

# Agrotrópica

Volume 26, número 1, janeiro a abril de 2014



**Centro de Pesquisas do Cacau  
Ilhéus - Bahia**

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**

**Ministro:** Neri Geller

**Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - CEPLAC**

**Diretor:** Helinton José Rocha

**Superintendência Regional no Estado da Bahia - SUEBA**

**Superintendente:** Juvenal Maynart Cunha

**Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC)**

**Chefe:** Adonias de Castro Virgens Filho

**Centro de Extensão (CENEX)**

**Chefe:** Sergio Murilo Correia Menezes

**Superintendência Regional no Estado de Rondônia - SUERO**

**Superintendente:** Wilson Destro

**Superintendência Regional no Estado do Pará - SUEPA**

**Superintendente:** Jay Wallace da Silva e Mota

Agrotrópica, v. 1, nº1 (1989)  
Ilhéus, BA, Brasil, CEPLAC/CEPEC, 1989

v.

Quadrimestral

Substitui “Revista Theobroma”

1. Agropecuária - Periódico.

CDD 630.5

**INFORMAÇÕES SOBRE A CAPA:** Primeiro relato do fungo Ascomycota *Ophioceras leptosporum* na serapilheira de *Harleyodendron unifoliolatum* (planta endêmica da Mata Atlântica) e nas Américas – detalhes da serapilheira, peritécio, ascos e ascósporos.

**AGROTRÓPICA é indexada em:**

AGRINDEX; THE BRITISH LIBRARY; CAB (i.e. Horticultural Abstracts, Review of Plant Pathology, Forestry Abstracts); AGROBASE; Agricultural and Environment for Developing regions (TROPAG); ULRICH'S INTERNATIONAL PERIODICALS DIRECTORY (Abstract on Tropical Agriculture, Agricultural Engineering Abstracts, Agroforestry Abstracts, Bibliography of Agriculture, Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Exerp Medical, Food Science & Technology Abstracts, Indice Agricola de America Latina y el Caribe, Nutrition Abstracts, Protozool. Abstracts, Review of Applied Entomology, Seed Abstracts, Tropical Oil Seeds Abstracts).

## **POLÍTICA EDITORIAL**

A Revista Agrotrópica está completando 42 anos, foi criada em 1971, sendo originalmente conhecida como Revista Theobroma. Por ter um caráter interdisciplinar, constitui-se num veículo para comunicação científica em várias áreas como: Biodiversidade, Ciências Agrárias, Ambientais, Veterinária, Zootecnia, Tecnologia de Alimentos, Geografia, Geociências, Socioeconomia, etc. A revista é publicada quadrimestralmente e está destinada a divulgação de trabalhos originais que têm contribuição real para o desenvolvimento agroecológico, ambiental e socioeconômico das Regiões Tropicais Úmidas.

A Revista Agrotrópica publica não apenas artigos científicos, como também notas científicas, revisões bibliográficas relevantes e de natureza crítica, todos em três idiomas: Português, Inglês e Espanhol. Publica também cartas endereçadas ao Editor sobre trabalhos publicados.

Os Autores são os responsáveis exclusivos pelo conteúdo do trabalho, todavia, o Editor, com a assessoria científica do Conselho Editorial da Revista, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações que considerarem necessárias.

Editor Chefe

## **EDITORIAL POLICY**

The Agrotrópica Journal is completing 42 year old, was created in 1971, being formerly known as Theobroma Journal. As having an interdisciplinary character, it constitutes in a vehicle for scientific communication in various areas as: Biodiversity, Agricultural Sciences, Environmental Science, Veterinary, Animal Science, Food Technology, Geography, Geosciences, Socioeconomics, etc. The journal is published every four months and is destined to dissemination of original scientific works that have real contributions to the development agroecological, environmental and socioeconomic of the tropical rain regions.

The Agrotrópica Journal publishes not only scientific papers, but also scientific notes, relevant bibliographical reviews and of critical nature, all in three idioms: Portuguese, English and Spanish. It also publishes letters to the editor about published works.

The authors are solely responsible for the content of the work, however, the Editor, with the scientific accessory of the Editorial Board, reserves the right of suggesting or requesting the changes that seem to be necessary.

Editor-in-Chief



**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,  
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**

**CEPLAC - Comissão Executiva do  
Plano da Lavoura Cacaueira**

**AGROTRÓPICA.** Publicação quadrimestral  
do Centro de Pesquisas do Cacau  
(CEPEC)/CEPLAC.

**Comitê Editorial:**

Adonias de Castro Virgens Filho; Almir  
Martins dos Santos; Antônio Cesar Costa  
Zugaib; Dan Érico Vieira Petit Lobão; Edna  
Dora Martins Newman Luz; George  
Andrade Sodré; Givaldo Rocha Niella;  
Jacques Hubert Charles Delabie; José  
Basílio Vieira Leite; José Inácio Lacerda  
Moura; José Luís Bezerra; José Luís Pires;  
José Marques Pereira; Karina Peres  
Gramacho; Manfred Willy Muller; Maria  
das Graças Conceição Parada Costa Silva;  
Paulo César Lima Marrocos; Raúl René  
Melendez Valle; Stela Dalva Vieira Midlej  
Silva; Uilson Vanderlei Lopes.

**Editor:** Ronaldo Costa Argôlo.

**Coeditor:** Quintino Reis de Araujo.

**Normalização de referências bibliográ-  
ficas:** Maria Christina de C. Faria

**Editoração eletrônica:** Jacqueline C.C. do  
Amaral e Selenê Cristina Badaró.

**Capa:** Ronaldo Costa Argôlo Filho

**Endereço para correspondência:**

**AGROTRÓPICA**, Centro de Pesquisas  
do Cacau (CEPEC), C.P. 07, 45600-970,  
Itabuna, Bahia, Brasil.

**Telefone:** (73) 3214 -3218

**Fax:** (73) 3214 - 3218

**E-mail:** agrotrop@cepec.gov.br

**Tiragem:** 700 exemplares

# AGROTRÓPICA

V. 26

Janeiro - abril

2014

N.1

## CONTEÚDO

### ARTIGOS

- 5 *Microcyclus ulei* na Bahia: base para estudo populacional. **E. L. Candeias, E. D. M. N. Luz, G. R. Niella, J. J. C. Miranda, C. D. dos Santos.**
- 17 Avaliação de progênies de clones de cacaueiros (série CP) quanto à resistência a *Moniliophthora perniciosa*. **C. S. Benjamin, E. D. M. N. Luz, W. R. Monteiro, L. P. Santos Filho, W. O. Santos.**
- 27 Aplicação de nitrogênio e potássio via água de irrigação no crescimento de mudas clonais de cacaueiro. **A. Ramos, G. A. Sodré, P. C. L. Marrocos, J. O. de Souza Júnior.**
- 35 Ascomycota em palmeiras: novos registros e novos hospedeiros para o Nordeste brasileiro. **N. S. Vitória, M. A. Q. Cavalcanti, M. V. O. dos Santos, M. L. Silvério, J. L. Bezerra.**
- 43 Fungos endófitos e do filoplano de *Caesalpinia echinata* Lam. da estação ecológica de Tapacurá, PE. **T. E. F. de Lima, M. da S. Cavalcanti.**
- 51 Fungos nematófagos da rizosfera de helicônias como potenciais antagonistas à *Rotylenchulus reniformis*. **S. M. V. S. Almeida, A. J. da Silveira, P. L. M. Soares, S. J. R. de Oliveira, M. A. L. Bittencourt.**
- 61 Reações de compatibilidade de clones de cacaueiros da série CEPEC. **M. M. Yamada, F. G. Faleiro, U. V. Lopes, J. L. Pires, R. F. dos Santos.**
- 65 Detecção de QTLs sob infecção natural de *Moniliophthora perniciosa* na progênie F2 com descendência Sca 6 (em inglês). **F. F. J. Santos, U. V. Lopes, J. L. Pires, G. R. P. Melo, K. P. Gramacho, D. Clément.**

### NOTAS CIENTÍFICAS

- 73 Assembleia de formigas de cafezal do Extremo Sul da Bahia e potencial para controle biológico. **P. F. Pereira, C. D. R. de Azevedo, E. S. da Conceição, A. de O. Costa Neto, J. H. C. Delabie.**
- 79 *Ophioceras leptosporum* na Mata Atlântica do Sul da Bahia: novo registro para América do Sul. **D. M. A. Magalhães, E. D. M. N. Luz, M. V. O. dos Santos, L. A. Magalhães, J. L. Bezerra.**





**MINISTRY OF AGRICULTURE  
LIVESTOCK AND FOOD SUPPLY**

**CEPLAC - Executive Commission of  
the Cacao Agriculture Plan**

**AGROTRÓPICA.** Published every four months by the Cocoa Research Center (CEPEC)/CEPLAC.

**Editorial Committee:**

Adonias de Castro Virgens Filho; Almir Martins dos Santos; Antônio Cesar Costa Zugaib; Dan Érico Vieira Petit Lobão; Edna Dora Martins Newman Luz; George Andrade Sodré; Givaldo Rocha Niella; Jacques Hubert Charles Delabie; José Basílio Vieira Leite; José Inácio Lacerda Moura; José Luís Bezerra; José Luís Pires; José Marques Pereira; Karina Peres Gramacho; Manfred Willy Muller; Maria das Graças Conceição Parada Costa Silva; Paulo César Lima Marrocos; Raúl René Melendez Valle; Stela Dalva Vieira Midlej Silva; Uilson Vanderlei Lopes.

**Editor:** Ronaldo Costa Argôlo.

**Coeditor:** Quintino Reis de Araujo.

**Revision of bibliographical references:**  
Maria Christina de C. Faria

**Desktop publish:** Jacqueline C.C. do Amaral and Selenê Cristina Badaró.

**Cover:** Ronaldo Costa Argôlo Filho

**Address for correspondence:**

**AGROTRÓPICA,** Cocoa Research Center (CEPEC), P.O.Box 07, 45600-970, Itabuna, Bahia, Brazil.

**Telephone:** 55 (73) 3214 - 3218

**Fax:** 55 (73) 3214-3218

**E-mail:** agrotrop@cepec.gov.br

**Circulation:** 700 copies.

# AGROTRÓPICA

V.26

January - April

2014

N.1

## CONTENTS

### ARTICLES

- 5 *Microcyclus ulei* in Bahia: basis for a populational study (in Portuguese). **E. L. Candeias, E. D. M. N. Luz, G. R. Niella, J. J. C. Miranda, C. D. dos Santos.**
- 17 Evaluation of open pollinated progenies of cacao clones (series CP) for resistance to *Moniliophthora perniciosa* (in Portuguese). **C. S. Benjamin, E. D. M. N. Luz, W. R. Monteiro, L. P. Santos Filho, W. O. Santos.**
- 27 Application of nitrogen and potassium via irrigation water on growth of clonal cocoa seedlings (in Portuguese). **A. Ramos, G. A. Sodré, P. C. L. Marrocos, J. O. de Souza Júnior.**
- 35 Ascomycota in palms: new records and new hosts to Brazil Northeast (in Portuguese). **N. S. Vitória, M. A. Q. Cavalcanti, M. V. O. dos Santos, M. L. Silvério, J. L. Bezerra.**
- 43 Endophytes and phylloplane fungi of *Caesalpinia echinata* Lam. of Estação Ecológica de Tapacurá, PE (in Portuguese). **T. E. F. de Lima, M. da S. Cavalcanti.**
- 51 Predacious fungi from the rhizosphere of heliconias as potential antagonists to *Rotylenchulus reniformis* (in Portuguese). **S. M. V. S. Almeida, A. J. da Silveira, P. L. M. Soares, S. J. R. de Oliveira, M. A. L. Bittencourt.**
- 61 Reaction of compatibility in cacao clones of CEPEC series (in Portuguese). **M. M. Yamada, F. G. Faleiro, U. V. Lopes, J. L. Pires, R. F. dos Santos.**
- 65 QTLs detection under natural infection of *Moniliophthora perniciosa* in a cacao F2 progeny with Scavina-6 descendants. **F. F. J. Santos, U. V. Lopes, J. L. Pires, G. R. P. Melo, K. P. Gramacho, D. Clément.**

### SCIENTIFICS NOTES

- 73 Potential for predation of ants in a coffee plantation of the Extreme South of the State of Bahia, Brazil (in Portuguese). **P. F. Pereira, C. D. R. de Azevedo, E. S. da Conceição, A. de O. Costa Neto, J. H. C. Delabie.**
- 79 *Ophioceras leptosporum* in Atlantic Rainforest of Southern Bahia: a new report to South America (in Portuguese). **D. M. A. Magalhães, E. D. M. N. Luz, M. V. O. dos Santos, L. A. Magalhães, J. L. Bezerra.**

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

**1.** O original para publicação em português, inglês ou espanhol, deve ter no máximo 18 páginas numeradas, em formato A4 (21,0 x 29,7 cm), fonte Times New Roman, corpo 12, espaço 1,5 (exceto Resumo e Abstract, em espaço simples), digitado em Word/Windows. O artigo deverá ser encaminhado à Comissão Editorial da revista por meio eletrônico. No rodapé da primeira página deverão constar o endereço postal completo e o endereço eletrônico do(s) autores(s). As figuras e tabelas devem vir à parte.

**2.** Os artigos devem conter: título, resumo, abstract, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusões, agradecimentos e literatura citada.

**3.** Os artigos científicos e notas científicas devem conter introdução que destaque os antecedentes, a importância do tópico e revisão de literatura. Nos materiais e métodos devem-se descrever os materiais e métodos usados, incluindo informações sobre localização, época, clima, solo etc., bem como nomes científicos se possível completo de plantas, animais, patógenos etc., o desenho experimental e recursos de análise estatística empregada. Os resultados e discussão poderão vir juntos ou separados e devem incluir tabelas e figuras com suas respectivas análises estatísticas. As conclusões devem ser frases curtas, com o verbo no presente do indicativo, sem comentários adicionais e derivados dos objetivos do artigo.

**4. Título** - Deve ser conciso e expressar com exatidão o conteúdo do trabalho, com no máximo 15 palavras.

**5. Resumo e Abstract** - Devem conter no máximo 200 palavras. Abstract deve ser tradução fiel do resumo em inglês.

**6. Palavras chave** - Devem ser no máximo de seis, sem estar contidas no título.

**7. Introdução** - Deverá ser concisa e conter revisão estritamente necessária à introdução do tema e suporte para a metodologia e discussão.

**8. Material e Métodos** - Poderá ser apresentado de forma descritiva contínua ou com subitens, de forma a permitir ao leitor a compreensão e reprodução da metodologia citada com auxílio ou não de citações bibliográficas.

**9. Resultados, Discussão e Conclusões** - De acordo com o formato escolhido, estas partes devem ser apresentadas de forma clara, com auxílio de tabelas, gráficos e figuras, de modo a não deixar dúvidas ao leitor, quanto à autenticidade dos resultados, pontos de vistas discutidos e conclusões sugeridas.

**10. Agradecimentos** - As pessoas, instituições e empresas que contribuíram na realização do trabalho deverão ser mencionadas no final do texto, antes do item Referências Bibliográficas.

**11. Unidades de medida** - Usar exclusivamente o Sistema Internacional (S.I.).

**12. Figuras (gráficos, desenhos, mapas)** - devem ser apresentadas com qualidade que permita boa reprodução gráfica; devem ter 8,2 cm ou 17 cm de largura; as fotografias devem ser escaneadas com 300 dpi e gravadas em arquivo TIF, separadas do texto.

**13. As tabelas** - devem ser apresentadas em Word ou Excel, e os dados digitados em Times New Roman.

**14. Literatura Citada** - No texto as referências devem ser citadas da seguinte forma: Silva (1990) ou (Silva, 1990).

A normalização das referências deve seguir os exemplos abaixo:

### PERIÓDICO

REIS, E. L. 1996. Métodos de aplicação e fracionamentos de fertilizantes no desenvolvimento da seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Sul da Bahia. *Agrotrópica* (Brasil) 8 (2): 39 - 44.

### LIVRO

BALL, D. M.; HOVELAND, C. S.; LACEFIELD, G. D. 1991. Southern forrages. Atlanta, PPI. 256p.

### PARTE DE LIVRO

ENTWISTLE, P. F. 1987. Insects and cocoa. In Wood, G.A.R.; Lass, R. A. Cocoa. 4 ed. London, Longman. pp.366-443.

### DISSERTAÇÃO

ROCHA, C. M. F. 1994. Efeito do nitrogênio na longevidade da folha de cacau (*Theobroma cacao* L.). Dissertação Mestrado. Salvador, UFBA. 31p.

### TESE

ROHDE, G. M. 2003. Economia ecológica da emissão antropogênica de CO<sub>2</sub> - Uma abordagem filosófica-científica sobre a efetuação humana alopoiética da terra em escala planetária. Tese Doutorado. Porto Alegre, UFRGS/IB. 235p.

### MONOGRAFIA SERIADA

TREVIZAN, S. D. P.; ELOY, A. L. S. 1995. Nível alimentar da população rural na Região Cacaueira da Bahia. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico nº 180. 19p.

### PARTE DE EVENTO

PIRES, J. L. et al. 1994. Cacao germplasm characterisation based on fat content. In International Workshop on Cocoa Breeding Strategies, Kuala Lumpur, 1994. Proceedings. Kuala Lumpur, INGENIC. pp.148-154.

A literatura citada deverá referir-se, de preferência, a trabalhos completos publicados nos últimos 5 anos.

**15. Correspondência de encaminhamento** do artigo deverá ser assinada pelo autor e coautores.

Os autores receberão cópias do seu trabalho publicado.

## GUIDELINES TO AUTHORS

**1** - The manuscript for publication in Portuguese, English or Spanish, not exceed 18 numbered pages, format A4, in Times New Roman, 12, 1.5 spaced (except Resumo and Abstract, simple spaced) typed in Word. The article must be addressed to the Editorial Commission in 4 printed copies and also in CD copy. Complete mailing address and e-mail of the author(s) must appear at the bottom of first page. Three out of the four copies should not state the author's name or acknowledgements, since these copies will go to reviewers. Figures (drawings, maps, pictures and graphs) and tables should be sent separately and ready for publication;

**2** - Articles must contain: title, abstract, introduction, material and methods, results and discussion, conclusions, acknowledgements and literature cited (references);

**3** - Scientific articles and notes must include an introduction highlighting the background and importance of the subject and literature review. Under materials and methods one must mention informations about locations, time, climate, soil, etc. and furnish latin names of plants, animals, pathogens, etc., as well experimental designs and statistical analysis used. Conclusions must be objective and derived from relevant results of the research.

**4 - Title** - It must be concise (not exceed 15 words) and express the real scope of the work.

**5 - Abstract** - No more than 200 words.

**6 - Key words** - Six at most, and should not be present in the title.

**7 - Introduction** - should be concise containing a strictly necessary review to the introduction of the topic and support for the methodology and discussion

**8 - Material and Methods** - may be presented in a continuous descriptive form or with subheadings, in a manner that allows the reader to understand and reproduce the described methodology. Bibliographic citations can be used.

**9 - Results, Discussion and Conclusions** - In accordance with the format chosen, these parts should be presented clearly, with the aid of tables, graphs and figures so as to leave no doubt as to the authenticity of the results, viewpoints discussed and conclusions emitted.

**10 - Acknowledgements** - Persons, institutions and companies that contributed to the accomplishment of the work should be mentioned at the end of the text before the Bibliographic References

**11 - Measurement units** - Use only the International System.

**12 - Figures** (drawings, maps, pictures and graphs) - They must possess good quality for graphic reproduction; size 8.2 cm or 17 cm wide; photos should be scanned at 300 dpi and recorded, out of the text, in TIF file.

**13 - Tables** - It should be present in Word or Excel and data typed in Times New Roman, 12.

**14 - References** - literature cited in the text must be written as follows: Silva (1990) or (Silva, 1990).

Citation should be given as follows.

### PERIODICALS

REIS, E. L. 1996. Métodos de aplicação e fracionamentos de fertilizantes no desenvolvimento da seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Sul da Bahia. *Agrotropica* (Brasil) 8(2): 39 - 44.

### BOOKS

BALL, D. M.; HOVELAND, C. S.; LACEFIELD, G. D. 1991. Southern forages. Atlanta, PPI. 256p.

### BOOK CHAPTERS

ENTWISTLE, P. F. 1987. Insects and cocoa. In Wood, G.A.R.; Lass, R. A. Cocoa. 4 ed. London, Longman. pp.366-443.

### DISSERTATION

ROCHA, C. M. F. 1994. Efeito do nitrogênio na longevidade da folha de cacau (*Theobroma cacao* L.). Dissertação Mestrado. Salvador, UFBA. 31p.

