

MURCHA DE CERATOCYSTIS, NOVA DOENÇA DO CUPUAÇUZEIRO

Marival Lopes de Oliveira, Ana Rosa R. Niella, Valdívia. R. Silva, Luiz C. Lima

CEPLAC/ CEPEC/ Seção de Fitopatologia - Caixa Postal 07, CEP 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil.
marival@ceplac.gov.br

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) é uma fruteira originária da Região Amazônica, cultivada principalmente nos estados do Pará, Amazonas, Acre e Bahia. No sul da Bahia tem sido explorada em alguns municípios produtores de cacau situados na região conhecida como Baixo Sul, para o aproveitamento da polpa e amêndoas por indústrias de alimentos e cosméticos. Durante inspeções fitossanitárias realizadas em uma área do Centro de Pesquisas do Cacau, Ilhéus, BA, plantada com cupuaçu foram observadas plantas apresentando sintomas de murcha, amarelecimento, seca de folhas, além de cancro e necrose do caule. Através de isolamentos em meio de BDA, a partir de tecidos necrosados, foi identificado o fungo *Ceratocystis fimbriata*, sendo também detectadas, em exames histopatológicos, estruturas do fungo nos vasos do xilema. Mudanças de cacau, com três meses de idade, e de cupuaçu com oito, inoculadas com o fungo, apresentaram sintomas aos 20 e 40 dias após a inoculação, respectivamente, sendo o fungo reisolado em todas as tentativas. Este é o primeiro relato da murcha de ceratocystis em plantas de cupuaçu.

Palavras-chave: *Theobroma grandiflorum*, *Theobroma cacao*, *Ceratocystis fimbriata*, mal do facão.

Ceratocystis wilt, a new disease of the cupuassu tree, in Brazil. The cupuassu tree (*Theobroma grandiflorum*), native of the Amazon region, is cultivated mainly in the states of Para, Amazonas, Acre and Bahia, Brazil. In Bahia, it has been planted in the same municipalities where cacao is grown, especially, in the region known as Baixo Sul. During phytosanitary inspections carried out in one area at the Cacao Research Center (CEPEC), in Ilheus, BA, cultivated with cupuassu, trees showing symptoms of wilting, chlorosis and leaf drying, in addition to canker and necrosis of the stem, were observed. *Ceratocystis fimbriata* was the fungus, predominately, isolated in PDA medium in all the attempts using necrotic tissues obtained from the stem. Histopathological studies, done at the optical microscope, showed the presence of mycelia and chlamydospores of the fungus in the xylem vessels. Three- and 8-month-old cacao and cupuassu seedlings inoculated with the fungus started exhibiting the disease symptoms 20 and 40 days later, respectively. The fungus was re-isolated from inoculated plants in all the attempts. This is the first record of ceratocystis wilt disease in cupuassu tree.

Key words: *Theobroma grandiflorum*, *Theobroma cacao*, *Ceratocystis fimbriata*, ceratocystis wilt.

Introdução

O cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng) Scum.] é uma fruteira da família Malvaceae (Alverson et al., 1999) originária da região Amazônica que foi introduzida no Sul da Bahia por volta dos anos 30. Por ser uma espécie pertencente ao mesmo gênero do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) e igualmente hospedeira do fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora [= *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer], agente causal da vassoura-de-bruxa (VB), teve seu cultivo desestimulado, durante anos, na região. O trânsito de materiais botânicos de cacau e outros hospedeiros, incluindo *T. grandiflorum*, provenientes da Amazônia, passou a ser proibido pela legislação fitossanitária, como parte da Campanha de Combate à Vassoura de bruxa (CAVAB) que visava coibir a introdução da doença no Estado da Bahia.

A partir do momento que a VB foi constatada no Sul da Bahia, e em decorrência dos graves problemas socioeconômicos advindos, novas alternativas econômicas passaram a ser perseguidas. Entre as culturas exploradas, a do cupuaçu foi considerada de destaque, principalmente, pela aceitação da sua polpa como suco, e das amêndoas por indústrias de alimentos e cosméticos, já que o incentivo ao seu cultivo não mais oferecia riscos à introdução da VB na região (Calzavara, 1982).

