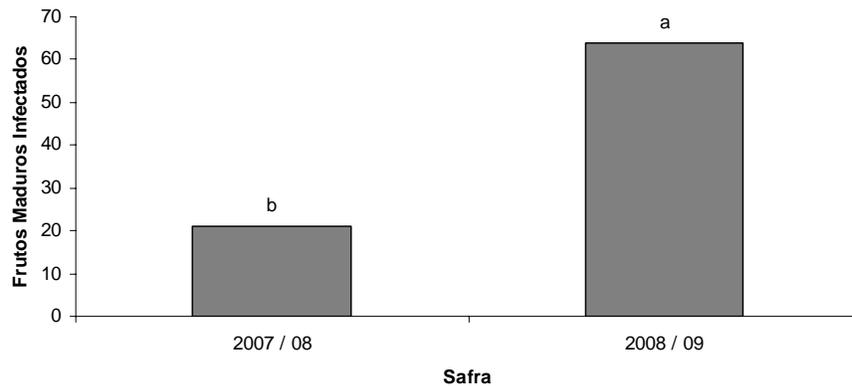


FIGURA 12 Avaliação do número de frutos maduros infectados em relação às safras 2007/08 e 2008/09. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A safra 2008/09, de maneira geral, apresentou maior produção de frutos maduros sadios, apesar de não apresentar diferença estatística significativa. Nenhum dos tratamentos apresentou diferença significativa para número de frutos sadios em relação à testemunha.

Quando se analisam em conjunto frutos maduros sadios e infectados (frutos maduros totais) não foi observada diferença estatística significativa para nenhum dos tratamentos e nem para as safras. A safra 2008/09 apresentou a tendência de maior produção.

5.3 Experimento 3. Avaliação de Agro-Mos[®] na proteção de plantas de cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa em campo, na região sul do estado da Bahia

Em relação à avaliação do número de vassouras vegetativas, não foi observada diferença significativa para nenhum dos períodos e tratamentos avaliados. Em experimento realizado por Almeida et al. (2002), não foi obtido resultado de controle de vassoura-de-bruxa em ramos e almofadas florais utilizando fungicidas à base de cobre. No entanto, Costa (2008), trabalhando com mudas de cacaueteiro em casa de vegetação, observou que mudas tratadas com Agro-Mos[®] nas dosagens de 2,5; 5 e 10 mL L⁻¹ e inoculadas com *C. perniciosas* apresentaram menor incidência de vassouras vegetativas em relação à testemunha.

Quando foi analisado o número de almofadas florais infectadas, não se observou diferença significativa entre os períodos avaliados. Entretanto, o produto Agro-Mos[®] na dosagem de 10 mL L⁻¹ apresentou diferença significativa em relação à testemunha, reduzindo a incidência de vassoura-de-bruxa no campo, seguido da dosagem de 5 mL L⁻¹, que não diferiu deste e da testemunha (Figura 13B).

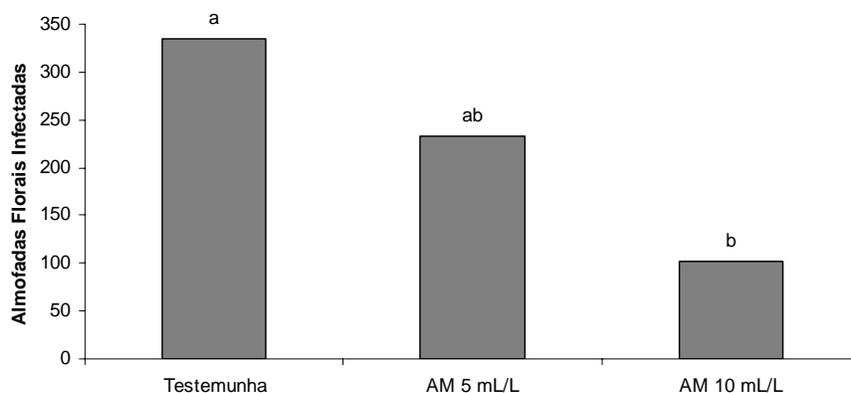


FIGURA 13 Número de almofadas florais infectadas em função das dosagens do produto Agro-Mos[®]. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em relação à análise do número total de ramos e almofadas florais infectadas (vassouras totais), observou-se que não houve diferença significativa para os períodos avaliados.