### THESIS

ROHDE, G. M. 2003. Economia ecológica da emissão antropogênica de CO<sub>2</sub> - Uma abordagem filosófica-científica sobre a efetuação humana alopoiética da terra em escala planetária. Tese Doutorado. Porto Alegre, UFRGS/IB. 235p.

### SERIAL MONOGRAPHS

TREVIZAN, S. D. P.; ELOY, A. L. S. 1995. Nível alimentar da população rural na Região Cacaueira da Bahia. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico n° 180. 19p.

### PART OF MEETINGS

PIRES, J. L. et al. 1994. Cacao germplasm characterisation based on fat content. In International Workshop on Cocoa Breeding Strategies, Kuala Lumpur, 1994. Proceedings. Kuala Lumpur, INGENIC. pp.148-154.

Literature cited should include published papers rather than in the last 5 years.

**15 - Correspondence** of guiding will have to be signed by the author and coauthors.

After attending the corrections of the reviewers the author should return to the Editor a definitive copy of the corrected version and CD copy in the software recommended by the editors.

Authors will receive the reprints of their published paper.

## ***Microcyclus ulei* NA BAHIA: BASE PARA ESTUDO POPULACIONAL\***

***Eliane Leal Candeias<sup>1</sup>, Edna Dora Martins Newman Luz<sup>2</sup>, Givaldo Rocha Niella<sup>2</sup>, José Jefferson Costa Miranda<sup>3</sup>, Cristiane Duarte dos Santos<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>UESC, Universidade Estadual de Santa Cruz, km 16, Rod. Ilhéus-Itabuna, 45650-000, Ilhéus, Bahia, Brasil. agrcandeias@hotmail.com; <sup>2</sup>CEPLAC/CEPEC, Caixa Postal 07, 45.600-970, Itabuna, Bahia, Brasil. ednadora@cepec.gov.br, gniella@cepec.gov.br; <sup>3</sup>FTC. Praça José Bastos, 55, Centro, 45600-081, Itabuna, Bahia, Brasil. jeffersonbask@gmail.com

\*Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - Bahia

O fungo *Microcyclus ulei* é o agente causal do mal-das-folhas, principal doença da seringueira, constituindo-se em um fator limitante à expansão da cultura no Brasil e ainda uma ameaça constante a outros países produtores de borracha. O controle genético é uma ferramenta importante no manejo integrado desta doença e para isso torna-se necessário a construção de uma micoteca do patógeno. Portanto, o objetivo do trabalho foi estabelecer uma coleção de isolados do patógeno, coletados em diferentes locais e regiões produtoras de seringueira, no Estado da Bahia, para estudos de variabilidade genética, morfológica e patológica, determinação de raças fisiológicas e seleção de clones para resistência a doença. Assim sendo, folíolos jovens infectados foram coletados em cinco sub-polos (SP) heveícolas deste Estado, correspondendo aos seguintes municípios: SP1 - Ituberá e Igrapiúna; SP2 - Porto Seguro, Guaratinga e Eunápolis; SP3 - Itamarajú; SP4 - Uruçuca e SP5 - Una. As amostras foram oriundas de cinco fazendas de cada sub-polo, sendo georeferenciadas 30 plantas por fazenda. No Laboratório de Micologia do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) realizou-se o isolamento das amostras, transferindo-se conídios presentes nas lesões em folíolos, diretamente para placas de Petri com o meio MC8. Processaram-se 515 amostras resultando na obtenção de 132 isolados: 14 no SP1, 52 no SP2, cinco no SP3, 45 no SP4, 16 no SP5. Melhor aproveitamento das amostras registrou-se no SP2 (64,2%) e SP4 (49,5%), demonstrando que o sucesso nos isolamentos depende da qualidade dos folíolos (jovens e com lesões novas) e da rapidez com que as amostras são processadas. Menores números de isolados foram obtidos em amostras processadas com mais de 48 h de coleta em função, principalmente, das contaminações. O patógeno está amplamente disseminado nos subpolos avaliados, porém em Ituberá encontrou-se o maior percentual de plantas infectadas e em Una o menor. Obteve-se uma coleção representativa da diversidade do pólo heveícola da Bahia.

**Palavras-chave:** *Hevea brasiliensis*, mal-das-folhas, micoteca, biogeografia

***Microcyclus ulei* in Bahia: basis for a populatinal study.** *Microcyclus ulei* is the causal agent of South American leaf blight the main disease problem of rubber tree in plantations of Bahia. The present research aimed to collect and isolate *M. ulei* from rubber plantations of South Bahia in order to obtain a culture collection that represents the pathogen population of that region as a subsidy for further studies of genetic, morphologic and pathologic variation, determination of physiological races and selection of clones for disease resistance. The rubber tree growing pole of South Bahia was divided in five sub-poles (SP) comprising the following municipalities: SP1 - Ituberá and Igrapiúna; SP2 - Porto Seguro, Guaratinga and Eunápolis; SP3 - Itamarajú; SP4 - Uruçuca and SP5 - Una. From each SP five farms were sampled and young leaflets infected by *M. ulei* were collected from 30 georeferenced plants per farm. The isolations were done at the mycology laboratory of CEPEC transferring conidia from the leaf lesions directly to Petri dishes containing MC8 culture medium. From 515 processed samples 132 isolates were obtained: 14 from SP1, 52 from SP2, 5 from SP3, 45 from SP4 and 16 from SP5. Better success on isolation were obtained from samples of SP2 (64.2%) and SP4 (49.5%) in which young leaflets with new lesions were collected and processed within 24 h. Smaller numbers of isolates were obtained from samples processed over 48 h of collection due mainly from contamination with other fungi. The pathogen is widespread in Bahia rubber tree plantations and the highest percentage of infected plants was observed in Ituberá and lowest in Una. A culture collection was obtained with isolates representing the pathogen diversity in the region.

**Key words:** *Hevea brasiliensis*, South American leaf blight, mycological collection, biogeography



## Introdução

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.D.R.) Muell. Arg.] planta nativa da Amazônia, foi introduzida na Bahia, no ano 1908, como uma estratégia de escape à doença mal-das-folhas, que havia devastado os plantios comerciais do Norte do Brasil (Rocha, 1972). Atualmente, a cultura se encontra distribuída em vários municípios baianos que constituem mais um polo heveícola no Brasil, sendo responsável por 14,2% da produção nacional de borracha natural (IBGE, 2011). Os plantios comerciais inicialmente formados no Sul da Bahia foram em monocultura, os mais recentes vêm sendo implantados utilizando a seringueira, como árvore de sombra permanente, em sistemas agroflorestais (SAFs) com o cacaueteiro e, ou, com outros cultivos alimentares, entre outras vantagens por diminuir a necessidade de se empregar defensivos químicos, proporcionando maior estabilidade econômica aos produtores (Marques et al., 2012).

Existem outras doenças que estão presente nas plantações de seringueira, mas nenhuma delas limita a expansão da heveicultura na Bahia tanto quanto o mal-das-folhas, causado pelo Ascomycota *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx. É fácil entender a importância econômica desta doença, ao rever a história do cultivo da seringueira verificando os fracassos nas inúmeras tentativas de implantação da heveicultura em vários países das Américas do Sul e Central, como: Brasil, Suriname e República Cooperativa da Guiana, Trinidad, Panamá e Costa Rica (Gasparotto et al., 1997). Na Bahia, o entusiasmo inicial dos produtores foi desestimulado com o aparecimento dessa doença, que, somente no município de Una, dado a severidade do patógeno, tornou improdutivo cerca de 8.000 dos 15.000 hectares implantados com seringueira (Rocha, 1972). Ainda segundo este autor, a situação não foi tão diferente nos demais municípios do Sul da Bahia, principalmente devido à elevada suscetibilidade dos clones à época plantados e às condições climáticas muito favoráveis ao desenvolvimento e disseminação da enfermidade (Rocha, 1972).

A severidade do *M. ulei* nesses seringais foi tamanha que promoveu perdas acentuadas em produtividade e produção de borracha, contribuindo para a redução da participação da produção baiana de borracha no mercado nacional de 29 % para pouco

mais de 10% (SUDHEVEA, Anuário Estatístico 1978). Com isso, a Bahia, que ocupava o primeiro lugar na produção nacional, nos anos 1980, perdeu a hegemonia para o Estado de São Paulo e, atualmente, segundo dados do IBGE (2011), ocupa o segundo lugar na produção nacional de borracha natural com a participação de 14,2%.

Segundo Mattos et al. (2003), o Sul da Bahia possui condições favoráveis ao desenvolvimento do ciclo do patógeno durante todo o ano e, Honorato Junior (2010), relata que este fato contribui para um aumento na exposição dos folíolos jovens ao *M. ulei* por um período maior porque as plantas localizadas nas baixadas e nas encostas estão mais vulneráveis à infecção do fungo. Comumente a seringueira apresenta apenas um fluxo de reenfolhamento ao ano (Gonçalves e Marques, 2008; Furtado, 1990). Porém, nas condições do Sul da Bahia, devido à alta severidade da doença, pode ocorrer um segundo reenfolhamento, causando alteração da fenologia da cultura (Honorato Junior, 2010).

Em estudos sobre o zoneamento agroclimático para a heveicultura, Cecílio et al. (2006) determinaram uma classificação (Classes de A a G), desde as áreas aptas às inaptas ao plantio comercial da seringueira, considerando as condições climáticas e os riscos da ocorrência do mal-das-folhas. A Classe A, considerada área apta a heveicultura, apresenta condições térmicas e hídricas satisfatórias, estando praticamente livre do mal-das-folhas. Possui evapotranspiração real anual (ETR) superior a 900 mm, déficit hídrico anual (Da) entre 0 e 200 mm, precipitação total anual (Pa) entre 1400 e 1600 mm e excedente hídrico anual (Ea) inferior a 200 mm. Ainda segundo esses autores, no sentido Norte-Sul há duas grandes áreas plenamente aptas à heveicultura, com probabilidade de ocorrência do mal-das-folhas praticamente nula. A primeira, localizada mais ao norte da Bahia, e estendendo-se na direção leste, desde o município de Coração de Maria até o litoral e na direção norte até a divisa com o Estado de Sergipe, e a segunda localizada mais ao Sul da Bahia, indo desde o município de Ibirapitanga até atingir o litoral nas proximidades de Porto Seguro. Outras duas pequenas áreas também dessa mesma classe estão presentes nos municípios de Teolândia e de Alcobaça.

Pensando nas possibilidades de expansão da heveicultura na Bahia, principalmente com o enfoque em SAFs, que têm boa adequação para a vocação agrícola da região Sul do Estado, objetivou-se com esta pesquisa coletar folhas infectadas para isolamento de *M. ulei* e formação de uma coleção de isolados representativos do polo heveícola da Bahia para subsidiar futuros estudos sobre a sua variabilidade genética, morfológica e patológica reforçando o programa de melhoramento genético da seringueira na Bahia.

## Material e Métodos

### Coletas

As coletas foram realizadas no polo heveícola da Região Sul da Bahia que para facilitar o desenvolvimento do trabalho foi dividido em cinco sub-polos formados, por um ou mais municípios localizados próximos, onde há plantios de seringueira, sendo: SP1 - Ituberá/Igrapiúna, SP2 - Porto Seguro/Guaratinga/Eunápolis, SP3 - Itamarajú, SP4 - Uruçuca e SP5 - Una (Figura1). Cinco fazendas em cada município

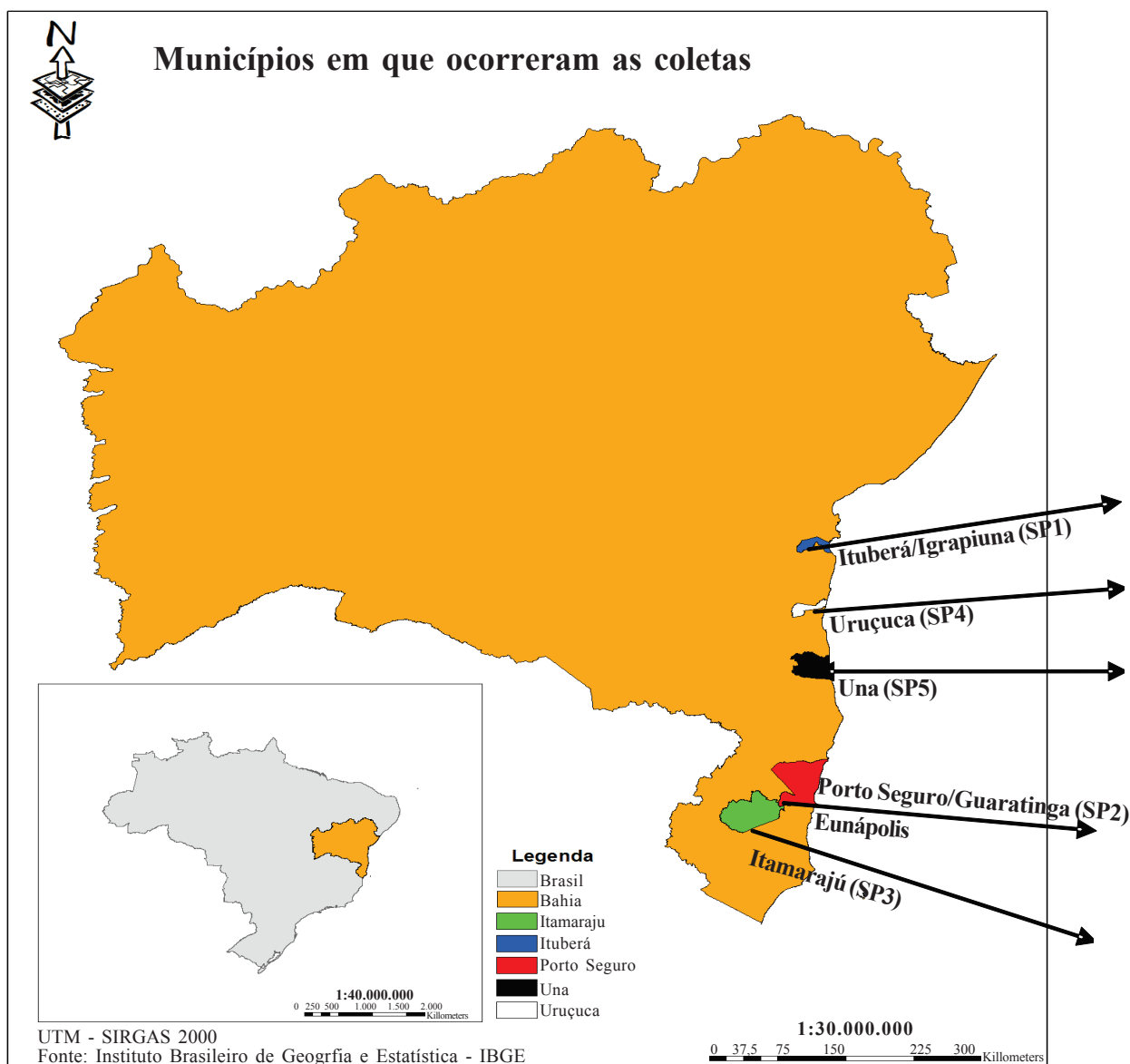


Figura 1 - Localização dos sub-polos heveícolas do Estado da Bahia, onde foram coletados folíolos de seringueira infectados por *M. ulei*.

foram visitadas durante os meses de fevereiro a setembro de 2011 e coletadas 30 amostras de folíolos infectados por fazenda, ou seja, 150 por sub-polo, aleatoriamente dentro do plantio utilizando o método de caminhada em “W” e levando em consideração apenas as plantas que apresentavam sintomas em folhas jovens, aproximadamente no mesmo estágio de desenvolvimento. As amostras compostas (folíolos de vários ramos) por planta foram coletadas com o uso do podão. Todos os pontos de coleta foram georefenciados e as coordenadas geográficas por planta amostrada estão na Tabela 2. As amostras assim obtidas foram colocadas em sacos de papel, identificadas, armazenadas em caixa de isopor e transportadas para o laboratório de micologia do CEPEC para isolamento de *M. ulei*.

### Obtenção dos isolados

O isolamento foi realizado transferindo-se conídios presentes nas lesões em folíolos jovens, diretamente

para placas de Petri com o meio MC8 [água 20g, sacarose 10g, batata 250g, cloranfenicol 0,15 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g, treonina 0,25mg (1 $\mu\text{L}$  de solução estoque), triptofano 0,25g (1 $\mu\text{L}$  de solução estoque) e cloridrato de lisina 10mg (1 $\mu\text{L}$  de solução estoque) e água para completar 1L], com o pH ajustado para  $5 \pm 0,2$ , conforme metodologia descrita por Junqueira et al. (1984).

Para todas as amostras foram utilizadas três placas com meio de cultura, cada uma delas com três pontos de transferência. Em seguida as placas foram incubadas à temperatura de 24°C em luz constante (Figura 2).

Após o crescimento, fragmentos de  $0,3 \pm 0,1\text{cm}$  das bordas das colônias puras foram transferidos para tubos de ensaio com MC8 em quatro replicas por isolado, sendo levemente pressionados sobre uma perfuração feita no centro do meio para garantir a sua fixação. As placas foram mantidas em câmaras de germinação do tipo BOD (Biochemical Oxygen Demand) a temperatura de 24°C no escuro (Figura 3).

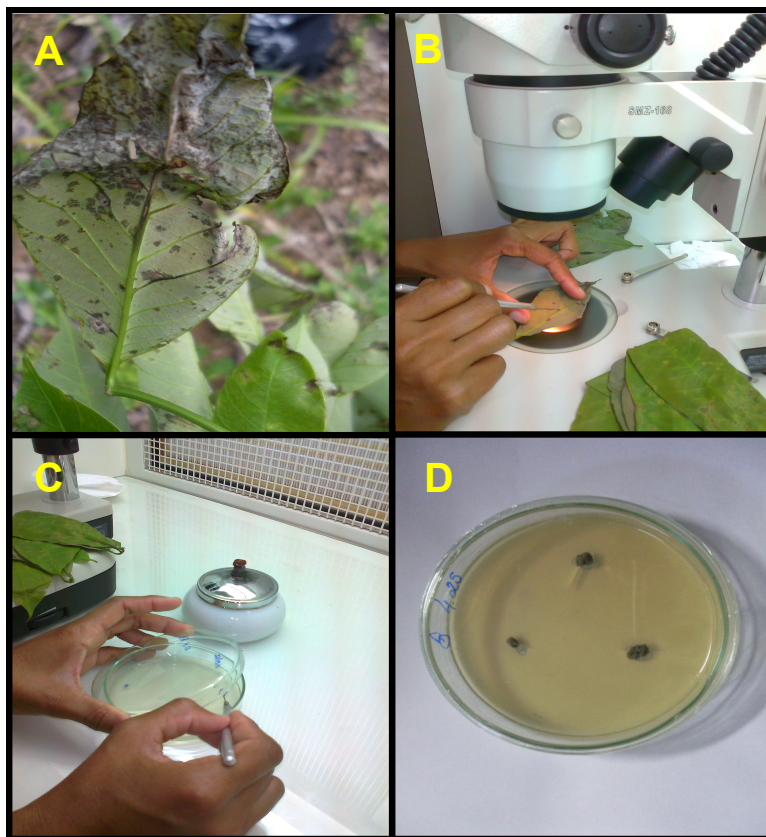


Figura 2 - Isolamento de *M. ulei*: A - folíolo jovem com lesões conidiais; B - captura de conídios em uma lesão no folíolo; C - transferência de conídios para placa de Petri contendo o meio MC8; D - colônias após 12 dias de incubação.