Durante inspeções fitossanitárias realizadas em uma área do Centro de Pesquisa do Cacau (CEPEC), cultivada com cupuaçu, foram encontradas plantas com quadro sintomatológico bastante semelhante ao da murcha de ceratocystis que ocorre no cacauzeiro e que vem apresentando considerável importância econômica no Sul da Bahia, ultimamente. Também conhecida como mal do facão, a doença é causada pelo fungo, originalmente identificado como *Ceratocystis fimbriata* Ell. e Halst., mas, que recentemente foi reconhecida como uma espécie independente, *Ceratocystis cacaofunesta* Engelbrecht e Harrington (Engelbrecht e Harrington, 2005).

Em cacau, a doença foi descrita pela primeira vez no Equador em 1918 (Delgado e Echandi, 1965), e posteriormente em outros países produtores das Américas do Sul e Central, como: Colômbia, Peru, Venezuela, Costa Rica, Guatemala, México, República Dominicana, Trinidad e Haiti (Thorold, 1975). No Brasil, a murcha de ceratocystis foi assinalada, inicialmente, no estado de Rondônia (Bastos e

Evans, 1978), e vinte anos mais tarde, no Sul da Bahia (Bezerra et al, 1998), apesar de até o momento não existirem quaisquer relatos da doença em cupuaçuzeiro.

O presente trabalho apresenta resultados de observações e estudos diagnósticos e histopatológicos em materiais de *Theobroma* spp., natural- e artificialmente infectados, direcionados para o esclarecimento da etiologia da murcha de ceratocystis do cupuaçuzeiro.

Material e Métodos

Inspeções fitossanitárias foram realizadas em uma área do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), Ilhéus, BA, cultivada com cupuaçu, com o objetivo de investigar as causas da mortalidade de plantas. Os sintomas da doença caracterizavam-se pela murcha, amarelecimento e seca das folhas, com o surgimento de cancos e necroses no caule, levando a planta à morte. Foram efetuadas observações detalhadas da sintomatologia e coletados materiais para exames em laboratório. As amostras foram conduzidas à Clínica Fitopatológica do CEPEC, onde foram utilizadas em estudos histopatológicos e nos isolamentos visando a identificação do patógeno. Os testes de patogenicidade foram realizados em casa de vegetação, sendo também efetuadas observações detalhadas dos sintomas e sinais do fungo em plântulas inoculadas.

No isolamento do patógeno a partir de tecidos lenhosos apresentando sintomas de descoloração e necrose, foi efetuada inicialmente a lavagem superficial do material em água corrente, e em seguida, sua desinfecção em uma solução de hipoclorito de sódio a 1%. Fragmentos obtidos das regiões de transição entre tecidos doentes e sadios, utilizando-se um canivete esterilizado, foram imersos na mesma solução de hipoclorito de sódio, por um minuto, lavados em água destilada esterilizada, secos em papel de filtro, inseridos em meio de batata-dextrose-agar (BDA) em placas de Petri, as quais foram então incubadas em uma BOD, a 25 °C. Discos de micélio com 5 mm de diâmetro, obtidos das margens de cada colônia, foram transferidos para o centro de novas placas com BDA, e estas então incubadas em idênticas condições, durante dez dias, para que houvesse a esporulação do fungo.

Na identificação do patógeno, materiais contendo micélio e frutificações do fungo constituídas por peritécios, foram obtidos de cada cultura, montados

em lâminas com lactofenol e examinados em um microscópio de luz Leica®, modelo DMLS. Imagens das estruturas características do fungo foram obtidas com o auxílio de uma câmara fotográfica Samsung®, modelo CCD SAC-410ND, acoplada ao microscópio e conectada a um microcomputador, utilizando-se o software Image-Pro® Plus, usado na captura de imagens. A identificação do patógeno foi feita com base em seus caracteres morfológicos utilizados em literaturas apropriadas (Morgan-Jones, 1967; Hanlin, 1990).

Os fungos mais prevalentes durante os isolamentos foram utilizados na inoculação de mudas de cupuaçu, com oito meses de idade, pertencentes a uma variedade não identificada; e de cacau com três meses, da cultivar 'comum'. Cada uma de dez plântulas de ambos hospedeiros foi inoculada, na haste, a 10 cm do solo, após terem sido efetuadas puncturas, com uma agulha esterilizada, no local a ser inoculado. Discos de micélio, com 7 mm de diâmetro, obtidos das margens da colônia, com oito dias de crescimento, foram colocados em contato com os tecidos, e a área inoculada recoberta com um chumaço de algodão embebido em água destilada esterilizada, fixado ao local com uma fita plástica. Igual número de plantas, sem acesso ao inóculo, foi mantido como testemunha.

