

AÇÃO PARASITÁRIA DE *Cladobotryum amazonense* A BASIDIOMAS DE *Moniliophthora perniciosa* EM VASSOURAS DE CACAUEIRO, CUPUAÇUZEIRO E LOBEIRA

Cleber Novais Bastos

CEPLAC/SUEPA/ERJOH. BR 316, Caixa Postal 46, 67105-970, Marituba, Pará, Brasil.
clebernbastos@hotmail.com

Foi avaliada a atividade parasitária do hiperparasita *Cladobotryum amazonense*, isolado de basidiomas de *Moniliophthora perniciosa* produzidos em vassouras de cacau, à basidiomas em vassouras de cacau, cupuaçuzeiro e lobeira. Os testes foram realizados em “vassoureiro” telado, sendo as vassouras pulverizadas com suspensão de conídios mais fragmentos de micélio produzidos em meio de arroz parbolizado e transformado para a forma de pó. O fungo se desenvolveu sobre os basidiomas hospedeiros e impedindo antagonicamente a disseminação de basidiósporos. Em adição, verificou-se *in vitro* que os basidiósporos aderidos ao micélio do antagonista não germinaram e apresentaram-se plasmolisados.

Palavras-chave: controle biológico, vassoura-de-bruxa, antagonista, cacau

Parasitic activity of *Cladobotryum amazonense* against basidiomata of *Moniliophthora perniciosa* on witches’ broom of cacao, cupuaçu and lobeira. The effect of the parasitic activity of the hyperparasite *Cladobotryum amazonense* was isolated from basidiomata of *Moniliophthora perniciosa* on cacao witches’ broom and tested against basidiomata on dead brooms of cacao, cupuaçu and lobeira. The tests were conducted in “vassoureiro” humid gauzehouse and the brooms were sprayed with a conidia and mycelium suspension. The hyperparasite overgrew the host basidiomata and physically prevented the spores dissemination. In addition, it was observed that the spores trapped in the mycelium of the hyperparasite failed to germinate and became plasmolysed when transferred to water agar.

Key words: biological control, witches’ broom, antagonist, cacao

Introdução

Cladobotryum amazonense Bastos, Evans e Samson sp. nov. (Bastos, Evans & Samson, 1981) é um hiperparasita do fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora (2005) causador da doença vassoura de bruxa em várias espécies de hospedeiros, tais como as famílias Malvaceae (Hardy, 1961; Thorold, 1975; Evans, 1978), Solanaceae (Bastos e Evans, 1985; Evans e Barreto, 1966; Silva et al., 1992; Bezerra, 1994), Bixaceae (Bastos e Andebrán, 1986), Bignoniaceae (Hedger et al., 1987), Malpighiaceae (Bastos et al., 1998.). O fungo foi primeiramente observado e isolado a partir de basidiomas desenvolvidos em liana originalmente coletada da floresta amazônica e classificado como *Dactylium* sp. (Bastos, 1979) e, posteriormente reclassificado como *Cladobotryum amazonense* Bastos, Evans, & Samson (Bastos et al., 1981).

Em ensaios realizados em condições controladas demonstraram que, quando vassouras contendo basidiomas em diferentes estágios eram pulverizadas com um macerado de micélio proveniente de cultura do hiperparasita, a sua colonização era rápida, de modo que os basidiomas mostrassem cobertos por uma rede micelial dentro de 30 h, provocando o fechamento do píleo e impedindo a disseminação de basidiósporos (Bastos, 1979). Em adição, constatou que o antagonista produz um metabólito extracelular e termoestável que induz a inibição da germinação e plasmólise de basidiósporos do agente causador da vassoura-de-bruxa do cacaueteiro *in vitro*, bem como possui a capacidade de proteger frutos contra a infecção de *M. perniciosa* (Bastos, 1984).

Recentemente, em 2012, observou-se em vassouras secas de cacaueteiro procedentes da Estação de Recursos Genéticos “José Haroldo”, Marituba, Pará, a presença de *C. amazonense* parasitando basidiomas de *M. perniciosa*. Estes se apresentavam colonizados por um micélio de coloração branca provocando fechamento do píleo e conseqüentemente impedindo a liberação dos basidiósporos.