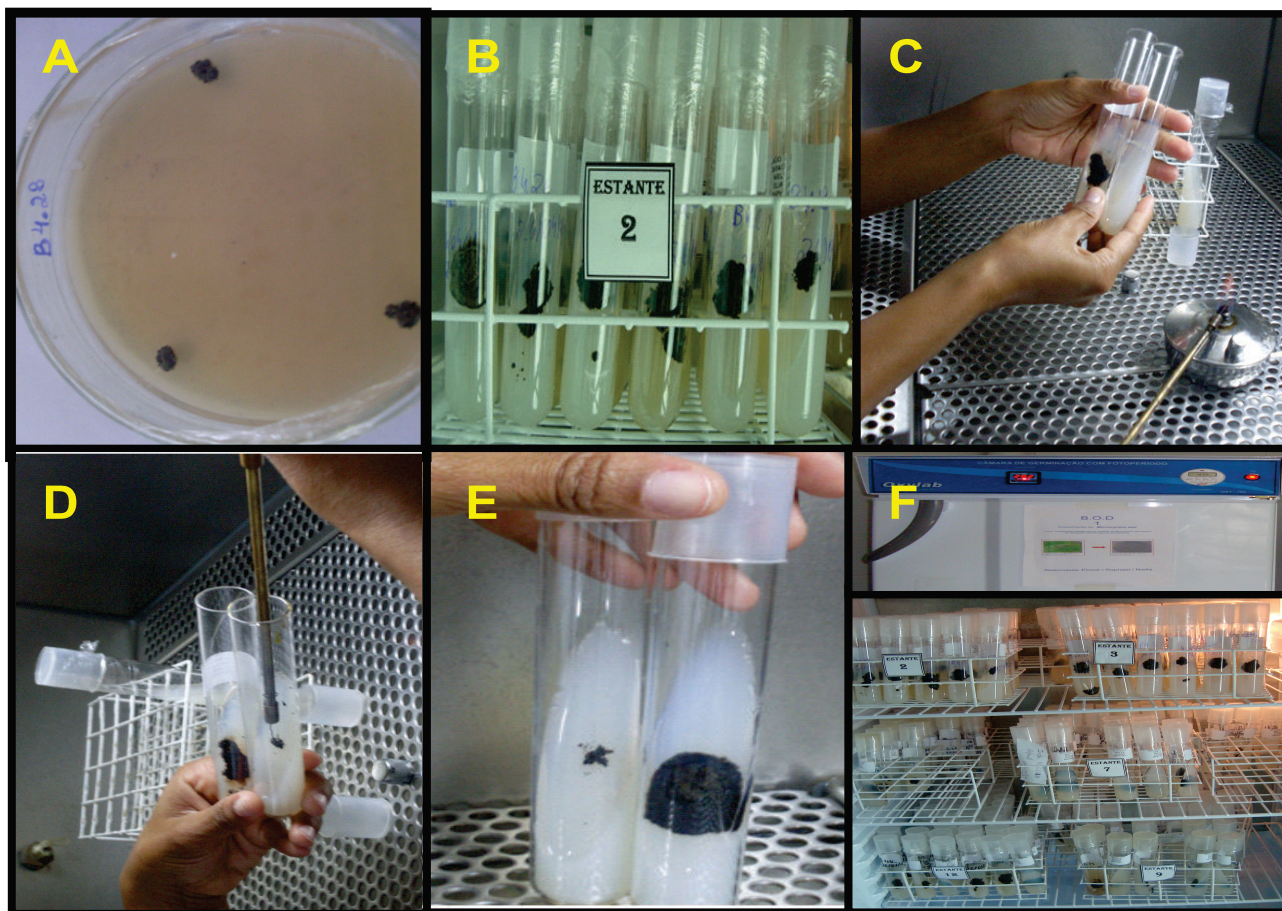


Figura 3 - Culturas de *M. ulei*: **A-B** colônias do fungo em placa e em tubo de ensaio; **C-D** replicagem para multiplicação do isolado; **E**- colônia original e replicada; **F**- armazenamento

Para identificação dos isolados utilizaram-se códigos compostos de letras e números que indicam o local de plantio e a fazenda de onde foram isolados, assim, todos os isolados com a mesma letra e número foram obtidos do mesmo plantio, a exemplo dos isolados B4.24B e B4.1B, onde o número subsequente refere-se ao número da árvore que foi georeferenciada e de onde as amostras de folíolos infectados foram coletadas.

## Resultado

Durante as coletas observou-se que o patógeno está disseminado nos sub-polos visitados, não sendo difícil encontrar plantas infectadas em todos eles. De 25 fazendas visitadas apenas em uma, conjunto Santa Rita, localizada no município de Itamarajú, não foram

encontradas árvores com sintomas do mal-das-folhas. Era um seringal ainda não produtivo, com aproximadamente três anos de idade.

O estágio de desenvolvimento da infecção nas plantas variou muito de local para local, o que impossibilitou as coletas em algumas fazendas no município de Eunápolis, pois as folhas já estavam no estágio de lixa. Nas amostras em que os folíolos não estavam no estágio inicial de infecção, fase conidial do patógeno, o procedimento de isolamento de *M. ulei* não obteve sucesso devido, principalmente, a contaminações.

As colônias do patógeno começaram a ficar visíveis no meio de cultura entre oito e 20 dias do isolamento e quando estabelecidas eram transferidas para tubos de ensaio com MC8 para evitar o ressecamento do meio nas placas e também contaminações. Após 20 dias,



quando não se notou crescimento nos pontos onde os conídios foram aderidos ao meio de cultura, as placas eram descartadas.

Foram processadas 515 amostras procedentes dos diferentes locais de coleta que resultaram na obtenção de 132 isolados sendo: 14 no SP1 (Ituberá e Igrapiúna), 52 no SP2 (Porto Seguro, Guaratinga e Eunápolis), cinco no SP3 (Itamarajú), 45 no SP4 (Uruçuca) e 16 no SP5 (Una) (Tabela 1). O melhor aproveitamento das amostras registrou-se no SP2 (64,2%) e no SP4 (49,5%), demonstrando que o sucesso nos isolamentos depende

da qualidade dos folíolos (jovens e com lesões novas) e da rapidez com que as amostras foram processadas. Para estes sub-polos o tempo entre a coleta e o processamento das amostras ficou entre 24 e 48 horas. Enquanto para os demais excedeu às 48 horas.

Menores números de isolados foram obtidos em amostras processadas com mais de 48 h de coleta em função das contaminações, pois embora acondicionados em sacos de papel e mantidos em caixas de isopor, os folíolos liberavam umidade nos sacos possibilitando a formação de ambiente propício ao desenvolvimento

de micélio de outros fungos presentes nas folhas ou de esporos que estavam no ar nos locais de coleta. Sugere-se que se faça o isolamento “*in loco*” nas próximas coletas em locais distantes.

Quanto à ocorrência da doença, foi possível notar que o maior percentual de plantas com sintomas visuais de *M. ulei* foi observado no município de Ituberá, enquanto que em Una, este percentual foi duas vezes menor. Atribui-se ao fato de que na região de Ituberá há uma maior variabilidade genética envolvida nos clones utilizados na formação dos plantios e isto muito provavelmente favoreceu uma maior adaptação ou o desenvolvimento de “raças fisiológicas” altamente virulentas (Junqueira et al., 1988).

Cento e trinta e duas culturas puras de *M. ulei* (Tabela 2) foram depositadas na micoteca do Cepec, representando, em parte, a diversidade da população do patógeno presente no pólo heveícola da Bahia.

## Discussão

A formação de uma coleção contendo isolados de locais os mais diversificados possíveis dentro de uma região é um importante passo para a realização de estudos sobre a diversidade de qualquer patógeno. No caso específico da presente pesquisa se buscou obter isolados de *M. ulei*, importante patógeno da seringueira, visando viabilizar estudos futuros.

Tabela 1 - Sub-polo, municípios, fazendas e números de amostras e isolados de *M. ulei*

Sub-polo	Município	Fazendas	Total de amostra	Total isolado
SP1	Ituberá	Pinha	29	0
		Primavera	14	8
		Lagoa Santa	26	1
		Canta Galo	30	0
		Morro Alto	29	5
Sub-total			128	14
SP2	Porto Seguro	Lucikátia	11	0
	Guaratinga	Nova Aurora	12	0
	Porto Seguro	Nascente	11	7
	Eunápolis	Bubalina	30	45
	Eunápolis	Batalha	17	0
Sub-total			81	52
SP3	Itamarajú	Estância e Prata	30	3
		Conjunto Amizade	26	2
		13 Pontos	11	0
		Conjunto Santa Rita	1	0
		Reserva Santa Helena	30	0
Sub-total			98	5
SP4	Uruçuca	Sempre Viva	22	9
		Dois de Ouro	30	13
		Reunidas Mucambo	4	6
		21 de Junho	14	7
		Divisão	21	10
Sub-total			91	45
SP5	Una	Bolandeira	12	2
		Estação Experimental (CEPLAC)	30	2
		Gislânia/Esmeralda	15	9
		Piruna	30	2
		Colônia Japonesa	30	1
Sub-total			117	16
Total			515	132

Tabela 2 - Isolado, sub-polo, município, clone, número e coordenadas geográficas das plantas de onde foram coletados os isolados de *M. ulei*

Isolado	Sup-polo	Município	Clone	Nº da planta	S/W*
1	SP1	Ituberá	Desconhecido	2.13	13°41.87' 39°09.50'
2	SP1	Ituberá	Desconhecido	2.14	13°41.86' 39°09.47'
3	SP1	Ituberá	Desconhecido	2.14	13°41.86' 39°09.47'
4	SP1	Ituberá	Desconhecido	2.5	13°41.85' 39°09.55'
5	SP1	Ituberá	Desconhecido	2.5	13°41.85' 39°09.55'
6	SP1	Ituberá	Desconhecido	2.5	13°41.85' 39°09.55'
7	SP1	Ituberá	Desconhecido	2.6	13°41.85' 39°09.54'
8	SP1	Ituberá	Desconhecido	2.6	13°41.85' 39°09.54'
9	SP1	Ituberá	Desconhecido	3.17	13°40.93' 30°10.49'
10	SP1	Ituberá	IAN 717	5.11	13°45.75' 39°16.37'
11	SP1	Ituberá	IAN 717	5.2	13°45.83' 39°16.33'
12	SP1	Ituberá	IAN 717	5.2	13°45.83' 39°16.33'
13	SP1	Ituberá	IAN 717	5.7	13°45.78' 39°16.35'
14	SP1	Ituberá	IAN 717	5.7	13°45.78' 39°16.35'
15	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.10	16°23.33' 39°30.13'
16	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.13	16°23.36' 39°30.14'
17	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.13	16°23.36' 39°30.14'
18	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.16	16°23.50' 39°30.15'
19	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.17	16°23.42' 39°30.13'
20	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.18	16°23.43' 39°30.12'
21	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.19	16°23.42' 39°30.09'
22	SP2	Eunápolis	RIMM 600	4.1	16°23.38' 39°30.01'
23	SP2	Eunápolis	RIMM 600	4.1	16°23.38' 39°30.01'
24	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.22	16°23.41' 39°30.07'
25	SP2	Eunápolis	Fx 986	4.24	17°23.41' 39°30.08'
26	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.24	16°23.41' 39°30.06'
27	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.24	16°23.41' 39° 30.06
28	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.25	16°23.39' 39° 30.08
29	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.25	16°23.39' 39°30.08'
30	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.25	16°23.39' 39°30.08'
31	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.26	16°23.38' 39°30.09'
32	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.27	16°23.39' 39°30.10'
33	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.28	16°23.38' 39°30.10'
34	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.28	16°23.38' 39°30.10'
35	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.28	16°23.38' 39°30.10'
36	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.28	16°23.38' 39°30.10'
37	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.29	16°23.37' 39°30.09'
38	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.29	16°23.37' 39°30.09'
39	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.29	16°23.37' 39°30.09'
40	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.29	16°23.37' 39°30.09'
41	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.29	16°23.37' 39°30.09'
42	SP2	Eunápolis	RIMM 600	4.2	16°23.40' 39°29.98'
43	SP2	Eunápolis	RIMM 600	4.2	16°23.40' 39°29.98'
44	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.30	16°23.37' 39°30.10'
45	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.30	16°23.37' 39°30.10'
46	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.9	16°23.32' 39°30.09'
47	SP2	Eunápolis	RIMM 600	4.4	16°23.38' 39°30.02'

Continuação Tabela 2

Isolado	Sup-polo	Município	Clone	Nº da planta	S/W*	
48	SP2	Eunápolis	RIMM 600	4.4	16°23.38'	39°30.02'
49	SP2	Eunápolis	RIMM 600	4.4	16°23.38'	39°30.02'
50	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.5	16°23.33'	39°30.08'
51	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.5	16°23.33'	39°30.08'
52	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.5	16°23.33'	39°30.08'
53	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.8	16°23.34'	39°30.10'
54	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.8	16°23.34'	39°30.10'
55	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.9	16°23.32'	39°30.09'
56	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.9	16°23.32'	39°30.09'
57	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.9	16°23.32'	39°30.09'
58	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.9	16°23.32'	39°30.09'
59	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.9	16°23.32'	39°30.09'
60	SP2	Porto Seguro	Desconhecido	3.11	16°23.87'	39°04.66'
61	SP2	Porto Seguro	Desconhecido	3.11	16°23.87'	39°04.66'
62	SP2	Porto Seguro	Desconhecido	3.2	16°22.82'	39°04.81'
63	SP2	Porto Seguro	Desconhecido	3.5	16°22.82'	39°04.83'
64	SP2	Porto Seguro	Desconhecido	3.5	16°22.82'	39°04.83'
65	SP2	Porto Seguro	Desconhecido	3.6	16°22.82'	39°04.82'
66	SP2	Porto Seguro	Desconhecido	3.7	16°22.82'	39°04.83'
67	SP3	Itamarajú	Desconhecido	1.20	16°57.06'	39°33.62'
68	SP3	Itamarajú	CDC 312	1.2	16°57.08'	39°33.64'
69	SP3	Itamarajú	CDC 312	1.2	16°57.08'	39°33.64'
70	SP3	Itamarajú	Desconhecido	2.18	17°00.69'	56°48.35'
71	SP3	Itamarajú	Pé franco	2.2	17°00.72'	40°48.69'
72	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2	14°26.61'	39°18.78'
73	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2	14°26.61'	39°18.78'
74	SP4	Uruçuca	Desconhecido	3	14°26.63'	39°18.80'
75	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5	14°26.64'	39°18.81'
76	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5	14°26.64'	39°18.81'
77	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5	14°26.64'	39°18.81'
78	SP4	Uruçuca	Desconhecido	1.14	14°31.05'	39°12.37'
79	SP4	Uruçuca	Desconhecido	1.14	14°31.05'	39°12.37'
80	SP4	Uruçuca	Desconhecido	1.16	14°31.05'	39°12.36'
81	SP4	Uruçuca	Desconhecido	1.2	14°31.06'	39°12.32'
82	SP4	Uruçuca	Desconhecido	1.2	14°31.06'	39°12.32'
83	SP4	Uruçuca	Desconhecido	1.2	14°31.06'	39°12.32'
84	SP4	Uruçuca	Desconhecido	1.3	14°31.15'	39°12.41'
85	SP4	Uruçuca	Desconhecido	1.3	14°31.15'	39°12.41'
86	SP4	Uruçuca	Desconhecido	1.5	14°31.01'	39°12.34'
87	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.15	14°32.29'	39°18.65'
88	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.15	14°32.29'	39°18.65'
89	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.16	14°32.31'	39°18.65'
90	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.18	14°32.32'	39°18.64'
91	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.18	14°32.32'	39°18.64'
92	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.20	14°32.31'	39°18.61'
93	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.22	14°32.31'	39°18.61'
94	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.22	14°32.31'	39°18.61'
95	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.23	14°32.30'	39°18.62'

Continuação Tabela 2

Isolado	Sup-polo	Município	Clone	Nº da planta	S/W*
96	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.23	14°32.30' 39°18.62'
97	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.23	14°32.30' 39°18.62'
98	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.30	14°32.26' 39°18.60'
99	SP4	Uruçuca	Desconhecido	1.16	14°31.05' 39°12.36'
100	SP4	Uruçuca	Desconhecido	4.11	14°28.11' 39°17.08'
101	SP4	Uruçuca	Desconhecido	4.13	14°28.11' 39°17.09'
102	SP4	Uruçuca	Desconhecido	4.13	14°28.11' 39°17.09'
103	SP4	Uruçuca	Desconhecido	4.1	14°27.97' 39°17.01'
104	SP4	Uruçuca	Desconhecido	4.1	14°27.97' 39°17.01'
105	SP4	Uruçuca	Desconhecido	4.5	14°27.95' 39°16.98'
106	SP4	Uruçuca	Desconhecido	4.5	14°27.95' 39°16.98'
107	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5.10	14°32.17' 39°23.54'
108	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5.11	14°32.16' 39°23.55'
109	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5.12	14°32.16' 39°23.55'
110	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5.15	14°32.13' 39°23.57'
111	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5.16	14°32.13' 39°23.57'
112	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5.16	14°32.13' 39°23.57'
113	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5.2	14°32.58' 39°23.32'
114	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5.3	14°32.58' 39°23.33'
115	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5.3	14°32.58' 39°23.33'
116	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5.5	14°32.59' 39°23.35'
117	SP5	Una	Desconhecido	1.26	15°17.52' 39°03.17'
118	SP5	Una	Desconhecido	1.29	15°17.52' 39°03.15'
119	SP5	Una	Desconhecido	3.13	15°17.45' 39°04.54'
120	SP5	Una	Desconhecido	3.3	15°17.46' 39°04.49'
121	SP5	Una	Desconhecido	5.27	15°15.59' 39°10.54'
122	SP5	Una	Pé franco	6.3	15°17.79' 39°04.68'
123	SP5	Una	Pé franco	6.3	15°17.79' 39°04.68'
124	SP5	Una	FDR 5788	7.3	15°17.53' 39°03.17'
125	SP5	Una	FDR 5788	7.4	15°17.52' 39°03.16'
126	SP5	Una	FDR 5788	7.4	15°17.52' 39°03.16'
127	SP5	Una	FDR 5788	7.4	15°17.52' 39°03.16'
128	SP5	Una	FDR 5788	7.4	15°17.52' 39°03.16'
129	SP5	Una	Pé franco	7.8	15°17.33' 39°03.09'
130	SP5	Una	Pé franco	7.8	15°17.33' 39°03.09'
131	SP5	Una	Pé franco	7.8	15°17.33' 39°03.09'
132	SP5	Una	CDC 312	7.1	15°17.57' 39°03.26'

\*S/W =Sul/Oeste.

Como a expressão dos sintomas do mal-das-folhas depende diretamente da idade dos folíolos e da suscetibilidade clonal, além do patógeno apresentar diferentes fases em seu ciclo de vida (Gasparotto et al., 1997), é necessário que, para realizar isolamento com sucesso, se tenha o cuidado de escolher no campo as folhas em estado adequado, tendo em vista os esporos que se pretende isolar. Em folíolos jovens, pós-

caducifolismo, que foram infectados por ascósporos, inóculo primário para infecção nos seringais (Holliday, 1970), formam-se lesões levemente escurecidas de formato circular angular, que causam enrugamento no limbo. Geralmente nessas lesões é possível observar uma massa de conídios (*Fusicladium macrosporum* J. Kuijper), verde-oliva ou cinza-escuro, com aspecto feltroso, muito fácil de diferenciar da fase de lixa,



comumente encontrada em folíolos maduros que apresentam aspecto áspero devido aos estromas, onde se formam primeiro a fase espermogonial e, depois, a fase pseudotecial, com ascos e ascósporos (Holliday, 1970). Portanto, a utilização da fase conidial para isolamento do patógeno, que consiste na transferência de conídios para meio de cultura em placa de Petri (isolamento direto), é essencial para a obtenção de maior número de isolados. O isolamento a partir de ascósporos é possível, porém, mais trabalhoso e demorado.

Gasparotto et al. (1997), já afirmavam que o isolamento de *M. ulei* deve ser feito com folíolos jovens, recém coletados, com lesões bem esporuladas e secas que estejam isentas de água de chuva, orvalho ou umidade proveniente de câmara úmida. Junqueira et al. (1984) atestam que para obter maior porcentagem de germinação de conídios é recomendável que se faça a inoculação e, ou, isolamento em meio de cultura o mais rápido possível.

No presente trabalho foi notado que quanto mais rápido foi o processamento das amostras maior foi o sucesso na obtenção dos isolados, tendo ocorrido mais contaminações nas amostras provenientes dos sub-polos mais distantes da sede ou que demoraram mais de 48 horas para serem processadas. Por este motivo, recomenda-se que, na impossibilidade de processar rapidamente as amostras em laboratório, que o isolamento seja tentado ainda no campo. Para tanto, improvisando as condições assépticas e transportando binocular estereoscópica e placas com meio de cultura para o próprio local da coleta.

O atraso no isolamento das amostras também pode causar perda na viabilidade dos conídios, embora, Holliday (1970), assegure que a habilidade de germinação dos conídios não decresça mais que 50% após dois ou três dias, desde que os conídios secos não sejam expostos diretamente à luz, mesmo que de baixa intensidade. O autor afirma também que sob condição experimental, após 10 dias de deposição em uma lâmina de vidro, no escuro e sob temperatura moderada, acima de 25% dos conídios germinaram. Em um outro estudo, Chee (1976) relatou que a formação de conídios em clones suscetíveis ocorre cinco a nove dias após a infecção.

Neste estudo, as amostras coletadas permaneceram no escuro durante todo o período de

transporte, porém estiveram expostas à luz durante o processo de seleção dos melhores folíolos e lesões para isolamento. Chee (1976) afirma que os conídios de *M. ulei* mantiveram-se viáveis por mais tempo quando as folhas com lesões foram mantidas em um dessecador. Esta precaução pode ser também adotada quando for necessário manter as folhas no laboratório até se ter certeza que a tentativa de isolamento resultou em sucesso, o que pode demorar em torno de 15 dias, conforme observado neste trabalho.

