



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agrônômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

ANALISE DA PRESENÇA DE GRÃOS DE AMIDO EM CACAUEIRO TRATADAS COM INDUTORES DE RESISTÊNCIA E INOCULADAS COM *Ceratocystis cacaofunesta*

Gabriel Leonardi Antonio^{1*}, Roberto de Lima Donato¹, Matheus Rodrigo Iossi¹,
Ana Carolina Firmino¹

¹Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas/ UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. CEP 17900-000, Dracena, SP. gabriel-leonardi@bol.com.br

RESUMO – A indução de resistência é uma alternativa ao uso de defensivos químicos e cultivares resistentes a quantificação de grãos de amido pode estar relacionada a esse processo, com isso foi avaliada a presença de grãos de amido em plantas de cacaueteiro infectadas pelo fungo *Ceratocystis cacaofunesta*, causador da murcha-deceratocystis, e submetidas a tratamento com diferentes doses e tipos de elicitores de resistência seguindo os seguintes tratamentos: glicose (0,1M, 0,5M e 1M), sacarose (0,1M, 0,5M, 1M) e Acibenzolar-s-metílico (1ppm, 100ppm e 1000ppm), testemunha inoculada com o fungo e sem aplicação de elicitores e testemunha sem inoculação do fungo e aplicação de elicitores. Uma semana após a aplicação dos indutores de resistência foi realizada a inoculação do fungo e a avaliação foi realizada até sessenta dias após a inoculação. Para isso foram retiradas amostras das plantas para a visualização dos grãos de amido em cada tratamento. Foram observados grãos de amido em todos os tratamentos.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*, fungo, murcha-de-ceratocystis.

INTRODUÇÃO

A murcha-de-Ceratocystis do cacaueteiro é uma doença causada pelo fungo *Ceratocystis cacaofunesta*. O patógeno caracteriza-se por obstruir os vasos do xilema das plantas provocando murcha das folhas e posteriormente a morte da planta devido a interrupção da passagem de seiva pela mesma, (SILVA, MAGALHÃES, 2014), além da obstrução do xilema pelas próprias estruturas do fungo a planta passa a produzir tiloses, estruturas de defesa que bloqueiam o xilema.

A indução de resistências em plantas vem sendo estudada com uma alternativa ao uso de agentes químicos e cultivares resistentes (KUHN, 2007), e é um método que consiste na ativação de mecanismos bioquímicos de resistência das plantas que podem ser induzidos por elicitores bióticos ou abióticos entre eles está o acibenzolar-S-metil (SILVA, PASCHOLATTI,



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agrônomo - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

BEDENDO, 2008). Esse método já foi testado com sucesso em cacaueteiro para controle da vassoura-de-bruxa utilizando como elicitores a glicose, a sacarose e o ácido salicílico em trabalho realizado por Vieira e Valle (2006). Muitos são os mecanismos de defesa envolvidos na indução de resistência de planta podendo-se citar a peroxidase, β -1,3-glicanase, quitinase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase (SILVA, PASCHOLATTI, BEDENDO, 2008).

Em relação a presença de grãos de amido, a visualização dos mesmos é um método microscópico/macrocópico indireto para a detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (STANGARLIN, et. al., 2010), que são moléculas produzidas durante o processo de transformação do oxigênio molecular a água (MEHDY et al., 1996). Essas moléculas podem impedir diretamente o crescimento do patógeno, fortalecer a parede celular e a membrana plasmática, por meio de ligações cruzadas com proteínas estruturais e pela peroxidação de lipídeos, respectivamente, além de regular genes de resistência da planta ou formar ácido jasmônico que atua como mensageiro secundário devido a presença do peróxido de hidrogênio (DOKE et al., 1996).

Tendo em vista esses fatores esse trabalho visou avaliar a presença de grãos de amido em cacaueteiros tratados com indutores de resistência e inoculados com *Ceratocystis cacaofunesta*, e verificar se há ligação da produção deste mecanismo com a reação da planta aos indutores utilizados.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e cultivo dos isolados de *Ceratocystis cacaofunesta*

Os isolados foram obtidos junto a pesquisadora Stela Dalva da CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) de Ilhéus-BA. O projeto foi desenvolvido na FCAT – Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas em Dracena -SP sendo os fungos cultivados em meio MEA (malte, extrato de levedura e Agar) pelo período de 10 dias.

