



**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Crinipellis
perniciosa*, INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À
VASSOURA-DE-BRUXA NO CACAUEIRO E
ANÁLISE DE PEROXIDASES NA INTERAÇÃO
PLANTA-PATÓGENO**

JANE OLIVEIRA PEREZ

2002

JANE OLIVEIRA PEREZ

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Crinipellis perniciosa*,
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA NO
CACAUUEIRO E ANÁLISE DE PEROXIDASES NA
INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende



**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2002**

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

Perez, Jane Oliveira

Caracterização de isolados de *Crinipellis pernicioso*, indução de resistência à
vassoura-de-bruxa no cacaueteiro e análise de peroxidase na interação planta-
patógeno / Jane Oliveira Perez. -- Lavras : UFLA, 2002.

81 p. : il.

Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Cacau. 2. *Theobroma cacao* L. 3. *Crinipellis pernicioso*. 4. Resistência
induzida. 5. Variabilidade. 6. Atividade enzimática. 7. Peroxidase. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.7494223

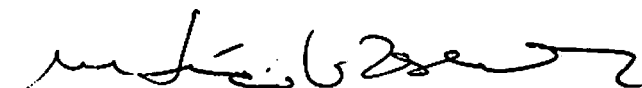
JANE OLIVEIRA PEREZ

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Crinipellis pernicioso*,
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA NO
CACAUUEIRO E ANÁLISE DE PEROXIDASES NA
INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso de Pós-
Graduação em Agronomia, área de concentração em
Fitopatologia, para obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 12 de abril de 2002

Prof. Dr ^a Dulcinéia de Carvalho	DCF/UFLA
Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu	DFP/UFLA
Dr. Marco Antônio Gáleas Aguilar	CEPLAC/CEPEC
Prof. Dr Ludwig Heinrich Pfenning	DFP/UFLA



Prof. Ph D. Mário Lúcio Vilela de Resende

UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

**Aos meus filhos, Amanda e Daniel, por cada sorriso de alegria, pelo
imenso amor e por fazerem parte da minha vida durante esta
caminhada**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares pelo incentivo, amor e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade da realização deste curso.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Mário Lúcio Vilela de Resende pela amizade, orientação e compreensão durante a realização deste trabalho.

À professora Dulcinéia de Carvalho pela confiança e apoio concedidos durante a condução dos experimentos no laboratório de Melhoramento Florestal.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos transmitidos e pelos exemplos de profissionais comprometidos com a pesquisa e educação.

Ao amigo Gutemberg Barone de Araújo Nojosa pela colaboração, disponibilidade, amizade e apoio durante os momentos de convivência e na realização dos trabalhos.

Aos amigos especiais, Alessandra Nakasone, Leimi Kobayashi, Cacilda Márcia, Oneida, Gabriela Carolina, Emílio Ishida, Anderson e Claudinha, pelo carinho, amizade sincera e apoio em todos os momentos alegres e difíceis.

A Ricardo S. Cavalcanti e Luis Gustavo Amorim pelo carinho, amizade, bons momentos de convivência e por serem um pedacinho da minha família.

A Leonardo Cavalcanti pelo apoio, incentivo e carinho durante esta etapa da minha vida, pelos nossos filhos e pelos bons momentos vividos juntos.

A todos os técnicos administrativos do DFP, em especial a Ana Maria, Angela e Eloísa, pela paciência e amizade.

À turma do Laboratório de Melhoramento Florestal pela colaboração e disponibilidade de tempo durante a realização das análises enzimáticas: em especial a Joema e Maria Carolina.

Aos bolsistas de Iniciação Científica, Aperfeiçoamento e estagiários, Cibelle, Sylvia, Fernanda, Carla, Aparecida, Renato, Sarah, Paulo, Fred, Telma e Gabriela Carolina, pela colaboração durante a condução dos experimentos.

Aos companheiros e amigos, Viviane, Fred, Augusto Carlos, Simone, Maria Luisa, Gilvane, Luis Henrique, Íris, Carlos Júnior, Cyntia Lacerda, Marluce e Givaldo Niella, pelos bons momentos de convivência.

A Silene Paulo pelo apoio, carinho e dedicação, especialmente no cuidado com os meus filhos, dando suporte para que eu chegasse até o final desta etapa.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iv
CAPÍTULO 1: Caracterização de isolados de <i>Crinipellis perniciosa</i>, indução de resistência à vassoura-de-bruxa no cacaueteiro e análise de peroxidases na interação planta-patógeno	01
1. Introdução Geral.....	02
2 Referencial Teórico.....	04
3 Referências Bibliográficas.....	13
CAPÍTULO 2: Variabilidade de isolados de <i>Crinipellis perniciosa</i> usando grupos de incompatibilidade somática e padrão de isoenzimas...	19
1 Resumo.....	20
2 Abstract.....	21
3 Introdução.....	22
4 Material e Métodos.....	23
4.1 Obtenção e manutenção de culturas polispóricas.....	23
4.2 Identificação dos grupos de incompatibilidade somática.....	24
4.2.1 Avaliação e determinação das distâncias.....	24
4.3 Perfil eletroforético de isolados de <i>Crinipellis perniciosa</i>	25
4.3.1 Preparo dos géis e corridas eletroforéticas.....	25
4.3.2 Determinação da atividade de peroxidases.....	26
5 Resultados e Discussão.....	27
5.1 Identificação dos grupos de incompatibilidade somática.....	27
5.2 Perfil eletroforético de isolados de <i>Crinipellis perniciosa</i>	29
5.2.1 Determinação da atividade de peroxidases.....	33
6 Conclusões.....	35
7 Referências Bibliográficas.....	36
CAPÍTULO 3: Otimização do uso do acibenzolar S-metil na proteção contra <i>Crinipellis perniciosa</i>, agente da vassoura-de-bruxa em <i>Theobroma cacao</i> L.....	38
1 Resumo.....	39
2 Abstract.....	40
3 Introdução.....	41
4 Material e Métodos.....	44
4.1 Material vegetal.....	44
4.2. Produção de inóculo e inoculação das mudas.....	44
4.3. Otimização de doses e épocas de aplicação do Acibenzolar S-metil (ASM) em mudas de	45

4.4.Efeito in vivo do ASM e de micronutrientes foliares na indução de resistência em mudas de cacau à <i>Crinipellis pernicioso</i>	46
4.5 Efeito do ASM puro e em misturas com fungicidas na proteção contra <i>Crinipellis pernicioso</i>	46
5 Resultados e Discussão.....	48
5.1 Otimização de doses e épocas de aplicação do Acibenzolar s-metil (ASM) em mudas de cacau	48
5.2 Efeito in vivo do ASM e de micronutrientes foliares na indução de resistência em mudas de cacau à <i>Crinipellis pernicioso</i>	49
5.3 Efeito do ASM puro e em misturas com fungicidas na proteção contra <i>Crinipellis pernicioso</i>	51
6 Conclusões.....	54
7 Referências Bibliográficas.....	55
CAPÍTULO 4: Perfil eletroforético e atividade da enzima peroxidase em tecidos de <i>Theobroma cacao</i>.L.....	57
1 Resumo.....	58
2 Abstract.....	59
3 Introdução.....	60
4 Material e Métodos.....	62
4.1 Preparo do material vegetal, aplicação do ASM e inoculação.....	62
4.2 Perfil eletroforético e determinação da atividade de peroxidase induzida por Acibenzolar S-metil (ASM) em diferentes cultivares de cacau.....	63
4.3 Perfil eletroforético e determinação da atividade de peroxidase induzida por Acibenzolar S-metil (ASM) na interação <i>Crinipellis pernicioso</i> x <i>Theobroma cacao</i>	64
5 Resultados e Discussão.....	66
5.1 Perfil eletroforético e determinação da atividade de peroxidase induzida por Acibenzolar S-metil (ASM) em diferentes cultivares de cacau.....	66
5.2 Perfil eletroforético e determinação da atividade de peroxidase induzida por Acibenzolar S-metil (ASM) na interação <i>Crinipellis pernicioso</i> x <i>Theobroma cacao</i>	69
6 Conclusões.....	74
7 Referências Bibliográficas.....	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
ANEXOS.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AS	Ácido salicílico
INA	Ácido 2,6 di-cloro isonicotínico
BTH	Éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7 carbotiólico
MYEA	Meio de extrato de malte e levedura
i.a	Ingrediente ativo
cv.	Cultivar
mL	Mililitro
μ M	Micro molar
mM	Mili molar
ADH	Álcool desidrogenase
PO	Peroxidases
PPOs	Polifenoloxidasas
ppm	Parte de um soluto em um milhão de partes de um solvente
SAR	Resistência sistêmica adquirida
$^{\circ}$ C	Graus Celsius
IAA	Indole acetato oxidase
PAL	Fenilalanina amônia-liase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Abs	Absorbância
ϕ	Diâmetro
BDA	Batata-dextrose-agar

RESUMO

PEREZ, Jane Oliveira. Caracterização de isolados de *Crinipellis pernicioso*, indução de resistência à vassoura-de-bruxa no cacauero e análise de peroxidases na interação planta-patógeno. 2002. 81p. Tese (Doutorado - em Agronomia - Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

Os estudos sobre a variabilidade de *Crinipellis pernicioso*, a utilização de compostos sintéticos na indução de resistência e o conhecimento das alterações fisiológicas induzidas por patógenos e por indutores de resistência, como o ASM, representam uma ferramenta adicional dentro do manejo integrado da vassoura-de-bruxa do cacauero. Quatorze isolados distintos dos hospedeiros (*Theobroma cacao*, *T. grandiflorum*, *T. bicolor*, *Heteropterys acutifolia* e *Solanum lycocarpum*), foram caracterizados através da análise de grupos de incompatibilidade somática, perfil eletroforético e atividade de peroxidases. Observou-se variações de 19 a 94% de dissimilaridade entre os isolados, sendo que a 60% de dissimilaridade, foi possível definir cinco grupos de isolados, com alguns sub-grupos presentes. Os isolados (Cp2 e Cp5) provenientes de Belém-PA e Santo Amaro-BA, ambos de cacau, foram compatíveis, demonstrando não haver clara relação entre os grupos de hospedeiros e a localização geográfica. O isolado (Cp1) proveniente de Ouro Preto D'Oeste-RO (cacau), apresentou a maior divergência genética (94%) em relação aos demais. Entre os hospedeiros alternativos, os isolados Cp12 e Cp13, provenientes de *T. bicolor* e *S. lycocarpum*, apresentaram a mesma a distância genética, sendo similar aos isolados de cupuaçu, indicando uma maior proximidade genética. Para o perfil eletroforético em gel de poliacrilamida, verificou-se diferenças entre os isolados quanto a intensidade de coloração e mobilidade da banda no gel. O isolado de Ouro Preto D'Oeste apresentou uma banda de isoenzima diferencial em relação aos demais. A otimização do uso do acibenzolar S-metil em combinação com micronutrientes ou fungicidas foi avaliado para proteção de mudas de cacau à vassoura-de-bruxa. Mudas da cv. SIC-23 foram pulverizadas aos 15, 30 e 60 dias antes da inoculação, nas dosagens de 0,05; 0,1 e 0,2 mg i.a/ mL de água. Obteve-se um efeito protetor maior na dosagem de 0,2 mg i.a/mL aos 30 dias antes da inoculação. Aplicou-se o ASM e os produtos à base de micronutrientes Axcell[®], Hortifós PK e Growmaster Mn[®] (14% Mn, produzido pela Intercuf), 15 dias antes da inoculação nas dosagens de 1250 µL; 1000 µL e 1000 µL/mL de água, respectivamente. Os micronutrientes não foram eficientes em reduzir a doença, no entanto, o ASM apresentou uma proteção próxima a 50%, em comparação com a testemunha inoculada. Os produtos: ASM 0,2 mg/ mL; Azoxystrobin 0,2 mg/ mL; óxido cuproso 9 mg/mL; chlorotalonil 1,5 mg/mL; ASM + azoxystrobin 0,1 mg/mL + 0,1 mg/mL; ASM + chlorotalonil 0,1 mg/mL + 0,75

mg/mL; ASM + ox. cuproso 0,1 mg/mL + 4,5 mg/mL, foram aplicados via pulverização foliar 15 dias antes da inoculação em mudas de cacau da cv. suscetível SIC-23. Os melhores tratamentos foram Azoxystrobin, óxido cuproso e a combinação ASM + Azoxystrobin, conferindo proteção de 86,6; 84,7 e 82,8% respectivamente, em relação à testemunha inoculada. O perfil eletroforético da enzima peroxidase foi avaliado em gel de poliacrilamida aos 3, 7, 15 e 30 dias após a aplicação do produto em mudas de cacau resistente (Theobahia) e suscetível (SIAL 169 e SIC-23). Verificou-se que a maior intensidade enzimática foi observada no clone SIAL-169, tratadas ou não com ASM, 3 dias após pulverização. Para as mudas do clone Theobahia, a maior intensidade ocorreu aos 30 dias, para as mudas tratadas com o indutor. No clone SIC-23, a maior intensidade de coloração da banda ocorreu nas mudas que receberam aplicação do ASM e depois foram inoculadas em todas as épocas. Já para a atividade enzimática de peroxidase, verificou-se que o pico da enzima na cv. Theobahia ocorreu aos 30 dias após o tratamento com ASM e para a cv. SIC-23, pico da enzima ocorreu aos 15 dias após o tratamento com ASM e depois foram inoculadas.

* Comitê Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Orientador), Dulcinéia de Carvalho- UFLA, Maria das Graças Claret de Sousa-CPAA/EMBRAPA, Ludwig Heinrich Pfenning – UFLA.

ABSTRACT

PEREZ, Jane Oliveira. Characterization of isolates of *Crinipellis pernicioso*, induction of resistance to witches' broom on cocoa and analyses of peroxidases in the plant-pathogen interaction. 2002. 81p. Thesis (Doctorate in Agronomy - Phytopathology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG*

Studies involving the knowledge of the variability of *Crinipellis pernicioso*, the use of synthetic compounds for the induction of resistance in plants in the knowledge of physiological changes induced by pathogens and by inducers of resistance like ASM is basic for determination of biochemical processes involved in defense mechanisms of plants against pathogens are extremely important for the integrated management of witches' broom disease. Micelial pairings in Petri dishes were carried out among 14 isolates from several hosts (*Theobroma cacao*, *T. grandiflorum*, *T. bicolor*, *Heteropterys acutifolia* and *Solanum lycocarpum*). Genetic dissimilarities ranging from 19 to 94% were found. Five groups of isolates with some subgroups inside, were defined, by using a limit of dissimilarity of 60%. It was observed that isolates from cocoa from different regions, such as Belém, PA (Cp2) and Santo Amaro, BA (Cp5) were compatible, therefore there was no clear relationship between compatibility and geographic localization. An isolate (Cp1) from Ouro Preto D'Oeste, RO, presented the largest genetic divergence (94%) in relation to the others. Amongst the population originated from cupuaçu, the isolate Cp8 from Belém, PA was more similar to the isolate Cp11 from Itabuna, BA. However, isolates Cp12 and Cp13 from the alternative hosts *T. bicolor* and *S. lycocarpum* showed the same genetic distance in comparison with isolates from cupuaçu, indicating a possible genetic proximity among them. In relation to data obtained from enzymatic pattern, it was observed that the activity of the enzyme peroxidase (PO) was efficient in the differentiation of isolates with differences at the intensity of colour and mobility on gel. The isolate from Ouro Preto D'Oeste, RO, presented an isoenzyme band not present in others isolates, from cocoa or other hosts. The optimization of use of Acilbenzolar S-methyl together with micronutrients or fungicides was investigated for the protection of cocoa seedlings against witches' broom disease. of the disease. ASM was sprayed on cocoa seedlings, 15, 30 and 60 days before inoculation, at doses of 0.05, 0.1 and 0.2 mg of active ingredient/mL of water. The best efficacy of protection was obtained when ASM was sprayed at 0.2 mg of a.i/mL, 30 days before inoculation. ASM was also tested together with micronutrient based products, 15 days before inoculation, however, no increase in efficacy against witches' broom was noticed. Finally, ASM at the dose of 0.2 mg/ mL had its performance assessed in comparison with azoxystrobin (0.2 mg/ mL), cuprous oxide (9.0 mg/mL); chlorotalonil (1.5 mg/mL); ASM + azoxystrobin (0.1 mg/mL + 0.1 mg/mL); ASM + chlorotalonil

(0.1 mg/mL + 0.75 mg/mL); ASM + cuprous oxide (0.1 mg/mL + 4.5 mg/mL), all sprayed 15 days before inoculation. The best treatments were: azoxystrobin, cuprous oxide and the combination ASM + azoxystrobin, conferring protection of 86.6, 84.7 and 82.8%, respectively, in relation to the inoculated control. The electrophoretic profile of peroxidase was evaluated in polyacrilamide gel, 3, 7, 15 and 30 days after sprayings in the cocoa seedlings resistant (*Theobahia*) and susceptible (SIAL-169 and SIC-23). It was observed great enzymatic intensity in seedlings of SIAL-169, treated or not with ASM, 3 days after ASM spraying. For *Theobahia* seedlings, the beginning of enzyme intensity occurred 7 days after spraying, peaking at 30 days. In the case of SIC 23, the great intensity was observed, at all times assessed, in seedlings sprayed with ASM and inoculated with *C. pernicioso*. The peak of peroxidase activity in cv. *Theobahia* occurred 30 days after the treatment with ASM. In the case of SIC 23, The peak of peroxidase activity occurred 15 days after the treatment with ASM and inoculated with *C. pernicioso*.

* Guidance Committee: Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Adviser), Dulcinéia de Carvalho- UFLA, Maria das Graças Claret de Sousa - CPAA/EMBRAPA, Ludwig Heinrich Pfenning – UFLA

CAPÍTULO 1

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Crinipellis pernicios*,
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA NO
CACAUEIRO E ANÁLISE DE PEROXIDASES NA INTERAÇÃO
PLANTA-PATÓGENO**

1 INTRODUÇÃO GERAL

A área cultivada com o cacaueteiro vem decrescendo de forma bastante significativa nos Estados do Amazonas, Pará, Acre, Rondônia e, principalmente, no Sul da Bahia, com uma redução em torno de 75% na produção (Luz et al., 1997). Vários fatores estão contribuindo para esta queda, mas a principal causa é a doença conhecida como “vassoura-de-bruxa”, causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, sendo esta considerada a mais grave das enfermidades. Atualmente essa doença é um ponto de estrangulamento para a implantação de novos cultivos e para competitividade da cacauicultura nacional no mercado internacional (Silva, 1997).

As perdas provocadas pela vassoura-de-bruxa na cultura são bastantes significativas, chegando a reduzir a produção em até 90% quando ocorre alta incidência da doença. No Sudeste do Estado da Bahia, a produção já sofreu perdas significativas de 75% (Pereira et al., 1989), o que provocou a extinção de grandes áreas produtivas remanescentes da Mata Atlântica (Luz et al., 1997).