Atribuem-se às contaminações com outros fungos como a principal causa do baixo número de isolados obtidos (Tabela 1). É sabido que o *M. ulei* cresce muito vagarosamente em meio de cultura, independentemente do tipo de meio e das variações de pH, temperatura e regime de luz, conforme salientado por Holliday (1970); Chee (1978); Lieberei et al. (1983) e Junqueira et al. (1984).

É importante mencionar que dentre os municípios prospectados, apenas em Itamarajú não foi constatado plantas com sintomas do mal-das-folhas, pois o seringal em fase inicial de crescimento, com aproximadamente três anos de idade, não tinha adquirido o hábito de troca foliar, portanto não haviam folíolos jovens. Como se sabe, as seringueiras somente a partir do quarto ou quinto ano de idade passam a renovar as folhas a cada ano, ou seja, a apresentarem o fenômeno de caducifolismo (Gonçalves e Marques, 2008; Gasparotto et al., 1997). Portanto, este fato explica a ausência de folíolos jovens em quantidade suficiente para infecção, por conídios ou ascósporos provenientes de plantios adjacentes, uma vez que não existiam pseudotécios nas folhas de seringueira caídas ao solo até então.

A coleção constituída pelos 132 isolados resultantes destas coletas e mais 41 disponibilizados por Plantações Michelin da Bahia, representa um importante acervo para estudos com *M. ulei* no Sul da Bahia, pois, ela contém parte da diversidade da população deste fungo existente nas diferentes regiões produtoras de borracha da Bahia. Futuros estudos para detecção de raças fisiológicas visando resistência à doença, além de estudos epidemiológicos e fisiológicos, com este peculiar patógeno serão beneficiados pela existência dessa coleção de isolados de *M. ulei*.

## conclusões

Obteve-se uma micoteca representativa da diversidade do polo heveícola da Bahia para a continuidade da pesquisa.

O patógeno está amplamente disseminado nos sub-polos avaliados, porém em Ituberá encontrou-se o maior percentual de plantas infectadas e em Una o menor.

## Agradecimentos

Ao professor José Luiz Bezerra, pela ajuda da caracterização morfológica do patógeno e sugestões durante todo decorrer do trabalho; ao técnico Euvaldo Moura, pela valiosa ajuda nas coletas; aos pesquisadores Karina Peres Gramacho, Adonias de Castro Virgens Filho e José Raimundo Bonadie Marques, pelo estímulo na execução dos trabalhos; a CAPES e ao CNPq pelas bolsas concedidas ao primeiro e segundo autores, respectivamente; a UESC pela oportunidade do mestrado em Produção Vegetal e a CEPLAC/CEPEC por disponibilizar o Laboratório de Diversidade de Fungo para a realização de todo o trabalho.

## Literatura Citada

- ANUÁRIO ESTATÍSTICO. 1978. Anuário estatístico do Brasil, nº 23. Rio de Janeiro, RJ, SUDHEVEA. 58p.
- CECÍLIO, R. A. et al. 2006. Zoneamento agroclimático para a heveicultura na parte leste do Estado da Bahia. *Bahia Agrícola (Brasil)* 7(2):14-17.
- CHEE, K. H. 1976. South American leaf blight of *Hevea brasiliensis*: spore dispersal of *Microcyclus ulei*. *Annals of Applied Biology* 84:147-152.
- CHEE, K. H. 1978. South American leaf blight of *Hevea brasiliensis*: culture of *Microcyclus ulei*. *Transactions of the British mycological Society* 70(3):341-344.
- FURTADO, E. L. 1990. Comportamento decíduo da seringueira (*Hevea spp.*) e quantificação do mal-das-folhas causado por *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx. Tese de Mestrado. Piracicaba, SP, USP/ESALQ.
- GONÇALVES, P. de S.; MARQUES, J. R. B. 2008. Melhoramento Genético da Seringueira - Passado, Presente e Perspectivas de Futuro. In: Alvarenga, A. de P.; Carmo, C. A. F. de S. do, eds. *Seringueira*. Viçosa, MG, EPAMIG. pp. 399-498.
- GASPAROTTO, L. et al. 1997. Doenças da seringueira no Brasil. Brasília, DF, EMBRAPA.
- HOLLIDAY, P. 1970. South American Leaf Blight (*Microcyclus ulei*) of *Hevea brasiliensis*. *Phytopathological Papers* 12. Farnham Royal. CAB 1-31.
- HONORATO JUNIOR, J. 2010. Mal-das-folhas da seringueira: dinâmica de inóculo do patógeno, progresso e danos, em três condições topográficas. Dissertação Mestrado. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria>. Acesso em 06 de dezembro.
- JUNQUEIRA, N. T. V. et al. 1984. Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal-das-folhas da seringueira. *Revista Ceres (Brasil)* 1(177):322-331.
- JUNQUEIRA, N. T. V. et al. 1988. Reação de clones de seringueira a vários isolados de *Microcyclus ulei*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 23(8): 877-893.
- LIEBEREI, R. et al. 1983. Effect of cyanide on *Microcyclus ulei* cultures. *Journal Rubber Research Institute Malaysia* 31:227-236.
- MARQUES, J. R. B. et al. 2012. O cultivo do cacauzeiro em sistemas agroflorestais com a seringueira. In: Valle, R. R. *Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacauzeiro*. 2 ed. Itabuna, BA, Gráfica e Editora Vital Ltda. pp.337-465.

- MATTOS, C. R. R. et al. 2003. Variabilidade de isolados de *Microcyclus ulei* no Sudeste da Bahia. *Fitopatologia Brasileira* 28:502-507.
- ROCHA, H. M. 1972. Problema de enfermidades nos seringais da Bahia. In: *Seminário Nacional da Seringueira*. Cuiabá, Mato Grosso.



## **AVALIAÇÃO DE PROGÊNIES DE CLONES DE CACAUEIROS (SÉRIE CP) QUANTO À RESISTÊNCIA A *Moniliophthora perniciosa***

**Carolina Santos Benjamin<sup>1</sup>, Edna Dora M. N. Luz<sup>2</sup>, Wilson Reis Monteiro<sup>2</sup>, Lindolfo P. Santos Filho<sup>2</sup>, Wedisson Oliveira Santos<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz, km 16, Rod. Ilhéus-Itabuna, 45650-000, Ilhéus, Bahia, Brasil. <sup>2</sup>CEPLAC/CEPEC/, Caixa Postal 07, 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil. <sup>3</sup>Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs. Campus Universitário, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

O programa de melhoramento genético do cacaueiro (PMGC) conduzido pelo Centro de Pesquisas do Cacau (Cepec) tem como uma das estratégias desenvolver novas populações melhoradas, buscando associar caracteres desejáveis por meio da acumulação de genes relacionados à resistência do cacaueiro à vassoura-de-bruxa (VB), principal doença dessa cultura no Brasil. Visando identificar progênies resistentes e genitores com alta capacidade geral de combinação (CGC), 15 progênies foram avaliadas através de inoculação em casa-de-vegetação com  $1 \times 10^5$  basidiósporos  $\text{mL}^{-1}$  de *Moniliophthora perniciosa*. As plântulas foram oriundas de sementes de polinização aberta, de 13 clones da série CP, constituindo-se assim, famílias de meios-irmãos. De cada progênie foram inoculadas 56 plântulas, aos trinta dias de idade, e os sintomas foram avaliados diariamente até o 30º dia e aos 60 dias após a inoculação, determinando-se a percentagem de plântulas infectadas dentro de cada progênie. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com 15 tratamentos (13 clones + 2 testemunhas - SCA6 e ICS1) e 4 repetições de 14 plântulas cada, sendo o experimento repetido em duas épocas. Entre as 13 progênies, apenas a do clone CP 195 (TSH1188 x CCN51) mostrou-se suscetível, embora a porcentagem média de infecção tenha sido relativamente baixa (6,3 %). Progênies dos clones CP 84, 149, 421, 302, 306, 300, 309 e 431, apresentaram níveis de infecção inferiores à média, demonstrando a eficiência da seleção para resistência quando se realizou o intercruzamento de materiais com diferentes níveis de resistência à VB.

**Palavras-chave:** *Theobroma cacao* L., vassoura-de-bruxa, melhoramento genético, resistência.

**Evaluation of open pollinated progenies of cacao clones (series CP) for resistance to *Moniliophthora perniciosa*.** The cacao breeding program (PMGC) conducted by the Cacao Research Center (Cepec) has as one of its strategies to develop new improved populations, aiming to add desirable traits and to accumulate genes related to resistance to witches' broom (WB) the major cacao disease in Brazil. Aiming to identify resistant progenies and parents with high general combining ability (CGC), 15 progenies were evaluated by artificial inoculation using a suspension of  $1 \times 10^5$   $\text{mL}^{-1}$  basidiospores of *M. perniciosa*. Seedlings were obtained from open pollinated seeds of 13 selected clones of the CP series, considered as half-sib families. From each progeny 56 thirty day-old seedlings were inoculated. Symptoms were assessed daily until day 30 and at 60 days after inoculation. The percentage of infected plants within each progeny was determined. The experimental design was randomized blocks with 15 treatments (13 clones + 2 controls - ICS1 and SCA6) and 4 replicates of 14 plants each. The experiment was repeated twice. Among the 13 progeny tested only the one of clone CP 195 (TSH1188 x CCN51) was susceptible, although the average percentage of infection in plants inoculated within the entire experiment was relatively low (6.3%). The infection levels of progenies of clones CP 84, 149, 421, 302, 306, 300, 309 and 431 were below the average of the experiment, demonstrating the effectiveness of selection for resistance when accomplishing the intercrossing of clones with different levels of resistance to WB.

**Key words:** *Theobroma cacao* L., witches' broom disease, plant breeding, resistance.



## Introdução

O cacauzeiro é uma espécie perene que se desenvolve de forma espontânea nas planícies úmidas da América do Sul e Central (Cuatrecasas, 1964). Dentro do gênero, é a espécie economicamente mais explorada e um dos mais importantes cultivos perenes dos trópicos, sendo cultivado em todos os continentes (Purdy e Schmidt, 1996).

O maior impedimento à produção de cacau no Brasil é causado pelas doenças fúngicas e, dentre elas, a vassoura-de-bruxa (VB) é a mais importante (Almeida e Andebrhan, 1987; Luz et al., 1997), sendo causada pelo fungo basidiomicota, *Moniliophthora perniciosa* (ex *Crinipellis*) (Aime e Phillips-Mora, 2005). No Brasil, esta enfermidade é conhecida desde 1898, na Região Amazônica, com o nome de lagartão (Silva, 1987). Foi registrada pela primeira vez no Estado da Bahia em 1989, tendo representado um verdadeiro desastre para a produção cacauzeira do Estado, que até então correspondia a aproximadamente 84,5 % da produção nacional e 15 % da mundial (Pereira et al., 1989; Kimati et al., 1997).

O controle da VB envolve o uso integrado de técnicas culturais, aplicação de fungicidas e de produtos biológicos, como o Tricovab e principalmente o uso de cultivares resistentes (Luz et al., 2006; Oliveira e Luz, 2005). A resistência à doença é um componente essencial do programa de manejo integrado da VB. Uma das principais e das mais importantes fases do melhoramento para resistência a doenças é a identificação das fontes de resistência. No cacauzeiro, como em outras culturas, é desejável que tais fontes sejam encontradas em genótipos que possam ser explorados comercialmente por conterem características genéticas desejáveis e adequadas ao sistema de cultivo tradicionalmente utilizado na região (Rios-Ruiz, 2001). Muito da variabilidade encontrada na cultura, incluindo genes de resistência, provém da América do Sul, especialmente da bacia do Amazonas, suposto centro de origem da espécie (Paulin e Eskes, 1995).

Nesse sentido, o Centro de Pesquisas do Cacau (Cepec) tem desenvolvido estratégias focadas no manejo integrado da doença, incluindo, principalmente, a melhoria do nível de resistência e durabilidade das novas variedades comerciais (Silva et al., 2010). A resistência durável, conceitualmente, é aquela que se

mantém efetiva em dada variedade que é amplamente cultivada por longo tempo em ambiente favorável a doença (Johnson, 1983).

Dessa maneira, populações estão sendo desenvolvidas e testadas gerando a possibilidade de distribuir ao longo do tempo, genótipos que apresentem além do caráter resistência, associação de caracteres de importância genético-agronômica, como resistência a outras doenças, compatibilidade genética, alta produção, tamanho de frutos e sementes e qualidade de sementes (Monteiro et al., 2006; Monteiro e Ahnert, 2012).

Buscando atender as demandas de renovação das lavouras da região cacauzeira, dois tipos de populações-base foram desenvolvidos pelo Programa de Melhoramento Genético do Cacauzeiro (PMGC) no Cepec: as geneticamente não estruturadas e as estruturadas. As não-estruturadas foram formadas a partir de auto-fecundação de clones, retrocruzados e cruzamentos complexos, utilizando-se da diversidade encontrada em ensaios de híbridos, gerados em fases anteriores do PMGC. A proposta da criação destas populações não estruturadas é gerar plantas resistentes, autocompatíveis, com ampla base genética (Monteiro e Ahnert, 2012). Dentre os genótipos já selecionados entre estas populações, quatro da série CP já foram recomendados para plantio na região: CEPEC 2003 (CP37); 2004 (CP46); 2005 (CP55) e 2006 (CP50) (CEPLAC, 2002).

Dos métodos utilizados para identificação de genótipos resistentes à VB, a inoculação com basidiósporos do patógeno, em condições de casa-de-vegetação, tem gerado resultados satisfatórios. Inúmeras plântulas selecionadas por este sistema têm se mantido livres de sintomas em condições de campo, quando expostas as altas taxas de infecção natural por vários anos (Dias e Resende, 2001; Paim et al., 2006).

O clone CP195 é proveniente de um cruzamento entre TSH1188 x CCN51. O clone TSH1188 ("Trinidad Selected Hybrids") originou-se de cruzamentos envolvendo os clones IMC67, ICS1, SCA6 e P18. Produz frutos vermelhos e com rugosidade áspera (Cepec, 1987), é autoincompatível e apresenta resistência à VB (Luz et al., 1997; CEPLAC, 2002). O CCN51 ("Coleccion Castro Naranjal") é oriundo de uma planta F1 do cruzamento entre ICS95 x IMC67 cruzada com um clone nativo do oriente equatoriano

denominado “Canelos” (Bartley, 1986). Este clone produz frutos vermelho-arroxeados quando imaturos, passando a amarelo alaranjado quando maduros, com casca levemente enrugada e sementes com coloração interna púrpura clara, é autocompatível, possui resistência mediana à vassoura-de-bruxa e apresenta alta produtividade (Del Campo e Andia, 1997).

Os testes de progênes são importantes instrumentos para o trabalho dos melhoristas, sendo utilizados na seleção de indivíduos visando quantificar e maximizar os ganhos genéticos (Costa et al., 2008). Estudos indicam que o cacaueiro tem ampla variabilidade para a resistência poligênica a *Moniliophthora perniciosa*, dessa maneira a seleção e o cruzamento de genitores resistentes, resultam na acumulação de resistência do tipo durável. A seleção para a capacidade geral de combinação objetiva identificar os indivíduos com os maiores valores genéticos aditivos, sendo praticada por meio da seleção recorrente intrapopulacional (Dias e Resende, 2001).

Neste trabalho objetivaram-se: i) identificar progênes resistentes à VB e ii) identificar genitores para serem inseridos no PMGC. Ambos atributos a partir de plântulas obtidas de sementes de polinização aberta de 13 clones oriundos de cruzamentos controlados e em fase de seleção no PMGC do Cepec.

## Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos em laboratório e casa-de-vegetação da Seção de Fitopatologia do Centro de Pesquisas do Cacau (Cepec), situada na sede da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (Ceplac), em Ilhéus, BA.

### Material genético

Foram utilizadas sementes de polinização aberta de 13 clones da série CP, selecionados em duas áreas pertencentes à seção de genética da Ceplac/Cepec, para serem testados quanto à resistência à vassoura-de-bruxa em duas épocas: outubro de 2011 e janeiro de 2012. Os clones ICS1 e SCA6 foram incluídos como padrão de suscetibilidade e padrão de resistência, respectivamente. Cada clone, cuja progênie de polinização aberta foi utilizada neste experimento, foi oriundo de cruzamentos em 1ª e 2ª geração entre clones de interesse para o PMGC (Tabela 1).

Tabela 1. Genealogia dos clones da série CP

Clones	Cruzamentos de origem
CP79	TSA644 x CCN51
CP195	TSH1188 x CCN51
CP80	TSA644 x CCN51
CP84	TSA644 x EET390
CP149	TSA644 x CCN51
CP264	SCA6 x ICS1
CP278	TSA644 x ICS95
CP300	[SIC952 x SCA12] x TSH 516
CP302	[SIC952 x SCA12] x TSH 516
CP306	[SIC952 x SCA12] x [EET399 x RB30]
CP309	[SIC952 x SCA12] x [EET399 x RB30]
CP421	CSUL6 x [ICS95 x TSH565]
CP431	CSUL7 x [CCN51 x TSH1188]

Os frutos de cada clone foram selecionados dentre uma parcela com vinte plantas, sendo colhidos cinco frutos de forma aleatória, que foram devidamente identificados. As sementes destes frutos foram extraídas e misturadas para cada clone e pré-germinadas por 48h em serragem esterilizada umedecida. De cada clone foram plantadas 70 sementes em tubetes plásticos contendo aproximadamente 300g de terriço esterilizado. As plântulas foram mantidas em condições de casa-de-vegetação, com irrigação por 20 min, 2 vezes ao dia (8 e 16h), exceto em dias quentes, quando era realizada uma irrigação adicional às 12h, durante as quatro semanas que antecederam a inoculação.

### Obtenção do inóculo

Os basidiósporos de *Moniliophthora perniciosa* utilizados nas inoculações foram obtidos de vassouras secas colhidas na área experimental da Estação Experimental Arnaldo Medeiros, no Cepec. As vassouras foram levadas ao laboratório, desinfetadas com lavagens rápidas em hipoclorito de sódio a 1 %, etiquetadas e penduradas em condições de telado (vassoureiro), onde foram mantidas com um regime diário de 8h de molhamento e 16h de seca.

Os basidiomas maduros produzidos após o período de dormência foram retirados das vassouras, lavados sequencialmente em água destilada, em solução de estreptomicina a 1 % e mais duas vezes em água destilada. Posteriormente foram secos em papel absorvente. Dos basidiomas enxutos, retiraram-se os

píleos, com escalpelo e pinça, em seguida, os píleos foram fixados com vaselina pastosa (Silinol SG) em tampas de vidro, com o himênio voltado para baixo, sobre um béquer contendo uma solução de glicerina a 16 %, e sob agitação constante, de modo que, ao serem liberados, os basidiósporos caíam sobre a solução. A coleta de basidiósporos foi feita por um período de 20h. Os cálculos das concentrações de basidiósporos nas suspensões foram realizados por meio de um contador de esporos. As suspensões de basidiósporos foram então estocadas em nitrogênio líquido, acondicionadas em tubos criogênicos de 2 mL, até o momento de serem utilizadas, conforme metodologia descrita por Dickstein et al. (1987).

Antes de estocar, uma alíquota de 25  $\mu$ L de cada uma das suspensões de basidiósporos obtidas foi retirada e espalhada com bastão de vidro sobre a superfície do meio ágar-água a 2 %, em placas de Petri de 5 cm de diâmetro, para avaliar a germinação dos esporos. Decorridas 6h da incubação a 25 °C as placas foram retiradas e realizou-se a avaliação do número de basidiósporos germinados em 100 observados, para cada campo do microscópio ótico, determinando-se a partir daí a percentagem de basidiósporos germinados. Este procedimento foi realizado tanto no momento da estocagem como também 24h antes da inoculação, quando uma nova alíquota de 25  $\mu$ L foi coletada das suspensões estocadas, procedendo-se o teste de germinação para determinação da viabilidade do inóculo.

### Inoculação

Das 70 plântulas de cada clone, foram selecionadas em cada época de inoculação 56 plântulas que apresentavam uniformidade no crescimento e desenvolvimento da gema apical, para serem inoculadas. As plantas excedentes foram posteriormente descartadas.

Um dia antes da inoculação, as plântulas de cada material genético, já selecionadas pelo desenvolvimento da gema apical, tiveram o tamanho de suas folhas reduzido para 1/3, com o auxílio de uma tesoura, a fim de acelerar o crescimento apical e expor a gema apical à infecção, e foram levadas posteriormente para a câmara climatizada, onde foi realizada a inoculação, após 24 h nestas condições de ambiente.