Cultivo das plantas de cacaueteiro

Foram utilizadas sementes do cultivar Theobahia cedidas pela CEPLAC e plantadas em vaso de 5 L com substrato Plantimax HT® dentro da casa de vegetação da FCAT em Dracena – SP.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

Indução de Resistência

A aplicação dos elicitores de resistência foi realizada quando a planta apresentava seis meses, sendo que em cada caule foi aplicada uma injeção contendo 0,1 mL de solução nos seguintes tratamentos: 0,1M de Glicose; 0,50M de Glicose; 1M de Glicose; 0,1M de Sacarose; 0,50M de Sacarose ; 1M de Sacarose; 1ppm de acibenzolans-metílico; 100ppm acibenzolar-s-metílico; 1000ppm acibenzolar-s-metílico, além da testemunha inoculada com o fungo e da inoculada apenas com MEA sem aplicação de elicitores.

A inoculação do fungo foi realizada seguindo o método de Silveira et.al. (2006), apresentando algumas modificações. O primeiro passo foi a abertura de uma incisão no caule da planta aonde o inóculo do fungo foi depositado entre o lenho e a casca através de um disco de micélio. Posteriormente um algodão umedecido com água deionizada foi colocado ao redor da inoculação e vedado com fita plástica. A inoculação foi realizada sete dias após a aplicação dos indutores. As amostras foram avaliadas até 60 dias após a inoculação. No total houve 11 tratamentos com 5 repetições cada.

Visualização da presença de amido

Fragmentos do caule das plantas de cada tratamento foram coletados e fixados em “Karnovsky” e submetidos a desidratação em séries crescentes de concentração de etanol (40%, 50%, 70%, 90% – 10 minutos cada e 100% por três vezes de 10 minutos). Posteriormente as amostras foram infiltradas com uma mistura de etanol 100% com “Basic Resin” (v/v de 1:1) durante 2 horas. Na sequência as amostras foram infiltradas somente com solução de “Basic Resin” pura por 24 horas. Após esse processo as amostras foram levadas a formas de silicone preenchidas com historesina e “Basic Resin” pura, essas formas passaram por secagem a temperatura ambiente dentro da capela. Após total polimerização das resinas as amostras foram cortadas em micrótomo na espessura de 1µm, colocadas em lâminas de vidro e coradas com lugol (cora amido –solução de iodo a 05% acrescentada de iodeto de potássio a 1%) durante dois minutos sobre os cortes, lavadas com água corrente e secos em placas aquecidas. Após a coração as lâminas foram visualizadas em microscópio Leica.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agrônomo - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho foram similares com os resultados demonstrados por Antonio et al. (2016), que observou que plantas de cacaueteiro tratadas com glicose e sacarose, apresentam, murcha e seca antes de 20 e 30 dias após a inoculação, respectivamente. E que os tratamentos com Acibenzolar-s-metílico a 1ppm as plantas permaneceram vivas até o último dia de avaliação, que ocorreu 60 dias após a inoculação.

Foi observada a presença de grão de amido em todas as amostras (Figura 1 e 2). Apesar de não se ter realizado nenhum método de quantificação do amido nas amostras analisadas, foi possível verificar visualmente que as plantas tratadas com Acibenzolar-s-metílico, principalmente na concentração de 1ppm, apresentaram maiores quantidades de grão de amido no tecido.

Segundo Antonio et al. (2016), o Acibenzolar-s-metílico mostrou bons resultados na indução de resistência de plantas de cacaueteiro a *C. cacaofunesta*, já que as plantas tratadas com este produto a 1 ppm não apresentaram morte até o dia de sua avaliação. Deste modo há duas hipóteses associadas a visualização de maiores quantidades de grãos de amidos nas plantas tratadas com Acibenzolar-s-metílico. A primeira seria que houve maior acúmulo de amido nas células, já que estas plantas sobreviveram por um período maior de tempo. A segunda hipótese, é que este produto pode induzir um aumento na produção de grãos amido pela planta devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzidas pelos elicitores de resistência.