As medidas de controle implementadas até o momento não têm alcançado resultados satisfatórios, principalmente devido à alta variabilidade do patógeno e às condições ambientais, o que inviabiliza e dificulta a obtenção de cultivares resistentes. Deste modo, surge a necessidade de um maior entendimento sobre a variabilidade do fungo para que seja possível otimizar medidas alternativas e implementá-las dentro do manejo integrado da doença. Dentre estas medidas, pode-se citar a resistência induzida (RI), cujo mecanismo, de amplo espectro, foi desenvolvido durante a evolução das plantas como resposta ao ataque de inimigos naturais. Várias são as substâncias que podem ser utilizadas como indutores de resistência em plantas sem que estas sejam modificadas geneticamente (Stadnik, 2000). Entre os diversos indutores já conhecidos, uma nova molécula, análoga ao ácido salicílico (AS), o éster S-metil

do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7-carbotióico, um composto do grupo benzotiadiazole (BTH), que apresenta como nome comum acibenzolar S-metil (ASM), é considerado o primeiro representante de uma nova geração de protetores de plantas eficientes na indução de resistência (Knight et al., 1997; Lyon & Newton, 1997). Este produto pode ser empregado isoladamente ou em misturas com fungicidas (Uknes et al., 1996), podendo, desta forma, aumentar a sua eficácia e a dos produtos utilizados. Sendo assim, o desempenho de um elicitador de resistência pode ser melhorado, ou mesmo estabilizado, se associado a outros indutores de resistência, a fungicidas e até mesmo a micronutrientes que podem funcionar como cofatores de várias enzimas envolvidas na síntese de compostos fenólicos ou terpenóides, comprovadamente importantes substâncias de defesa do cacauzeiro (Aguilar & Resende, 2000).

Entretanto, para que a indução de resistência seja eficaz e confira uma proteção adequada à cultura, é necessário otimizar a utilização dos diferentes indutores e que se conheça a variabilidade do patógeno e os possíveis mecanismos bioquímicos de resistência que estão envolvidos no patossistema para que se possam disponibilizar produtos menos tóxicos ao homem e ao meio ambiente para um manejo adequado da doença.

Os objetivos deste trabalho foram estudar a variabilidade patogênica de *C. perniciosa*, a otimização do uso do Acibenzolar S-metil (ASM) na proteção de mudas de cacau à vassoura-de-bruxa e os possíveis mecanismos de defesa envolvidos na resistência a *C. perniciosa* após o tratamento indutor com ASM.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) é uma cultura perene de origem tropical, cujo centro de origem está localizado na bacia amazônica; é uma fruteira de grande importância sócio-econômica para o Brasil, uma vez que é responsável por cerca de 50% das exportações de amêndoas, que geram e sustentam a indústria de chocolates. Entretanto, este setor agrícola vem sofrendo graves mudanças na sua estrutura e expansão devido, principalmente, à ocorrência de doenças, entre elas a vassoura-de-bruxa, que é considerada, atualmente, a principal causa da queda de produção e exportação de amêndoas para o mercado externo. Devido à ocorrência desta doença, o Brasil passou de segundo maior produtor para quarto no ranking mundial, ficando atrás da Costa do Marfim, Gana e Indonésia (ICCO, 1998; Niella, 2000).

A doença está amplamente distribuída em todas as áreas produtoras da Amazônia e Sul da Bahia, visto que estas regiões apresentam condições agroecológicas bastante propícias ao desenvolvimento e disseminação do patógeno. *C. pernicioso*, agente etiológico desta doença, é um fungo da classe dos basidiomicetos, que apresenta uma fase monocariótica (parasítica) no seu ciclo vital, o qual é composto de uma fase inicial da germinação do basidiósporo unicelular haplóide, no substrato, até produzir um micélio, prolongado e sem grampos de conexão, que constitui a fase vegetativa do ciclo de vida. A fase saprofítica é caracterizada pela presença de vassouras secas, frutos mumificados e outros órgãos colonizados e mortos pelo patógeno, sendo que o micélio apresenta-se intracelular, dicariótico e com grampos de conexão, nos quais há formação dos basidiocarpos. A única estrutura infectiva dos basidiomicetos são os basidiósporos, que se formam a partir de projeções do basídio, os esterigmas, como balões inflados (Krugner & Bacchi, 1995).

No cacauzeiro, a doença afeta principalmente os tecidos meristemáticos, induzindo sintomas de superbrotamento em gemas vegetativas, almofadas

florais, flores e frutos. Em mudas, o sintoma inicialmente ocorre no broto apical, com engrossamento, secamento e morte das folhas. Nas brotações vegetativas, as infecções induzem a hiperplasia do ramo, com emissão de lançamentos curtos e brotações laterais, com folhas apresentando, na sua maioria, crescimento reduzido. Posteriormente, com o ramo seco, observa-se o sintoma conhecido como vassoura de bruxa. Quando a infecção ocorre na época da floração, verifica-se um aumento na emissão de botões florais, o que ocasiona o posterior aborto das flores, gerando os sintomas de vassoura verde, que são geralmente visíveis cerca de quatro a seis semanas após o início da infecção. Em frutos jovens, ocorre paralisação do crescimento e mumificação ficando estes presos às árvores, quando não morrem (Luz et al., 1997).

Estudos sobre a variabilidade de *C. pernicioso* em cacauero são confusos, pois sabe-se que apesar de existirem diferentes formas patogênicas, não se pode afirmar que estas sejam raças, uma vez que ainda não se estabeleceram hospedeiros diferenciais (Luz et al., 1997). Observam-se variações dentro da população deste patógeno em decorrência da sua adaptação a outras plantas. Purdy & Schmidt (1996) citam que o biótipo-S, patótipo de *C. pernicioso*, está bem adaptado a hospedeiros da família das solanáceas, enquanto o biótipo-B, a hospedeiros da família Bixaceae (*Bixa orellana*), além dos biótipos-C (Cacau) e L (Liana). Wheeler & Mepsted (1988) citam que existem algumas hipóteses sobre a variabilidade patogênica de diferentes isolados de *C. pernicioso*. Uma delas é sobre a formação da vassoura, que inicialmente surge de basidiósporos simples, sendo o micélio na vassoura seca provavelmente autodicariótico. Entretanto, algumas vassouras são semelhantes às que surgem de infecções de múltiplos basidiósporos. Anastomoses entre micélios de diferentes origens de basidiósporos poderiam dar oportunidade ao surgimento de heterocários no micélio saprofítico, com subsequente aumento da variabilidade na próxima geração de basidiósporos. O teste desta hipótese é de fundamental

interesse porque o conhecimento sobre o potencial de diversidade deste patógeno, especialmente dentro de uma região produtora de cacau, é importante para o planejamento de programas de manejo integrado da doença, incluindo o uso da resistência induzida.

Contudo, para que se conheça a diversidade dentro de uma população fúngica, várias técnicas podem ser utilizadas para caracterizar isolados. Entre estas técnicas pode-se citar os sistemas de cruzamento (incompatibilidade somática) e a análise de isoenzimas. Estas técnicas visam identificar de forma mais rápida e precisa os agentes patogênicos, diferenciar raças e biótipos, bem como conhecer a sua diversidade genética entre e dentro das populações, através do grau de similaridade dos indivíduos (Dahlberg & Stenlid 1995).

A reação de incompatibilidade somática ocorre quando há formação de uma zona de delimitação separando isolados incompatíveis, podendo ou não ocorrer uma alteração na pigmentação ou na produção de compostos inibitórios. Este processo é originado devido ao abortamento da fusão celular, ou seja, as hifas de dois indivíduos não são geneticamente idênticas, evitando, desta forma, que os genótipos existam num mesmo citoplasma. Entretanto, se os indivíduos são geneticamente semelhantes, ocorre a fusão celular entre as hifas, desfavorecendo a reação de incompatibilidade (Dahlberg & Stenlid 1995).

Hedger et al. (1987) observaram diferenças entre isolados de *C. pernicioso* de *T. cacao* (biótipo C) através da formação de zona de transição em culturas de dicárions de diferentes áreas, que foram confrontados com isolados de cacau oriundos de Trinidad Tobago e do Brasil. Anteriormente, Andebrhan (1986) já havia observado diferenças entre isolados obtidos de vassouras secas coletadas em plantações comerciais de 13 diferentes pontos geográficos da Amazônica, mediante avaliação da taxa de crescimento micelial das reações bioquímicas, estudos de compatibilidade somática e testes de patogenicidade, sendo os isolados classificados em 4 grupos, conforme a região de coleta. Os

isolados provenientes de hospedeiros alternativos mostraram reações diferentes quando comparados com os isolados de *T. cacao* (cacau), com exceção de Liana (cipó).

Diferentes grupamentos geográficos de isolados de *C. pernicioso* têm sido baseados em características morfológicas e culturais, grupos de compatibilidade somática (SCG), análises moleculares e reações bioquímicas em *Theobroma cacao* e outras espécies de *Theobroma* (Hedger et al., 1987; Andebrhan, 1988; Bastos et al., 1988; Wheeler & Mepsted, 1988). Variantes saprofitas têm sido observadas em *C. pernicioso* e agrupamentos de compatibilidade somática e caracteres morfológicos estão sendo usados para auxiliar na detecção da variabilidade.

Estudos de compatibilidade somática entre isolados de *C. pernicioso*, foram desenvolvidos por Oliveira (1995). O autor verificou que todos os isolados testados provenientes da Amazônia foram incompatíveis com os isolados de cacau da região cacauera da Bahia. Yamada & Oliveira (2000) utilizaram diversos sistemas enzimáticos para diferenciar 110 isolados de *C. pernicioso* e observaram que dos sistemas avaliados, MDH; FLE,PGI,PGM 6-PG e IDH foram eficientes em detectar eletromorfos em todos os isolados, evidenciando que a análise com isoenzimas foi útil nos estudos de variabilidade entre as populações deste patógeno.

Outra técnica bastante utilizada na caracterização e diferenciação de isolados é o método de RAPD, por sua rapidez e simplicidade. Vários trabalhos já foram desenvolvidos utilizando o polimorfismo do DNA de *C. pernicioso* para diferenciação por análise de RAPD, em vários gêneros e espécies de Sterculiaceae, Solanaceae e Bixaceae. Os resultados mostraram que a proximidade entre os isolados é mais importante que a espécie hospedeira, para determinar a relação genética entre isolados (Andebrhan & Furtek, 1994).

Devido à alta variabilidade dentro e entre as populações de *C. pernicioso*, o controle desse patógeno com base em podas fitossanitárias, o controle químico e biológico não têm alcançado resultados satisfatórios, até o momento surgindo a necessidade de se obterem novas medidas a serem adotadas dentro do manejo, que sejam viáveis, econômicas e eficientes. Assim, o controle genético aliado à resistência induzida é, atualmente, uma das alternativas mais promissoras a serem implantadas dentro do manejo da doença.

A resistência de um hospedeiro, dentro do contexto da fisiologia do parasitismo, é definida como a capacidade da planta de atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos (Goodman et al., 1986). Deste modo, cada interação hospedeiro-patógeno pode ser encarada como uma luta entre dois organismos pela sobrevivência. Dentro desta luta, as plantas podem se defender dos agentes fitopatogênicos de forma passiva (pré-formados) e ativa (pós-formados). Nestas categorias, estão incluídos os fatores estruturais que atuam como barreira física, impedindo a entrada do patógeno e colonização dos tecidos, e os fatores bioquímicos, que ocorrem nas células do hospedeiro produzindo substâncias tóxicas ao patógeno ou criando condições adversas ao crescimento deste no interior da planta (Pascholati & Leite, 1994; 1995).

Visando encontrar medidas de controle mais eficientes no manejo da doença vassoura-de-bruxa em diversas espécies de *Theobroma*, vários pesquisadores vêm estudando um método eficaz para determinar os possíveis componentes estruturais e/ou bioquímicos que possam conferir resistência, os quais, controlados diretamente pelo sistema genético, poderiam auxiliar na identificação de fontes de resistência e seleção de cultivares (Bell & Mace, 1981; Brownlee, 1990; Tenkouano et al., 1993; Resende et al., 1996).

Indução de resistência em plantas é um fenômeno no qual ocorre um aumento no nível de resistência após a indução por fatores bióticos ou abióticos

que estavam inativos ou latentes, ou seja, produtos químicos, não-patógenos, formas avirulentas de patógenos, raças incompatíveis ou formas virulentas de patógenos em determinadas circunstâncias (Pascholati & Leite, 1995; Stadnik, 1999; Romeiro, 1999). A RI caracteriza-se pela ausência de toxicidade do agente indutor sobre o patógeno, pela necessidade de um intervalo de tempo para expressão da resistência após a aplicação do tratamento indutor, pela sua supressão pelo uso de inibidores específicos da expressão dos genes de defesa do hospedeiro, pela inespecificidade de proteção, por ser dependente do genoma da planta, pela ausência de resposta a níveis crescentes do indutor, e por ser local e/ou sistêmica (Steiner & Schönbeck, 1995).

Um dos primeiros relatos sobre indução de resistência em plantas, foi caracterizado por Ross (1961) quando este demonstrou que a resistência sistêmica adquirida foi ativada em plantas de fumo após infecções locais com o vírus do TMV, ocorrendo decréscimo na severidade dos sintomas em infecções secundárias por outros diferentes patógenos. Em geral, a indução de resistência é sistêmica, porque a capacidade defensiva é aumentada não somente na infecção primária em certas partes da planta, mas também em partes não infectadas. Por causa deste caráter, resistência induzida, foi denominada de resistência sistêmica adquirida - SAR (Ross, 1961; Ryals, 1996; Sticher, et al., 1997).

A resistência sistêmica adquirida se desenvolve sistemicamente ou localizadamente em resposta a um patógeno que causa uma lesão necrótica, reação de hipersensibilidade (HR) ou por aplicação exógena de ácido salicílico (AS) ou compostos sintéticos como o éster S-metil do ácido benzo [1,2,3] tiadiazol-7-carbotióico (BTH) e o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA). Neste caso, a resistência geralmente é efetiva contra um amplo espectro de patógenos e está associada com a produção de proteínas relacionadas à patogênese (PRP's), cuja rota de elicitação é mediada pelo ácido salicílico (Hammerschmidt & Smith-Becker, 1999). Evidências da atuação do ácido salicílico (AS) foram

obtidas após a sua utilização em experimentos com plantas transgênicas de fumo e *Arabidopsis*, as quais exibem aumentos de suscetibilidade e/ou resistência com a variação das concentrações de AS (Hammerschmidt & Smith-Becker, 1999).

O metabolismo do AS em plantas ocorre através do fluxo da rota dos fenilpropanóides, no qual a fenilalanina é convertida a ácido transcinâmico pela enzima Fenilalanina amônia liase (PAL), o qual induz a SAR através da sinalização para o acúmulo de PRP's, fitoalexinas e formação de biopolímeros protetores como a lignina, calose e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, além de papilas em algumas interações fúngicas (Klessig & Malamy, 1994; Wei, et al, 1995). O AS também é capaz de inibir a enzima catalase, que é responsável pela conversão do H_2O_2 em $H_2O + O_2$. A inibição da catalase induz um aumento na taxa de H_2O_2 citoplasmático, que é formado nas etapas iniciais das respostas de defesa sistêmica das plantas (Vernooij et al., 1994; Ryals et al., 1994). O H_2O_2 , por sua vez, pode ser tóxico diretamente ao patógeno ou atuar na sinalização para expressão de genes relacionados à defesa, como, por exemplo, o ácido benzóico2-hidrolase.

A aplicação de compostos tipo AS, BTH (Bion®) e INA, dentre outros, ativa genes de resistência que codificam para uma série de enzimas oxidativas, como as peroxidases (PO) e polifenoloxidasas (PPO), e outros fenóis oxidativos que contribuem para a formação de barreiras de defesa que reforçam a estrutura celular (Avdiushko, Ye e Kuć, 1993). A maioria dessas enzimas tem sido correlacionada com defesa a patógenos em diversas plantas, incluindo fumo, tomate, cucurbitáceas e arroz (Rajappan et al., 1995; Goy et al., 1992; Rasmussen, 1991).

Diversos trabalhos demonstraram a eficiência do Bion® na indução de resistência, com aumento nos níveis de enzimas chaves envolvidas nas respostas de defesa (Oliveira, Pascholati & Leite, 1997; Xue, Charest & Jabaji-Hare, 1998; Resende et al., 2000). Observou-se que a atividade de enzimas

relacionadas ao metabolismo fenólico foi sempre maior em plântulas tratadas com BTH em relação às não tratadas, o que sugere uma provável participação de fenólicos complexos, como a lignina, no processo de defesa, sendo esta característica também evidenciada em outras interações (Dann & Deverall, 2000; Cavalcanti, 2000).

Outras substâncias químicas, como elementos minerais, podem induzir resistência sistêmica em determinadas plantas (Doubrava et al., 1988). Alguns nutrientes podem funcionar como ativadores, co-fatores e reguladores de enzimas, afetando a permeabilidade de membranas, e podem estar envolvidos no controle osmótico, transporte de elétrons e sistema-tampão do protoplasma, participando de diversos eventos fisiológicos essenciais ao crescimento e desenvolvimento da planta e podendo ou não desempenhar importante papel no metabolismo secundário dos vegetais (Marschner, 1995). A importância e o efeito de certos micronutrientes nos processos de resistência parece estar relacionada com sua participação em diversos pontos das rotas metabólicas da síntese de fenóis e lignina (Graham & Webb, 1991).

Dentre os micronutrientes, o Manganês é um dos mais importantes para o desenvolvimento de resistência em plantas (Graham & Webb, 1991). Vários autores obtiveram sucesso no controle de doenças através da adição desse nutriente ao solo ou à solução nutritiva. Para o cacaueiro, Nakayama et al (1998) verificaram uma redução na porcentagem de plantas infectadas pela vassoura-de-bruxa após aplicação de Mn via pulverização foliar. Aguilar (1999), estudando o efeito do Mn sobre o crescimento, os teores de Mn e sua eficiência nutricional em dois genótipos de cacau com resistência diferencial à vassoura-de-bruxa, verificou que nos genótipos suscetíveis, na presença de diferentes níveis de Mn, os teores de amido e as taxas fotossintéticas foram maiores e a taxa de infecção foi semelhante em todos os níveis de Mn utilizados no genótipo suscetível.