Após as inoculações, as plântulas foram transferidas para casa de vegetação, sem controle ambiental, sendo efetuadas observações periódicas até o aparecimento dos sintomas a morte das plantas. Plantas apresentando gradações variadas na sintomatologia, incluindo as mortas, foram examinadas para a confirmação dos sintomas internos e presença de sinais do fungo, procedendo-se a seguir ao reisolamento do patógeno em meio de cultura. Exames histopatológicos foram realizados tanto em materiais natural- quanto artificialmente infectados, com o intuito de aprimorar o processo de diagnose da doença.

Resultados e Discussão

O quadro sintomatológico da doença mostrou-se bastante similar ao da murcha de ceratocystis ou mal do facão do cacaueiro, causada pelo fungo tratado tradicionalmente como *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. (Hardy, 1961; Oliveira e Luz, 2005), mas que foi reclassificado, ultimamente, como uma nova

espécie, *C. cacaofunesta* Engelbrecht & Harrington (Engelbrecht e Harrington, 2005).

Em cacaueiro, a murcha de ceratocystis se tornou um problema sério pouco tempo após ser constatada no Sul da Bahia, principalmente, sobre a variedade Theobahia, que foi o primeiro material genético com resistência à vassoura de bruxa recomendado pelo CEPEC. Por apresentar elevada susceptibilidade à doença, a variedade foi praticamente dizimada da região num curto espaço de tempo.

As observações iniciais indicavam que os sintomas da doença em cupuaçuzeiro eram bastante semelhantes aqueles descritos para a murcha de ceratocystis do cacaueiro. Caracterizavam-se por murcha, amarelecimento e seca das folhas, podendo ocorrer tanto de forma parcial, causando a seca de galhos; quanto generalizada, levando a planta à morte, a depender do local de infecção (Figura 1a). As folhas ao perderem a turgidez, pendiam verticalmente, enrolavam e secavam, permanecendo, entretanto, aderidas à planta por algum tempo, mesmo após sua morte aparente (Figura 1a). Ao se examinar as partes lenhosas, observavam-se lesões necróticas, deprimidas, em forma de cancro, os quais se iniciavam a partir dos pontos de penetração do fungo, e eram mais frequentes nas regiões inferiores do caule. Tais lesões eram, invariavelmente, associadas a ferimentos provocados durante as práticas de limpeza do solo, poda, desbrota e colheita, à semelhança do que é, normalmente, observado em cacaueiro (Oliveira e Luz, 2005). Sobre a casca, assumiam uma coloração escura, em decorrência da exsudação de um líquido avermelhado, e no lenho, castanho-avermelhado, às vezes púrpura, estendendo-se tanto para cima quanto para baixo dos pontos de penetração, mas que diminuía em intensidade em direção aos tecidos sadios (Figura 1b).

Não obstante terem sido isolados outros fungos, normalmente, associados a outras doenças do cacaueiro, como: *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. e *Fusarium* spp., aquele que foi mais prevalente em todos os isolamentos, pertencia ao gênero *Ceratocystis*, com a espécie sendo identificada como *C. fimbriata* Ell. & Halst (Morgan-Jones, 1967; Hanlin, 1990).

A identificação do patógeno foi feita com base em suas estruturas morfológicas características, observadas ao microscópio ótico a partir de colônias desenvolvidas em meio de cultura (Morgan-Jones,