O presente trabalho objetivou demonstrar a ação parasitária do isolado de *C. amazonense* sobre basidiomas produzidos em vassouras de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.), cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Wild ex Spreng) e lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hill.).

Material e Métodos

Isolamento e produção de inóculo de *Cladobotryum amazonense*

O antagonista foi isolado a partir da massa micelial acrescidos de conídios desenvolvidos nos píleos dos basidiomas parasitados, desenvolvidos em vassouras de cacaueteiros, quais foram retirados pelo método direto, com auxílio de uma agulha histológica flambada, sob microscópio estereoscópico e, transferidos para tubos de ensaio contendo meio BDA. A cultura pura do fungo foi repicada para placas de Petri contendo BDA e incubadas em estufa B.O.D a 25°C, na ausência de luz.

Para obtenção do inóculo do antagonista, três discos de 7 mm de diâmetro de BDA contendo micélio e esporos do fungo, foram colocados sobre 50 gr de arroz parbolizado, umedecido com 20 ml de água destilada em frascos Erlenmeyers de 250 ml, previamente autoclavados, por 20 minutos. Os frascos foram mantidos em condições ambientais de laboratório (25-28°C) por 10-12 dias, para colonização do substrato. Após, este foi transferido para bandejas rasas e exposto a desumidificação em câmara de fluxo laminar por cerca de 72 horas. A seguir, o substrato foi triturado até ser transformado em pó, sendo em seguida passado por uma peneira de 40 meshes.

Teste de parasitismo

Para determinar a ação parasitária do isolado de *C. amazonense* ao fungo *M. perniciosa*, uma suspensão de esporos e fragmentos de micélio foi atomizada com pulverizador manual (1L) em vassouras secas de cacaueteiro, cupuaçuzeiro e lobeira contendo basidiomas em diferentes estágios de desenvolvimento, penduradas no interior de um “vassoueteiro” telado (câmara indutora de basidiomas). Para manter a turgidez dos basidiomas e fornecer condições de umidade favorável para o desenvolvimento do microparasita, bem como a indução na formação de novos basidiomas, as vassouras foram periodicamente aspergidas com água através de um sistema de irrigação por aspersão, durante o período oito a dez horas.

Fungitoxidade *in vitro*

O isolado de *C. amazonense* foi cultivado no meio líquido de Weindling (Bastos et al. 1986) em frascos Erlenmeyer de 250 ml à temperatura ambiente do

laboratório (25-28°C), sem agitação, durante 10-12 dias. Após este período o micélio foi separado por filtração em papel filtro e o filtrado de cultura foi esterilizado através de membrana Millipore 0,22 µm. A atividade inibitória do filtrado de cultura do antagonista foi avaliada quanto a germinação de basidiósporos de *M. pernicioso*, isolado do cacaueteiro, cupuaçuzeiro e lobeira, como descrito por Bastos et al. (1986).

Resultados e Discussão

Os resultados mostraram que o hiperparasita colonizou os basidiomas existentes nas vassouras de cacaueteiro, cupuaçuzeiro e lobeira (Figura 1). Decorridos 3 a 4 meses após a aplicação do hiperparasita, foi verificada a presença de basidiomas parasitados, demonstrando persistência e habilidade do antagonista em sobreviver nas vassouras, na ausência de basidiomas. Em adição, observaram basidiomas parasitados em vassouras de cacaueteiro e cupuaçuzeiro, não pulverizadas com o antagonista, indicando que os conídios do antagonista foram dispersos pelo vento e/

ou por pingos d'água produzidos pelo sistema de irrigação no interior do vassoureiro. Observações feitas ao microscópio, das amostras de micélio do agente retirado de basidiomas parasitados de *M. pernicioso*, tanto de cacaueteiro, quanto de cupuaçuzeiro e de lobeira, revelaram que os basidiósporos liberados estavam aderidos ao micélio do hiperparasita. Para verificar a viabilidade destes basidiósporos, o micélio do fungo foi transferido para placas de Petri contendo 1,5% de ágar-água e, após, 24 horas de incubação a 25°C, examinando a cultura ao microscópio, constatou-se que os basidiósporos não germinaram e apresentaram-se plasmolisados. Atribui-se a esta perda da capacidade germinativa e lise dos esporos a metabólito(s) extracelular(es) como demonstrado por Bastos (1984).