Outros compostos minerais também vêm sendo utilizados na indução de resistência, como os produtos à base de fosfito. Diversos trabalhos já demonstraram a eficiência deste produto, principalmente em doenças causadas por diferentes espécies de *Phytophthora* (Erwin & Ribeiro, 1996). Na literatura, há relatos de aumento na síntese de fitoalexinas após a aplicação do fosfito ou de fosetyl-AL (Guest, 1984; Afek & Szejnberg, 1989). Guest & Grant (1991), citados por Erwin & Ribeiro (1996), sugerem que os fosfonatos param ou retardam o crescimento e a esporulação do patógeno na planta em razão do efeito tóxico direto, dependente da concentração do produto na planta, e que essa redução na taxa de crescimento do patógeno propicia à planta um tempo extra para que os seus sistemas de defesa atuem, eliminando o patógeno. Além disso, os autores sugerem que o produto também atua alterando o metabolismo de patógeno de forma a reduzir sua ação supressora sobre os mecanismos defesas da planta.

Deste modo, o uso de agentes bióticos e/ou abióticos para indução de resistência pode possibilitar uma forma de manejo de doenças bastante promissora, principalmente se houver a utilização de plantas transformadas que sejam capazes de sintetizar enzimas, fitoalexinas e outros compostos secundários em níveis mais elevados, com potencial para manter um nível tolerável de doença.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFEK, U.; SZTEJNBERG, A. Effects of fosetyl -Al and phosphorous acid on scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus to *Phytophthora citrophthora*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 79, n. 7, p. 736-739, July 1989.

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

AGUILAR, M. A. G.; RESENDE, M. L. V. Bases bioquímicas e fisiológicas da resistência a doenças. In: Dias, L. A. S. (Ed.). **Melhoramento genético do cacauero**. Viçosa: UFV, 2000. p.325-359.

ANBEHRHAN, T. Características culturais e reações bioquímicas dos isolados de *C. perniciosa*, agente causador da vassoura-de-bruxa do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 286, jun. 1986. Suplemento.

ANBEHRHAN, T. Cultural and biochemical reactions of isolates of *Crinipellis perniciosa*, causative agent of witches' broom disease cocoa. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 10., 1988, Santo Domingo, Dominican Republic. **Proceedings...** Santo Domingo, Dominican Republic, 1988. p. 363-368.

ANBEHRHAN, T.; FURTEK, D. B. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis perniciosa* isolates from different hosts. **Plant Pathology**, Oxford, v. 43, n. 6, p. 1020-1027, Dec. 1994.

AVDIUSHKO, S. A.; YE, X. S.; KUC, J. Detection of several enzymatic activities in leaf prints cucumber plant. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 42, n. 6, p. 441-454, June 1993.

BASTOS, C. N.; ANBEHRHAN, T.; ALMEIDA, L. C. Comparação morfológica e fisiológica de *C. perniciosa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 2, p. 202-206. jun. 1988.

CAVALCANTI, L. S. Indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb. em plântulas de cacauero (*Theobroma cacao* L.) cv. Theobahia, por benzotiadiazole (BTH). 2000. 82 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2000.

DAHLBERG, A.; STENLID, J. Somatic incompatibility in ectomycorrhizas. In: VARMA, A; HOCK, B. (Ed.). *Mycorrhiza: structure, function, molecular and biotechnology*. New york: Springer-Verlag, 1995. p. 115-135.

DANN, E. K.; DEVERALL, B. J. Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. *Plant Pathology*, Oxford, v. 49, n. 3, p. 324-332, June 2000.

DOUBRAVA, N.; DEAN, R. A. ; KUC', J. A. Induction of systemic resistance to anthracnose caused by *Colletotricum lagenarium* in cucumber by oxalates and extracts from spinach and rhubarb leaves. *Physiological Molecular Plant Pathology*, London, v. 33, n. 1, p. 69-79, July 1988.

ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. Chemical control. In: ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul: The American Phytopathological society, 1996. p. 211-237.

GOY, A. P.; FELIX, G.; MÉTRAUX, J. P.; MEINS, F. Jr. Resistance to disease in the hybrid *Nicotiana glutinosa* X *Nicotiana debneyi* is associated with high constitutive level of β -1,3-glucanase, chitinase, peroxidase and polyphenoloxidase. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 41, n. 1, p. 11-21, July 1992.

GRAHAM, R. D.; WEBB, M. J. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. In: MORTVEDT, J. J.; COX, F. R.; SHUMAN, L. M.; WELCH, R. M. (Ed.). *Micronutrients in agriculture*. 2. ed. Madison: Soil Science Society of America, 1991. p. 329-370.

GRIFFITH, G. W.; WILSON, J. F.; HEDGER, J. N. Populations structure, breeding biology and evolutionary relationships in the biotypes of the witches' broom disease fungus *Crinipellis pernicioso*. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 11., 1994. p. 48-51.

GUEST, D.I. Modification of defense responses in tobacco and *Capsicum* following treatment with fosetyl-Al (Aluminium tris (O-ethyl phosphonate)). *Physiological Plant Pathology*, London, v. 25, n. 2, p. 125-134, 1984.

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 Press, 1999. p. 37-53.

HEDGER, J. N.; PICKERING, V.; ARAGUNDI, J. Variability of populations of the witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*). **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 88, n. 4, p. 533-46, June 1987.

ICCO. 1998. **Quarterly Bulletin**, 03/1998.

KLESSIG, D. F.; MALAMY, J. The salicylic acid signal in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 26, n. 5, p. 1439-1458, Dec. 1994.

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

LAKER, H. A.; MOTA, J. W. S. Witches' broom disease of cocoa in the State of Rondonia, Brazil: Historical perspectives and present situation. **Cocoa Grower's Bulletin**, Bournville, v. 43, p. 45-49, 1990.

LUZ, E. D. M. N.; BEZERRA, J. L.; RESENDE, M. L. V.; OLIVEIRA, M. L. Cacau (*Theobroma cacao*) Controle de Doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: UFV, 1997. p. 611-656.

LYON, G. D.; NEWTON, A. C. Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies? **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 636-641, Oct. 1997.

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

NAKAYAMA, L. H. I.; ANDERBRHAN, T.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Indução de resistência em *Theobroma cacao* ao *Crinipellis pernicioso*, agente causador da vassoura-de-bruxa, através do manganês, boro e interação MnxB. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS – FertBio, 23., 1998, Caxambu, MG. **Resumos....** Lavras: UFLA/SBCS/SBM, 1998. p. 528.

NIELLA, G. R. Frutificação in vitro, caracterização molecular e patogenicidade de *Crinipellis pernicioso* (Stabel) Singer em *Theobroma cacao* L. 2000. 75 p. Tese (Doutorado em Agronomia-Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OLIVEIRA, M. L. Estudos de compatibilidade entre isolados de *Crinipellis pernicioso* provenientes de cacau e de outros hospedeiros. Ilhéus: CEPLAC, 1995. p. 99-101. (CEPLAC. Informe de Pesquisas)

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, p. 417-53.

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, 1996.

RAJAPPAN, K.; VIDHYASEKARAN, P.; RAGUCHANDER, T. Elicitation of enzyme activity by nickel nitrate in suspension cultured rice. **Plant Disease Research**, Punjab, v. 10, p. 142-145, 1995.

RASMUSSEN, J. B. Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, n. 4, p. 1342-1347, Dec. 1991.

RESENDE, M. L. V.; FLOOD, J.; RAMSDEN, J. D.; ROWAN, M. G.; BEALE & COOPER, R. M. Novel phytoalexins including elemental sulphur in the resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) to Verticillium wilt (*Verticillium dahliae* Kleb.). **Physiology Molecular Plant Pathology**, London, v. 48, n. 5, p. 347-359, May 1996

ROMEIRO, R. S. PGPR e indução de resistência sistêmica em plantas a patógenos. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 23., 2000, Campinas. **Anais...** Campinas, 2000. p. 181-196.

ROSS, A. F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. **Virology**, San Diego, v. 14, n. 3, p. 340-358, 1961.

RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H. Y.; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, Rockville, v. 9, n. 3, p. 425-439, Mar. 1996.

RYALS, J. A.; UKNES, S.; WARD, E. Systemic acquired resistance. *Plant Physiology*, Rockville, v. 104, n. 4, p. 1109-1112, Aug. 1994.

SILVA, S. D. V. M. **Histologia e seleção de variáveis para avaliar resistência de cacaueteiro a *Crinipellis pernicioso***. 1997. 93 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

STADNIK, M. J. Indução de resistência a oídios. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 26, n. 1, p. 175-177, jan./mar. 2000.

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. (PhD Thesis) - University of Hohenheim, Stuttgart.

STEINER, U.; SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In: HAMERSCHMIDT, R.; KUC', J. (Ed.). **Induced Resistance to Disease in Plants – Developments in Plant Pathology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. v. 4, p. 86-110.

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

UKNES, S.; VERNOOIJ, B.; MORRIS, S.; CHANDLER, D. et al. Reduction of risk for growers: methods for the development of disease-resistant crops. *New Phytologist*, Cambridge, v. 133, n. 1, p. 3-10, May 1996.

VERNOOIJ, B.; UKNES, S.; WARD, E.; RYALS, J. Salicylic acid as a signal molecule in plant-pathogen interactions. *Current Opinion Cell Biology*, London, v. 6, n. 2, p. 275-279, Apr. 1994.

YAMADA, M. M.; OLIVEIRA, M. L. Métodos e protocolos para eletroforese em gel de amido de isoenzimas de *Crinipellis pernicioso*. *Agrotropica*, Ilhéus, 2000. No prelo.

WEI, G.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 12, p. 1508-1512, Dec. 1991.

WHEELER, B. E. J.; MEPSTED, R. Pathogenic variability among isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Plant Pathology**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 475-88, Dec. 1988.

CAPÍTULO 2

VARIABILIDADE DE ISOLADOS DE *Crinipellis pernicioso* USANDO GRUPOS DE INCOMPATIBILIDADE SOMÁTICA E PADRÃO DE ISOENZIMAS

1 RESUMO

PEREZ, Jane Oliveira. Variabilidade de isolados de *Crinipellis pernicioso* usando grupos de incompatibilidade somática e padrão de isoenzimas. 2002. 81p Tese (Doutorado em Agronomia - Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Estudos envolvendo o conhecimento da variabilidade de *Crinipellis pernicioso*, são extremamente importantes para o manejo da doença vassoura-de-bruxa do cacau. Isolados de *C. pernicioso* provenientes de diferentes hospedeiros e localidades, foram caracterizados através da análise de grupos de incompatibilidade somática, perfil eletroforético e atividade de peroxidases. Foram realizados pareamentos em placas de Petri entre 14 isolados distintos dos hospedeiros (*Theobroma cacao*, *T. grandiflorum*, *T. bicolor*, *Heteropterys acutifolia* e *Solanum lycocarpum*). Observou-se variações de 19 a 94% de dissimilaridade entre os isolados, sendo que a 60% de dissimilaridade, foi possível definir cinco grupos de isolados, com alguns sub-grupos presentes. Os isolados (Cp2 e Cp5) provenientes de Belém-PA e Santo Amaro-BA, ambos de cacau, foram compatíveis, demonstrando não haver relação entre os grupos de hospedeiros e a localização geográfica. O isolado (Cp1) proveniente de Ouro Preto D'Oeste-RO (cacau), apresentou a maior divergência genética (94%) em relação aos demais. Dentro da população de *C. pernicioso* provenientes de cupuaçu, os isolados Cp8 e Cp11 são mais próximos geneticamente. Entre os hospedeiros alternativos, os isolados Cp12 e Cp13, provenientes de *T. bicolor* e *S. lycocarpum*, apresentaram a mesma a distância genética, sendo similar aos isolados de cupuaçu, indicando uma maior proximidade genética. Para o perfil eletroforético em gel de poliacrilamida, tendo como substrato para peroxidase, σ -dianisidina e H_2O_2 verificou-se diferenças entre os isolados quanto a intensidade de coloração e mobilidade da banda no gel. O isolado de Ouro Preto D'Oeste apresentou uma banda de isoenzima diferencial em relação aos demais. Os resultados do perfil isoenzimático de peroxidase, reforça a importância da análise desta enzima em estudos de caracterização e diferenciação de isolados e/ou raças fisiológicas de *Crinipellis pernicioso*.

Comitê Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Orientador),
Dulcinéia de Carvalho - UFLA, Maria das Graças Claret de Sousa - CPAA-
EMBRAPA, Ludwig Heinrich Pfenning - UFLA

2 ABSTRACT

PEREZ, Jane Oliveira. Variability of isolates of *Crinipellis pernicioso* using somatic incompatibility grouping and patterns of isoenzymes. 81p Thesis (Doctorate in Agronomy - Phytopathology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Studies involving the knowledge of the variability of *Crinipellis pernicioso* are extremely important for the integrated management of witches' broom disease. *C. pernicioso* isolates from different hosts and places were characterized by somatic incompatibility, electrophoretic profiles and peroxidase activity. Micelial pairings in Petri dishes were carried out among 14 isolates from several hosts (*Theobroma cacao*, *T. grandiflorum*, *T. bicolor*, *Heteropterys acutifolia* and *Solanum lycocarpum*). Genetic dissimilarities ranging from 19 to 94% were found. Five groups of isolates with some subgroups inside, were defined, by using a limit of dissimilarity of 60%. It was observed that isolates from cocoa from different regions, such as Belém, PA (Cp2) and Santo Amaro, BA (Cp5) were compatible, therefore there was no clear relationship between compatibility and geographic localization. An isolate (Cp1) from Ouro Preto D'Oeste, RO, presented the largest genetic divergence (94%) in relation to the others. Amongst the population originated from cupuaçu, the isolate Cp8 from Belém, PA was more similar to the isolate Cp11 from Itabuna, BA. However, isolates Cp12 and Cp13 from the alternative hosts *T. bicolor* and *S. lycocarpum* showed the same genetic distance in comparison with isolates from cupuaçu, indicating a possible genetic proximity among them. In relation to data obtained from enzymatic pattern, it was observed that the activity of the enzyme peroxidase (PO) was efficient in the differentiation of isolates with differences at the intensity of colour and mobility on gel. The isolate from Ouro Preto D'Oeste, RO, presented an isoenzyme band not present in others isolates, from cocoa or other hosts. The results of pattern of peroxidase isoenzymes can be important in the studies of differentiation and characterization of isolates and/or physiological races of *C. pernicioso*.

* Guidance Committee: Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Adviser), Dulcinéia de Carvalho - UFLA, Maria das Graças Claret de Sousa - CPAA-EMBRAPA, Ludwig Heinrich Pfenning - UFLA

3 INTRODUÇÃO

Hoje, a cacauicultura nacional tem o grande desafio de devolver ao Brasil o posto de um dos maiores produtores e exportadores de amêndoas de cacau. Entretanto, para que isto aconteça é preciso vencer alguns obstáculos, como a doença vassoura-de-bruxa, cujo agente etiológico é o fungo *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer. A vassoura-de-bruxa do cacauceiro, é a doença mais destrutiva da cultura, principalmente na região sul do Estado da Bahia. *C. perniciosa* é patogênico a diversas espécies dos gêneros *Theobroma*, *Herrania* e *Solanum*, dentre outros, o que demonstra a grande variabilidade entre e dentro das distintas populações do fungo.

A incompatibilidade somática é uma técnica que vem sendo utilizada há bastante tempo e está disseminada entre vários ramos da biologia. Em animais, plantas e células, a fusão somática é regulada através de anastomose. Em fungos, a regulação somática está em um nível mais íntimo, determinando que esta fusão ou anastomose hifal resulta em uma continuidade citoplasmática e permutação nuclear (Petersen, 1995). Os estudos sobre o relacionamento entre populações com base no sistema de incompatibilidade somática podem fornecer subsídios para o conhecimento da especificidade do fungo e o seu estabelecimento nas diferentes espécies de hospedeiro.

Outro método que pode ser utilizado na distinção dos isolados é o perfil eletroforético com base no padrão de isoenzimas, uma técnica bastante utilizada para classificação de determinados grupos de fitopatógenos, de fácil aplicação e prática para análise de várias enzimas comumente presentes nos tecidos fúngicos (Bonde et al., 1984).

Este trabalho objetivou determinar a variabilidade existente entre isolados de *C. perniciosa* provenientes de diferentes hospedeiros e regiões geográficas distintas com base na expressão de incompatibilidade somática e na análise dos padrões isoenzimáticos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo do Departamento de Fitopatologia e no Laboratório de Melhoramento Florestal do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Lavras-MG.

4.1 Obtenção e manutenção de culturas polispóricas

Os isolados de *C. pernicioso* utilizados neste ensaio (Tabela 1) foram obtidos a partir de vassouras secas coletadas em diversos estados brasileiros, mantidas em vassoureiros com regime de molhamento controlado a fim de induzir a produção de basidiocarpos.

TABELA 1 Isolados de *Crinipellis pernicioso*. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Código	Isolados	Hospedeiro	Origem
Cp 1	Rondônia	<i>Theobroma cacao</i>	Ouro Preto D' Oeste -RO
Cp 2	Belém	<i>T. cacao</i>	Belém -PA
Cp 3	Manaus	<i>T. cacao</i>	Manaus -AM
Cp 4	Ilhéus	<i>T. cacao</i>	Ilhéus -BA
Cp 5	Santo Amaro	<i>T. cacao</i>	Sto. Amaro -BA
Cp 6	Camacan	<i>T. cacao</i>	Camacan -BA
Cp 7	Altamira	<i>T. cacao</i>	Altamira -PA
Cp 8	Belém-Cupuaçu	<i>T. grandiflorum</i>	Belém -PA
Cp 9	Rondônia-Cupuaçu	<i>T. grandiflorum</i>	Porto Velho -RO
Cp 10	Manaus-Cupuaçu	<i>T. grandiflorum</i>	Manaus -AM
Cp 11	Bahia	<i>T. grandiflorum</i>	Itabuna -BA
Cp 12	Bicolor	<i>T. bicolor</i>	Belém -PA
Cp 13	Lobeira	<i>Solanum lycocarpum</i>	Lavras -MG
Cp 14	Cipó	<i>Heteropterys acutifolia</i>	Lavras -MG

Após a emissão e coleta dos primeiros basidiocarpos, os mesmos foram lavados em água estéril e desinfestados numa solução de estreptomicina a 1%. Os basidiocarpos foram fixados com vaselina em tampas de placas de Petri de

9cm contendo BDA e mantidos à temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Após a obtenção de colônias polispóricas, foi efetuada uma nova repicagem de discos de 7 mm das margens das colônias para o meio BDA, sendo as culturas mantidas em BOD à temperatura de 26°C e fotoperíodo de 12 h. Os isolados foram conservados em geladeira na micoteca do Departamento de Fitopatologia da UFLA, Lavras, MG.

4.2 Identificação dos grupos de incompatibilidade somática

A expressão de incompatibilidade somática entre os isolados miceliais, foi analisada como descrito por Griffith & Hedger (1994), segundo o qual discos de meio de cultura com micélio (5mm Ø), obtidos das margens de colônias com 10 dias de idade, foram pareados a uma distância de 2cm cada em placas de Petri (9cm) contendo 20 mL de meio MYEA, invertidas e incubadas a 25°C por 4 semanas. Para cada pareamento, utilizaram-se 4 repetições.