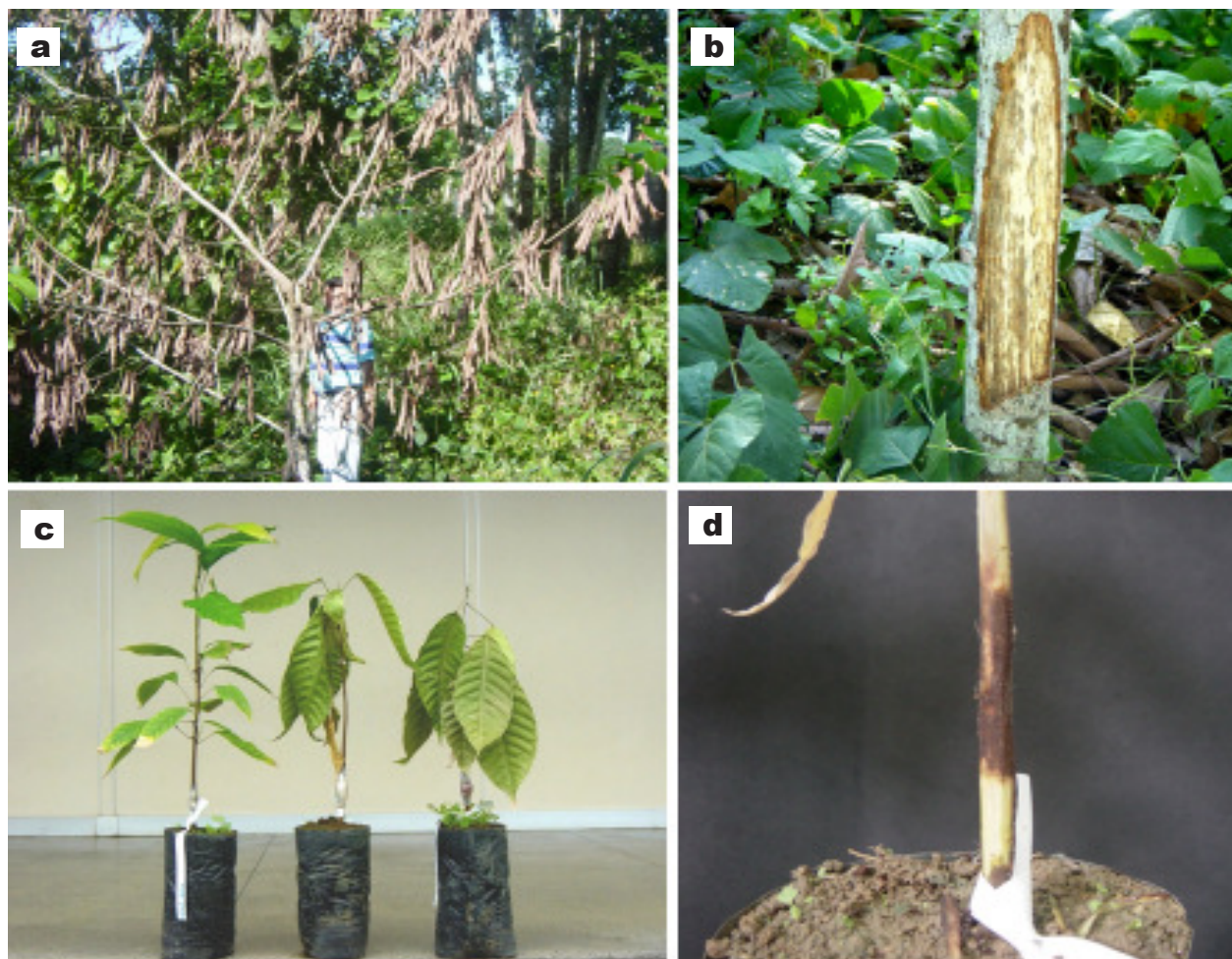


Figura 1. Sintomas da murcha de ceratocystis em cupuaçuzeiro: (a) murcha e seca de folhas que permanecem presas à planta; (b) sintomas necróticos no lenho; (c) plântulas de cacau inoculadas com um isolado de *C. fimbriata* de cupuaçuzeiro, apresentando folhas secas, duas plantas à direita; e uma planta sem inocular, à esquerda (testemunha); (d) lesão necrótica, na haste de uma plântula inoculada.

1967; Hanlin, 1990). Entre elas, peritécios com pescoços longos e com hifas ostiolares (Figura 2a, b); ascósporos com a aparência de chapéu (Figura 2c); endoconídios cilíndricos, unicelulares, hialinos e catenulados produzidos em endoconidióforos, também cilíndricos, longos e hialinos (Figura 2d, e); além de clamidósporos castanhos, globosos a piriformes ocorrendo tanto isoladamente, quanto em cadeias curtas (Figura 2f) (Morgan-Jones, 1967; Hanlin, 1990). Em exames histológicos realizados em materiais natural ou artificialmente infectados, adotando uma metodologia simples utilizada na diagnose da doença em outros hospedeiros (Ferreira et al., 2005), foram observados hifas e clamidósporos do fungo no interior dos vasos do xilema (Figura 2f).