O incremento na quantidade de grãos de amido em plantas pode estar relacionado tanto a fatores bióticos ou abióticos como relatado por Benicci et.al.(2005), que citam que algumas doenças como a ferrugem, míldio e fusariose causaram aumento na presença de grãos de amido nas plantas infectadas.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA
Instituto Agrônomo - Campinas, SP
7 a 9 de Fevereiro de 2017

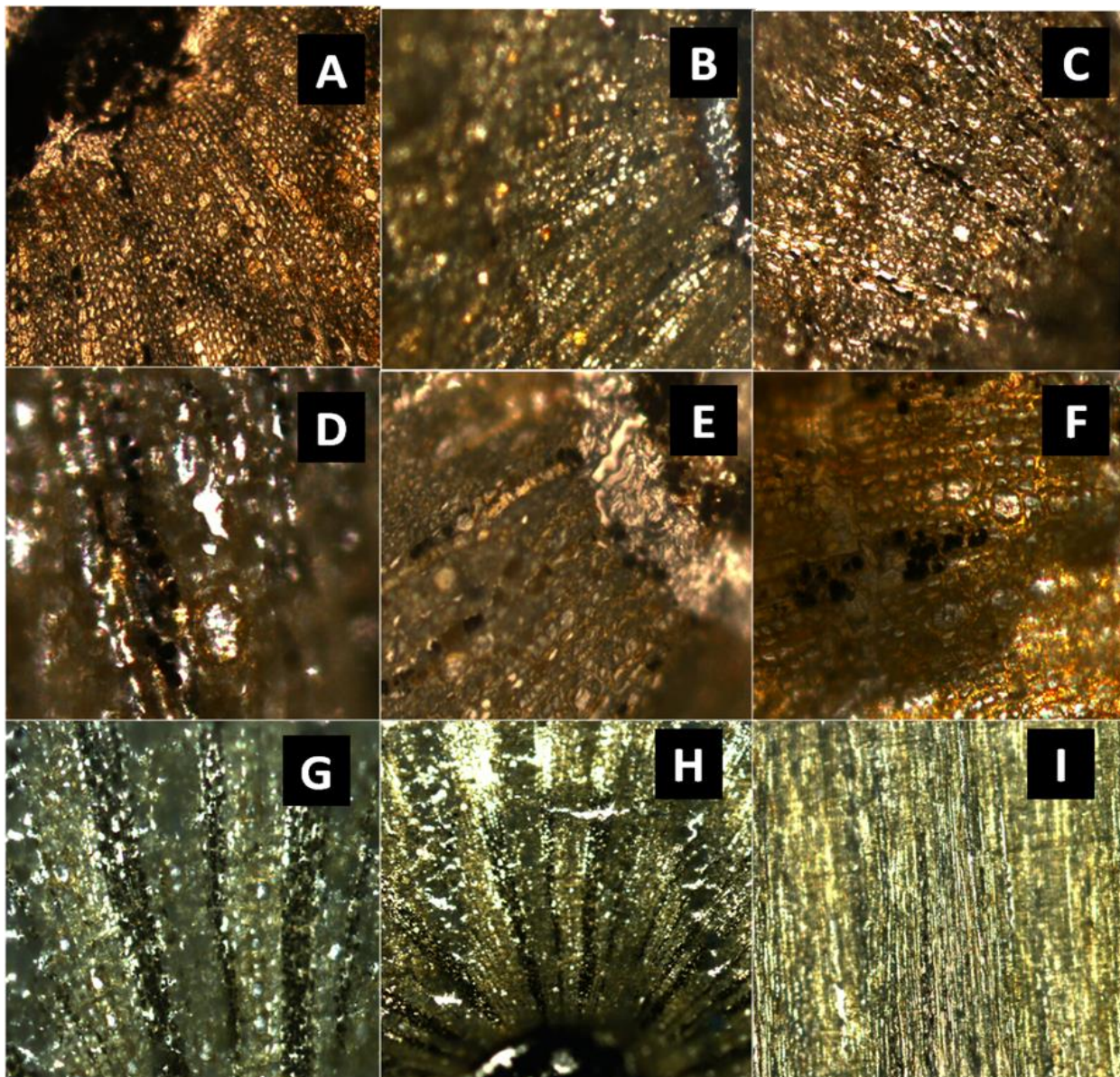


Figura 1. Cortes histológicos realizados nas amostras das plantas tratadas com diferentes doses e tipos de elicitores de resistência. Pontos escuros são os grãos de amido. A, B e C: glicose 0,1M, 0,5M e 1M, respectivamente; D, E e F: sacarose 0,1M, 0,5M, 1M, respectivamente; G, H e I: Acibenzolar-s-metílico 1ppm, 100ppm e 1000ppm, respectivamente.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA
Instituto Agronômico - Campinas, SP
7 a 9 de Fevereiro de 2017

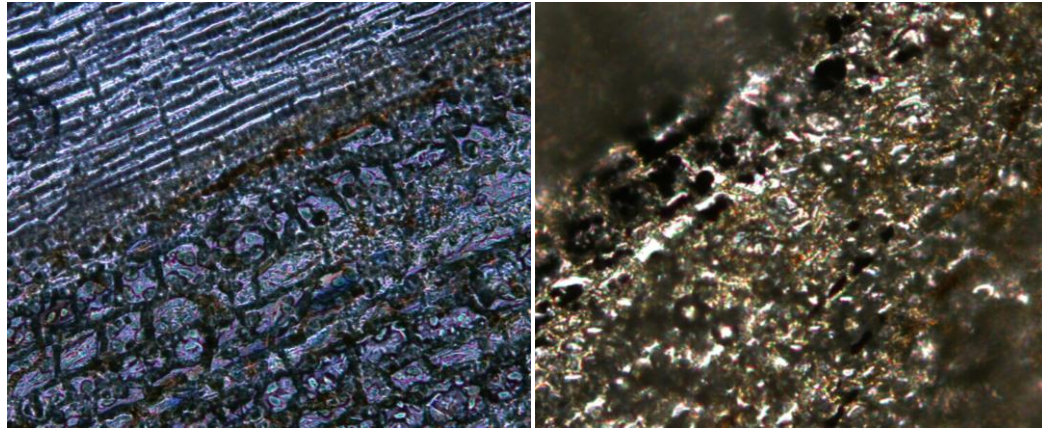


Figura 2. Cortes histológicas realizadas nas plantas testemunhas. À direita planta, somente inoculada com *Ceratocystis*, à esquerda planta inoculada com um disco de meio de cultura, sem o fungo. Pontos escuros são os grãos de amido.

CONCLUSÃO