4.2.1 Avaliação e determinação das distâncias

As avaliações foram realizadas com base nas reações de incompatibilidade (zona de transição) e compatibilidade entre os isolados. Os dados obtidos foram transformados em matriz de valores binários, interpretando-se os resultados pela presença (1) ou ausência (0) de compatibilidade entre os isolados

O cálculo dos dados das distâncias entre os isolados foram utilizados para construção de um dendrograma originado da análise de “cluster” (método Unweighted Pair Group Analyses - UPMGA), utilizando o programa Statistica (Statsoft, 1995).

4.3 Perfil eletroforético de isolados de *Crinipellis pernicioso*

Basidiocarpos de *C. pernicioso* de diferentes hospedeiros (Tabela 2) foram coletados de vassouras secas dispostas em vassoureira sob condições de temperatura e umidade controlada.

TABELA 2 Basidiocarpos de diferentes hospedeiros de *Crinipellis pernicioso*.
UFLA, Lavras, MG, 2002.

Código	Basidiocarpos	Hospedeiro	Origem
Cpb 1	Rondônia	<i>T. cacao</i>	Ouro Preto D' Oeste -RO
Cpb 2	Santo Amaro	<i>T. cacao</i>	Sto Amaro -BA
Cpb 3	Itamarajú	<i>T. cacao</i>	Itamarajú -BA
Cpb 4	Camacan	<i>T. cacao</i>	Camacan -BA
Cpb 5	Cipó	<i>H. acutifolia</i>	Lavras - MG
Cpb 6	Bicolor	<i>T. bicolor</i>	Belém -PA
Cpb 7	Cupuaçu	<i>T. grandiflorum</i>	Belém -PA
Cpb 8	Solonacea	Não identificada	Monte Verde -MG

Os basidiocarpos foram coletados, lavados com água destilada e armazenados em ultra-freezer a -80°C até o momento da extração para obtenção das amostras. Posteriormente, foram macerados em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido mantido sobre banho de gelo, adicionando-se tampão de extração, solução n^o 1, de acordo com Alfenas et al. (1998). Após as extrações, as amostras foram centrifugadas a 4°C , 12.500 rpm, por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi armazenado em ultra-freezer a -80°C até o momento das análises.

4.3.1 Preparo dos géis e corridas eletroforéticas

A eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes foi conduzida utilizando-se o gel de concentração a 12,5%, um gel de separação a 4% e o tampão da cuba Tris-glicina (0,025 M Tris, 0,192 M glicina, 0,1%), preparado de acordo com o protocolo de Alfenas et al. (1998). Após a

polimerização dos géis, foram aplicados individualmente em cada cavidade, 40µL das amostras na canaleta do gel concentrador. Cada corrida eletroforética foi conduzida a uma temperatura de 4^o C, mantendo-se a corrente constante a 10mA, durante 3 horas e 30 minutos. Após a corrida, os géis foram corados com solução de revelação específica para cada enzima, determinando-se a atividade de peroxidase (PO), indolacetato oxidase (IAA) e álcool desidrogenase (ADH), segundo a metodologia de Alfenas et al., (1998).

4.3.2 Determinação da atividade de peroxidases

A atividade de peroxidase foi quantificada através da medida da absorbância da reação de oxidação do guaiacol, conforme metodologia descrita por Cortelazzo, Marais & Joseleau (1996), modificada. A mistura da reação consistiu de 40 mM de guaiacol e 20 mM de peróxido de hidrogênio em 40 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 6,7. Foram adicionados, à mistura, 100 µL da amostra diluída, resultando em um volume total de 2,5 mL.

As reações ocorreram em temperatura ambiente em torno de 21° C. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Beckmam DU 640B a 420 nm, durante 02 minutos para peroxidases, com acompanhamento em intervalos de 05 segundos, sendo os valores expressos em mudança na absorbância por grama de matéria fresca de amostra por minuto.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação dos grupos de incompatibilidade somática

De acordo com os dados binários obtidos, foi possível agrupar os isolados com base nas distâncias genéticas calculadas pelo método hierárquico aglomerativo de agrupamento, sendo possível ilustrar os resultados na forma de um dendrograma (Figura 1 e Tabela 1A).

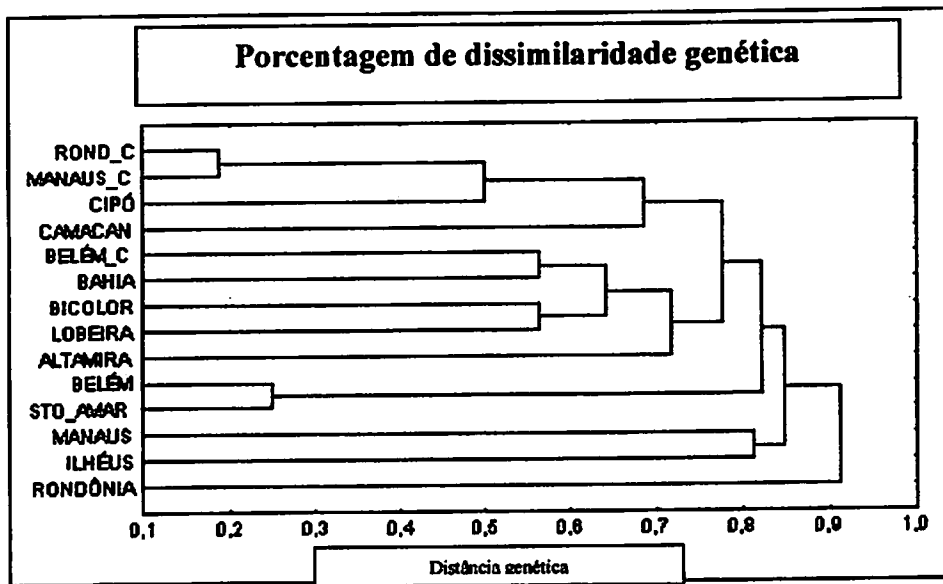


FIGURA 1 Análise de agrupamento (dendrograma) de quatorze isolados de *Crinipellis pernicioso* com base na incompatibilidade somática, Dados originais são baseados na matriz das distâncias genéticas (%).

Pela análise do dendrograma, verificou-se que a variação entre os isolados foi de 19 a 94% de dissimilaridade. Quando se observa o dendrograma a uma distância de 60%, os isolados foram divididos em cinco grupos distintos (Tabela 3).

TABELA 3 Grupos de isolados de *Crinipellis pernicioso* formados com base nas reações de incompatibilidade somática, UFLA, Lavras, MG 2002.

Grupos	Denominação dos isolados	Hospedeiro
1	Cp 9, Cp10 e Cp 14	Cupuaçu e Cipó
1.1	Cp 6	Cacau
2	Cp 8 e Cp 11	Cupuaçu
2.1	Cp 12 e Cp 13	Bicolor e Lobeira
2.2	Cp 7	Cacau
3	Cp 2 e Cp 5	Cacau
4	Cp 3 e Cp 4	Cacau
5	Cp 1	Cacau

De acordo com estes agrupamentos, não se observou relação entre os grupos de isolados compatíveis e a localização geográfica. O isolado (Cp 1) proveniente de Ouro Preto D'Oeste-RO apresentou a maior divergência em relação aos demais.

Observou-se que, para os isolados testados, a variabilidade dentro da população de isolados de *C. pernicioso* provenientes do cupuaçu foi relativamente baixa, uma vez que o isolado Cp 8, de Belém-PA, foi semelhante ao isolado Cp 11, proveniente do estado da Bahia, com uma distância de 56%. Dentro do grupo 1, os isolados Cp 9 e Cp 10 de cupuaçu provenientes de Rondônia e Manaus apresentaram a menor distância, indicando, provavelmente, que são mais próximos geneticamente. O isolado de cipó (Cp 14), apesar de estar neste grupo, apresentou 50% de dissimilaridade. Um dado interessante pode ser observado no grupo 2.1, constituído pelos hospedeiros alternativos de

Bicolor e Lobeira, os quais apresentam distância genética similar aos isolados do grupo 2.

Testes de patogenicidade utilizando isolados de lobeira, realizados por Viana Júnior (2001), indicaram a capacidade destes em causar sintomas de vassoura-de-bruxa em mudas de cupuaçu. Sugere-se que este isolado de *C. pernicioso* apresenta alta capacidade de causar doença em diferentes espécies hospedeiras, o que confirma a sua similaridade nos testes de compatibilidade com os isolados de cupuaçu da Bahia.

Os agrupamentos definidos não obedecem às barreiras ecológicas e genéticas dos diferentes hospedeiros, como observado nos componentes dos grupos 3 e 4, havendo a necessidade de correlacioná-los com a virulência das populações no campo. Estudos de compatibilidade realizados por Almeida & Andebrhan (1984) com isolados de *C. pernicioso* provenientes do Pará não permitiram determinar diferenças entre os isolados de diferentes regiões e hospedeiros. O autor considera que a proximidade geográfica dos isolados permite que condições de campo contribuam para infecções múltiplas. Entretanto, Andebrhan et al., (1998) observaram variação genética entre isolados de *C. pernicioso* do cacauero em diferentes municípios do Estado de Rondônia, realizando estudos através de testes *in vitro* e *in vivo*. Andebrhan et al., (1998) utilizaram grupos de compatibilidade somática (SCG) e identificaram dois grupos do fungo: o grupo formado pelos isolados dos municípios de Ouro-Preto d'Oeste e Jaru e o grupo formado pelos isolados dos municípios de Cacoal e Ariquemes, caracterizando a existência de variabilidade entre grupos de isolados de *C. pernicioso* dentro de uma mesma região geográfica.

5.2 Perfil eletroforético de isolados de *C. pernicioso*

Com base nos resultados do perfil eletroforético para os extratos obtidos de basidiocarpos de diferentes hospedeiros de *C. pernicioso*, verificou-se que

para as enzimas ADH e IAA-oxidase não ocorreu atividade enzimática. No entanto, para a enzima peroxidase, o perfil enzimático foi detectado para todos os isolados (Figura 2). Observou-se a presença de uma isoenzima comum a todos os isolados, contudo apresentando diferenças quanto à intensidade de coloração e mobilidade no gel. Para os isolados provenientes de cacau oriundos da Bahia, verificou-se que as bandas foram diferentes quanto à mobilidade e intensidade, sendo o isolado (Cpb 4) proveniente de Camacan-BA o mais divergente em relação aos isolados Cpb 2 e Cpb 3, de Santo Amaro e Itamarajú.

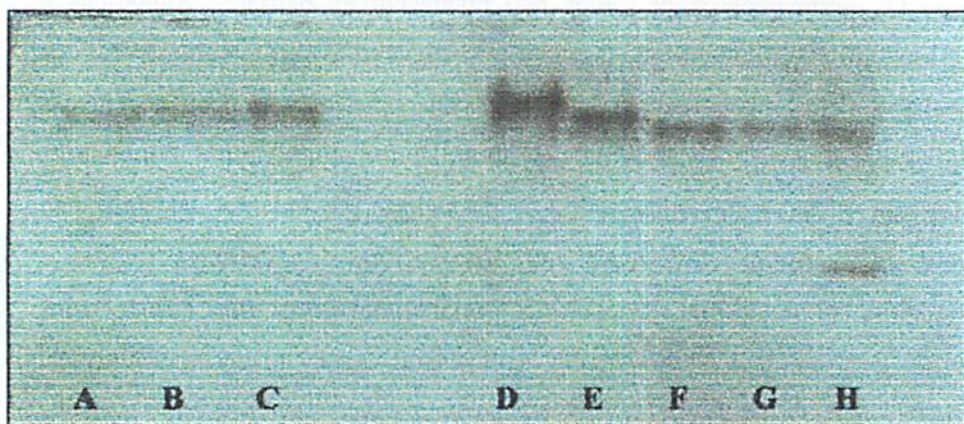


FIGURA 2 Perfil eletroforético dos isolados de *Crinipellis pernicioso* provenientes de diferentes hospedeiros em gel de poliacrilamida, corado com σ -dianisidina e H_2O_2 , para visualização das isoenzimas de peroxidase. A- Santo Amaro, B- Itamarajú, C- Camacan, D- Cipó, E- Bicolor, F- Cupuaçu, G- Solonácea, H- Rondônia.

Para o isolado de cipó (Cpb 5), o perfil da enzima no gel apresentou uma maior intensidade de coloração e mobilidade, sendo diferente dos demais isolados. Esta característica também foi observada para o isolado de bicolor (Cpb 6). Quando se analisou o perfil enzimático do isolado de cupuaçu (Cpb 7), verificou-se que o mesmo apresenta uma banda com intensidade de coloração e

mobilidade no gel semelhante ao obtido para o isolado de Camacan. Com base nas ilustrações apresentadas na Figura 2, observou-se que o isolado (Cpb 8) proveniente de uma solonácea ainda não identificada apresentou um padrão de banda com características intermediárias, ou seja, com uma intensidade de coloração menos expressiva, mas com intensidade e mobilidade relativa um pouco menor que o isolado de cupuaçu.

O isolado (Cpb 1) proveniente de Ouro Preto D'Oeste-RO apresentou perfil enzimático distinto daqueles apresentados pelos outros isolados, com a presença de uma isoenzima a mais e com uma banda de mobilidade diferente. Este isolado, apesar de ser oriundo de cacau, foi divergente dos isolados de cacau provenientes da Bahia.

Diferenças no perfil eletroforético de PO podem ser explicadas pela presença de isoenzimas diferentes. Diferenças no perfil de isoenzimas podem ser geradas pela presença de alelos diferentes codificando para isoformas de uma mesma enzima. Isoenzimas diferentes podem ocorrer em tecidos diferentes ou mesmo em tecidos iguais submetidos a diferentes condições de desenvolvimento ou estresses pela expressão de alelos anteriormente não expressos sob condições normais de desenvolvimento ou em fase diferentes de desenvolvimento. No caso dos perfis de isoenzimas apresentados neste trabalho, os mesmos foram obtidos a partir de extratos provenientes de basidiocarpos e estes se constituem da fase saprofítica do patógeno, na qual a condição nuclear dicariótica pode produzir mais de um padrão de bandas complexas para a expressão de alelos separados (Micales & Bonde, 1995). As diferenças observadas no perfil isoenzimático de PO no isolado de Rondônia indica que este isolado pode apresentar um alelo que não está presente nos demais isolados e constituir um excelente marcador molecular para *C. pernicioso*. Estes dados reforçam a hipótese de que este isolado apresenta uma ampla diversidade em relação aos demais, como observado nos testes de incompatibilidade somática, em que foi o mais

divergente comparado aos outros isolados, como visto nos resultados do item 4.2 citado anteriormente. Em trabalhos realizados por Niella (2000), observou-se, sob condições de casa-de-vegetação, que o isolado de Ouro Preto D'Oeste foi o que apresentou a maior média de proporções estimadas de incidência da doença em relação aos outros isolados testados sobre o clone Scavina 6 (SCA 6, padrão de resistência a vassoura-de-bruxa), vencendo a resistência desse clone. Resende (2000 comunicação pessoal) também já havia observado a alta virulência deste isolado sobre mudas seminais de SCA 6, resultando numa incidência da doença de até 80%, sendo este isolado o único capaz de causar doença nesta cultivar. A presença de uma isoenzima diferente para peroxidase neste isolado sugere que a mesma tenha uma função específica, que possa estar diretamente relacionada com a alta virulência do patógeno e a sua ação diferencial envolvida na interação de suscetibilidade do clone SCA 6.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, é provável que a atividade diferenciada da PO para este isolado seja um indicativo de que os tecidos do fungo produzam substâncias que podem aumentar e/ou elicitar, nas plantas hospedeiras, alguns dos sintomas característicos da vassoura-de-bruxa. Vale ressaltar a importância de se identificar qual a estrutura desta PO, já que as peroxidases de fungos são relacionadas às peroxidases de plantas em suas estruturas primárias e terciárias, sendo classificadas dentro da classe II das peroxidases extracelulares (Welinder et al., 1992). Um trabalho pioneiro evidenciando a atividade da PO em filtrados obtidos de culturas fúngicas de *C. pernicioso*, foi realizado por Krupasagar & Sequeira (1969), os quais detectaram a presença de duas diferentes enzimas oxidando IAA, uma peroxidase com características de IAA-oxidase e uma lacase. De acordo com os autores, vassouras de cacau infectadas, que exibem pouca dominância apical e grande proliferação de brotos axilares, ocorrem devido às alterações hormonais no nível IAA-IAA oxidase, resultando num aumento da atividade de IAA oxidase em

vassouras terminais e tecidos infectados lateralmente. Segundo Pilet, (1961) modificações observadas em tecidos infectados, como redução no tamanho do limbo foliar, podem ser devidas a um desbalanço hormonal provocado por um aumento da oxidação de IAA.

Os resultados obtidos neste trabalho quanto à presença da atividade de PO em extratos obtidos de basidiocarpos confirmam as observações feitas por Krupasagar & Sequeira (1969) e Pilet (1961) quando detectaram a presença de PO em extratos miceliais de *C. pernicioso*.

5.2.1 Determinação da atividade de peroxidases

Diferenças significativas foram observadas entre os isolados de *C. pernicioso* quanto à medida da atividade de peroxidase, através da leitura de absorbância a 420 nm (Figura 3). Verificou-se que o isolado de cacau (Cpb 3) proveniente de Itamarajú-BA apresentou o maior pico de atividade, diferenciando-se completamente do isolado Cpb 1 (Ouro Preto D'Oeste-RO), que teve a menor atividade enzimática. A ausência de distinção com base na análise estatística entre os isolados Cpb 4, Cpb 5, Cpb 6, Cpb 7 e Cpb 8 quanto à atividade da enzima peroxidase pode ser devida a alterações nos níveis de peroxidases. Estas modificações podem ocorrer pela produção de novas isoformas, ou em função do aumento de formas constitutivas (Siegel, 1993).

Para que ocorra um melhor entendimento sobre o comportamento da atividade de peroxidase em estruturas reprodutivas, como os basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso*, recomenda-se que a coleta do material tenha o mesmo estágio de crescimento, maturação, etc. Deste modo, estes procedimentos poderão fornecer melhores informações sobre a síntese desta enzima nos tecidos do hospedeiro, para que novos estudos sejam realizados objetivando uma melhor diferenciação com base em sistemas isoenzimáticos.