O fungo é pertence ao clado latino-americano do complexo de espécies de *C. fimbriata*, grupo apresentando grande variabilidade genética e um círculo de hospedeiros amplo, onde estão presentes mais de 50 famílias de angiospermas, incluindo coqueiro (*Cocos nucifera* L.), cafeeiro (*Coffea arabica* L.), seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. Juss.) Müll. Arg.], batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), mangueira (*Mangifera indica* L.), eucalipto (*Eucalyptus* spp.), além do próprio cacauzeiro. Como outros hospedeiros, citam-se: cássia (*Cassia* sp.), crotalária (*Crotalaria juncea* L.), mamona (*Ricinus communis* L.) e pinha (*Annona squamosa*) (Morgan-Jones, 1967; MacFarlene, 1968; Harrington, 2000; Barnes et al., 2001; Baker et al., 2003; Marin et al., 2003; Engelbrecht e Harrington, 2005;

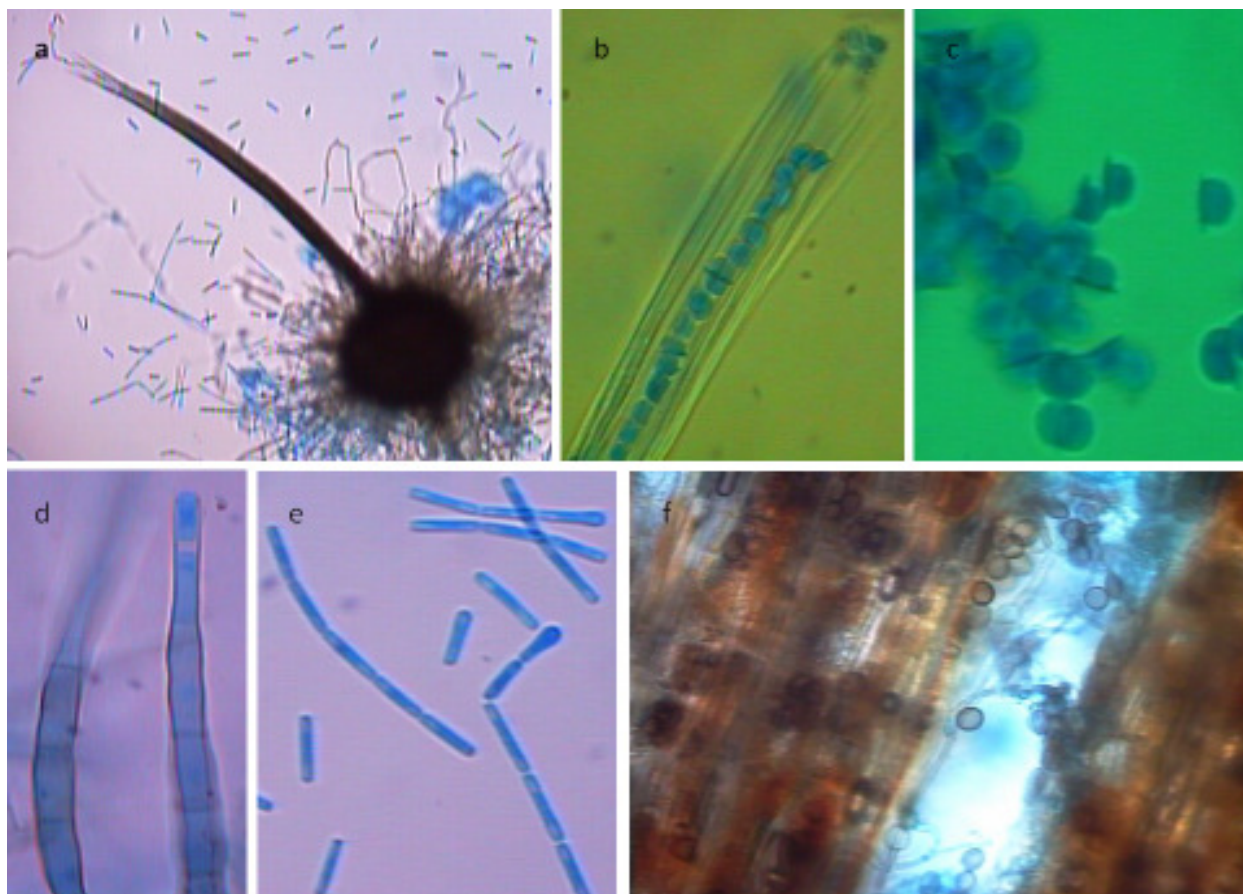


Figura 2. Estruturas morfológicas características de um isolado de *Ceratocystis fimbriata* de cupuaçuzeiro: a) peritécio com pescoço longo e com hifas ostiolares; b) detalhes das hifas ostiolares e da liberação de ascósporos; c) ascósporos em forma de chapéu; d) endoconidioforos cilíndricos e hialinos; e) endoconídios cilíndricos e hialinos em cadeia; f) secção histológica de tecidos infectados mostrando hifas e clamidósporos nos vasos do xilema.

Silveira et al., 2006; Engelbrecht et al., 2007). A despeito desta ampla distribuição e círculo de hospedeiros, a doença ainda não havia sido relatada em cupuaçuzeiro, mesmo em países aonde já ocorre sobre o cacauzeiro há bastante tempo.

Durante os testes de patogenicidade, plântulas de cacau inoculadas com um isolado de *C. fimbriata* de cupuaçu foram infectadas (Figura 1c, d) e apresentavam os mesmos sintomas observados normalmente em plantas inoculadas com isolados do próprio hospedeiro. Por outro lado, de 10 plantas de cupuaçu inoculadas com o mesmo isolado, apenas duas apresentaram sintomas de infecção. Outro aspecto é que a despeito das plantas de cacau mostrarem sintomas já a partir dos 20 dias após a inoculação, as de cupuaçu, só o fizeram após os 40 dias. Possíveis razões para este fato poderiam ser atribuídas à idade superior das plantas de cupuaçu, à variedade