Com relação ao efeito inibitório do filtrado de cultura do antagonista sobre a germinação de basidiósporos, observou-se que o líquido metabólico apresentou acentuada toxicidade, provocando inibição da germinação de basidiósporos dos isolados de cacaueteiro, cupuaçuzeiro e lobeira. Os basidiósporos em contato com o filtrado de cultura em concentrações

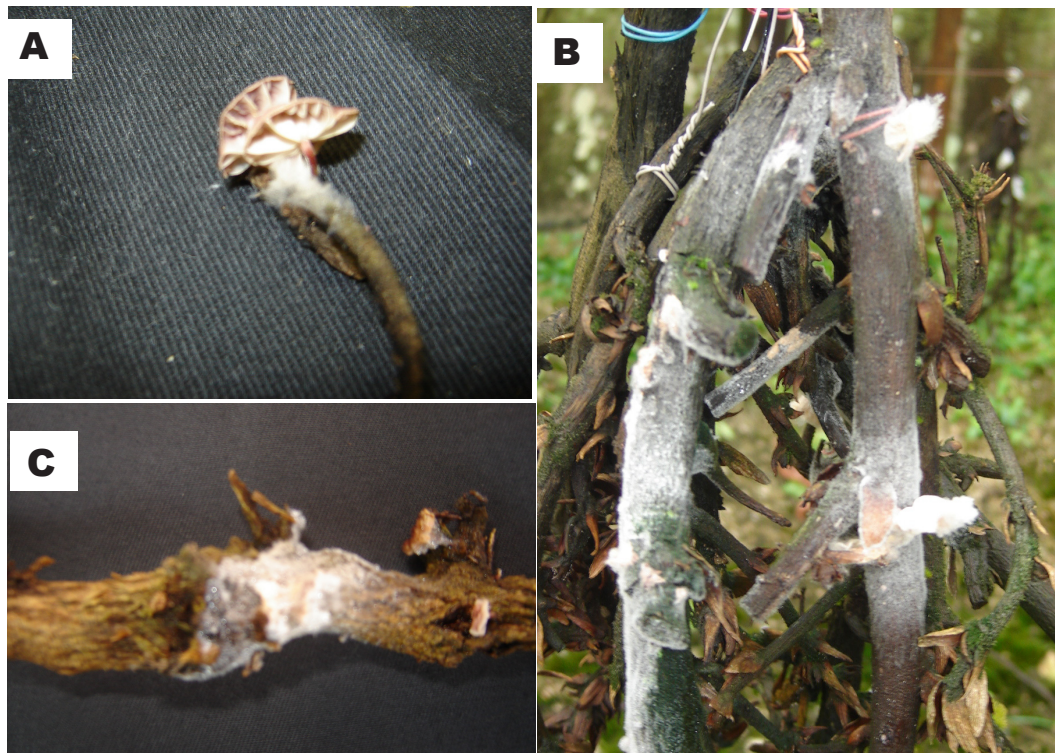


Figura 1. *Cladobotryum amazonense* parasitando basidiomas de *Moniliophthora pernicioso* em vassoura-de-bruxa do cacaueteiro (a), cupuaçuzeiro (b) e lobeira (c).

acima de 10% tiveram 100% de inibição na germinação e apresentaram-se plasmolisados, contrastando com as testemunhas em água destilada, que geminaram normalmente. Paralelamente, foi demonstrado que o tal metabólito é termostável, não perdendo sua atividade tóxica após o filtrado de cultura ter sido submetido à temperatura de 120 °C, durante 15 minutos. Bastos et al (1986) também isolaram uma substância antibiótica e termostável de filtrados de cultura de *C. amazonense* que tem amplo espectro de atividade inibitória contra fungos e bactérias. A estrutura química desta substância antibiótica ainda não é conhecida, mas testes qualitativos indicaram que se trata de um polipeptídeo.