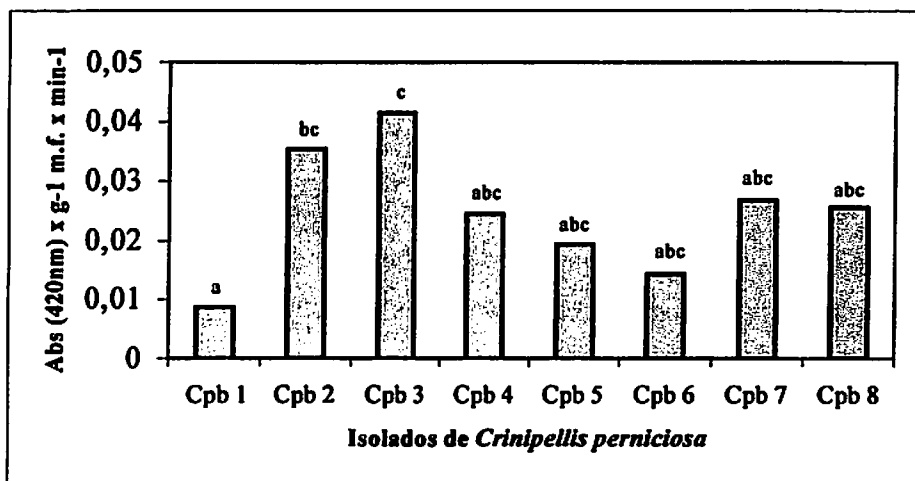


FIGURA 3 Atividade de peroxidases de isolados de *Crinipellis perniciosia*, provenientes de estruturas reprodutivas (basidiocarpos). 1) Cacau: Cpb 1, Ouro Preto D'Oeste; Cpb 2, Santo Amaro; Cpb 3, Itamarajú; Cpb 4, Camacan; 2) Cipó: Cpb 5, Lavras; 3) Bicolor: Cpb 6, Belém; 4) Cupuaçu: Cpb 7, Belém; 5) Solonácea: Cpb 8, Monte Verde.

Sendo assim, de acordo com os resultados obtidos, pode-se inferir que as diferenças encontradas entre os isolados, tanto pela análise eletroforética como pela leitura da absorbância, podem ser um indicativo de que esta enzima pode vir a ser utilizada como marcador bioquímico para diferenciar isolados de *C. perniciosia* provenientes de diferentes hospedeiros, bem como para identificar possíveis raças fisiológicas do fungo em cacau. Esta é a primeira referência acerca da diferenciação de isolados utilizando a enzima PO como um provável marcador molecular. Estes dados são extremamente importantes porque comprovam que existe variabilidade entre as distintas populações de *C. perniciosia* e que novos estudos envolvendo a atividade desta enzima na diferenciação de isolados podem contribuir substancialmente para um avanço nos programas de manejo integrado da vassoura-de-bruxa do cacauero.

6 CONCLUSÕES

- 1. Existe variabilidade entre as distintas populações do fungo, indicando a provável existência de raças fisiológicas.**
- 2. A análise de incompatibilidade somática não foi eficaz na diferenciação de grupos de compatibilidade genética entre os isolados de *C. pernicioso*.**
- 3. O isolado de Ouro Preto D'Oeste, RO, foi o mais divergente entre os analisados tanto por testes de incompatibilidade somática como pelo perfil eletroforético e atividade enzimática de peroxidase.**
- 4. A duas isoformas de peroxidase detectadas no isolado de Ouro Preto D'Oeste podem indicar especificidade para maior virulência em testes de patogenicidade.**
- 5. O padrão isoenzimático de PO obtido reforça a importância da análise desta enzima em estudos de caracterização e diferenciação de isolados e/ou raças fisiológicas de *Crinipellis pernicioso*.**

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. **Eletrforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos.** Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

ALMEIDA, L. C.; ANDEBRHAN, T. **Reação de clones de cacau à *C. pernicioso*.** Belém: CEPLAC/DEPEA, 1984. p. 73-146. (CEPLAC/DEPEA. Informe de Pesquisas).

ANDEBRHAN T.; ALMEIDA, L. C.; NAKAYAMA, L. H. I. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer: A experiência da Amazônia brasileira. *Agrotrópica*, Ilhéus, v. 10, n. 2 p. 49-60, maio/ago. 1998.

CORTELAZZO, A. L.; MARAIS, M.-F.; JOSELEAU, J.-P. Changes in peroxidases in the suspension culture of *Rubus fruticoso* during growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v. 46, p. 27-33, 1996.

GRIFFITH, G. W.; WILSON, J. F.; HEDGER, J. N. Populations structure, breeding biology and evolutionary relationships in the biotypes of the witches' broom disease fungus *Crinipellis pernicioso*. In: **INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE**, 11., 1994. p. 48-51.

KRUPASAGAR, V.; SEQUEIRA, L. Auxin destruction by *Marasmius pernicioso*. *American journal of Botanic*, Columbus, v. 56, n. 4, p. 390-397, Apr. 1969.

MICALES, J. A.; BONDE, M. R. Isozymes: methods and applications. In: **Molecular methods in plant pathology.** Florida: CRC Press, 1995. p. 115-130.

NIELLA, G.R. **Frutificação in vitro, caracterização molecular e patogênica de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer em *Theobroma cacao* L.** 2000. 75 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PETERSEN, R. H. There's more to a mushroom than meets the eye: mating studies in the Agaricales. *Mycologia*, New York, v. 87, n. 1, p. 1-17, Jan./Feb. 1995.

PILET, P.E. **Les phytohormones de croissance**. Paris: Masson et Cie, 1961.

RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; SILVA, L. H.C.P.; AGUILAR, M. A. G.; NIELLA, G. R.; CARVALHO, G. A.; GIOVANINI, G. R.; CASTRO, R. M. Perspectivas da indução de resistência em cacaueteiro contra *Crinipellis perniciosa* através do benzothiadiazole (BTH). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 149-156, jun. 2000.

STATSOFT. **Programa de análise estatística**, versão 5.0, 1995.

VIANA JÚNIOR, C. A. C. **Compatibilidade somática e patogenicidade de *Crinipellis* sp.** 2001. 61 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

WELINDER, K. G.; GAJHEDE, M. Structure and evolution of peroxidase. In: WELINDER, K. G. et al. (Ed.). **Plant peroxidases: biochemistry and physiology**. (Ed.). Geneva: University of Geneva, 1993.

CAPÍTULO 3

OTIMIZAÇÃO DO USO DO ACIBENZOLAR S-METIL NA PROTEÇÃO CONTRA *Crinipellis perniciosa*, AGENTE DA VASSOURA- DE-BRUXA EM *Theobroma cacao* L.

1 RESUMO

PEREZ, Jane Oliveira. Otimização do uso do acibenzolar S-metil na proteção contra *Crinipellis perniciosa*, agente da vassoura-de-bruxa em *Theobroma cacao* L. 2002. 81p. Tese (Doutorado em Agronomia-Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A utilização de compostos sintéticos na indução de resistência representa uma ferramenta adicional dentro do manejo integrado de doenças em diversos patossistemas. Deste modo, a otimização do uso do acibenzolar S-metil em combinação com micronutrientes ou fungicidas foi avaliado para proteção de mudas de cacau à vassoura-de-bruxa. Objetivando reduzir a dose e o tempo de aplicação do ASM, mudas de cacau cv. SIC-23 foram pulverizadas aos 15, 30 e 60 dias antes da inoculação, nas dosagens de 0,05; 0,1 e 0,2 mg i.a./mL de água. Obteve-se um efeito protetor maior na dosagem de 0,2 mg i.a./mL aos 30 dias antes da inoculação. Nos testes *in vivo* sobre mudas de cacau cv. SIC-23, aplicaram-se o ASM e os produtos à base de micronutrientes Axcell[®], Hortifós PK e Growmaster Mn[®] (14% Mn, produzido pela Intercuf), 15 dias antes da inoculação nas dosagens de 1250 µL; 1000 µL e 1000 µL/mL de água, respectivamente. Os micronutrientes não foram eficientes em reduzir a doença, no entanto, o ASM apresentou uma proteção próxima a 50%, em comparação com a testemunha inoculada. Para os testes com fungicidas, foram utilizados os produtos: ASM 0,2 mg/ mL; Azoxystrobin 0,2 mg/ mL; óxido cuproso 9 mg/mL; chlorotalonil 1,5 mg/mL; ASM + azoxystrobin 0,1 mg/mL + 0,1 mg/mL; ASM + chlorotalonil 0,1 mg/mL + 0,75 mg/mL; ASM + ox. cuproso 0,1 mg/mL + 4,5 mg/mL, os quais foram aplicados via pulverização foliar 15 dias antes da inoculação em mudas de cacau da cv. suscetível SIC-23. Os melhores tratamentos foram Azoxystrobin, óxido cuproso e a combinação ASM + Azoxystrobin, conferindo proteção de 86,6; 84,7 e 82,8% respectivamente, em relação à testemunha inoculada.

Comitê Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Orientador),
Dulcinéia de Carvalho - UFLA, Maria das Graças Claret de Sousa -
EMBRAPA-CPPA, Ludwig Heinrich Pfenning – UFLA.

2 ABSTRACT

PEREZ, Jane Oliveira. Optimization of the use of acibenzolar S-methyl in the protection against *Crinipellis pernicios*, the witches' broom agent in *Theobroma cacao* L. 2002. 81p. Thesis (Doctorate in Agronomy-Phytopathology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil. *

The use of synthetic compounds for the induction of resistance in plants represents an additional tool in the integrated disease management system at several pathosystems. In this way, the optimization of use of Acilbenzolar S-methyl together with micronutrients or fungicides was investigated for the protection of cocoa seedlings against witches' broom disease. Aiming at reducing ASM dose and time of application, ASM was sprayed on cocoa seedlings, 15, 30 and 60 days before inoculation, at doses of 0.05, 0.1 and 0.2 mg of active ingredient/mL of water. The best efficacy of protection was obtained when ASM was sprayed at 0.2 mg of a.i/mL, 30 days before inoculation. ASM was also tested together with micronutrient based products, 15 days before inoculation, however, no increase in efficacy against witches' broom was noticed. Finally, ASM at the dose of 0.2 mg/ mL had its performance assessed in comparison with azoxystrobin (0.2 mg/ mL), cuprous oxide (9.0 mg/mL); chlorotalonil (1.5 mg/mL); ASM + azoxystrobin (0.1 mg/mL + 0.1 mg/mL); ASM + chlorotalonil (0.1 mg/mL + 0.75 mg/mL); ASM + cuprous oxide (0.1 mg/mL + 4.5 mg/mL), all sprayed 15 days before inoculation. The best treatments were: azoxystrobin, cuprous oxide and the combination ASM + azoxystrobin, conferring protection of 86.6, 84.7 and 82.8%, respectively, in relation to the inoculated control.

* Guidance Committee: Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Major Professor), Dulcinéia de Carvalho - UFLA, Maria das Graças Claret de Sousa - EMBRAPA-CPAA, Ludwig Heinrich Pfenning - UFLA

3 INTRODUÇÃO

A vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauieiro é a doença mais destrutiva desta cultura no Brasil, causando inúmeros problemas econômicos, ecológicos e sociais na região cacauieira do Sul da Bahia. Diversas estratégias de manejo da doença vêm sendo utilizadas, objetivando o controle eficiente da doença. Entre as medidas de controle adotadas até o momento podem ser citadas o uso de fungicidas protetores à base de óxido cuproso e os sistêmicos (tebuconazole), a utilização de material genético parcialmente resistente, a realização de podas fitossanitárias e a utilização de um produto à base de *Trichoderma* sp, o TRICOVAB® (CEPLAC/CEPEC, Itabuna-BA). Entretanto, até o momento nenhuma medida tem apresentado total eficiência, devido à alta variabilidade genética que o fungo apresenta e ao agroecossistema altamente propício à ocorrência da doença na região do Sul da Bahia.

Deste modo, uma nova tendência a ser utilizada no contexto do manejo integrado da doença é a utilização da Resistência Sistêmica Adquirida (SAR), que pode ser elicitada por agentes bióticos e ou abióticos, os quais disparam os mecanismos de defesa da planta contra o ataque de patógenos. A indução de resistência tem sido reconhecida a mais de 30 anos; no entanto, somente a partir da década de 60 é que a resistência induzida tornou-se alvo de uma análise mais detalhada, principalmente após os trabalhos desenvolvidos por Ross (1961), nos quais foram utilizadas plantas de fumo pré-inoculadas com o vírus do mosaico do fumo. Este experimento resultou numa proteção posterior a diversos outros vírus, passando a ser designado de SAR - systemic acquired resistance.

Recentemente, alguns compostos de natureza sintética têm sido utilizados como indutores para ativação de genes de defesa. Dentre estes

compostos, uma molécula foi desenvolvida, o Acibenzolar-S-metil (ASM[®], Syngenta Proteção de Cultivos, São Paulo, SP), que tem como características, não apresentar fitotoxidez e ser um potente indutor de resistência, ativando o processo de sinalização e induzindo a expressão de SAR.

Este composto já vem sendo utilizado em diversos países da Europa, no controle de diferentes doenças, como o oídio do trigo, causado pelo fungo *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*, com uma redução de 35% nos sintomas da doença (Görlach et al., 1996). No Brasil, existem trabalhos utilizando o ASM[®] com resultados bastante promissores, como, por exemplo, em cacaueteiro contra *C. pernicioso* e *Verticillium dahliae*. Na interação cacaueteiro x *C. pernicioso*, foi observada uma eficiência de 33 a 84% proteção após aplicação do BTH em mudas de cultivares suscetíveis, dependendo principalmente da época de aplicação (Resende et al., 2000). Já na interação cacaueteiro x *V. dahliae*, a proteção em mudas de cacaueteiro, cv. Theobahia, foi de 55,4% quando se fez a aplicação de 20 g de acibenzolar S-metil/ 100 L de água, 15 dias antes da inoculação (Cavalcanti, 2000).

Entretanto, para que a proteção obtida com o indutor seja eficiente e atue de forma local ou sistêmica, é necessário que o intervalo de tempo entre a aplicação do elicitador (tratamento indutor) e a inoculação do patógeno (tratamento desafiador) seja previamente determinado, para a realização do processo de sinalização e a conseqüente ativação de genes de defesa da planta (Pascholati & Leite, 1995).

O acibenzolar S-metil pode ser empregado isoladamente ou em misturas com fungicidas (Uknes et al., 1996). Portanto, a possibilidade de indução de resistência ao patógeno antes de sua inoculação e penetração certamente aumentará a eficácia de fungicidas quando aplicados numa lavoura. Outro aspecto importante dentro do manejo de uma doença é a possibilidade de utilização de outras substâncias, que podem ser utilizadas isoladamente ou em

conjunto. Sendo assim, o desempenho de um elicitor de resistência certamente pode ser melhorado ou estabilizado, se associado a outros indutores de resistência, ou mesmo a micronutrientes que podem funcionar como cofatores de várias enzimas envolvidas na síntese de compostos fenólicos ou terpenóides, comprovadamente importantes substâncias de defesa do cacauero (Aguilar & Resende, 2000).

De modo geral, este trabalho objetivou testar métodos alternativos ao manejo integrado da vassoura-de-bruxa do cacauero, com a disponibilização de produtos menos tóxicos ao homem e meio ambiente e compatíveis com outras metodologias já empregadas. Os objetivos específicos foram:

- Otimizar dosagens e épocas de aplicação do acibenzolar S-metil em plântulas de cacau, tentando diminuir a dosagem a ser recomendada e/ou aumentar o intervalo de aplicação.
- Testar o acibenzolar S-metil associado a micronutrientes, especialmente à um composto à base de ácido fosforoso, o qual transloca-se pelo floema e aparentemente induz a síntese de fitoalexinas em plântulas de cacau.
- Comparar a eficiência do acibenzolar S- metil puro e em misturas com fungicidas com potencial para o controle da vassoura-de-bruxa em plântulas de cacau.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo e em casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras-MG.

4.1 Material vegetal

Foram utilizadas mudas de cacau da cv. SIC-23, suscetível à vassoura-de-bruxa, com 40 dias de idade, cultivadas em sacos plásticos contendo mistura de terra, areia e esterco bovino na proporção de 2:1:1, respectivamente. As mudas permaneceram em casa-de-vegetação à temperatura de 25^oC com UR em torno de 80%, controladas por um sistema automatizado de nebulização.

4.2 Produção de inóculo e inoculação das mudas

Basidiocarpos de *C. pernicioso* foram obtidos de vassouras secas infectadas colocadas em vassoureiro (câmara úmida indutora de formação de basidiocarpos) localizado no DFP-UFLA ou em meio artificial à base de farelo-vermiculita, de acordo com a metodologia de Griffith et al., (1993), modificada por Niella et al., (1999). Os basidiósporos obtidos foram armazenados em ultra-freezer a - 80^o C, de acordo com a metodologia descrita por Frias et al., (1995), modificada por Resende et al., (1998). A porcentagem de germinação dos basidiósporos foi determinada antes da armazenagem e antes da inoculação, em lâminas escavadas de 3 cavidades. As lâminas, contendo a suspensão de basidiósporos, foram mantidas em câmara úmida por 24 horas, quando os esporos tiveram o crescimento paralisado pelo corante azul de lactofenol (Hawksworth et al., 1995). Foi então determinada a porcentagem de esporos germinados, amostrando-se ao acaso 200 basidiósporos/ cavidade.

As inoculações foram realizadas no final da tarde, e a seguir as mudas foram mantida sob umidade relativa do ar próxima da saturação (100%), após o corte de 1/3 do tamanho de cada folha para acelerar o crescimento apical. Foi utilizada uma suspensão na concentração de $1,75 \times 10^5$ basidiósporos/mL. A inoculação consistiu da deposição de uma gota ($\pm 30 \mu\text{L}$) da suspensão de basidiósporos na gema apical de cada muda. Após as inoculações, as mudas permaneceram por 48 horas a temperaturas em torno de 25°C e umidade relativa do ar de aproximadamente 90 a 100%, mantida por um sistema automatizado de nebulização.

4.3 Otimização de doses e épocas de aplicação do Acibenzolar S-metil (ASM) em mudas de cacau.

Resende et al. (2000) testaram doses de ASM maiores ou iguais a 0,2 mg i.a./ mL e intervalos entre o tratamento indutor e o desafiador menores ou iguais a 30 dias, visando diminuir a dosagem de ASM a ser recomendada e/ou aumentar o intervalo de aplicação. O ASM foi pulverizado aos 60, 30 e 15 dias antes da inoculação em mudas de cacau, clone SIC 23, com 30 dias de idade, em três dosagens, 0,05; 0,1 e 0,2 mg i.a./ mL de água. Foram incluídos como tratamentos- controle uma testemunha absoluta (sem aplicação de ASM e sem inoculação), uma testemunha positiva (somente inoculada) e uma testemunha só com ASM. O inóculo utilizado foi proveniente do município de Itamarajú, BA.

As avaliações foram realizadas aos 30, 45 e 60 dias após as inoculações, utilizando-se a variável índice de doença. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados em arranjo fatorial com nove tratamentos, três épocas de aplicação x três doses de ASM, mais os tratamentos adicionais, T_{ABS} . (Testemunha absoluta), T_{CP} (Testemunha positiva, inoculada com *C. pernicioso*) e T_{ASM} (Testemunha somente com o ASM). Cada tratamento foi constituído de quatro repetições com 11 plantas cada. Os dados obtidos foram

submetidos à análise de variância e teste de média (Tukey 5%) utilizando o software estatístico SISVAR 4.3 (versão UFLA, 1999).