utilizada que já poderia apresentar alguma resistência à doença, ou ainda pelo próprio cupuaçuzeiro ser um hospedeiro mais resistente que o cacauzeiro, a julgar pela baixa ocorrência da doença em campo, até o momento.

O método de inoculação utilizado mostrou-se eficiente na reprodução dos sintomas da murcha de ceratocystis (Figura 1c, d), sendo o fungo reisolado de todas as plantas inoculadas. Exames histopatológicos, ao microscópio de luz, revelaram a presença de hifas e clamidósporos de *C. fimbriata* nos vasos do xilema, tanto em plantas natural- quanto artificialmente infectadas (Figura 2f).

Ao se consultar a literatura, não foi encontrada qualquer referência sobre a ocorrência da murcha de ceratocystis em cupuaçuzeiro (Lima e Souza, 1998; Benchimol, 2000; Gasparoto et al., 2005), nem na lista de fungos que ocorrem sobre plantas no Brasil (Mendes

et al, 1998) ou mesmo em outros países, constituindo-se este no seu primeiro relato para a ciência.

Em cacau a doença é disseminada, principalmente, através de ferramentas contaminadas utilizadas em práticas culturais, como: poda, desbrota, colheita e roçagem, ou ainda pela ação de coleobros dos gêneros *Xyleborus* e *Xylosandrus*, que ao produzirem galerias nos tecidos lenhosos, disseminam-na tanto de forma direta, transportando propágulos aderidos ao corpo; quanto indireta, no seu trato alimentar (Thorold, 1975; Oliveira e Luz, 2005). Apesar de ainda não ter sido comprovado em campo, este também poderia ser o mecanismo de disseminação da doença no cupuaçuzeiro, à semelhança do que é observado em outros hospedeiros. Considerando-se a sua importância econômica em cacau, atenção especial deveria ser dada igualmente à cultura do cupuaçu, procurando realizar inspeções fitossanitárias periódicas, principalmente, em localidades onde já tiver sido constatada, com o objetivo de se conhecer sua real importância na cultura. Estudos complementares, visando estabelecer diferenças em termos de virulência entre isolados de ambos hospedeiros, deverão ser postos em prática, através da realização de inoculações cruzadas.

Conclusões

1. *Ceratocystis fimbriata* é o agente etiológico da doença provocando a morte de plantas de cupuaçu, em uma área do CEPEC.