O Agro-Mos[®] na dosagem de 10 mL L⁻¹ diferiu estatisticamente da testemunha, reduzindo a incidência de vassoura-de-bruxa, seguido pela dose 5 mL L⁻¹, que foi semelhante à testemunha (Figura 14). A dose 10 mL L⁻¹ do Agro-Mos[®] apresentou 54,1% de controle em relação à testemunha, enquanto a dose 5 mL L⁻¹ apresentou 28,3% de controle (Figura 15).

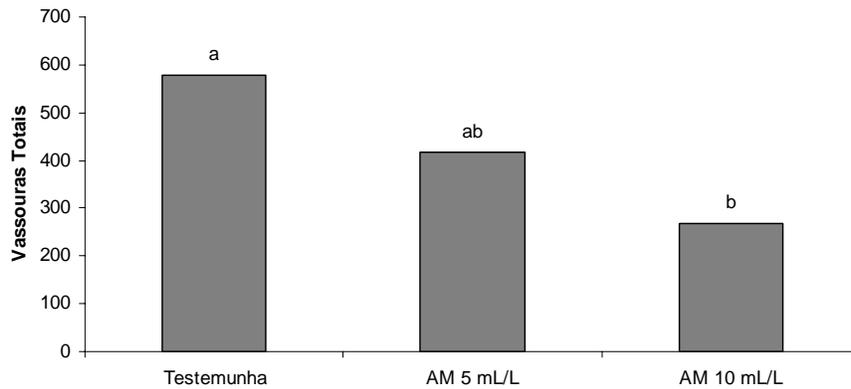


FIGURA 14 Número de vassouras total em relação às dosagens do produto Agro-Mos[®]. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

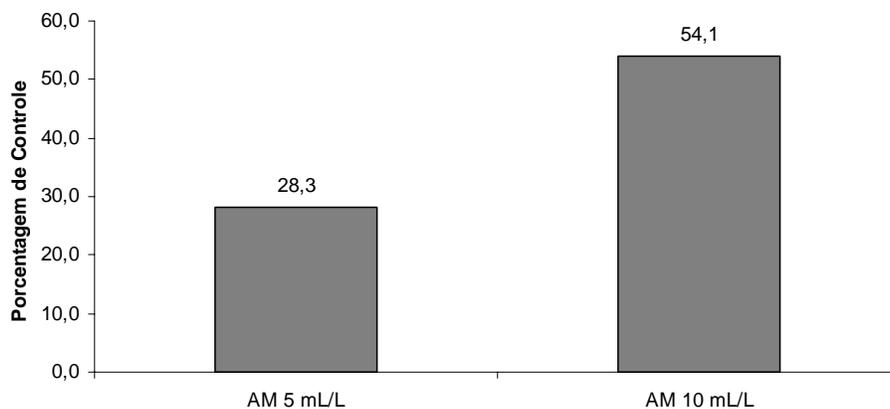


FIGURA 15 Porcentagem de controle dos tratamentos em relação à testemunha para o número de vassouras totais.

Para a análise de frutos maduros infectados observou-se diferença estatística significativa para o período de novembro de 2007 a abril de 2008, quando foi registrada uma menor incidência de frutos maduros infectados (Figura 16).