4.4 Efeito *in vivo* do ASM e de micronutrientes foliares na indução de resistência em mudas de cacau a *Crinipellis pernicioso*.

O ASM foi aplicado via pulverização foliar em mudas de cacau, clone SIC-23, com 60 dias de idade, na dosagem de 0,2 mg i.a/ mL de água, trinta dias antes da inoculação. Os produtos à base de micronutrientes Axcell[®], Hortifós PK e Growmaster Mn[®] (14% Mn, produzido pela Intercuf) foram pulverizados 15 dias antes da inoculação, nas dosagens de 1250 µL; 1000 µL e 1000 µL do produto por mL de água, respectivamente. Foram também testadas combinações de ASM com os micronutrientes, sendo as respectivas concentrações reduzidas a metade.

As avaliações foram realizadas aos 25, 35 e 45 dias após as inoculações, utilizando a mesma metodologia descrita no item 4.3. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados em arranjo fatorial com sete tratamentos, quatro produtos e três combinações destes, mais seis tratamentos adicionais, T_{ABS} (Testemunha absoluta), T_{Cp} (Testemunha positiva) e T_{ASM}, T_{ASM + Hortifós PK}, T_{ASM + Axcell}, T_{ASM + Growmaster Mn}, constituídos de 04 repetições com 15 plantas cada. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de médias utilizando o software estatístico SISVAR 4.3.

4.5 Efeito do ASM puro e em misturas com fungicidas na proteção contra *Crinipellis pernicioso*

O ASM e os fungicidas, com suas respectivas dosagens (Tabela 1), foram aplicados via pulverização foliar 15 dias antes da inoculação em mudas de cacau do clone suscetível SIC-23. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com nove tratamentos, sendo quatro produtos e três

combinações do ASM[®] com os fungicidas e duas testemunhas, absoluta e inoculada, com três repetições de 12 plantas cada. As avaliações foram realizadas aos 30, 45 e 60 dias após as inoculações, utilizando a mesma metodologia descrita no item 4.3. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de média utilizando o software estatístico SISVAR 4.3.

TABELA 1 Produtos químicos utilizados para a proteção contra *Crinipellis pernicioso* em mudas de cacau, clone SIC-23

Nome Técnico	Nome Comercial	Dosagem do i.a.
Acibenzolar S- metil	ASM [®] 50 WG [®]	0,2 mg/ mL
Azoxystrobin	Amistar 500 WG [®]	0,2 mg/mL
Óxido cuproso	Cobre Sandoz BR [®]	9 mg/mL
Chlorotalonil	Bravonil Ultrex [®]	1,5 mg/ mL
ASM [®] + Azoxystrobin		0,1 mg/mL + 0,1 mg/mL
ASM [®] + Chlorotalonil		0,1 mg/mL + 0,75 mg/mL
ASM [®] + Ox. Cuproso		0,1 mg/mL+ 4,5 mg/mL

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização de doses e épocas de aplicação do Acibenzolar S-metil (ASM) em mudas de cacau.

Não houve diferença significativa entre as doses de ASM utilizadas, as quais promoveram uma redução média de 23% em relação à testemunha inoculada. Quanto ao efeito da época de aplicação do ASM®, a melhor proteção ocorreu no período de 30 dias antes da inoculação, com uma proteção de 45,15% nas mudas de cacau em relação à testemunha positiva. Com os dados do fatorial dose x época, foi possível obter a dosagem de 0,2 mg i.a./ mL aos 30 dias antes da inoculação, como a melhor combinação (Figura 1, Tabela 2A).

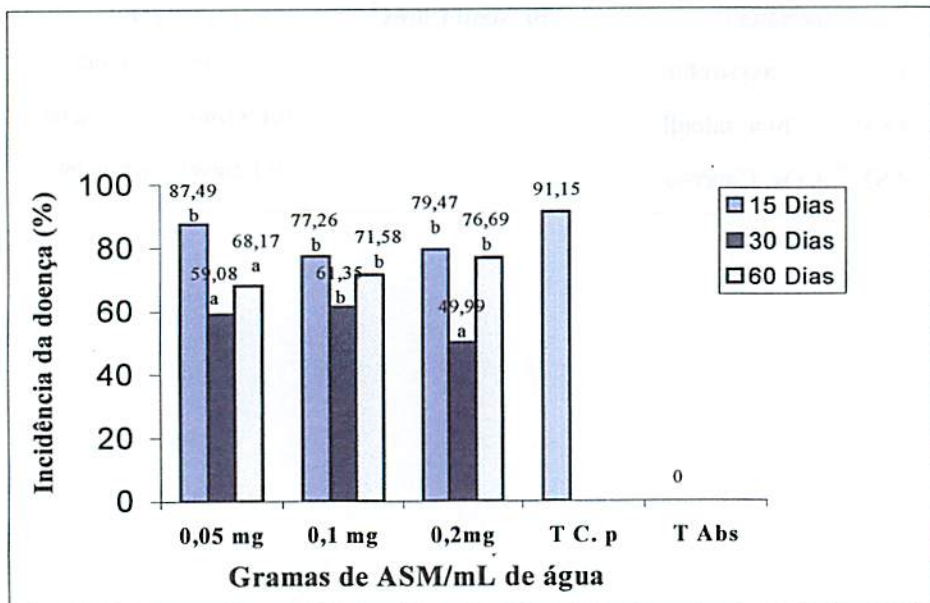


FIGURA 1 Incidência da doença na interação dose x época de aplicação do ASM® em mudas de cacau do clone SIC-23, 60 dias após inoculação com *C. pernicioso*. Dados são médias de quatro repetições e médias seguidas de letras iguais não diferem entre si dentro de cada dosagem pelo teste de Tukey a 5%.

O período de aplicação do indutor não pode ser muito curto ou muito extenso, como nos tratamentos utilizando os intervalos de 15 ou 60 dias entre a aplicação do produto e a inoculação do patógeno. Aparentemente, a resposta de defesa ainda não havia sido totalmente ativada com 15 dias, e com 60 dias, o ASM[®] não mais estava disponível na quantidade certa para ativar essa resposta. Resende et al., (2000) também observaram uma maior eficiência do produto, quando aplicado 30 dias antes da inoculação.

Segundo Pascholati & Leite (1995), a proteção obtida utilizando um produto indutor como tratamento inicial na resistência induzida só terá sucesso se houver um intervalo de tempo adequado para que a planta reconheça e transmita sinais no âmbito celular, ativando seus mecanismos de defesa. Sugere-se que também seja testado o intervalo de 45 dias em experimentos vindouros.

Estes resultados corroboram os obtidos por Resende et al., (2000), no que se refere à época de aplicação, em relação à eficiência do produto em induzir resistência em mudas de cacau sob condições controladas, indicando a necessidade específica que cada cultura tem de ter um determinado período de tempo para que seja possível ativar os seus mecanismos de defesa (Uknes et al., 1999).

5.2 Efeito *in vivo* do ASM e de micronutrientes foliares na indução de resistência em mudas de cacau a *Crinipellis pernicios*.

Para os dados obtidos 45 dias após a inoculação (Figura 2, Tabela 3A), observou-se que o efeito dos tratamentos sobre as mudas de cacau com a aplicação do ASM[®] isolado e em mistura com os micronutrientes apresentaram diferenças significativas. No tratamento com ASM[®] aplicado isoladamente, verificou-se o maior efeito protetor sobre as mudas de cacau com uma redução na incidência da doença de 49,06% aos 45 dias após a inoculação, diferindo significativamente de todos os outros tratamentos, exceto do tratamento ASM +

distinção significativa entre os produtos em relação à testemunha positiva (Tukey 5%). Os dados indicam o efeito protetor do fungicida azoxystrobin com o menor valor para índice de doença, de 19,44%, quando avaliado 60 dias após a inoculação. Os fungicidas azoxystrobin, o óxido cuproso e a combinação ASM + azoxystrobin apresentaram-se como os mais eficientes, reduzindo a doença em 86,6, 84,7 e 82,8%, respectivamente, diferindo estatisticamente do tratamento com ASM sozinho. O ASM isoladamente não apresentou resultados positivos neste experimento, provavelmente devido ao fato de que foi aplicado nas mudas 15 dias antes da inoculação, indicando que não houve tempo suficiente para que o mesmo atuasse como indutor de resistência. Contudo, quando esteve associado aos outros fungicidas, apresentou resultados satisfatórios

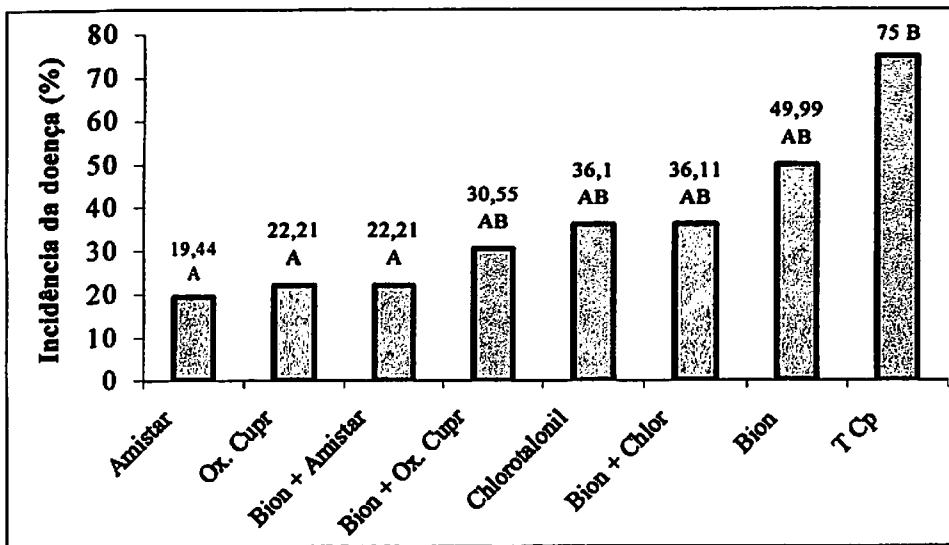


FIGURA 3 Efeito do ASM e dos fungicidas sobre a incidência da doença em mudas de cacau do clone SIC-23, 60 dias após a inoculação. Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de 5% Tukey).

Resultados semelhantes foram encontrados por Nojosa (1999), que considerou o óxido cuproso um produto altamente eficiente no controle da vassoura-de-bruxa em condições de casa-de-vegetação. Os dados obtidos com a aplicação do fungicida azoxystrobin na proteção contra a vassoura-de-bruxa mostram que o mesmo destacou-se dos demais, sendo seguido do óxido cuproso e da combinação ASM + azoxystrobin. Vale ressaltar que o fato de o ASM não ter apresentado resultados expressivos na proteção a doença provavelmente foi devido ao tempo de aplicação do mesmo, de apenas 15 dias antes da inoculação como os demais. Deste modo, é interessante que se façam novos testes comparativos para confirmar a eficiência da época de 30 dias antes da inoculação.

6 CONCLUSÕES

1. O ASM apresentou o melhor efeito protetor em mudas de cacauero contra *Crinipellis perniciosa* quando utilizado na dosagem de 0,2 mg i.a/mL aos 30 dias antes da inoculação.
2. Os micronutrientes Hortifós PK, Axcell e Growmaster Mn não apresentaram efeito protetor sobre mudas de cacau inoculadas com *C. perniciosa*.
3. Os fungicidas azoxystrobin, óxido cuproso e a combinação ASM + azoxystrobin, apresentaram os melhores resultados na proteção de mudas de cacauero do clone SIC-23 à *C. perniciosa*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CAVALCANTI, L. S.; RESENDE, M. L. V. Efeito da época de aplicação e dosagem de benzotiadiazole na indução de resistência a *Verticillium dahliae* em plântulas de cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 458, 2000. Suplemento.

EDGINTON, L.V.; KHEN, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, St. Paul, v. 61, n. 1, p. 42-44, Jan. 1971.

ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. Chemical control. In: ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. **Phytophthora diseases worldwide**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1996. p. 211-237.

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

FURTADO, D. F. (Ed.). **SISVAR**. Programa para análise estatística. versão 4.3. Lavras: UFLA, 1999.

GÖRLACH, J.; VOLRATH, S.; KANAUF-BEITER, G. et al. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance activates gene expression and disease reduction in wheat. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 4, p. 629-643, Apr. 1996.

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis pernicioso* using a bran-vermiculite medium. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 99, n. 4, p. 227-230, 1993.

NAKAYAMA, L. H. I.; ANDERBRHAN, T.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Indução de resistência em *Theobroma cacao* ao *Crinipellis pernicioso*, agente causador da vassoura-de-bruxa, através de fertilizantes e ácido salicílico. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS – FertBio, 23., 1998, Caxambu, MG. Resumos... Lavras: UFLA/SBCS/SBM, 1998. p. 527.

NIELLA, G. R.; RESENDE, M. L. V.; CASTRO, H. A., CARVALHO, G. A.; SILVA, L. H. C. P. Aperfeiçoamento da metodologia de produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 24, n. 4, p. 523-527, dez. 1999.

NOJOSA, G. B. A. Participação de fenóis e enzimas oxidativas nos mecanismos bioquímicos de resistência constitutiva e induzida do cacauero (*Theobroma cacao* L.) à *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. 1999. 85 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília. DF.

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, p. 417-53.

RESENDE, M. L. V. Bases Bioquímicas e fisiológicas da resistência a doenças In: *Melhoramento genético do cacauero*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001.

RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; SILVA, L. H. C. P.; AGUILAR, M. A. G.; NIELLA, G. R.; CARVALHO, G. A.; GIOVANINI, G. R.; CASTRO, R. M. Perspectivas da indução de resistência em cacauero contra *Crinipellis pernicioso* através do benzothiadiazole (BTH). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 25, n. 2, p. 149-156, jun. 2000.

UKNES, S.; VERNOOIJ, B.; MORRIS, S.; CHANDLER, D. et al. Reduction of risk for growers: methods for the development of disease-resistant crops. *New Phytologist*, Cambridge, v. 133, n. 1, p.3-10, May 1996.

CAPÍTULO 4

PERFIL ELETROFORÉTICO E ATIVIDADE DA ENZIMA PEROXIDASE EM TECIDOS DE *Theobroma cacao* L.

1 RESUMO

PEREZ, Jane Oliveira. Perfil eletroforético e atividade da enzima peroxidase em tecidos de *Theobroma cacao* L. 2002. 81p. Tese (Doutorado - em Agronomia - Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*

O conhecimento das alterações fisiológicas induzidas por patógenos e por indutores de resistência, como o ASM, é de fundamental importância para a determinação dos processos bioquímicos que estão envolvidos nos mecanismos de defesa das plantas. Os objetivos do trabalho foram identificar possíveis alterações na atividade da enzima peroxidase em mudas de cacau resistente (*Theobahia*) e suscetível (SIAL 169 e SIC-23) à vassoura-de-bruxa, após pulverização com ASM. O perfil eletroforético da enzima peroxidase foi avaliado em gel de poliacrilamida aos 3, 7, 15 e 30 dias após a aplicação do produto. O substrato usado para peroxidase foi σ -dianisidina na presença de H_2O_2 . Verificou-se que a maior intensidade enzimática foi observada no clone SIAL-169, tratadas ou não com ASM, 3 dias após pulverização. Esta intensidade, manteve-se inalterada até o sétimo dia da aplicação, ocorrendo uma queda na atividade a partir do 15^o dia, até desaparecer aos 30 dias. Para as mudas do clone *Theobahia*, a maior intensidade ocorreu a partir do sétimo dia, para as mudas tratadas com o indutor, a maior intensidade ocorreu aos 30 dias. No experimento utilizando o clone SIC-23, a maior intensidade de coloração da banda ocorreu nas mudas que receberam aplicação do ASM e depois foram inoculadas em todas as épocas. Já para a atividade enzimática de peroxidase, verificou-se que o pico da enzima na cv. *Theobahia* ocorreu aos 30 dias após o tratamento com ASM. Para a cv. SIC-23, pico da enzima ocorreu aos 15 dias após o tratamento com ASM e depois foram inoculadas.

* Comitê Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Orientador), Dulcinéia de Carvalho - UFLA, Maria das Graças Claret de Sousa - CPAA-EMBRAPA, Ludwig Heinrich Pfenning – UFLA.

2 ABSTRACT

PEREZ, Jane Oliveira. Eletroforetic profile and activity of isozymes peroxidases in the tissues of *Theobroma cacao* L. 2002. 81p. Thesis (Doctorate - Agronomy - Phytopathology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG*

The knowledge of physiological changes induced by pathogens and by inducers of resistance like ASM is basic for determination of biochemical processes involved in defense mechanisms of plants against pathogens. The objectives of this work were to identify possible changes in peroxidase activity of cocoa seedlings resistant (*Theobahia*) and susceptible (SIAL-169 and SIC-23) to witches' broom disease, sprayed or not with ASM. The eletrophoretic profile of peroxidase was evaluated in polyacrilamide gel, 3, 7, 15 and 30 days after sprayings. The substract used for peroxidase was σ -dianisidina in the presence of H_2O_2 . It was observed great enzymatic intensity in seedlings of SIAL-169, treated or not with ASM, 3 days after ASM spraying. This intense activity remained until 7 days after spraying, dropping at 15 days and disappearing 30 days after application of ASM. For *Theobahia* seedlings, the beginning of enzyme intensity occurred 7 days after spraying, peaking at 30 days. In the case of SIC 23, the great intensity was observed, at all times assessed, in seedlings sprayed with ASM and inoculated with *C. pernicioso*. The peak of peroxidase activity in cv. *Theobahia* occurred 30 days after the treatment with ASM. In the case of SIC 23, The peak of peroxidase activity occurred 15 days after the treatment with ASM and inoculated with *C. pernicioso*.

Guidance Committee: Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Major Professor), Dulcinéia de Carvalho - UFLA, Maria das Graças Claret de Sousa - CPAA-EMBRAPA, Ludwig Heinrich Pfenning - UFLA.

3 INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre os mecanismos de resistência envolvidos no patossistema cacau x *C. pernicioso* é fundamental na implantação de um sistema de manejo integrado da doença, auxiliando de forma significativa nos estudos de melhoramento e na obtenção de novas fontes de resistência à vassoura-de-bruxa. Sendo assim, é importante que se conheçam as alterações fisiológicas induzidas pelo patógeno após a sua infecção nos tecidos do cacauzeiro e por substâncias indutoras de proteção, como o Acibenzolar s-metil (ASM). A proteção induzida envolve um sistema de vigilância do hospedeiro, que reconhece de alguma forma o contato estabelecido com o patógeno, seguido pela transdução de sinais alertando sobre a presença do patógeno e, por fim, envolve a expressão de genes relacionados a defesa (Lamb et al., 1989).