No dia da inoculação, os tubos criogênicos contendo o inóculo foram retirados do nitrogênio líquido e seguiu o protocolo descrito por Dickstein et al. (1987). A concentração de inóculo foi ajustada para  $1 \times 10^5$  basidiósporos  $\text{mL}^{-1}$ . As suspensões de inóculo utilizadas nesse experimento apresentaram acima de 90 % de germinação.

As plântulas foram inoculadas manualmente, com uma micropipeta (Figura 1a), utilizando-se 30  $\mu$ L da suspensão do inóculo, na concentração de  $1 \times 10^5$  basidiósporos  $\text{mL}^{-1}$ , depositada na gema apical das plântulas. Após as inoculações as plântulas foram mantidas em câmara climatizada (Figura 1b), por 48 h, com temperatura de 25°C e 100 % de umidade relativa.

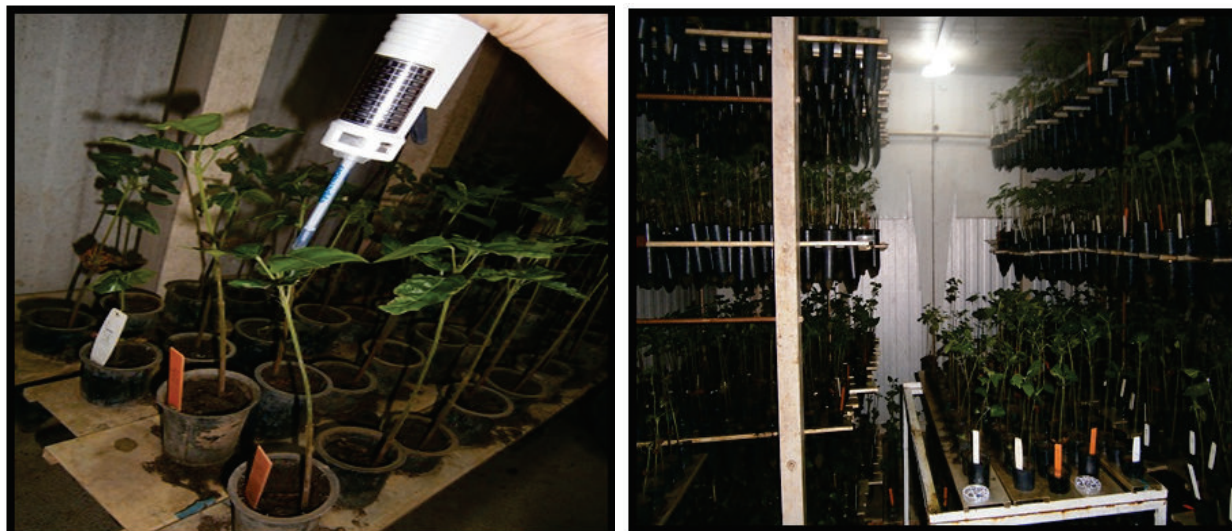


Figura 1. Inoculação das plântulas das progênes de cacaueiro avaliadas quanto a resistência a *Moniliophthora perniciosa*, 30 dias após a semeadura. a) Inoculação manual com micropipeta; b) Plântulas no interior da câmara úmida após a inoculação.

Em seguida foram transferidas para casa-de-vegetação sob condições ambientais e de irrigação controladas, até o final das avaliações.

### Delineamento, avaliações e análise dos dados

Foram testadas 15 progênies (13 dos clones + 2 controles), com 4 repetições de 14 plântulas cada, totalizando 56 plântulas de cada clone, perfazendo um total de 840 plântulas por experimento. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, em duas épocas: outubro de 2011 e janeiro de 2012.

As progênies foram avaliadas individualmente, a cada semana após a inoculação e, diariamente após o 15º dia de inoculação para registrar o aparecimento dos primeiros sintomas. Sessenta dias após a inoculação foram anotadas as plântulas que apresentaram vassouras. Para a análise dos dados, foram utilizados os escores 1 (presença) e 0 (ausência) de formação de vassoura.

Os procedimentos estatísticos foram realizados pelo programa SISVAR (Ferreira, 2008). As análises estatísticas avaliaram os efeitos de época, clone e bloco. As diferenças foram interpretadas por meio do teste F e o número médio de plantas infectadas por tratamento foi comparada pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

Os sintomas de infecção por *M. perniciosa* surgiram a partir dos 10º dia após a inoculação (DAI),

quando observou-se o intumescimento da gema apical. A formação de vassouras ocorreu aos 21 DAI. Este comportamento já havia sido observado por Surujdeo-Maharaj e Umaharan (2004) ao avaliarem a resistência à doença vassoura-de-bruxa (VB) em populações clonais e segregantes de *Theobroma cacao*, ressaltando que os sintomas mais precoces ocorrem normalmente nos materiais mais suscetíveis. Tal evidência foi sugerida como uma das variáveis para avaliação da resistência do cacaueiro à doença VB. Silva et al. (1998), também observaram a formação de vassouras em plântulas de cacaueiro a partir do 20º DAI, notando grande variedade de sintomas nas plântulas, após a 3ª e a 5ª semana da inoculação. É importante ressaltar que os clones CP 195, 80 e 278, que neste experimento apresentaram as maiores quantidades de plântulas infectadas, também foram os mais precoces no surgimento de sintomas de VB, em concordância com o estabelecido por Surujdeo-Maharaj e Umaharan (2004).

Evidenciou-se a existência de variação de resistência entre os materiais testados, embora tenha sido registrado um baixo nível de infecção no experimento, refletido no número médio de plântulas infectadas por *M. perniciosa* - 6,3 % (Figura 2). No entanto, deve-se levar em consideração que os materiais genéticos testado eram progênies de clones oriundos de cruzamentos cujos parentais foram selecionados por apresentarem bons níveis de resistência à vassoura-de-bruxa e outras características agrônomicas desejáveis.

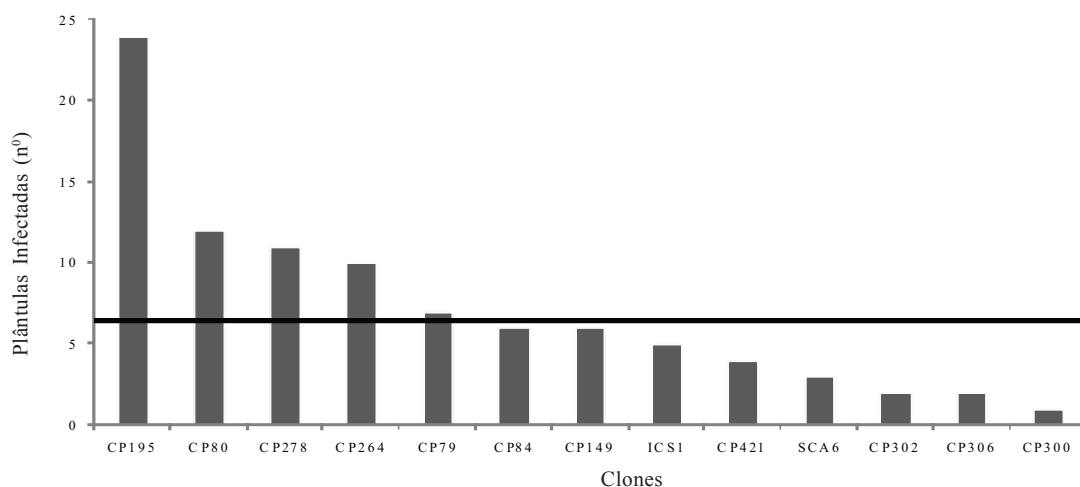


Figura 2. Infecção por *M. perniciosa* em diferentes clones, 60 dias após a inoculação ( $1 \times 10^5$  basidiósporos  $\mu\text{L}$ )



O clone CP 278 apresentou duas plântulas com vassoura do tipo axilar, enquanto o clone CP 195 apresentou quatro plântulas com vassoura desse mesmo tipo. Também, aos 20 DAI, o clone CP 84, apresentou duas plântulas infectadas por vassoura do tipo cotiledonar. Os clones CP 79 e CP 80 apresentaram os primeiros sintomas 23 DAI, com o surgimento de vassouras do tipo cotiledonar. O início dos sintomas no padrão de resistência utilizado nesse ensaio, SCA6, ocorreu aos 27 DAI, enquanto no ICS1, padrão de suscetibilidade, somente aos 30 DAI. A partir desse período, os demais clones também apresentaram sintomas de VB.

No experimento realizado em outubro/2011, houve predominância de vassouras do tipo cotiledonar (Figura 3a) e axilar, enquanto, no ensaio de janeiro/2012, prevaleceram as vassouras do tipo terminal (Figura 3b), provavelmente em função das condições climáticas.

De acordo com Silva et al. (2002), as inoculações artificiais na gema apical nos estádios de primeiro e segundo lançamentos foliares podem gerar muitos tipos de sintomas, entre eles, a presença de vassouras terminais e axilares, além de vassouras cotiledonares. Tais vassouras resultam de uma deformação na gema apical na forma de alongamento e engrossamento. Nos dois ensaios avaliados vassouras cotiledonares foram formadas predominantemente nos materiais genéticos CP 79, 84, 80, 431 e 309.

Como não houve diferença estatística entre as duas épocas em que o ensaio foi realizado, os dois ensaios foram analisados conjuntamente com 112 plântulas por progênie (56 de cada experimento), utilizando-se como variável a percentagem de plantas entre as 112 que apresentaram sintomas de VB após a inoculação (Tabela 2).

Sabe-se que o cruzamento interclonal entre TSH1188 x CCN51, segrega para diversas características, dentre eles a resistência à VB (Santos, 2007), entretanto, apesar do clone CP 195 possuir genitores resistentes à VB, nas inoculações artificiais em casa-de-vegetação a sua progênie, oriunda de polinização aberta, apresentou suscetibilidade em

Tabela 2. Análise de variância dos clones em relação à resistência à vassoura-de-bruxa, considerando conjuntamente as duas épocas (outubro/2011 e janeiro/2012)

FV	GL	QM
Época	1	3,812 <sup>ns</sup>
Clone	14	237,48 <sup>**</sup>
Bloco	3	158,08 <sup>ns</sup>
Erro	101	
Total	119	
CV (%)	154,58	
Média geral	0,7916	

\*\* Significativo a 5% pelo teste F. ns Não-significativo.



Figura 3. Sintomas de vassoura-de-bruxa, quatro semanas após a inoculação: A- vassoura cotiledonar, com encurvamento do caule da plântula em função do intumescimento e alongamento acima do nó cotiledonar; B- vassoura terminal, com intumescimento da gema terminal e formação posterior da vassoura axilar.



relação aos demais clones testados, isso pode ser um indicativo de que, apesar dos seus genitores possuírem genes de resistência no seu genótipo, não conseguiram transmitir esses genes para sua descendência. Em um estudo que identificou genótipos com alta capacidade geral de combinação quanto à resistência à VB, ficou comprovado que, embora seja resistente, o clone CCN51, não possui alta capacidade geral de combinação (Silva et al., 2010). Ressalta-se também que o presente experimento foi realizado com sementes provenientes de progênies de polinização aberta, o que certamente aumenta a diversidade genética nas plântulas geradas. É importante também lembrar, que o fato do clone ter sido gerado de um cruzamento, já implica em ampla diversidade para diferentes características, inclusive resistência à VB.

O clone CP 195 diferiu estatisticamente dos demais, apresentando a maior percentagem de plântulas infectadas (21,43 %). Já as progênies dos clones CP 80, 278 e 264, foram estatisticamente iguais, apresentando um número mínimo e máximo de plântulas infectadas entre 8,9 e 10,71 %, respectivamente, enquanto as progênies dos clones CP 79, 84, 149, 421, 300, 302, 306, 309 e 431, apresentaram menor incidência de vassoura, com mínimo de 0,89 % e máximo de 6,2 % de plântulas infectadas. Os padrões de resistência (SCA6) e de suscetibilidade (ICS1), não diferiram estatisticamente, sendo este um comportamento inesperado. Sugere-se que os frutos podem ter sido oriundos de polinização aberta e assim ter mistura com material genético resistente, o que teria mascarado a expressão de suscetibilidade do ICS1. Reforça esta hipótese o fato de o ICS1 ser considerado de reação intermediária em relação a doença VB, entretanto Silva (2009), encontrou uma progênie de ICS1 que mostrou-se altamente suscetível, quando comparada com o SCA6 e SIC23.

A utilização do SCA 6 como padrão de resistência se justifica, pois os clones Scavina são referências históricas de resistência (Pound, 1938, 1943; Bartley, 1994) e até recentemente constituíam a principal base das variedades indicadas para plantio comercial na Bahia (Pires, 2003). Entretanto, é sabido que devido à existência de variações do patógeno detectadas na Bahia, os clones Scavina e seus descendentes podem apresentar comportamento variável nas diversas

regiões, evidenciando a necessidade de aumentar as fontes de resistência em programas de melhoramento (Pires, 2003), tendo já sido comprovada a quebra da resistência nestes clones, desde 2005 (Paim et al., 2006). No entanto, nas inoculações realizadas ao longo do tempo em casa-de-vegetação, o seu comportamento de resistência tem sido mantido (Monteiro et al., 2006; Silva, 2009). No presente experimento o mesmo foi ainda observado, tendo a sua progênie demonstrado resistência quando apresentou apenas três plântulas com sintomas de vassoura-de-bruxa entre as 112 inoculadas.

Dentre as 15 progênies testadas, incluindo os dois controles, o número médio de plântulas infectadas no experimento corresponde a 6,3, representando um percentual de 0,79 % (ver linha na Figura 2). Sendo assim, as progênies dos clones CP 195, 80, 278, 264 e 79 apresentaram número de plântulas infectadas superiores à média do experimento, enquanto, outras 10 progênies, dos clones CP 84, 149, 421, 300, 302, 306, 309, 431, ICS1 e SCA6 tiveram percentagem de plântulas infectadas inferiores à média do experimento (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de plântulas com sintomas de vassoura-de-bruxa por progênie dos 15 clones avaliados, 60 dias após a inoculação com *Moniliophthora pernicioso*

Clone	% de Plântulas Infectadas
195	21,427
80	10,713
278	9,821
264	8,928
79	6,250
149	5,357
84	5,356
ICS1	4,463
421	3,570
SCA6	2,677
302	1,785
306	1,785
309	0,892
300	0,892
431	0,892
CV(%)	153,870

\*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).

Cinco clones (CP 300, 302, 306, 309 e 431) apresentaram uma baixíssima incidência de vassouras, com percentagem média de plântulas infectadas variando de 1,78 a 0,89 %. Este era um comportamento esperado, uma vez que descendem de materiais resistentes. Quatro desses materiais (CP 300, 302, 306 e 309) possuem genitores em comum, o SCA 12 e o SCA 6, que são amplamente conhecidos como resistentes à VB. Os clones 300 e 302 ([SIC952 x SCA12] x TSH516) possuem o genitor TSH 516, que é um clone oriundo de Trinidad, descendente também de SCA6, e que, apresentava alto nível de resistência a VB e excelente produtividade (Pinto e Pires, 1998).

Os clones CP 306 e 309, são descendentes de cruzamentos entre materiais resistentes, como exemplo o EET 399 que descende do SILECIA 1, uma clássica fonte de resistência, de acordo com Pires (2003), e o RB 30, um material proveniente de Rio Branco, no Acre, que apresenta resistência à VB (Wadsworth et al., 1997). Já o clone CP 431, tem em sua base genética genes de CCN51 x TSH1188, diferentemente do clone CP 195 que é descendente direto deste cruzamento e que, neste trabalho, não apresentou resistência a VB, teve ótimo desempenho com baixo nível de infecção por *M. perniciosa*. CP 431 possui o CSUL7 como um dos genitores. Diversos clones da série Cruzeiro do Sul foram considerados como resistentes por apresentarem baixa incidência da doença, quando se avaliou sob condições de infecção natural, à campo, no banco de germoplasma do CEPEC (Marita et al., 2001). No entanto, o CP 431, nas condições de inoculação em casa-de-vegetação, foi um bom genitor, pois transmitiu os seus genes de resistência para a sua descendência.

Diante dos resultados obtidos, confirma-se que pelo menos as progênes de oito dos 13 clones testados (CP 431, 309, 300, 306, 302, 421, 149, 84) apresentaram bons níveis de resistência à VB, e que, à exceção do CP 195, os seus genitores podem continuar a ser usados como fonte de resistência na composição das populações-base desenvolvidas pelo PMGC. Como o melhoramento para resistência a doenças tem se tornado prioritário em muitos países produtores de cacau, dentre eles o Brasil, estes resultados são importantes, pois direcionam a pesquisa para a seleção de genitores que poderão ser inseridos no PMGC e também oferecem subsídios aos melhoristas sobre o

comportamento dos mesmos em avaliação precoce, quanto à agregação de genes para resistência a esta importante doença do cacau.

## Conclusões

Os níveis de resistência variam entre as progênes de 13 clones de uma população base não estruturada da série CP.

Comprovou-se o sucesso da tentativa de acumular genes para resistência a *M. perniciosa* nas progênes desta população.

## Literatura Citada

- AIME, M. C.; PHILLIPS-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 (5):1012-1022.
- ALMEIDA, L. C.; ANDERBRAN, T. 1987. Recuperação das plantações de cacau com alta incidência de vassoura na Amazônia Brasileira. In: Conferência Internacional de Pesquisas em Cacau. Santo Domingo. Proceedings, Lagos, Cocoa Producers Alliance 10:337-339.
- BARTLEY, B. G. D. 1986. Cacau, *Theobroma cacao*. FAO Plant Production and Protection Paper 70: 25-42.
- BARTLEY, B. G. D. 1994. A review of cacao improvement. Fundamental methods and results. In: International Workshop on Cocoa Breeding Strategies. Proceedings. Kuala Lumpur, Malásia. 16p.
- COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA. CENTRO DE PESQUISAS DO CACAU. 1987. List of clones in the CEPEC. Ilhéus, BA. Computer printout from CEPEC.
- COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA - CEPLAC. 2002. Novas variedades clonais resistentes à vassoura-de-bruxa: recomendação varietal. Itabuna, BA.

- COSTA, R. B. et al. 2008. Variabilidade genética e seleção para caracteres de crescimento da seringueira. *Bragantia* (Brasil) 67(2):299-305.
- CUATRECASAS, J. 1964. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. National Herbarium Contribution (EUA) 35:377-605.
- DEL CAMPO, E. C.; ANDIA, F. C. 1997. Cultivo y beneficio del cacao CCN 51. Quito, Ed. El Conejo. 136p.
- DIAS, L. A. S.; RESENDE, M. D. V. 2001. Experimentação no melhoramento. In: Dias, L. A. S. Melhoramento genético do cacaueiro. Viçosa, MG. pp. 439-492.
- DICKSTEIN, E. R.; PURDY, L. H.; FRIAS, G. A. 1987. *Crinipellis perniciosa*, the cacao witches' broom fungus: Inoculum production and storage. *Phytopathology* 77:1747.
- FERREIRA, D. F. 2008. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium* (Brasil) 6:36-41.
- JOHNSON, R. 1983. Genetic background of durable resistance. In: Lamberti, F.; Waller, J. M.; Van Der Graaff, N. A. Durable resistance in crops. New York, Plenum Press. pp. 5-26.
- KIMATI, H. et al. 1997. Manual de Fitopatologia. 3ª ed. São Paulo, SP. Agronômica Ceres.
- LUZ, E. D. M. N. et al. 1997. Cacao (*Theobroma cacao* L.) Controle de doenças. In: Ribeiro do Vale, F. X.; Zambolim, L. Controle de doenças de plantas - grandes culturas. Viçosa, MG, v.2. pp.617-622.
- LUZ, E. D. M. N. et al. 2006. Vassoura-de-bruxa do cacaueiro: novos enfoques sobre uma velha doença. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* (Brasil) 14: 59-111.
- MARITA, J. M. et al. 2001. Analysis of genetic diversity in *Theobroma cacao* with emphasis on witches' broom disease resistance. *Crop Science* (USA) 41(4):1305-1316.
- MONTEIRO, W. R.; AHNERT, D. 2012. Melhoramento Genético do Cacaueiro. In: Ciência, tecnologia e manejo do cacaueiro. Brasília, DF. pp.11-30.
- MONTEIRO, W. R. et al. 2006. Population breeding activities in Brazil. In: Eskes, A. B.; Efron, Y. Global approaches to cocoa germoplasm utilization and conservation. 1ª ed. Itália, Roma. CFC/OCCO/IPGRI. v.1. pp.28-34.
- OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. 2005. Identificação e manejo das principais doenças do cacaueiro no Brasil. Ilhéus, BA, CEPLAC/CEPEC/SEFIT. 132p.
- PAIM, V. R. L. et al. 2006. Sources of resistance to *Crinipellis perniciosa* in progenies of cacao accessions collected in the Brazilian Amazon. *Scientia Agrícola* (Brasil) 63(6):572-578.
- PAULIN, D.; ESKES, A. D. 1995. Le cacaoyer: stratégies de sélection. *Plantations* (2):5-18.
- PEREIRA, J. L. et al. 1989. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. *Agrotropica* (Brasil) 1(1):79-81.
- PINTO, L. R. M.; PIRES, J. L. 1998. Seleção de plantas de cacau resistentes à vassoura-de bruxa. Ilhéus, BA, CEPLAC/CEPEC. *Boletim Técnico* nº 181. 35p.
- PIRES, J. L. 2003. Avaliação quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento do cacaueiro com ênfase na produtividade, qualidade de frutos e resistência a doenças. Tese Doutorado. Viçosa, MG, UFV. 220p.
- POUND, F. J. 1938. Cacao and witches' broom disease (*Marasmius pernicius*) of South America, with notes on other species of *Theobroma*. Report on a visit to Ecuador, the Amazon Valley and Colombia. Yulle's Printerie (Espanha) 58p.
- POUND, F. J. 1943. Cacao and witches' broom disease (*Marasmius pernicius*). Report on a recent visit to the Amazon territory of Peru. Yulle's Printerie. 14p.
- PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. 1996. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology and management. *Phytopathology* 34:573-594.
- RIOS-RUIZ, R. A. 2001. Melhoramento para resistência a doenças. In: Dias, L. A. S. Melhoramento genético do cacaueiro. Viçosa, MG. pp.439-492.