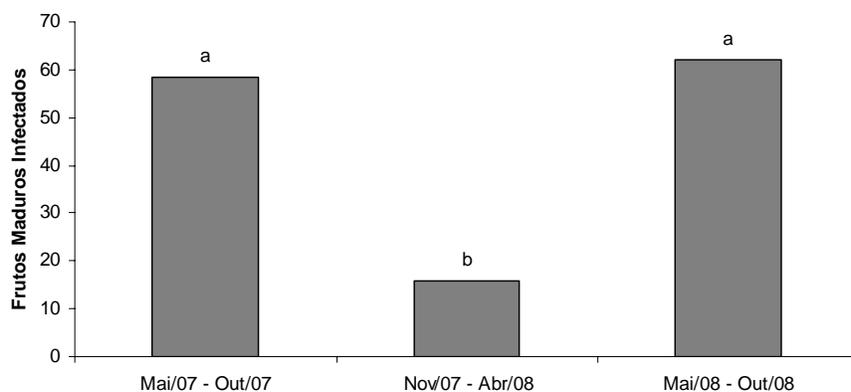


FIGURA 16 Número de frutos maduros infectados em relação aos períodos avaliados. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Não se observou diferença entre os tratamentos, sendo que a maior dose de Agro-Mos[®] tende a apresentar menor número de frutos maduros infectados.

Na avaliação do número de frutos maduros sadios não foram observadas diferenças nem para as épocas nem para os tratamentos. No entanto, onde foi aplicado o produto Agro-Mos[®], as plantas tenderam a produzir maior número de frutos sadios (Figura 17).

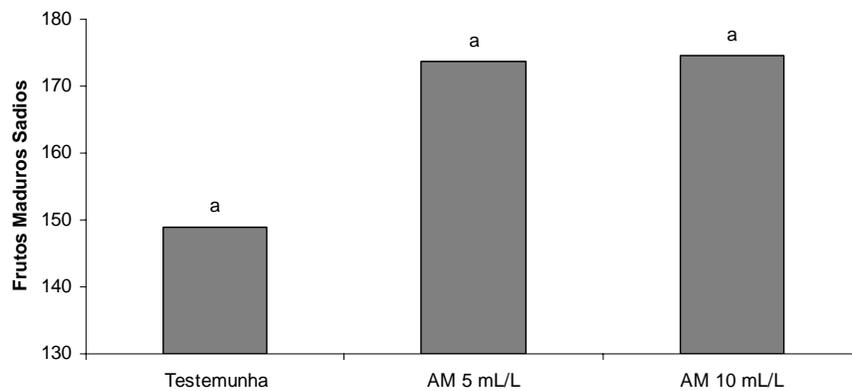


FIGURA 17 Número de frutos maduros sadios em relação aos tratamentos. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Analisando em conjunto os frutos maduros sadios e infectados (frutos totais), não se observou diferença significativa entre os períodos e entre os tratamentos avaliados (Figura 18). Entretanto, Agro-Mos[®] na dose 5 mL L⁻¹ apresentou maior número de frutos.

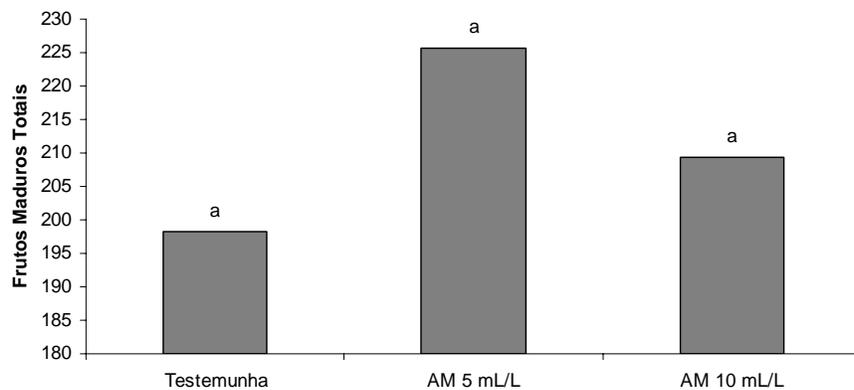


FIGURA 18 Número de frutos maduros totais em relação aos tratamentos. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

6 CONCLUSÕES

Em mudas de cacaueteiro tratadas com o Agro-Mos[®] observou-se o aumento da síntese de peroxidases de guaiacol, polifenoloxidasas, quitinasas, β -1, 3-glucanase, quando comparadas com a testemunha pulverizada com água.