2. Isolados de *C. fimbriata* provenientes de cupuaçu foram patogênicos tanto a este hospedeiro, quanto ao cacau.

3. O cupuaçuzeiro passa a ser considerado outro importante hospedeiro de *C. fimbriata*.

Literatura Citada

- ALVERSON, W. S. et al. 1999. Phylogeny of core Malvales: evidence from ndhF sequence data. *American Journal of Botany* 89:1474-1486.
- BAKER, C. J. 2003. Genetic variability and host specialization in the American clade of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology* 93:1274-84.
- BARNES, I. et al. 2001. Microsatellite markers reflect intra-specific relationship between isolates of the vascular wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. *Molecular Plant Pathology* 2: 319-325.
- BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. 1978. Ocorrência de *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. na região Amazônica Brasileira. *Acta Amazônica* 8(4): 543-544.
- BENCHIMOL, R. L. 2000. Doenças do cupuaçuzeiro causadas por fungos. Belém, PA. EMBRAPA/Amazônia Ocidental. 50p.
- BEZERRA, J. L. et al. 1998. Ocorrência de *Ceratocystis fimbriata* em clones de cacau no Estado da Bahia. *Fitopatologia Brasileira* (Suplemento). p. 365.
- CALZAVARA, B. B. G. 1982. Cupuaçuzeiro – *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum. Belém, PA. EMBRAPA/CPATU. 11p. (Cultivos Pioneiros).
- DELGADO, U.; ECHANDI, E. 1965. Evaluación de la resistencia de especies y clones de cacao al mal del machete provocado por *Ceratocystis fimbriata*. *Turrialba* (Costa Rica) 15: 286-289.
- ENGELBRECHT, C. J. B.; HARRINGTON, T. C. 2005. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. *Mycologia* 97: 57-69.
- ENGELBRECHT, C. J. B. et al. 2007. Genetic variation in populations of the cacao wilt pathogen, *Ceratocystis cacaofumesta*. *Plant Pathology* 56: 923-933.
- FERREIRA, F. A.; MAFFIA, L. A.; FERREIRA, E. A. 2005. Detecção rápida de *Ceratocystis fimbriata* em lenho infectado de eucalipto, mangueira e outros hospedeiros lenhosos. *Fitopatologia Brasileira* 30: 543-545.
- GASPAROTO, L. et al. 2005. Doenças de fruteiras da Amazônia. In: H. Kimati, L. et al. *Manual de Fitopatologia*. v. 2. pp. 355-360.
- HANLIN, R. T. 1990. *Illustrated genera of ascomycetes*. St. Paul, Minnesota, USA. APS Press. 263p.
- HARDY, F. 1961. Enfermedades fungosas del cacao y su controle. In: *Manual de cacao*. Turrialba, CR. IICA. pp. 253-286.
- HARRINGTON, T. C. 2000. Host specialization and speciation in the American wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. *Fitopatologia Brasileira* 25: 262-263.
- LIMA, M. I. P. M.; SOUZA, A. G. C. 1998. Diagnóstico das principais doenças do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) e seu controle. Manaus, AM. EMBRAPA, CPAA. Documentos n° 9. 18p.
- MACFARLENE, H. H. 1968. *Review of applied mycology. Compiled from world literature on plant pathology. Plant host pathogen index to volumes 1-40 (1922-61)*. Kew, England. Commonwealth Mycological Institute.
- MARIN, M. et al. 2003. Relationships of *Ceratocystis fimbriata* isolates of Colombian coffee-growing regions based on molecular data and pathogenicity. *Journal of Phytopathology* 151: 395-405.
- MENDES, M. A. S et al. 1998. Fungos em plantas no Brasil. Brasília, DF, EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENEARGEN. 569 p.
- MORGAN-JONES, G. 1967. *Ceratocystis fimbriata*. CMI. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria n° 141. 2p.
- OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. 2005. Identificação e manejo das principais doenças do cacau no Brasil. Ilhéus, BA. CEPEC/CEPLAC. 132p.
- SILVEIRA, S. F. et al. 2006. *Annona squamosa*, a new host of *Ceratocystis fimbriata*. *Fitopatologia Brasileira* 31(4): 382-385.
- THOROLD, C. A. 1975. *Disease of cocoa*. Oxford, England, Clarendon Press. 423p.