Todas as plantas apresentaram produção de grãos de amido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONIO, G. L.; DONATO, R. L.; IOSSI, M. R.; FIRMINO, A.C. 2016. Disponível em: <<http://www.dracena.unesp.br/Home/Eventos/imast/037.pdf>>. Acesso em 02 dez. 2016.
- DOKE, N.; MIURA, Y.; SANCHEZ, L. M.; PARK, H.-J.; NORITAKE, T.; YOSHIOKA, H.; KWAKITA, K. The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence – a review. *Gene*, v.179, p.45-51, 1996.
- FERRARI SILVA, R., FLORENTINO PASCHOLATI, S., BEDENDO, I. P. Indução de resistência em plantas de berinjela por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*: aspectos bioquímicos e biomassa vegetal. *Summa Phytopathologica*, v. 34: 137-144. 2008.
- Kuhn, O. J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de produção. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, ESALQ. Piracicaba/SP. 2007.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

MEHDY, M. C.; SHARMA, Y. K.; SATHASIVAN, K.; BAYS, N. W. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. **Physiologia Plantarum**. v. 98: 365-374. 1996.

SILVA, S. D. V. M.; MAGALHÃES, D. M. A. 2014. Disponível em <<http://www.summanet.com.br/summanet-site/congressos/2014/palestras/p10.htm>>. Acesso em 02 de dez. 2016.