No estado do Espírito Santo, o Agro-Mos[®] reduziu a incidência de vassoura-de-bruxa em plantas de cacaueteiro na dosagem de 5 mL L⁻¹ (68,5% de controle em relação à testemunha). A aplicação dos produtos não interferiu na produção das plantas do experimento.

O Fulland[®] não apresentou resultado consistente no controle da vassoura-de-bruxa do cacaueteiro e nem interferiu em sua produção.

No estado da Bahia, o Agro-Mos[®] reduziu a incidência de vassoura-de-bruxa em plantas de cacaueteiro na dosagem de 10 mL L⁻¹, com 54,1% de controle em relação à testemunha, respectivamente.

No período avaliado não foi possível chegar a informações conclusivas em relação à produção, sendo necessário um maior período de avaliação.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Agro-Mos[®] pode ser considerado indutor de resistência contra *Crinipellis pernicioso*.

A indução de resistência deve ser considerada como mais uma importante ferramenta a ser inserida no manejo integrado da vassoura-de-bruxa do cacaueteiro e não vista como uma medida.

Torna-se necessária a continuação deste estudo, de forma que se possa avaliar com maior consistência a real eficiência do produto, visto que o mesmo vem demonstrando grande potencial de controle da incidência da doença, tanto em casa de vegetação quanto em campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

AIME, M.C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (*Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmicaceae. **Mycologia**, New York, v.97, n.5, p.1012-1022, Sept. 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.

ALMEIDA, O.C.; ALMEIDA, L.C.C.; BEZERRA, J.L. Estudo de fungicidas a base de cobre no controle da vassoura-de-bruxa do cacau no sudeste da Bahia. **Agrotropica**, Itabuna, v.14, n.3, p.97-100, set. 2002.

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**, Columbus, v.86, n.10, p.1474-1486, Oct. 1999.

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**, London, v.141, n.4, p.399-436, Apr. 2003.

ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA – AGRIANUAL. São Paulo: FNP, 2000.

ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA – AGRIANUAL. São Paulo: FNP, 2008.

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

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

BASTOS, C.N.; EVANS, H.C. A new pathotype of *Crinipellis pernicioso* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. **Plant Pathology**, Oxford, v.34, n.2, p.306-312, June 1985.

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**, New York, v.72, n.1/2, p.248-254, May 1976.

CAVALCANTE, F.R.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; PEREIRA, R.B.; ZACCARONI, A.B.; RESENDE, M.L.V. Natural extracts induce lignification on cocoa and tomato leaves. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS, 2., 2004, Lavras. **Resumos...** Lavras: UFPA, 2004. p.45-52.

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, n.3, p.709-712, Mar. 1993.

COSTA, J.C.B. **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.

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**, Jaguariúna, v.30, n.3, p.314-319, jul. 2004.

DATTA, S.K.; MUTHUKRISHNAN, S. **Pathogenesis-related proteins in plants**. Boca Raton: CRC, 1999. 291p.

FAZENDA ARIZONA. **Agro-Mos 2000**: entendendo o modo de ação. Juazeiro. Disponível em: <[http:// www.fazendaarizona.com/textos/agromos2000.htm](http://www.fazendaarizona.com/textos/agromos2000.htm)>. Acesso em: 27 jan. 2008.

FRIAS, G.A.; PURDY, L.H.; SCHMIDT, R.A. An inoculation method for evaluate resistance of cocoa to *Crinipellis pernicioso*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.79, n.8, p.787-791, Aug. 1995.

GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F.; NICOLAS, J. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. **Analytical Biochemistry**, New York, v.215, n.1, p.59-65, Nov. 1993.