Em conclusão, o isolado de *C. amazonense* demonstrou potencial de colonizar os corpos de frutificação de *M. pernicioso*, impedindo a liberação de basidiósporos viáveis e consequentemente demonstrando capacidade de reduzir o inóculo do patógeno nas vassouras secas de diferentes hospedeiros. Estes resultados são bastante promissores para o desenvolvimento de trabalhos futuros na busca de mais uma alternativa de controle da vassoura-de-bruxa. Estudos devem ser conduzidos para desenvolver tecnologia para formulações de produção de um produto biológico constituído de propágulos viáveis e de metabólitos tóxicos ao patógeno, visando a sua utilização num sistema de manejo integrado de controle da vassoura de bruxa do cacaueteiro e do cupuaçuzeiro. Assim, duas alternativas de controle do patógeno da vassoura-de-bruxa são factíveis: controle biológico direto pelo tratamento das vassouras com o inóculo de *C. amazonense* e controle químico pelo tratamento de tecidos sadios com os possíveis metabólitos tóxicos presentes no filtrado de cultura.

Literatura Citada

- AIME, M. C.; PHILIPS-MORA, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97:1012-22.
- BASTOS, C. N. 1979. Hiperparasitismo do fungo *Dactylium* sp. a *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer em vassoura-de-bruxa do cacaueteiro. *Revista Theobroma (Brasil)* 9:197-200.
- BASTOS, C. N. 1984. Efeito do filtrado de cultura de *Cladobotryum amazonense* sobre patógenos do cacaueteiro e de outros cultivos. *Revista Theobroma (Brasil)* 4:263-269.
- BASTOS, C. N.; EVANS, C. H.; SAMSON, R. A. 1981. A new hyperparasitic fungus, *Cladobotryum amazonense*, with potential for control of fungal pathogen of cocoa. *Transactions of the British Mycological Society* 77(2):273-278.
- BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. 1985. A new pathotype of *Crinipellis pernicioso* (Witches' broom) on solonaceous hosts. *Plant Pathology* 34(2):306-12.
- BASTOS, C. N.; ANDEBRHAN, T. 1986. Urucu (*Bixa orellana*): nova espécie hospedeira da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacaueteiro. *Fitopatologia brasileira* 11(4): 963-965.
- BASTOS, C. N.; NEILL, S. J.; HORGAN, R. 1986. A metabolite from *Cladobotryum amazonense* with antibiotic activity. *Transactions of the British Mycological Society* 86(4): 571-578.
- BASTOS, C. N.; FONSECA, S. E. A.; MELO, W. F. 1998. *Mascagnia* cf. *sepium*, cipó nativo da Amazônia brasileira, hospedeiro de *Crinipellis pernicioso*. *Fitopatologia brasileira* 23(4): 504.
- BEZERRA, J. L. 1994. Novos hospedeiros de *Crinipellis pernicioso* na região cacaueteira da Bahia. *Fitopatologia brasileira* 19(supl) 341.
- EVANS, H. C. 1978. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*) in Ecuador. I. The fungus. *Annual Applied Biology* 89:183-92
- EVANS, H. C.; BARRETO, R. W. 1996. *Crinipellis pernicioso*: A much investigated but little understood fungus. *Mycologist* 10(2):58-61.
- HARDY, F. 1961. Manual de cacao. Turrialba (Costa Rica) IICA. 395p.
- HEDGER, J. N.; PICKERING, V.; ARAGUNDI, J. 1987. Variability of populations of the Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*). *Transactions of the British Mycological Society* 88(4): 533-546.
- SILVA, S. D. V. M.; GRAMACHO, K. P.; ALMEIDA, O. C. de. 1992. *Solanum paniculatum* hospedeiro de *Crinipellis pernicioso* na região Sul da Bahia. *Agrotropica (Brasil)* 4(1):17-20.
- THOROLD, C. A. 1975. Witches' broom disease. In: Thorold, C. A. Disease of cocoa. Oxford, Clarendon Press. pp. 11-31.