A eficácia de produtos alternativos na proteção de plantas tem crescido significativamente após a descoberta de indutores de resistência de origem biótica e/ou abiótica, que levam a uma indução localizada ou sistêmica em plantas suscetíveis. Dentre estes compostos, o benzo 1,2,3 thiazol-7-carbottióico acido-S-metil ester (BTH) ou acibenzolar-S-metil (ASM) já têm sido relatados em uma ampla gama de patossistemas (Cohen et al., 1999; Siegrist et al., 2000; Ziadi et al., 2001).

A natureza sistêmica do BTH foi evidenciada em trabalhos com ervilha, nos quais o tratamento na primeira folha expandida de plântulas com Bion[®] e 7 a 14 dias, inoculadas com *Mycosphaerella pinodes*, proporcionou um decréscimo significativo na suscetibilidade das plantas, ocorrendo um aumento no nível das atividades enzimáticas para β -1,3 glucanase e quitinase. Outros trabalhos também demonstraram a eficiência do Bion[®] na indução de resistência, com aumento expressivo nos níveis de enzimas chaves envolvidas nas respostas de defesa (Siegrist et al., 1994; Ishii et al., 1999; Dann & Deverall, 2000). Várias

enzimas estão envolvidas na defesa de plantas contra patógenos, como quitinases, glucanases, fenilalanina-amônia-liases e peroxidases (Bowles, 1990; Shewry & Lucas, 1997). Observa-se que a atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo fenólico foi sempre maior em plântulas tratadas com BTH em relação às não tratadas, o que sugere uma provável participação de fenólicos complexos, como a lignina, no processo de defesa, sendo esta característica também evidenciada em outras interações (Dann & Deverall, 2000; Cavalcanti, 2000). As peroxidases, enzimas capazes de oxidar compostos fenólicos na presença de H_2O_2 , estão envolvidas em vários processos fisiológicos (Siegel, 1993), mas estruturalmente são as peroxidases aniônicas que parecem atuar na biossíntese de lignina e de suberina, devido à sua afinidade por álcoois coniferis, à sua localização na parede celular e à expressão em tecidos lignificados. Contudo, peroxidases catiônicas também se ligam a álcoois coniferis e em fumo, plantas deficientes em peroxidases aniônicas não demonstraram redução no teor de lignina (Baucher et al., 1998). Alguns genes e cDNAs codificando peroxidases já foram associados com a lignificação (Baucher et al., 1998). Muitas das enzimas do tipo peroxidase podem ser expressas diferencialmente sob certas condições de estresses, ataque de patógenos ou por indução de proteção.

Assim, este trabalho objetivou identificar possíveis alterações em mudas de cacau tratadas com ASM mediante perfil eletroforético e atividade da enzima peroxidase e em dois materiais genéticos, tolerante e suscetível à vassoura-de-bruxa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, em casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia e no Laboratório de Melhoramento Florestal do Departamento de Engenharia Florestal da UFLA, Lavras-MG.

4.1 Preparo do material vegetal, aplicação do ASM e inoculação

Foram utilizadas mudas de cacau dos clones suscetível (SIC-23 e SIAL-169) e o clone resistente (Theobahia). As sementes foram cultivadas em sacos de polietileno, contendo 2 Kg de uma mistura de terra, areia e esterco bovino na proporção de 2:1:1, respectivamente. As mudas permaneceram sob condições de casa-de-vegetação à temperatura de 25°C, com umidade relativa UR em torno de 80%, controlada por um sistema automatizado de nebulização.

Os basidiocarpos de *C. pernicioso* foram obtidos de vassouras secas infectadas colocadas em vassoureiro (câmara úmida indutora de formação de basidiocarpos) localizado no DFP-UFLA e por meio artificial à base de farelo-vermiculita, de acordo com a metodologia de Griffith et al. (1993), modificado por Niella et al. (1999). Os basidiósporos obtidos foram armazenados em ultra freezer - 80°C, de acordo com a metodologia descrita por Frias et al. (1995). A porcentagem de germinação dos basidiósporos foi determinada antes e após a armazenagem, e também antes da inoculação, em lâminas escavadas de 3 cavidades. As lâminas contendo a suspensão de basidiósporos foram mantidas em câmara úmida por 24 horas, quando os esporos tiveram o crescimento paralisado pelo corante azul de lactofenol, depois foi determinada a porcentagem de esporos germinados, amostrando-se ao acaso 200 basidiósporos/ cavidade.

As inoculações foram realizadas no final da tarde, e a seguir as mudas foram mantidas sob umidade relativa do ar próxima da saturação (100%), após o

corte de 1/3 do tamanho de cada folha para acelerar o crescimento apical. A inoculação consistiu da deposição de uma gota ($\pm 30 \mu\text{L}$) da suspensão, acrescida de 0,2% de ágar-água na concentração de $1,75 \times 10^5$ basidiósporos/mL sobre a gema apical de cada muda. Após as inoculações, as mudas permaneceram por 48 horas a temperatura em torno de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de aproximadamente 90 a 100%, mantida por um sistema automatizado de nebulização.

4.2 Perfil eletroforético e determinação da atividade de peroxidase induzida por Acibenzolar S-metil (ASM) em diferentes cultivares de cacau.

Foram utilizadas mudas de dois materiais genéticos de cacau, o clone SIAL-169 suscetível e o clone Theobahia resistente à vassoura-de-bruxa com 60 dias de idade. O ensaio foi mantido em casa-de vegetação, sendo as mudas dos dois materiais genéticos pulverizadas com ASM na dosagem de 0,2 mg i.a/mL e as mudas do tratamento testemunha pulverizadas apenas com água destilada. O delineamento foi blocos ao acaso, com quatro repetições de seis mudas cada. Amostras do primeiro par de folhas, localizadas abaixo do ápice, foram coletadas com 3, 7, 15 e 30 dias após a pulverização do produto. As folhas foram coletadas diretamente na casa-de-vegetação e armazenadas em ultra-frezer a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Para a obtenção do extrato enzimático, misturaram-se 2 mL do tampão de extração, solução nº 1 (Alfenas et al., 1998), com 0,2 g dos tecidos foliares, macerados individualmente com auxílio de um pistilo e nitrogênio líquido, em almofariz de porcelana mantido em banho de gelo para não ocorrer a desnaturação das proteínas. Após a maceração, as amostras foram centrifugadas a 4°C , 12.500 rpm por 10 minutos. Posteriormente à centrifugação, o sobrenadante foi coletado e armazenado em ultra-freezer a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento das análises.


Para análise eletroforética, foi utilizado gel de poliacrilamida a 12,5% (AA/BIS acrilamida e bis-acrilamida - 30% T, 2,6% C). Os extratos de cada amostra foram colocados com auxílio de micropipetas, empregando-se 30 μ l em cada cavidade do gel. A corrida eletroforética foi realizada a 4°C, mantendo-se a corrente constante a 10 mA. A migração ocorreu por três horas e meia. O padrão eletroforético de peroxidase (PO) foi determinado de acordo com a metodologia de Brune et al.,(1998), utilizando σ -dianisidina e H₂O₂ como substrato para peroxidase.

A atividade de peroxidase foi quantificada através da medida da absorbância da reação de oxidação do guaiacol, conforme metodologia descrita por Cortelazzo, Marais e Joseleau (1996), modificada. A mistura da reação consistiu de 40 mM de guaiacol e 20 mM de peróxido de hidrogênio em 40 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 6,7. Foram adicionados à mistura 100 μ L da amostra diluída, resultando em um volume total de 2,5 mL.

As reações ocorreram em temperatura ambiente, em torno de 21 °C. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Beckmam DU 640B a 420 nm, durante 02 minutos para peroxidase com acompanhamento em intervalos de 05 segundos, sendo os valores expressos em mudança na absorbância por grama de matéria fresca de amostra por minuto.

4.3 Perfil eletroforético e determinação da atividade de peroxidase induzida por Acibenzolar S-metil (ASM) na interação *Crinipellis pernicioso* x *Theobroma cacao*

O ASM foi pulverizado em mudas de cacaueteiro do clone SIC-23 suscetível à vassoura-de-bruxa na dosagem de 0,2 mg/mL, aos trinta dias antes da inoculação. Os tratamentos utilizados foram: ASM + *C. pernicioso* (T_{ASM + C.p}) e somente ASM (T_{ASM}). A testemunha absoluta (T_{ABS}) pulverizada com água destilada e a testemunha inoculada somente com o fungo (T_{ASM + C.P}). O



delineamento foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições, constituídas de 5 plantas cada. Amostras do primeiro par de folhas, localizadas abaixo do ápice, foram coletadas com 3, 7 e 15 dias após a inoculação com *C. pernicioso*. A metodologia de inoculação, coleta das amostras, obtenção do extrato protéico e análise eletroforética foram semelhantes aos descritos nos itens 4.1 e 4.2. A atividade de peroxidases foi quantificada através da medida da absorbância da reação de oxidação do guaiacol, conforme metodologia descrita por Cortelazzo, Marais e Joseleau (1996), modificada, como descrito no item 4.2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil eletroforético e determinação da atividade de peroxidase induzida por Acibenzolar S-metil (ASM) em diferentes cultivares de cacau.

Observou-se uma diferença no perfil eletroforético de peroxidase (PO) quanto à intensidade da enzima para as quatro épocas de avaliação (Figura 1). Inicialmente verificou-se um aumento no perfil da PO para os tratamentos $T_{\text{SIAL}} + \text{ASM}$ e T_{SIAL} , no intervalo de 3 dias após a aplicação do produto. Para os tratamentos $T_{\text{THEO}} + \text{ASM}$ e T_{THEO} , não foram observadas diferenças quanto à intensidade de cor que pudessem distinguir os tratamentos. Contudo, quando se observou o perfil eletroforético das amostras coletadas aos 7 dias após a pulverização com ASM, verificou-se que nos tratamentos $T_{\text{SIAL}} + \text{ASM}$ e $T_{\text{THEO}} + \text{ASM}$, houve um aumento da intensidade das bandas. Quanto aos tratamentos sem aplicação do ASM nos dois clones, observou-se que o perfil eletroforético permaneceu inalterado.

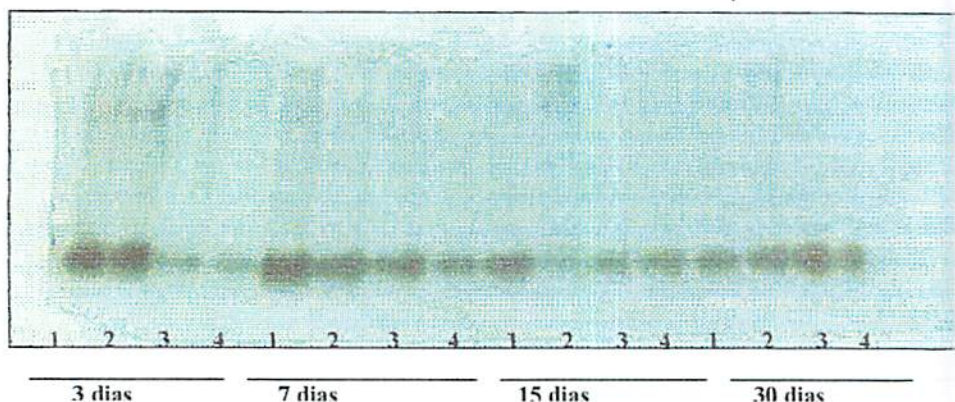


FIGURA 1 Perfil eletroforético da enzima peroxidase em mudas de cacau após indução por Acibenzolar s-metil, avaliadas aos 3, 7, 15 e 30 dias após a inoculação com *Crinipellis pernicioso*. Tratamentos: 1= $T_{\text{SIAL}} + \text{ASM}$; 2= T_{SIAL} ; 3= $T_{\text{THEO}} + \text{ASM}$; 4= T_{THEO} .

Na terceira época de coleta, quinze dias após o tratamento indutor, observou-se, que no tratamento T_{SIAL} , houve uma diminuição gradativa do perfil. Estes resultados podem indicar a natureza sistêmica do produto e a necessidade de tempo que o mesmo precisa para estimular a formação, na planta, de processos de resistência induzida. Estas diferenças no perfil eletroforético da enzima peroxidase para os diferentes genótipos, resistente e susceptível, já foram evidenciadas em outros patossistemas (Reuveni et al., 1992). Outra hipótese a respeito das diferenças entre os materiais, como se observa no tratamento T_{SIAL} , de é que alguns conteúdos protéicos podem variar sob diferentes condições de crescimento, podendo ou não alterar o perfil protéico da amostra. Estas alterações podem provocar um desbalanço nos conteúdos protéicos devido a oxidação de auxinas, principalmente o ácido indol acético - IAA, por certos tipos de peroxidases. Este processo de oxidação provavelmente está envolvido no desenvolvimento de sintomas da vassoura-de-bruxa (Ockerse et al., 1966).

Através da leitura da absorvância a 420 nm, em espectrofotômetro, verificou-se maior atividade de peroxidase nas plantas do clone Theobahia, no período de 3 dias, após aplicação do produto para os tratamentos $T_{THEO+ASM}$ e T_{THEO} , em comparação com as plantas dos tratamentos $T_{SIAL+ASM}$ e T_{SIAL} (Figura 2A). Para o intervalo de 7 e 15 dias, verificou-se um aumento gradativo da atividade enzimática para os tratamentos $T_{SIAL+ASM}$, T_{SIAL} e $T_{THEO+ASM}$ quando comparados ao tratamento T_{THEO} (Figura 2B e 2C). Com os resultados obtidos na atividade enzimática de peroxidase para os dois clones nas três primeiras épocas de avaliação, pode-se supor que o complexo de enzimas envolvidas na defesa induzida em *T. cacao* é bastante variável. Mudanças na atividade de peroxidases devido ao efeito do tratamento indutor já foram observadas em outras culturas, como tomate, algodão e melão, entre outras (Smith & Dubery, 1997). Entretanto, uma diferença significativa pôde ser verificada na atividade da enzima nas plantas do clone Theobahia tratadas com ASM, com o seu pico máximo aos 30

dias após aplicação do produto, indicando ser este o período mais propício para que a planta ative as respostas de defesa através da síntese desta enzima (Figura 2D). Estes resultados corroboram os obtidos no teste de otimização para definir qual a melhor época de aplicação do ASM em mudas de cacau; os melhores resultados obtidos na proteção de mudas contra *C. perniciosa* ocorreram 30 dias após a aplicação do produto.

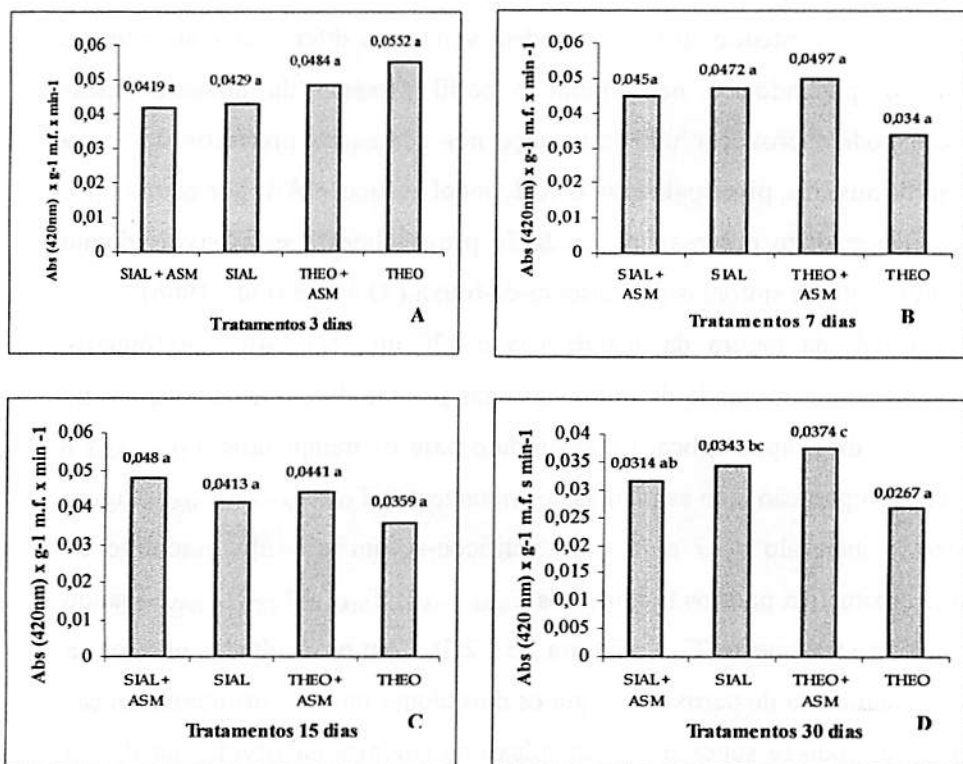


FIGURA 2 Atividade de peroxidases em mudas de cacau dos clones SIAL -169 e Theobahia aos 3, 7, 15 e 30 dias após aplicação do ASM (Letras distintas representam diferenças ao nível de 5% pelo teste de Tukey).

A atividade de peroxidases em cacauero necessita ser melhor estudada, uma vez que os resultados aqui obtidos quanto aos maiores níveis de atividade ocorreram com 30 dias após a indução, diferindo, portanto, do verificado por Nojosa (1999), quando determinou que o período de 15 dias após aplicação do tratamento indutor foi o mais eficiente em induzir maior atividade de peroxidase. Vale salientar que estes resultados nos níveis de atividade podem ser devidos a diferenças nos níveis de suscetibilidade dos clones testados, o que pode interferir na expressão da atividade enzimática.

5.2 Perfil eletroforético e determinação da atividade de peroxidase induzida por Acibenzolar S-metil (ASM) na interação *Crinipellis pernicioso* x *Theobroma cacao*

Observou-se que o padrão da enzima em gel de poliacrilamida foi comum em todos os tratamentos para as três épocas avaliadas, ocorrendo a presença de uma banda única para todos os tratamentos, diferindo apenas quanto à intensidade (Figura 3). Verificou-se, nos tratamentos $T_{ASM + Cp}$ e T_{ASM} , que no intervalo de 3 dias após a inoculação do patógeno houve um aumento no perfil eletroforético da enzima quanto à intensidade das bandas, quando comparados com os tratamentos testemunha (T_{ABS}) e apenas inoculado com *C. pernicioso* (TCp). Para esta época, o perfil indica que o ASM promoveu uma indução na planta, expressa através da intensidade das bandas de isoenzimas de peroxidase, que pode ter sido derivada da ação do patógeno ou da ação do indutor de resistência ASM.

Contudo, nas outras épocas avaliadas, não foi possível verificar diferenças significativas entre os tratamentos, uma vez que todos apresentaram o mesmo padrão de bandas quanto à intensidade. Diferenças na atividade de peroxidases já foram evidenciadas em diversas culturas, tais como melão, tomate

e algodão, entre outras (Reuveni et al., 1992; Smit & Dubery, 1997; Silva et al., 2001).