GRIFFITH, G.W. Witches' brooms and frosty pods: threats to world cacao production. **Biologist**, Urbana, v.51, n.2, 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, Jan. 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, 1952.

JACKSON, T.J.; BURGESS, T.; COLQHOUN, I.; HARDY, G.E.S. Action of the fungicide phosphate on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Oxford, v.49, n.1, p.147-154, Jan. 2000.

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).

KNIGHT, S.C.; ANTHONY, V.M.; BRADY, A.M.; GREENLAND, A.J.; HEANEY, S.P.; 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**, Palo Alto, v.35, p.349-372, Sept. 1997.

KOLATTUKUDY, P.E.; MOHAN, R.; BAJAR, M.A.; SHERF, B.A. Plant peroxidase gene expression and function. **Biochemical Society Transaction**, London, v.20, n.2, p.333-337, May 1992.

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**, Saint Paul, v.70, n.12, p.1134-1140, Dec. 1980.

LOON, L.C. van. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.103, n.9, p.753-765, Dec. 1997.

LOON, L.C. van; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.36, p.453-483, June 1998.

LOON, L.C. van; STRIEN, E.A. van. The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.55, n.2, p.85-97, Aug. 1999.

LUZ, E.D.M.N.; BEZERRA, J.L.; RESENDE, M.L.V.; OLIVEIRA, M.L. de. Cacau (*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.341-341, 1994. Suplemento.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. London: Academic, 1995. 889p.

MAUCH, F.; STAEHELIN, L.A. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and [beta]-1,3-glucanase in bean leaves. **Plant Cell**, Baltimore, v.1, n.4, p.447-457, Apr. 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.103-103, 2005. Suplemento.

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

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

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

OKABE, E.T.; ALMEIDA, C.M.V.C.; ALMEIDA, L.C.; DIAS, L.A.S. Desempenho de clones de cacauero em Ouro Preto do Oeste, Rondônia, Brasil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.20, n.3, p.113-143, set. 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.90-90, 2005. Suplemento.

OLIVEIRA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Papilla formation and peroxidase activity in *Mimosa scabrella* hypocotyls inoculated with the nonpathogen *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**, Saint Paul, v.82, n.6, p.696-698, June 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. **Agrotrópica**, Ilhéus, v.1, n.1, p.79-81, jan. 1989.

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**, Rockville, v.104, n.1, p.109-118, Jan.1994.

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

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, **Anais...** Lavras. Lavras: UFLA, 2002. p.9-35.

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 cacaueiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.3, p.213-221, maio/jun. 2007.

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, *Heteropterys acutifolia*, é patogênico ao cacaueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, n.1, p.88-91, mar. 2000.

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

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 pernicioso* em cacaueiro. **Agrotropica**, Ilhéus, v.14, n.2, p.1-24, maio 2002.

SMILLIE, G.; GRANT, B.R.; GUEST, D. The mode of action of phosphate: evidence for both direct and indirect modes of action on three *phytophthora* spp in plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v.79, n.9, p.921-926, Sept. 1989.

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**, Brasília, v.29, n.4, p.373-377, jul./ago. 2004.

STADNIK, M.J. **Induction of resistance in wheat by a benzothiadiazole derivative against the powdery mildew (*Blumeria graminis f. sp. tritici*): practical aspects and mechanisms of action**. 1999. 139p. Thesis (PhD) In Plant Pathology University of Hohenheim, Stuttgart.

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, set. 1992.

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

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

TOSUN, N. O papel dos ativadores de plantas no controle de doenças em estufas. In: SIMPÓSIO AGRONÔMICO BRASILEIRO, 2005, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Improcrop, 2005. p.6-10.

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, Jan. 1991.

VIDHYASEKARAN, P. **Fungal pathogenesis in plant and crops**. New York: M. Decker, 1997. 553p.

VIDHYASEKARAN, P. Lignin and disease resistance. In: _____. **Physiology of disease resistance in plants**. Boca Raton: 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.