- SANTOS, R. M. F. 2007. Caracterização da resistência à vassoura-de-bruxa, do vigor vegetativo e de polimorfismos em microssatélites na população de cacaueiros derivada do cruzamento entre os clones TSH 1188 e CCN 51. Dissertação Mestrado. Ilhéus, BA, UESC. 63p.
- SILVA, F. S. 2009. Variabilidade patogênica de *Moniliophthora perniciosa* em três agrossistemas da região cacaueira baiana. Dissertação Mestrado. Ilhéus, BA, UESC. 67p.
- SILVA, P. 1987. Cacau e lagartão ou vassoura-de-bruxa: registros efetuados por Alexandre Rodrigues Ferreira nos anos de 1785 a 1787 na Amazônia. Ilhéus, BA, CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico nº 146. 21p.
- SILVA, S. D. V. M. et al. 2002. Redescrição da sintomatologia causada por *Crinipellis perniciosa* em cacaueiro. *Agrotrópica (Brasil)* 14(1):1-28.
- SILVA, S. D. V. M. et al. 2010. Parents selection for cocoa resistance to witches' broom. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45:680-685.
- SILVA, S. D. V. M.; LUZ, E. D. M. N.; MATSUOKA, K. 1998. Seleção das variáveis na avaliação de progênies de cacaueiro (*Theobroma cacao*) quanto à resistência à *Crinipellis perniciosa*. *Agrotrópica (Brasil)* 10(2):87-94.
- SURUJDEO-MAHARAJ, S.; UMAHARAN, P. 2004. Assessment of resistance to witches' broom disease in clonal and segregating populations of *Theobroma Cacao*. *Plant Disease* 88(8):797-803.
- WADSWORTH, R. M. et al. 1997. International Cocoa Germplasm Database. London International Financial Futures and Options Exchange/ The University of Reading, Reading.

●

## APLICAÇÃO DE NITROGÊNIO E POTÁSSIO VIA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO NO CRESCIMENTO DE MUDAS CLONAIS DE CACAUEIRO

*Adriana Ramos<sup>1</sup>, George Andrade Sodré<sup>1,2</sup>, Paulo César Lima Marrocos<sup>1,2</sup>, José Olímpio de Souza Júnior<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>UESC, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, km 16, 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil.  
aramosmendes@gmail.com

<sup>2</sup>CEPLAC/CEPEC/SENUP, Caixa Postal 07, 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil.

Problemas de baixa qualidade em mudas de cacau, tais como toxidez de ferro e necessidade de calibração do fósforo e baixo enraizamento podem estar associados a fatores que ocorrem independentemente (substratos, vigor da estaca e características do ambiente de enraizamento e crescimento) ou ao seu somatório. Entre esses fatores destaca-se o manejo da irrigação e a adubação. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de doses de nitrogênio e potássio, aplicadas via água de irrigação no crescimento de mudas clonais de cacau. O estudo foi conduzido em casa de vegetação do Instituto Biofábrica de Cacau, localizada no município de Ilhéus - BA. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e três repetições, sendo cada tratamento composto por diferentes doses de N e K, mantendo-se o fósforo constante, correspondendo às seguintes relações (NPK): T1 = testemunha, sem adubação; T2 = 7,4:7:13,8; T3 = 14:7:20; T4 = 20,8:7:28; T5 = 27:7:32. As respostas das mudas de cacau aos tratamentos foram avaliadas pela retirada de 5 plantas de cada tratamento, em intervalos de 30 dias para a obtenção da massa de matéria seca total, massa seca de raiz e análise de nutrientes na planta. Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na altura e número de folhas das mudas em função das doses de nitrogênio e potássio. Os teores dos nutrientes na matéria seca foliar variaram entre as épocas de amostragem. A relação 20,8:7:28 (NPK) referente ao tratamento 4 proporcionou melhores resultados até os 4 meses.

**Palavras-chave:** *Theobroma cacao*, clones, fertirrigação

**Application of nitrogen and potassium via irrigation water on growth of clonal cocoa seedlings.** Losses in cocoa seedlings may be associated with a number of factors that occur independently (substrates, cutting force and rooting characteristics and growth environment) or linked, between these factors may be the management of irrigation and fertilization. The aim of this study was to evaluate the effects of nitrogen and potassium doses applied in fertirrigation on the growth of cocoa seedlings. The study was carried in a greenhouse of the Institute Biofactory Cacao, located in the city of Ilhéus - BA. The experimental design was completely randomized with five treatments and three replications, each treatment consisting of different doses of N and K, corresponding to the following relations (NPK): T1 = control, no fertilization, T2 = 7, 4:7:13,8; T3 = 14:7:20; T4 = 20,8:7:28; T5 = 27:7:32. The P doses was keeping constant. The cocoa seedlings responses to the treatments were evaluated in five plants of each treatment every 30 days to obtain the dry weight, root dry weight and nutrient analysis in leaves. There were significant differences ( $P < 0,05$ ) in height and number of leaves of seedlings according to the levels of nitrogen and potassium. The nutrient content in the leaf dry matter varied between sampling times. The ratio 20,8:7:28 (NPK) was the treatment that provided better results after 4 months.

**Key words:** *Theobroma cacao*, clones, fertirrigation



## Introdução

O cultivo comercial do cacaueteiro no Brasil ocorre desde o final do século XIX e se estende por nove estados, dentre os quais, se destaca o da Bahia, o Espírito Santo e também a região Amazônica (Rondônia, Pará e Roraima). Entretanto, desde meados da década de 80 do século passado, o cacauete vem diminuindo significativamente sua participação na pauta do Agronegócio brasileiro. Nesse contexto, as lavouras passam atualmente por sérias dificuldades culminando com a redução drástica da produção, particularmente na Bahia, onde se concentra 65% da produção nacional.

Problemas fitossanitários fizeram com que nos últimos anos houvesse morte de plantas e consequente redução de stands e comprometimento da produção. Deve-se ressaltar a agressividade de doenças fúngicas nas plantações da região, com destaque para a podridão parda (*Phytophthora* spp) e vassoura-de-bruxa (*Monilophthora perniciosa*).

A recuperação e modernização da cacauicultura brasileira passa pela adoção de novos plantios e principalmente, da utilização de variedades clonais resistentes as enfermidades (Lima et al., 2001). Segundo Rosa (1998), esta é uma das estratégias adotadas pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira CEPLAC e tem como base o fato de que por meio da multiplicação assexuada é possível transmitir todo o potencial genético de uma planta aos seus descendentes.

Mudas clonais de cacaueteiros produzidas pelo método da estaquia permanecem de 5 a 6 meses no viveiro até que se encontrem em condições de atender a padrões que as caracterizam como ideais para plantio (Sodré e Marrocos, 2009). Entretanto, existem situações em que as perdas de material enraizado podem atingir até 60%, as quais estão associadas a fatores que ocorrem independentemente ou em conjunto. Entre esses fatores destaca-se o manejo da irrigação e a adubação das mudas.

A fertirrigação se destaca como alternativa eficiente e econômica, principalmente quando comparada com técnicas convencionais de aplicação, porque maximiza o uso do equipamento de irrigação reduzindo o custo de aplicação de produtos químicos. Contudo, para aumentar a eficiência de um programa de fertirrigação

são necessários três cuidados: o controle da irrigação para manter as condições hídricas ideais para a cultura, o conhecimento do nutriente a ser aplicado e o conhecimento das necessidades da cultura para cada nutriente.

Matos (1972) trabalhando com regimes de irrigação em cacaueteiros jovens aplicou os tratamentos: a) irrigação com base na evaporação diária do tanque classe A (TCA); b) irrigação após a evaporação de 10 mm de água; c) irrigação após a evaporação de 20 mm de água. Esse autor concluiu que o melhor regime para induzir o crescimento radicular foi obtido com a irrigação diária na qual as plantas obtiveram maior taxa de produção de matéria seca, diferenciando-se significativamente dos demais regimes.

Gavade (1969) estudou o efeito da umidade do solo sobre a difusão do oxigênio e o uso da água pelo cacaueteiro e observou que o teor de umidade do solo exercia influência sobre a taxa de difusão de oxigênio, a temperatura do solo, a taxa de consumo de água e o crescimento do cacaueteiro. Por outro lado, Miranda e Prado (1969) estudaram a influência da umidade disponível no aproveitamento de duas fontes de fósforo por plântulas de cacaueteiro, demonstrando que a absorção de nutrientes fosfatados está fortemente relacionada com a água disponível do solo. Esses autores também verificaram maior crescimento das plantas quando a umidade disponível do solo estava acima de 50%.

No enraizamento de estacas de cacaueteiro os controles da irrigação e umidade do ar são críticos. Isso ocorre porque a perda de água da folha pode reduzir o conteúdo de água das mudas a tão baixos níveis que elas podem não sobreviver. Para evitar que isso ocorra deve-se: a) manter uma atmosfera com baixa demanda evaporativa, minimizando as perdas de água das mudas por transpiração, evitando déficit hídrico nos tecidos; b) manter a temperatura aceitável para o metabolismo de regeneração na base da estaca, evitando com isso o stress das folhas pelo calor e c) manter níveis adequados de luz para fotossíntese e produção de carboidratos, sem causar stress hídrico (Hartmann et al., 1997).

Além do controle da irrigação, o desenvolvimento de um programa de fertilização permite o aumento da eficiência no uso de fertilizantes (Kalil, 1992; Shani, 1981) e da água (Shani, 1981), menor perda por

lixiviação (Hartz e Hochmuth, 1996) e melhor distribuição do adubo para as plantas, além do aumento de produção (Kalil, 1992).

A fertirrigação bem conduzida na produção de mudas de cacaueteiro poderá promover uma melhoria na eficiência do uso da água e fertilizantes; maior flexibilidade no tempo de aplicação de fertilizantes; reduzir as flutuações da salinidade no substrato devido aos fertilizantes e ainda permitir o crescimento vegetativo sem restrições hídricas e nutricionais para a planta. Para o caso de mudas enraizadas, a fertirrigação deve ser feita tanto durante o enraizamento, quanto no crescimento e rustificação das mudas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de doses de nitrogênio e potássio, aplicadas via água de irrigação no crescimento de mudas clonais de cacaueteiros.

## Material e Métodos

O estudo foi conduzido em casa de vegetação do Instituto Biofábrica de Cacau (IBC), localizada no Povoado do Banco do Pedro no município de Ilhéus - BA. A região apresenta clima quente e úmido, sem estação seca, do tipo Af, com precipitação anual média entre 1.500 a 1.750 mm e precipitação média mensal de 50 a 100 mm (podendo chegar a 150 mm) (Koppen, 1936).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e três repetições, sendo cada tratamento composto por doses de N e K, mantendo-se o fósforo constante, correspondendo às seguintes relações (NPK): T1 = testemunha, sem adubação; T2 = 7,4:7:13,8; T3 = 14:7:20; T4 = 20,8:7:28; T5 = 27:7:32. O clone escolhido foi o CEPEC 2004.

As doses dos tratamentos foram definidas em função da solução estoque (2) de Hoagland e Arnon (1950). As fontes de nutrientes utilizadas foram o nitrato de potássio, nitrato de cálcio, uréia e MAP purificado.

Foram realizadas fertirrigações semanais totalizando 16 aplicações. As quantidades de N e K aplicadas por tubete são apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

Inicialmente foram estaqueadas 54 mudas por bandeja e aos 45 dias foi realizado um desbaste deixando 27 plantas/bandeja e 12 bandejas/tratamento.

Tabela 1 - Quantidade de N aplicadas por tubete

Fertilizantes	T1	T2	T3	T4	T5
	mg / tubete				
KNO <sub>3</sub>	0	0,30	0,45	0,64	0,80
CaNO <sub>3</sub>	0	0,20	0,42	0,42	0,42
MAP	0	0,10	0,10	0,10	0,10
Uréia	0	0,0	0,024	0,13	0,20
Total N	0	0,6	1,09	1,29	1,52

Tabela 2 - Quantidade de K aplicadas por tubete

Fertilizantes	T1	T2	T3	T4	T5
	mg / tubete				
KNO <sub>3</sub>	0	0,06	0,09	0,13	0,16
Total K	0	0,06	0,09	0,13	0,16

O substrato usado foi uma mistura de casca de Pinus e pó de fibra de coco na proporção volumétrica de (1:1). Foram usadas estacas herbáceas, coletadas na ponta de ramos plagiotrópicos, medindo 16 cm de comprimento. A base da estaca foi cortada transversalmente 2 mm abaixo de uma gema foliar e em seguida a primeira folha da base para o ápice foi reduzida à metade e as demais em 20% do tamanho original. Depois de tratadas na base com ácido indolbutírico (AIB) 6.000 mg kg<sup>-1</sup> misturado em talco, as estacas foram inseridas em tubetes de 288 cm<sup>3</sup> preenchidos com o substrato e conduzidas ao viveiro de enraizamento.

Aos 76 dias, quando as mudas encontravam-se enraizadas foram iniciadas as fertirrigações. Para aplicação de água, empregou-se um sistema de irrigação localizada (microaspersão) com micro emissores com vazão de 60 L h<sup>-1</sup> e Pressão de Serviço de 20 mca. O manejo da irrigação foi efetuado em função do método do tanque Classe A. A evaporação do Tanque Classe A foi medida diariamente e multiplicada pelo coeficiente do tanque de 0,8, para um tanque com bordadura de 10 m, área com umidade relativa maior que 70% e velocidade do vento inferior a 2 m s<sup>-1</sup> (Bernardo, 2009). As irrigações foram realizadas diariamente, aplicado 100% de Evapotranspiração de referência (ET<sub>o</sub>). A lâmina de irrigação média aplicada do período estudado foi de 4,5 mm.

Para verificar a quantidade de água aplicada, bem como a uniformidade de aplicação do sistema, foram colocados copos coletores com diâmetro de 6,4 cm instalados em bandejas ao lado de cada tratamento, totalizando 56 coletores por bandeja. O teste foi realizado sem vento durante 30 minutos. Os volumes foram coletados e o determinou-se o Coeficiente de Uniformidade de Distribuição, que foi de 95%. Para a injeção do adubo na água de irrigação foi utilizado um injetor Venturi.

Para proporcionar maior uniformidade de aplicação da solução, foi construída uma barra (de PVC) de 1,0 m onde foram colocados os mesmos modelos dos microaspersores presentes no sistema de irrigação do viveiro. A barra estava conectada ao sistema de irrigação por uma mangueira e conduzida por duas pessoas aplicando a solução sobre as mudas. Este sistema foi construído para evitar excesso de lixiviação de nutrientes, bem como, para evitar a deriva da solução pelo vento. Adicionalmente foram avaliadas semanalmente a condutividade elétrica (CE) e o pH da solução lixiviada dos substratos.

Aos 120 após o início do experimento foram retiradas plantas de 5 bandejas, correspondente a cada um dos 5 tratamentos que foram separados parte aérea e sistema radicular, sendo o material levado para estufa para obtenção da matéria seca. No material seco das folhas foram analisados os teores de N, P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn segundo metodologia descrita por Embrapa (1999).

Os resultados foram submetidos à análise de variância e regressão em função de doses de N e K. Foram aceitos os modelos que apresentaram coeficientes significativos a até 5% pelo Teste F e o maior coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$ ).

## Resultados e Discussão

A Figura 1A apresenta o pH e a CE da solução aplicada. Verifica-se que os maiores valores de pH foram obtidos para T1 (média de 7,7) que corresponde somente à água, sem adição de adubos, sendo esta uma água com elevada concentração de cálcio, segundo foi verificado pela análise química.

Na medida em que foi aumentada a fertirrigação ocorreu uma diminuição do pH da solução, resultado que pode ser atribuída ao efeito acidificante do íon amônio presente no MAP. Assim, os tratamentos T4 e T5 apresentaram menores valores de pH, em média de 6,6.

Efeito contrário ao pH ocorreu com a CE, verificando-se que os valores médios cresceram e variaram de 0,14, 0,83, 1,27, 1,44 e 1,65  $\text{dS m}^{-1}$ , para T1, T2, T3, T4 e T5, respectivamente (Figura 1B). Esses resultados podem ser inicialmente atribuídos à salinidade dos fertilizantes. Entretanto, considerando que a CE é um indicativo da concentração de sais ionizados na solução e da salinidade do substrato verifica-se que em relação ao acúmulo de sais os

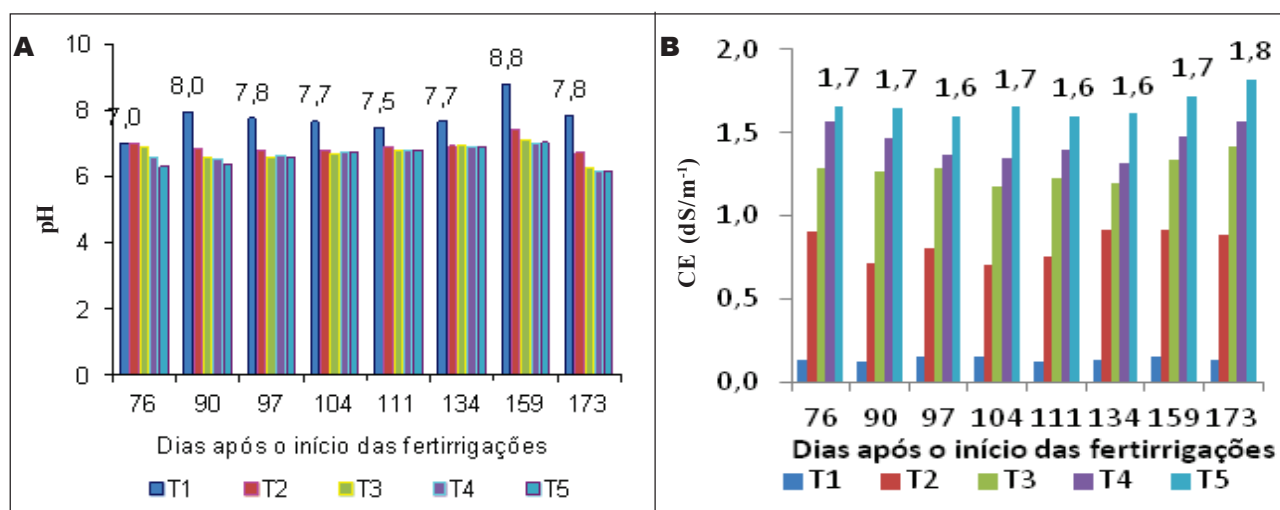


Figura 1 - pH e condutividade elétrica CE ( $\text{dS m}^{-1}$ ) da solução lixiviada nos tubetes.

valores observados sugerem não haver problemas de salinização mesmo para as maiores doses.

Deve-se também considerar a elevada capacidade que a FC (fibra de coco) tem de liberar íons Na e K e com isso contribuir para elevar a CE dos substratos o que não ocorreu nesse experimento. Nesse contexto, Sodré (2012) verificou que a CE da FC alcançou valor de 6,6 dS m<sup>-1</sup> esse valor é 3,3 vezes superior a 2,0 dS m<sup>-1</sup> que representa o limite superior de CE adotado por viveiristas para mudas de cacauzeiros.