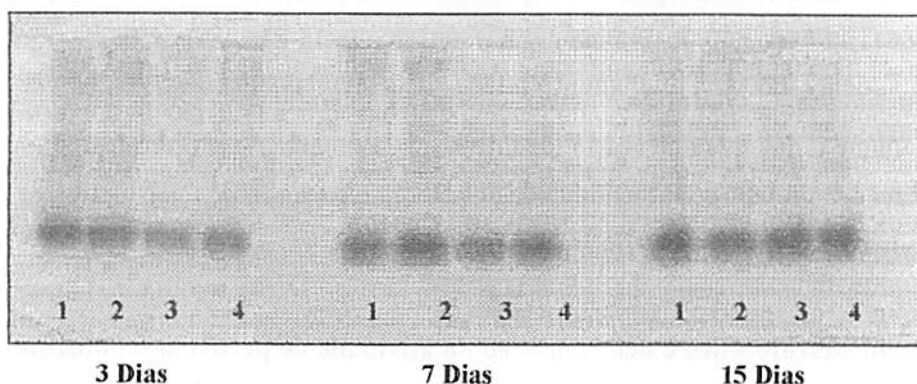


FIGURA 3 Perfil eletroforético para atividade da enzima peroxidase induzida por ASM, em extratos de folhas de cacau do clone SIC-23 suscetível, obtidas aos 3, 7 e 15 dias após a inoculação com *Crinipellis pernicioso*. Tratamentos: 1= T_{ASM+Cp} ; 2= T_{ASM} ; 3= T_{Abs} ; 4= $T C. p.$

Em cacauero, a atividade de peroxidases, já foi observada em plantas resistentes ou que receberam tratamento com algum tipo de elicitor, em diversas interações com *Phytophthora palmivora*, *C. pernicioso* e *Verticillium dahliae* (Okey et al., 1997; Resende et al., 2000; Cavalcanti, 2000). A maior atividade enzimática foi observada no tratamento em que as plantas foram pulverizadas com ASM. Tais alterações também foram verificadas por outros autores, Pritsch et al., (2000) detectaram diversos RNAs transcritos correspondentes a peroxidases e outras proteínas na interação de *Fusarium graminearum* com trigo. Xue et al. (1998) identificaram peroxidases de feijão sendo induzidas por *Rhizoctonia* conjuntamente com glucanases e quitinases.

Em relação à atividade de peroxidases, através da leitura de absorbância a 420 nm observa-se uma maior atividade enzimática aos 3 e 7 dias após a inoculação no tratamento testemunha (T_{Abs}), diferindo estatisticamente dos

demais (Figura 4A e 4B). Este aumento na atividade da enzima no tratamento testemunha, pode ter sido devido a uma alteração no estado fisiológico da planta, através de alterações induzidas naturalmente no metabolismo de auxinas, e a outros reguladores de crescimento. Estas alterações já foram observadas por Siegel (1993) e Nojosa (1999), em tecidos sadios e clones de cacau com diferentes níveis de resistência à vassoura-de-bruxa.

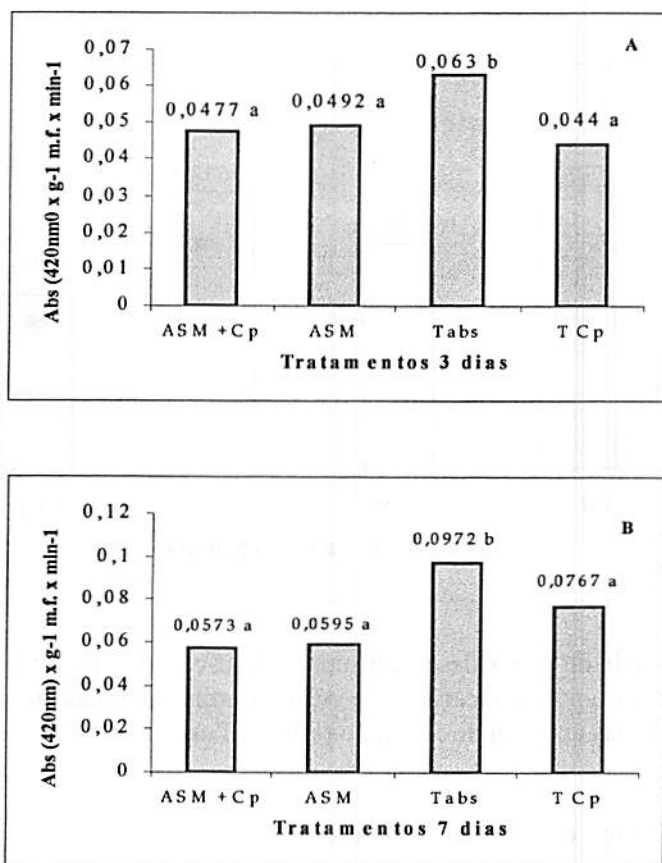


FIGURA 4 Atividade de peroxidase em mudas de cacau do clone SIC-23, (A) 3 dias, (B) 7 dias após aplicação do ASM. (Letras distintas representam diferenças ao nível de 5% pelo teste de Tukey).

Entre as épocas avaliadas para definir qual o melhor intervalo para expressão da atividade enzimática, observaram-se diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 5). No intervalo de 15 dias ocorreu maior atividade da enzima peroxidase nas plantas tratadas com ASM, em relação às plantas que foram inoculadas com *C. pernicioso*. Estes dados estão de acordo com os obtidos por Nojosa (1999) em mudas de cacau da cultivar catongo, que é suscetível à vassoura-de-bruxa.

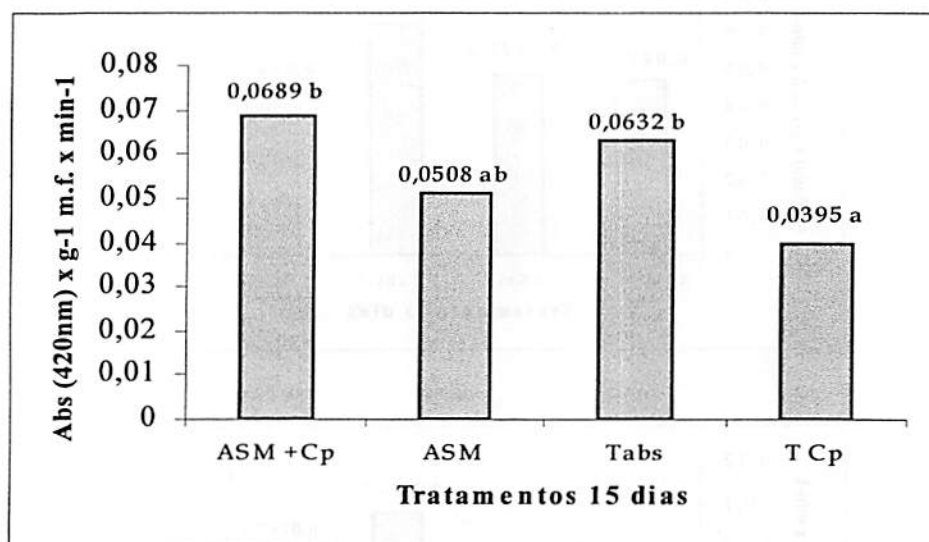


FIGURA 5 Atividade de peroxidases em mudas de cacau do clone SIC-23, aos 15 dias após aplicação do ASM. (Letras distintas representam diferenças ao nível de 5%, pelo teste de Tukey).

As diferenças encontradas quanto ao período de maior atividade enzimática de peroxidase nos diferentes materiais testados podem ser devidas a diferenças genéticas entre os clones ou ao fato de que as plantas dos clones SIAL-169 e Theobahia já estavam num estágio mais adiantado de maturidade fisiológica (60 dias), enquanto as plantas do tratamento com o clone SIC-23

tinham apenas 30 dias de idade. Isto, provavelmente, pode ter alterado a expressão da enzima quando da indução com o ASM. Contudo, os resultados obtidos indicam que a peroxidase tem um papel importante nos diferentes mecanismos fisiológicos de defesa do cacaueteiro a *C. pernicioso*, principalmente quando ocorre a indução através do tratamento com ASM.

6 CONCLUSÕES

- 1. Mudanças de cacauzeiro dos clones SIAL-169 e Theobahia apresentaram perfil eletroforético diferenciado para a enzima peroxidase quando receberam tratamento com o ASM a partir do terceiro dia após a sua aplicação.**
- 2. A maior atividade enzimática de peroxidase verificada nos clones SIAL-169 e Theobahia ocorreu aos 30 dias após a aplicação do ASM.**
- 3. Mudanças do clone SIC-23 tratadas com ASM apresentaram aumento no perfil eletroforético no que se refere à intensidade da banda (cor) para a enzima peroxidase.**
- 4. A maior atividade enzimática de peroxidase para o clone SIC- 23 foi verificada aos 15 dias após o tratamento com ASM.**
- 5. A utilização do indutor de resistência ASM em mudas de cacau, tem um papel importante nos processos de resistência induzida através do aumento da expressão da enzima peroxidase.**

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos.** Viçosa: UFV, 1998. 574 p.
- BAUCHER, M.; MONTIES, B.; Van MONTAGU, M.; BOERJAN, W. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 17, n. 2, p. 125-197, 1998.
- BOWLES, D. J. Defense-related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 59, p. 873-907, 1990.
- BRUNE, W.; ALFENAS, A. C.; JUNGHANS, T.G. Identificação específica de enzimas em géis. In: ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos.** Viçosa: UFV, 1998. p. 201-311.
- CAVALCANTI, L. S. **Indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb. em plântulas de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) cv. Theobahia, por benzotiadiazole (BTH).** 2000. 82 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- DANN, E. K.; DEVERALL, B. J. Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. **Plant Pathology**, Oxford, v. 49, n. 3, p. 324-332, June 2000.
- GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis pernicioso* using a bran-vermiculite medium. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 99, n. 4, p. 227-230, 1993.
- ISHII, H.; TOMITA, Y.; HORIO, T.; NARUSAKA, Y.; NAKAZAWA, Y.; NSHIMURA, K.; IWAMOTO. Induced resistance of acibenzolar-s-methyl (CGA 245704) to cucumber and Japanese pear diseases. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, n. 1, p. 77-85, Jan. 1999.
- LAMB, C. J.; LAWTON, M. A.; DRON, M.; DIXON, R. A. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. **Cell**, Cambridge, v. 56, n. 2, p. 215-224, Jan. 1989.

OCKERSE, R.; SIEGEL, B.; GALSTON, A. Hormone-induced repression of a peroxidase isozyme in plant tissues. *Science*, Washington, v. 151, n. 3709, p. 452, Jan. 1966.

OKEY, E. N.; DUNCAN, E. J.; SIRJU-CHARRAN, G.; SREENIVASAN, T. N. *Phytophthora* canker disease resistance in cacao: role of peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia-lyase. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v. 145, n. 7, p. 295-299, July 1997.

RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; SILVA, L. H. C. P.; AGUILAR, M. A. G.; NIELLA, G. R.; CARVALHO, G. A.; GIOVANINI, G. R.; CASTRO, R. M. Perspectivas da indução de resistência em cacaueteiro contra *Crinipellis pernicioso* através do benzothiadiazole (BTH). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 25, n. 2, p. 149-156, jun. 2000.

REUVENI, R.; SHIMONI, M.; KARCHI, Z.; KUC, J. Peroxidase activity as a biochemical marker for resistance of muskmelon (*Cucumis melo*) to *Pseudoperonospora cubensis*. *Phytopathology*, St Paul, v. 82, n. 7, p. 749-753, July 1992.

SHEWRY, P. R.; LUCAS, J. A. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. *Advances in Botanical Research*, London, v. 26, p. 135-192, 1997.

SIEGEL, B. Z. Plant peroxidases – an organismic perspective. *Plant Growth Regulation*, Dordrecht, v. 12, n. 3, p. 303-312, Feb. 1993.

SIEGRIST, J.; JEBLICK, W.; KAUSS, H. Defense responses in infected and elicited cucumber (*Cucumis sativus* L.) hypocotyl segments exhibiting acquired resistance. *Plant Physiology*, Rockville, v. 105, n. 4, p. 1365-1374, Aug. 1994.

SIEGRIST, J.; OROBER, M.; BUCHENAUER, H. β -aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation of salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 56, n. 3, p. 95-106, Mar. 2000.

XUE, L.; CHAREST, P. M.; JABAJI-HARE, S. H. Systemic induction of peroxidases, 1,3- β -glucanase, chitinases, and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. *Phytopathology*, St. Paul, v. 88, n. 4, p. 359-365, Apr. 1998.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços nos estudos de variabilidade em espécies patogênicas utilizando marcadores bioquímicos e moleculares vêm contribuindo de forma significativa para os programas de melhoramento visando resistência a doenças. Dentre os marcadores bioquímicos, a análise de isoenzimas de espécies fúngicas, fornece resultados extremamente rápidos, que podem auxiliar nos estudos de diferenciação e caracterização de diferentes isolados e/ou raças fisiológicas. Nos experimentos realizados objetivando caracterizar diferentes isolados de *Crinipellis pernicioso*, verificou-se que o perfil isoenzimático de peroxidase, foi eficiente na diferenciação dos isolados, principalmente no que se refere a presença de uma isoenzima diferencial, encontrada no isolado Cp1 proveniente de Ouro Preto D'Oeste-RO. Diante disto e dos resultados obtidos, pode-se sugerir que novos trabalhos sejam desenvolvidos visando melhor caracterizar os isolados, através de técnicas de biologia molecular, que em conjunto com outras técnicas possam vir a tornar-se em poderosas ferramentas para a caracterização e identificação inequívoca de microrganismos.

A descoberta de um provável marcador molecular, aliado à melhor otimização das medidas de manejo da doença, possibilitará, num futuro bem próximo, a adoção de novas estratégias de convívio com a doença. Deste modo, novas pesquisas devem ser desenvolvidas, procurando identificar qual a verdadeira função e ação dos diferentes indutores e suas associações com o fenômeno da resistência na cultura do cacau, tanto nas interações compatíveis como incompatíveis.

Entre as medidas de manejo da vassoura-de-bruxa do cacau, a utilização de novos elicitores bióticos e/ou abióticos para resistência devem ser testados, como, por exemplo, os micronutrientes, avaliando-se novas épocas e

doses de aplicação. Principalmente porque, nos resultados obtidos com a utilização de micronutrientes, estes não apresentaram resultados satisfatórios.

No tocante à análise de enzimas, ficou claro a capacidade do ASM em induzir a expressão de peroxidase em plantas tratadas, evidenciando a importância que o indutor de resistência possui na interação *C. pernicioso* x *Theobroma cacao* e como a aplicação deste produto pode interferir no sistema de defesa do cacauero. Contudo, novos trabalhos podem ser desenvolvidos, objetivando melhor esclarecer quais os mecanismos bioquímicos estão realmente atuando neste patossistema.

ANEXOS

ANEXO A		Página
TABELA 1A	Matriz de distância genética entre os diferentes isolados de <i>Crinipellis pernicioso</i> , com base no coeficiente de dissimilaridade.....	80
TABELA 2A	Quadro da análise de variância para o efeito da interação dose x época de aplicação do ASM sobre a incidência da vassoura-de-bruxa em mudas de cacau do clone SIC-23, 60 dias após a inoculação.....	81
TABELA 3A	Quadro da análise de variância para o efeito da aplicação do ASM puro e em mistura com micronutrientes, sobre a incidência da vassoura-de-bruxa em mudas de cacau do clone SIC-23, 45 dias após a inoculação.....	81
TABELA 4A	Quadro da análise de variância para o efeito da aplicação do ASM puro e em mistura com fungicidas sobre a incidência da doença em mudas do clone SIC-23, 60 dias após a inoculação.....	81

TABELA 1A Matriz de distância genética entre os diferentes isolados de *Crinipellis pernicioso*, com base no coeficiente de dissimilaridade. UFLA, Lavras, MG, 2002

Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ron c 1	0,00													
Man c 2	0,19	0,00												
Bel c 3	0,63	0,63	0,00											
Bah c 4	0,69	0,69	0,56	0,00										
Bicolor 5	0,81	0,81	0,75	0,63	0,00									
Cipó 6	0,50	0,50	0,69	0,75	0,88	0,00								
Cam 7	0,69	0,69	0,69	0,81	0,69	0,69	0,00							
Altam 8	0,81	0,81	0,76	0,63	0,75	0,81	0,94	0,00						
Belém 9	0,75	0,75	0,81	0,69	0,75	0,75	0,88	0,69	0,00					
Man 10	0,88	0,88	0,81	0,88	0,69	0,88	0,75	0,88	0,81	0,00				
Ilhéus 11	0,94	0,94	0,81	0,81	0,81	0,94	0,88	0,81	0,88	0,81	0,00			
St. Am 12	0,88	0,88	0,81	0,81	0,94	0,88	0,94	0,81	0,25	0,94	0,88	0,00		
Rond 13	0,94	0,94	0,88	0,88	0,94	0,94	0,94	0,88	0,94	0,94	0,88	0,88	0,00	
Lob 14	0,81	0,88	0,56	0,63	0,56	0,94	0,81	0,75	0,88	0,81	0,81	0,94	0,94	0,00

TABELA 2A - Quadro da análise de variância para o efeito da interação dose x época de aplicação do ASM sobre a incidência da vassoura-de-bruxa em mudas de cacau do clone SIC-23, 60 dias após a inoculação

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q	Q.M.	VALOR F	
DOSE	2	49.189267	24.594633	0.206	0.8155
ÉPOCA	2	3704.094050	1852.047025	15.478	0.0000
DOSE X ÉPOCA	4	618.729883	154.682471	1.293	0.2977
RESÍDUO	27	3230.763275	119.657899		
TOTAL	35	7602.776475			

CV - 15.60 %

Média Geral - 70.12

TABELA 3A - Quadro da análise de variância para o efeito da aplicação do ASM puro e em mistura com micronutrientes sobre a incidência da vassoura-de-bruxa em mudas de cacau do clone SIC-23, 45 dias após a inoculação

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q	Q.M.	VALOR F	
TRATAMENTOS	7	5165.305600	737.900800	Fc	Pr>Fc
				13.396	0.0000
RESÍDUO	24	1321.977950	55.082415		
TOTAL	31	6487.283550			

CV = 10.63 %

Média Geral: 69.78

TABELA 4A - Quadro da análise de variância para o efeito da aplicação do ASM puro e em mistura com fungicidas sobre a incidência da doença em mudas do clone SIC-23, 60 dias após a inoculação

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q	Q.M.	VALOR F	
TRATAMENTOS	7	7197.402867	1028.200410	Fc	Pr>Fc
				6.581	0.0009
ERRO	16	2499.666733	156.229171		
TOTAL	23	9697.069600			

CV - 34.29 %

Média Geral - 36.45