Nas Tabelas 3 e 4 são apresentadas as equações de regressão para as variáveis em função do N e K aplicados. Verifica-se que o número de folhas (NF) e o comprimento do lançamento foliar (CL) foram as variáveis biométricas que responderam significativamente a adição de N enquanto que para o K apenas o número de folhas indicou diferenças entre as doses aplicadas.

Tabela 3. Equações de regressão para as características de crescimento de mudas de cacauzeiro em função de doses de N

Variável <sup>(1)</sup>	Equação de regressão	R <sup>2</sup>
MSR	$\hat{Y} = 0,9385 + 0,8477X - 0,5427X^2$	0,46 <sup>ns</sup>
MSPA	$\hat{Y} = 2,7028 + 1,1097X - 0,4795X^2$	0,11 <sup>ns</sup>
ALT	$\hat{Y} = 20,5074 + 11,3318X - 6,1475X^2$	0,88 <sup>ns</sup>
DC	$\hat{Y} = 0,4269 + 0,1396X - 0,0802X^2$	0,83 <sup>ns</sup>
NF	$\hat{Y} = 6,1842 + 1,4567X - 0,8468X^2$	0,96 <sup>*</sup>
CL	$\hat{Y} = 2,4345 + 4,27223X - 2,493X^2$	0,99 <sup>*</sup>

Variável: MSR: massa seca de raiz (g/planta); MSPA: massa seca de parte área (g/planta); ALT: altura (cm); DC: diâmetro do caule (cm); NF: número de folhas; CL: comprimento do lançamento foliar (cm).

Tabela 4. Equações de regressão para as características de crescimento de mudas de cacauzeiro em função de doses de K

Variável <sup>(1)</sup>	Equação de regressão	R <sup>2</sup>
MSR	$\hat{Y} = 0,9578 + 7,4527X - 47,775X^2$	0,53 <sup>ns</sup>
MSPA	$\hat{Y} = 2,7668 + 10,366X - 46,935X^2$	0,08 <sup>ns</sup>
ALT	$\hat{Y} = 20,5136 + 109,7746X - 518,7639X^2$	0,92 <sup>ns</sup>
DC	$\hat{Y} = 0,4283 + 1,327X - 7,5483X^2$	0,88 <sup>ns</sup>
NF	$\hat{Y} = 6,1842 + 13,5494X - 76,8231X^2$	0,99 <sup>**</sup>
CL	$\hat{Y} = 2,4652 + 38,097X - 213,342X^2$	0,92 <sup>ns</sup>

Variável: MSR: massa seca de raiz (g/planta); MSPA: massa seca de parte área (g/planta); ALT: altura (cm); DC: diâmetro do caule (cm); NF: número de folhas; CL: comprimento do lançamento foliar (cm).

As doses que correspondem ao ponto de máxima para NF e CL em função de doses de N e CL em função da dose de K foram respectivamente 0,86 e 0,85 e 0,088 mg/tubete.

Não se verificou efeito para a variável massa seca de raízes em função da aplicação dos tratamentos. Esse resultado é parcialmente corroborado por Hartmann et al. (1997) que não verificaram promoção de iniciação radicular como resposta   suplementação de nutrientes.

Os teores de Mg e Ca reduziram com o aumento da dose de K e depois cresceram relativamente a redução do K nas folhas. Essa redução do teor de magnésio decorrente da adubação com K   atribuída segundo Marschner (1995) a absorção competitiva entre esses elementos.

A Figura 2 apresenta os teores de nutrientes nas folhas para as análises realizadas após a fertirrigação.   possível verificar maior teor de nitrogênio (22,2 g kg<sup>-1</sup>) encontrado no tratamento 5. Esses valores encontram-se dentro da faixa dos teores recomendados para a folha do cacauzeiro (19 a 23 g kg<sup>-1</sup>) por Malavolta et al. (1997).

Em relação ao potássio, verificou-se que os teores na primeira amostragem não variaram e que o tratamento 4 apresentou o maior valor de K na folha (18,3 g kg<sup>-1</sup>), no entanto, este valor encontra-se baixo em relação ao encontrado em mudas de cacauzeiros por Sodré et al. (2012), entretanto na faixa média do recomendado para a cultura que é de 17 a 20 g kg<sup>-1</sup> (Malavolta et al., 1997).

Na segunda análise (30/12) o potássio obteve o mesmo comportamento que o nitrogênio e seus valores foram ainda menores, variando de 15,3 a 16,3, sendo este um indicativo de que a adubação potássica, mesmo para a maior dose (tratamento 5) foi insuficiente para suprir as necessidades da planta. Nesse contexto, deve-se ressaltar que aplicações maciças de adubo potássico podem levar a rustificação das mudas pelo efeito de incremento da resistência estomática evitando que a planta perca água demasiadamente em situações de stress.

Na análise inicial o teor de fósforo estava próximo (1,4 g kg<sup>-1</sup>) encontrava-se próximo a valores sugerido por Raij et al. (1997) para cacauzeiros por (1,75 - 1,8 g kg<sup>-1</sup>) e ao nível crítico (1,7 g kg<sup>-1</sup>) encontrado por Souza Junior et al. (2011) para mudas clonais. Entretanto, com as fertirrigações a quantidade de P nas folhas elevou-

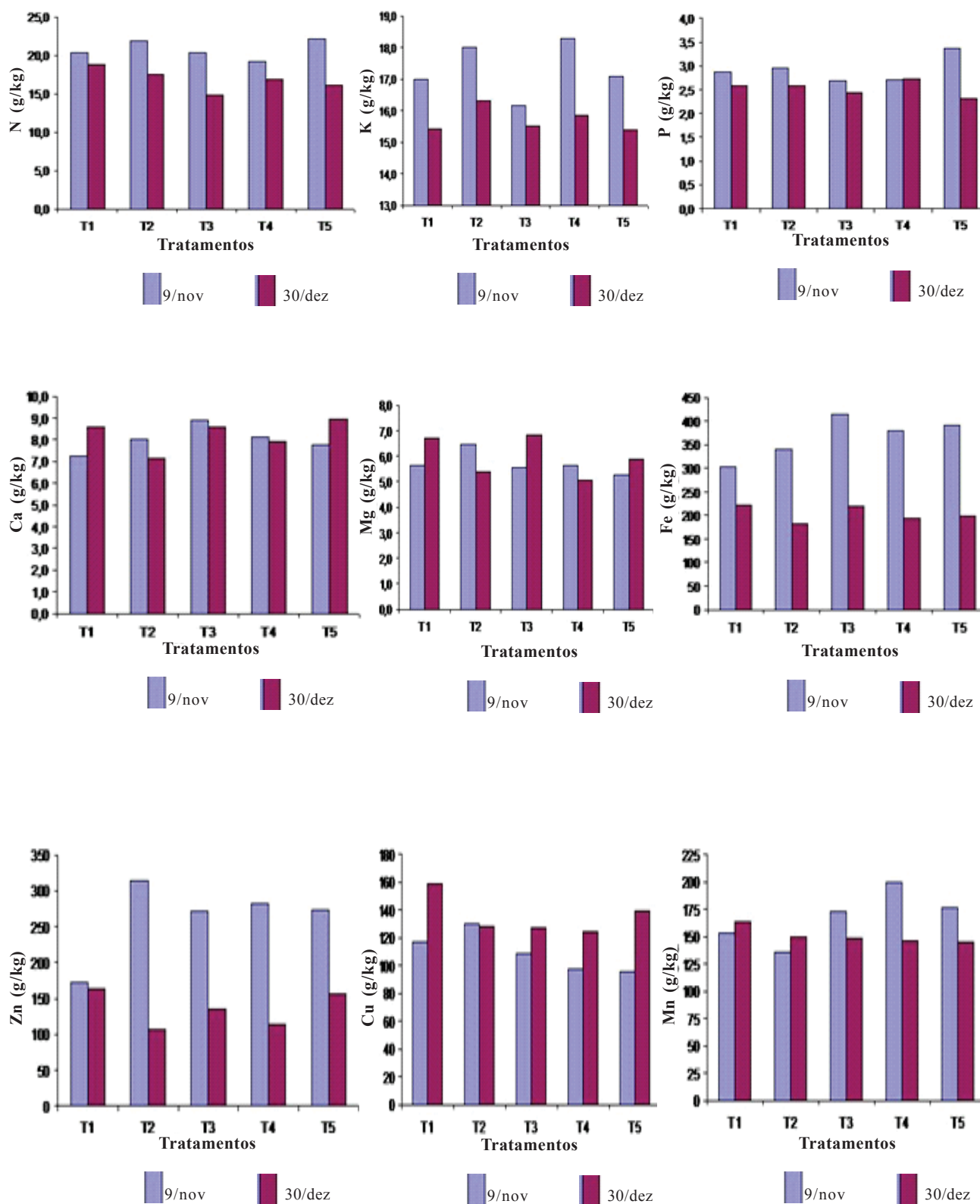


Figura 2 - (a) Teor de nitrogênio N, P, K, Ca, Mg, Cu, Fe Mn e Zn em folhas de mudas de cacaueiros.



se para 3,38 g kg<sup>-1</sup> no T5, nos demais tratamentos, que entre 2,6 e 2,9 g kg<sup>-1</sup>. Esses valores são superiores a 2,0 g kg<sup>-1</sup>, que é indicado por Malavolta (2006) como adequado para cacaueros adultos e sugerem que a quantidade de fósforo aplicada foi superior à necessidade da cultura.

Apesar de não terem sido feitas fertirrigações com micronutrientes, verificou-se que tanto os teores de ferro (Fe) quanto de zinco (Zn) estiveram acima dos valores recomendados para a cultura por Malavolta et al. (1997). Esses teores elevados são consequência da alta quantidade, principalmente de Fe, presentes em substratos a base de casca de Pinus e já foram observados em por Marrocos e Sodré (2004) como um problema associado à qualidade de mudas de cacaueros.

Em relação ao cobre é possível verificar que os teores também estavam muito altos além do recomendado para a cultura do cacau (10 a 15 mg kg<sup>-1</sup>). Esse resultado foi consequência de pulverizações com cobre realizadas visando o controle fitossanitário.

### Conclusões

Houve diferença significativa na altura e número de folhas das mudas em função das doses de nitrogênio e potássio.

Os teores dos nutrientes na matéria seca foliar variaram entre as épocas de amostragem.

A relação 20,8:7:28 (NPK) proporcionou melhores resultados até os 4 meses.

A quantidade de nitrogênio e potássio aplicada foi inferior à necessidade da cultura em todos os tratamentos.

### Literatura Citada

- BERNARDO, S.; SOARES, A. A.; MANTONVANI, E. C. 2009. Manual de Irrigação. 8ª ed. Viçosa, MG, UFV. 625p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. EMBRAPA. 1999. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica. 370p.
- GAVADE, S. A. 1969. Influence of soil moisture regimes on oxygen diffusion and water use by cacao. In: Conferencia Internacional de Pesquisa em Cacau, 2, Salvador. pp.431-435.
- HARTZ, T. K.; HOCHMUTH, G. J. 1996. Fertility management of drip-irrigated vegetables. Hort Technology 6(3):168-172.
- HARTMANN, T. H. et al. 1997. Plant propagation; principles and practices. Editora Prentice-Hall do Brasil. 6 ed. 770p.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. 1950. The water culture method for growing plants without soils. Berkeley, California Agricultural Experimental Station. 347p.
- KALIL, A. J. B. 1992. Comparação entre a adubação nitrogenada via fertirrigação por gotejamento e a aplicação convencional na produtividade da alface (*Lactuca sativa* L.). Dissertação Mestrado. Viçosa, MG, UFV. 57p.
- KOPPEN, W. 1936. Das Geographische System der Climate. In: Koppen, W., Geiger, R. eds. Handbuch der Klimatologie. Gebrüder Borntraeger, Berlin. 44p.
- LIMA, J. L. C. et al. 2001. Recomendações para o plantio de cacaueros propagados por estaquia. Ilhéus, BA, CEPLAC/CEPEC. 34p.
- MARSCHNER, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London. 889p.
- MATOS, A. 1972. Efeitos de diferentes substratos e regimes de irrigação sobre o desenvolvimento de mudas de cacaueros (*Theobroma cacao* L.). Dissertação Mestrado. Viçosa, MG, UFV. 49p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas. 2 ed. Piracicaba, SP, POTAFOS. 316p.
- MALAVOLTA, E. 2006. Manual de nutrição mineral de plantas. São Paulo, SP. Ceres (Brasil). 631p.
- MARROCOS, P. C.; SODRÉ, G. A. 2004. Sistema de produção de mudas de cacaueros. In: Encontro Nacional sobre Substrato para Plantas, 4, Viçosa. MG. Anais... Viçosa, MG, UFV. pp.283-311.

- MIRANDA, E. R.; PRADO, E. P. 1969. Influência de umidade disponível sobre o aproveitamento de duas fontes de fósforo por plântulas de cacau. In: Conferencia Internacional de Pesquisa em Cacau, 2. Salvador, BA. pp.476-479.
- RAIJ, B. Van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. 1997. Estimulantes. In: Raij, B. Van; Cantarella, H.; Quaggio, J.A.; Furlani, A.M.C., eds. Recomendação de adubação e calagem para o estado de São Paulo. Boletim Técnico nº 100. 2 ed. Campinas, Instituto Agrônômico de Campinas. pp.93-95.
- ROSA, I. de S. 1998. Enxertia do cacauzeiro. Ilhéus, BA, CEPLAC/CEPEC. 42p.
- SODRÉ, G. A.; MARROCOS, P. C. L. 2009. Manual da produção vegetativa de mudas de cacauzeiro. Ilhéus, BA, Editus. 46p.
- SODRÉ, G. A. et al. 2012. Extrato da Casca do Fruto do Cacauzeiro como Fertilizante Potássico no Crescimento de Mudas de Cacauzeiro. Revista Brasileira de Fruticultura 34:881-887.
- SOUZA JR, J. O.; CARMELLO, Q. A. C. 2011. Substrato e adubação fosfatada para a produção de mudas clonais de cacau. Revista Brasileira de Ciência do Solo 35: 151-159.
- SHANI, M. 1981. La fertilización combinada con el riego. Tel Aviv: Ministério da Agricultura, Servicio de Extensión. 36p.il.



## ASCOMYCOTA EM PALMEIRAS: NOVOS REGISTROS E NOVOS HOSPEDEIROS PARA O NORDESTE BRASILEIRO

*Nadja Santos Vitória<sup>1</sup>, Maria Auxiliadora Q. Cavalcanti<sup>2</sup>, Marcos Vinícius Oliveira dos Santos<sup>2</sup>,  
Michelline Lins Silvério<sup>3</sup>, José Luiz Bezerra<sup>4</sup>*

<sup>1</sup>Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Educação,  
Rua do Gangorra, 503, 48608-240, Bairro Alves de Souza, Paulo Afonso, BA, Brasil. nadjasv@hotmail.com;

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Micologia,  
Av. Prof. Nelson Chaves, s/nº, 50670-901, Recife, PE, Brasil;

<sup>3</sup>Universidade Federal do Vale do São Francisco, Centro de Ciências Agrárias, Rodovia BR 407, Km 12, Lote 543, Projeto de Irrigação Nilo Coelho, s/n, Vila C1, 56304-450 - Petrolina, PE, Brasil;

<sup>4</sup>Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa, 710, 44380-00, Cruz das Almas, BA, Brasil.

A micobiota peritecinal da serrapilheira de Arecaceae foi investigada durante os anos de 2008 e 2011 nos estados da Bahia e de Pernambuco, ao longo da costa nordestina. Os fungos *Byssosphaeria schiedermayeriana* e *Javaria samuelsii* (Pleosporales) e *Pemphidium zonatum* (Xylariales) são registrados pela primeira vez para a região Nordeste. *Coccostromopsis diplothemii* (Phyllachoraceae) e *Fasciatispora petrakii* (*incertae sedis*) são novos registros para o estado de Pernambuco, enquanto *Coccostromopsis palmicola* (Phyllachoraceae) é um novo registro para a Bahia. As palmeiras *Attalea funifera*, *Bactris acanthocarpa*, *Elaeis guineensis*, *Euterpe edulis*, *E. oleracea*, *Mauritia flexuosa*, *Polyandrococos caudescens* e *Syagrus botryophora* são registradas pela primeira vez como hospedeiras destes fungos.

**Palavras-chave:** Arecaceae, Mata Atlântica, serrapilheira, microfungos, taxonomia.

**Ascomycota in palms: new records and new hosts to Brazil Northeast.** The perithecial mycobiota of decaying litter of Arecaceae in Pernambuco and Bahia States along the Northeastern coast of Brazil was investigated during the years of 2008 and 2011. The fungi *Byssosphaeria schiedermayeriana* and *Javaria samuelsii* (Pleosporales) and *Pemphidium zonatum* (Xylariales) are first records to Northeastern Brazil. *Coccostromopsis diplothemii* (Phyllachoraceae) and *Fasciatispora petrakii* (*incertae sedis*) are new records to Pernambuco State, while *Coccostromopsis palmicola* (Phyllachoraceae) is a new record to Bahia State. The palms *Attalea funifera*, *Bactris acanthocarpa*, *Elaeis guineensis*, *Euterpe edulis*, *E. oleracea*, *Mauritia flexuosa*, *Polyandrococos caudescens* and *Syagrus botryophora* are newly assigned as hosts of these fungi.

**Key words:** Arecaceae, Atlantic Rainforest, litter, microfungi, taxonomy

## Introdução

A porção de floresta referida como Mata Atlântica do Nordeste compreende os estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí (Tabarelli et al., 2006). Do ponto de vista biogeográfico, a Mata Atlântica do Nordeste abriga quatro dos cinco centros de endemismo que ocorrem neste bioma; dois deles situam-se ao norte do Rio São Francisco: o Centro de Endemismo Pernambuco e os Brejos Nordestinos. Ao sul do Rio São Francisco estão os centros Diamantina e Bahia, os quais ocupam também pequenas porções dos estados de Minas Gerais e do Espírito Santo. Além do elevado número de espécies endêmicas, esses quatro centros estão entre as áreas mais ricas em espécies de toda a Mata Atlântica. O Centro Bahia é uma das porções mais ricas de floresta tropical do mundo; todavia, a Mata Atlântica do Nordeste e seus centros de endemismo representam um dos setores mais degradados do bioma, abrigando dezenas de espécies ameaçadas de extinção (Tabarelli et al., 2006).

O Nordeste é muito rico em palmeiras, com registro de 82 espécies (Lista de Espécies da Flora do Brasil 2012 in <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012>); no entanto, a micota associada com Arecaceae é pobremente conhecida. Durante pesquisas realizadas sobre microfungos associados com palmeiras nos estados da Bahia e de Pernambuco ao longo da Costa Nordestina (Vitória et al., 2008, 2010, 2011a,b, 2012a,b; Vitória, 2012; Souza et al., 2008), 81 espécies de Ascomycota foram identificadas. *Byssosphaeria schiedermayeriana* (Fuckel) M. E. Barr, *Javaria samuelsii* Boise e *Pemphidium zonatum* K. D. Hyde são novos registros para a região Nordeste. *Coccostromopsis diplothemii* (Rehm) K. D. Hyde & P.F. Cannon e *Fasciatispora petrakii* (Mhaskar & V.G. Rao) K. D. Hyde são novas ocorrências para o estado de Pernambuco e *Coccostromopsis palmicola* (Speg.) K. D. Hyde & P. F. Cannon um novo registro para a Bahia.

O objetivo desse trabalho foi contribuir para a expansão do conhecimento sobre os Ascomycota associados com palmeiras em áreas de extrema importância biológica. Nesta publicação são documentados e ilustrados novos registros e novos hospedeiros para o Nordeste Brasileiro.

## Material e Métodos

Folhas mortas de *Attalea funifera* Mart. ex Spreng., *Bactris acanthocarpa* Mart., *Elaeis guineensis* Jacq., *Euterpe edulis* Mart., *E. oleracea* Mart., *Mauritia flexuosa* L.f., *Polyandrococos caudescens* (Mart.) Barb. Rodr. e *Syagrus botryophora* (Mart.) Mart. foram coletadas nos municípios de: Cabo de Santo Agostinho (08°10'00" S e 35°02'30" W, 54m altitude), Recife (08°15'30" S e 35°57'00" W, 30m de altitude) e Tamandaré (08°43'55" S e 35°10'26" W, 95m altitude)/Pernambuco, Una (15°16'207" S e 39°05'532" W, 86m altitude) e Uruçuca (14°36'165" S e 39°16'608" W, 100m altitude)/Bahia. Os espécimes identificados foram herborizados e depositados nos Herbários URM (Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-Pernambuco) e CEPEC (Coleção Micológica do Centro de Pesquisas do Cacau). A análise topográfica do material coletado e as mensurações das estruturas macroscópicas foram feitas com auxílio de microscópio estereoscópico (Holtermann modelo LH-20/10x).

Após o exame, fragmentos das estruturas fúngicas foram montados entre lâmina e laminula, utilizando lactofenol como meio de montagem, com ou sem adição de corantes (azul de algodão ou fucsina ácida). Reagente de Melzer e KOH a 10% e 3% também foram utilizados. As preparações foram observadas ao microscópio de luz em diversos aumentos para caracterização das microestruturas do fungo, as quais foram medidas com auxílio de um micrometro ocular. As fotomicrografias foram feitas utilizando-se uma câmara digital (Cyber-shot 4.1 mega pixels). Utilizou-se literatura específica para identificação dos espécimes.

## Resultados e Discussão

**1. *Byssosphaeria schiedermayeriana*** (Fuckel) M.E. Barr, Mycotaxon 20(1): 34. 1984.

**Figuras 1, 7, 13, 19, 20.**

**Descrição:** Ascomas 440-550 × 430-560 µm, superficiais, solitários ou em grupos, com subículo de hifas marrons, ostiolados, com área do poro alaranjada.



Ascos 125-150 × 10-12,5 µm, cilíndrico-clavados, 8-esporos. Ascósporos 28-39 × 5-7 µm, hialinos quando jovens, tornando-se amarelos a marrons quando velhos, bicelulares, lisos, com pequenos apêndices mucilaginosos, 2-3 × 2-3,5 µm, em ambas as extremidades.

**Comentário:** Trata-se de *B. schiedermayeriana*, redescrito por Barr em 1984. O gênero *Byssosphaeria* foi anteriormente sinonimizado em *Herpotrichia* Fuckel; no entanto, Barr (1984) o reestabeleceu, sinonimizando muitos outros gêneros em *Byssosphaeria*. Essa classificação não é aceita por todos os micologistas, mas é seguida neste estudo. Barreto e Evans (1994) documentaram *B. schiedermayeriana* para a região sul do Brasil. Este é o segundo registro para o país e o primeiro para o Nordeste. A palmeira *E. guineensis* constitui novo hospedeiro para o fungo estudado.

**Distribuição:** Cosmopolita, incluindo: Alemanha, Argentina, Austrália, Birmânia, Brasil, Filipinas, Grã-Bretanha, Hong Kong, Itália, Japão, Malásia, Norte e Sul da África, Ásia, Taiwan.

**Substratos:** Madeira morta de plantas e outros substratos, incluindo: *Archontophoenix*, *Cocos*, *Elaeis*, *Rhapis*, *Trachycarpus* (Arecaceae), *Chromolaena* (Asteraceae), *Deutzia* (Hydrangeaceae), *Jussiaea* (Onagraceae).

**Material examinado - BRASIL.** BAHIA: Uruçuca, EMARC, em folhas mortas (raque) de *E. guineensis*, 18 mar. 2010, N.S. Vitória 108 (CEPEC 2272, URM 83498).

**2. *Coccostromopsis diplothemii* (Rehm) K.D. Hyde & P.F. Cannon, Mycol. Pap. 175: 63. 1999.**

**Figuras 2, 8, 14, 21.**

**Descrição:** Estromas em forma de losango na superfície da folha, anfigenos, carbonáceos, verrucosos, recobertos por uma camada de coloração amarelo enxofre, facilmente removida em KOH, ostiolados, irrompentes; em secção vertical 300-600 × 280-700 µm, subglobosos. Ascos 82,5-125 × 10-20 µm, cilíndrico-clavados, unitunicados, 8-esporos, parafisados. Ascósporos 15-25 × 7,5 µm, elipsóides a fusiformes, hialinos a amarelados, unicelulares, gutulados, bainha mucilaginosa não observada.

**Comentário:** O material foi identificado como *C. diplothemii* após comparação dos caracteres morfológicos das espécies afins (Hyde & Cannon, 1999). *Coccostromopsis diplothemii* já foi documentada para o Brasil nos estados de Minas Gerais e Sergipe. No país, os hospedeiros conhecidos são: *Bactris ferruginea* e *Bactris* sp. Este é o primeiro registro de *C. diplothemii* para o estado de Pernambuco sobre um novo hospedeiro, *B. acanthocarpa*.

**Distribuição:** Brasil, Cuba, República Dominicana, Guiana, Paraguai, Trinidad.

**Substratos:** *Allagoptera*, *Astrocaryum*, *Bactris*, *Diplothemium*, *Euterpe* e *Prestoea* (Arecaceae).

**Material examinado - BRASIL.** PERNAMBUCO: Recife, Parque Estadual Dois Irmãos, em folhas vivas de *B. acanthocarpa*, 03 nov. 2008, N.S. Vitória 117 (CEPEC 2281, URM 83505).

**3. *Coccostromopsis palmicola* (Speg.) K.D. Hyde & P.F. Cannon, Mycol. Pap. 175: 67.**

**Figuras 3, 9, 15, 22.**

**Descrição:** Lesões alongadas, de coloração marrom-claras, com estromas ascígeros 0,6-1,3 mm diâmetro, negros, anfigenos, de textura macia, 1-vários lóculos, superfície verrucosa, subglobosos, isolados ou em linha, com base truncada e fracamente aderidos à superfície do hospedeiro. Ascos 100-146 × 16-30 µm, cilíndrico-clavados, unitunicados, 8-esporos. Ascósporos 18-28 × 8-14 µm, hialinos quando imaturos, marrom-claros quando maduros, dísticos, elipsóides a ovóides, com extremidades arredondadas, lisos, unicelulares, com bainha mucilaginosa. Anamorfo presente na folha, com conidiomas 0,2-1 mm diâmetro, negros, pulvinados, podendo formar extensos lóculos na parte superior do estroma ascígero. Picnídios 30-38 × 4-6 µm, hialinos, fusoides.

**Comentário:** O fungo estudado é morfológicamente semelhante a *C. palmicola*, documentado para o Brasil no Distrito Federal, na Paraíba, em Sergipe e no Rio de Janeiro (Hyde & Cannon, 1999). Este é o primeiro registro para o estado da Bahia sobre um novo hospedeiro, *A. funifera*.

**Distribuição:** Argentina, Brasil e Paraguai.

**Substratos:** *Attalea* (Arecaceae), *Allagoptera* (Arecaceae), *Butia* (Arecaceae), *Cocos* (Arecaceae), *Diplothemium* (Arecaceae).

**Material examinado - BRASIL.** BAHIA: Uruçuca, Parque Estadual da Serra do Conduru, em folhas vivas de *A. funifera*, 18 mar. 2009, J.L. Bezerra 616 (CEPEC 992).

**4. *Fascistispora petrakii*** (Mhaskar & V.G. Rao) K.D. Hyde, Nova Hedwigia 61(1-2): 255. 1995.

**Figuras 4, 10, 16, 23, 24.**

**Descrição:** Ascomas em secção vertical 150-200 × 90-192,5 µm, subglobosos, imersos, com ostíolo central, perfisados. Ascospores 80-100 × 10-14 µm, unitunicados, 8-esporos, cilíndricos, curto-pedicelados, com um anel apical I<sup>+</sup>, 3 × 1-2 µm, discoide, parafisados. Ascospores 12-16,5 × 5-7 µm, unicelulares, marrons, com uma faixa hialina equatorial, elipsóides a ovóides, lisos, bainha mucilaginosa observada apenas nos ascospores ainda nos ascospores.

**Comentário:** As coleções foram identificadas como *F. petrakii* de acordo com a chave de Hyde (1995). Na literatura, os hospedeiros previamente listados para *F. petrakii* são da família Arecaceae. No Brasil, *F. petrakii* foi reportada sobre *Butia* sp. no Distrito Federal e *E. oleifera* Kunth, na Bahia (Mendes & Urben, 2011). Este é o primeiro registro de *F. petrakii* para o estado de Pernambuco, e para as palmeiras: *E. oleracea*, *M. flexuosa* e *S. botryophora*, que constituem novos hospedeiros.

**Distribuição:** Austrália, Brasil, Brunei, China, Filipinas, Flórida, Índia, Hong Kong, Java, Malásia, Papua-Nova Guiné, Singapura, Tailândia e USA.

**Substratos:** *Archontophoenix*, *Butia*, *Calamus*, *Cocos*, *Cyrtostachys*, *Daemonorops*, *Elaeis*, *Euterpe*, *Licuala*, *Livistona*, *Mauritia*, *Metroxylon*, *Oncosperma*, *Phoenix*, *Sabal*, *Syagrus*, *Trachycarpus* e *Wallichia* (Arecaceae).

**Material examinado - BRASIL.** BAHIA: Uruçuca, EMARC, em folhas mortas (raque) de *S. botryophora*, 19 mar. 2009, N.S. Vitória (URM 83509). PERNAMBUCO: Cabo de Santo Agostinho, Reserva Ecológica de Gurjaú, em folhas mortas (raque) de *E. guineensis*, 09 jun. 2009, N.S. Vitória 119 (URM 83507, CEPEC 2283); ib., em folhas mortas (raque) de *E. oleracea* N.S. Vitória 120 (CEPEC 2284); Recife, Parque Estadual Dois Irmãos, em folhas mortas (raque) de *M. flexuosa*, 06 set. 2010, N.S. Vitória (URM 83506); Tamandaré, Reserva Biológica de

Saltinho, em folhas mortas (raque) de *E. oleracea*, 03 set. 2010, N.S. Vitória (URM 83508).

**5. *Javaria samuelsii*** Boise, Acta Amazon., Supl. 14 (1-2, Suppl.): 50. 1986.

**Figuras 5, 11, 17, 25.**

**Descrição:** Ascomas em secção vertical 440-470 × 550-650 µm. Ascospores 135-227 × 15-25 µm, bitunicados, 8-esporos, com pseudoparáfises filiformes, 1 µm diâmetro. Ascospores 42,5-57 × 6-8 µm, hialinos, 1-septados, levemente constritos no septo central, dísticos, com uma bainha mucilaginosa que se prolonga nas extremidades dos esporos fusiforme-alongados.

**Comentário:** Os espécimes examinados foram identificados morfológicamente de acordo com Boise (1986). Segundo este autor, *Javaria* difere de *Astrosphaeriella* na pigmentação e estrutura dos ascospores. No entanto, Hyde & Fröhlich (1998) ampliaram a concepção genérica de *Astrosphaeriella*, sinonimizando *Javaria*. Por causa das semelhanças morfológicas entre *Javaria* e *Astrosphaeriella* esses gêneros estão em Melanommatales. Na atualidade, *Javaria* é um epíteto válido, com duas espécies. Estudos moleculares são necessários para ampliar o conhecimento sobre o gênero. No Brasil, *J. samuelsii* foi encontrada na Amazônia sobre uma palmeira indeterminada. Este é o primeiro registro para a região Nordeste.

**Distribuição:** Brasil e Nova Zelândia.

**Substratos:** *Elaeis* (Arecaceae), *Nothofagus* (Fagaceae), pecíolo de palmeira indeterminada.

**Material examinado - BRASIL.** PERNAMBUCO: Recife, Parque Estadual Dois Irmãos, em folhas mortas (raque) de *E. guineensis*, 18 nov. 2009, N.S. Vitória 128 (URM 83512, CEPEC 2292).

**6. *Pemphidium zonatum*** K. D. Hyde, Sydowia 45(1): 8. 1993.

**Figuras 6, 12, 18, 26.**

**Descrição:** Ascomas em secção vertical 530-1283 × 160-480 µm, lenticulares, ostíolo central. Ascospores 160-262,5 × 7,5-10 µm, cilíndricos, longos, parafisados, I<sup>+</sup>, 8-esporos, unitunicados. Ascospores

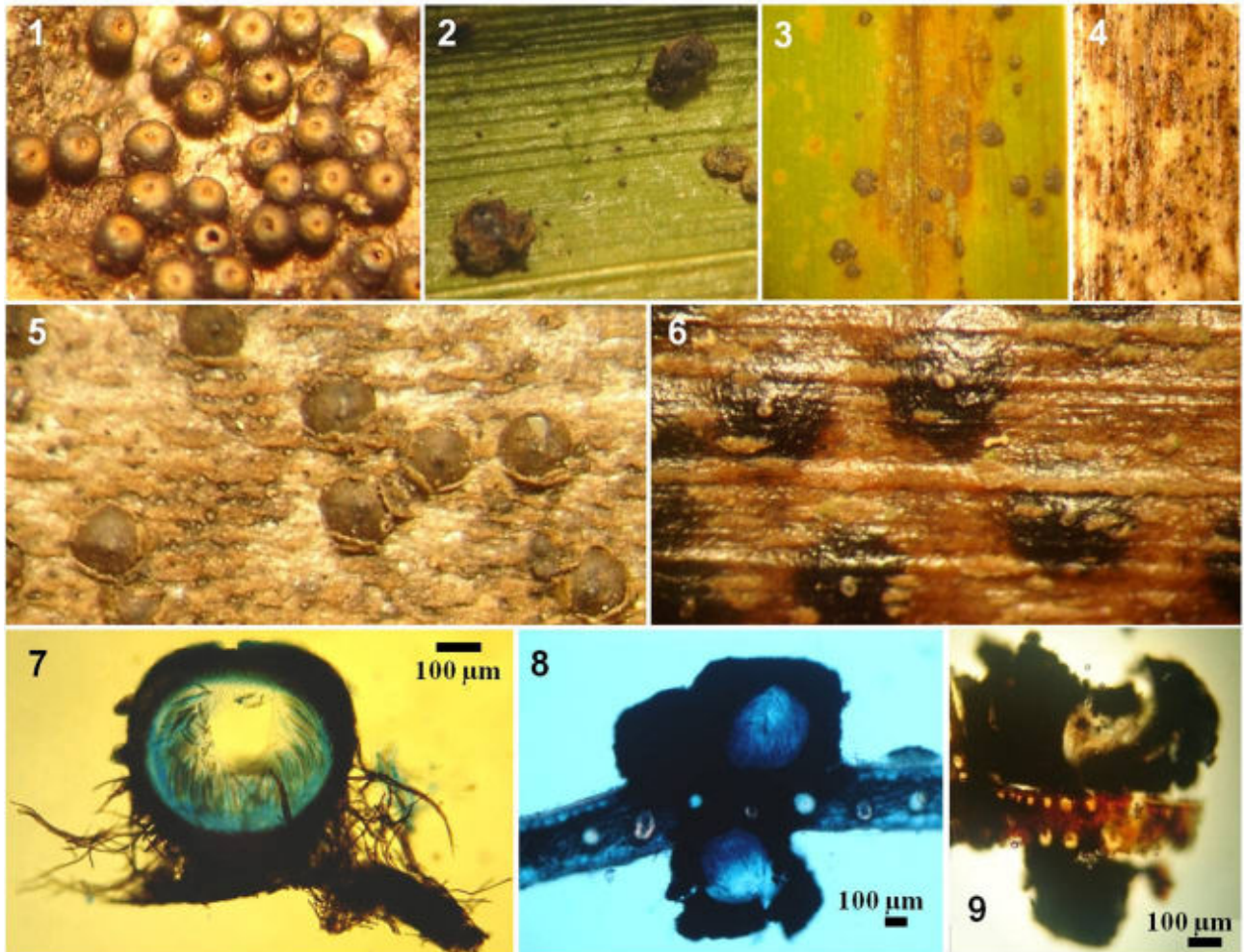
67-95(-112,5) × 3-5 µm, hialinos, unicelulares, lisos, com bandas refringentes, cilíndricos, acuminados, com apêndice polar em ambas as extremidades.

**Comentário:** Os espécimes foram identificados morfológicamente como *P. zonatum* de acordo com Fröhlich & Hyde (2000). Na descrição original de *P. zonatum* os ascomas são um pouco menores e os ascos um pouco maiores; no entanto, são morfológicamente semelhantes. *Pemphidium zonatum* já foi registrado para o Brasil, na Amazônia. Este é o primeiro registro da espécie para a região Nordeste, sobre quatro novos hospedeiros: *Attalea*, *Elaeis*, *Euterpe* e *Polyandrococos*.

**Distribuição:** Brasil, Equador e Guiana.

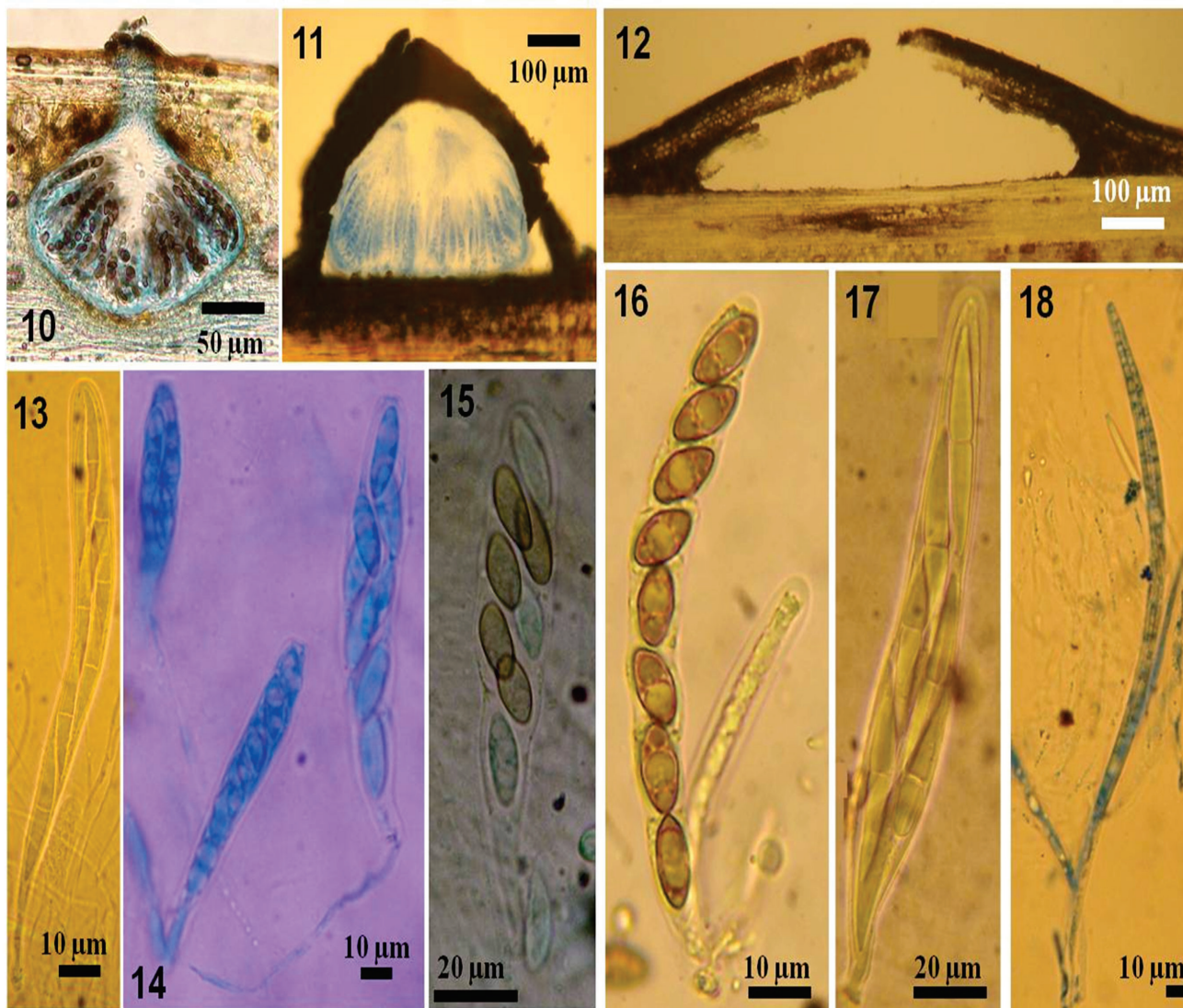
**Substratos:** *Attalea*, *Elaeis*, *Euterpe*, *Jessenia*, *Mauritia*, *Phenakospermum* e *Polyandrococos* (Arecaceae).

**Material examinado – BRASIL.** BAHIA: Una, Estação Experimental Lemos Maia, em folhas mortas (raque) de *A. funifera*, 20 jan. 2009, N. S. Vitória 169 (CEPEC 2333); ib., em folhas mortas (raque) de *E. edulis*, 21 jul. 2009, N.S. Vitória (URM 83524); Uruçuca, Parque Estadual da Serra do Condurú, em folhas mortas (raque) de *P. caudescens*, 17 mar. 2010, N. S. Vitória 170 (CEPEC 2334). PERNAMBUCO: Recife, Parque Estadual Dois Irmãos, em folhas mortas (raque) de *E. guineensis*, 18 nov. 2009, N. S. Vitória (URM 83523).



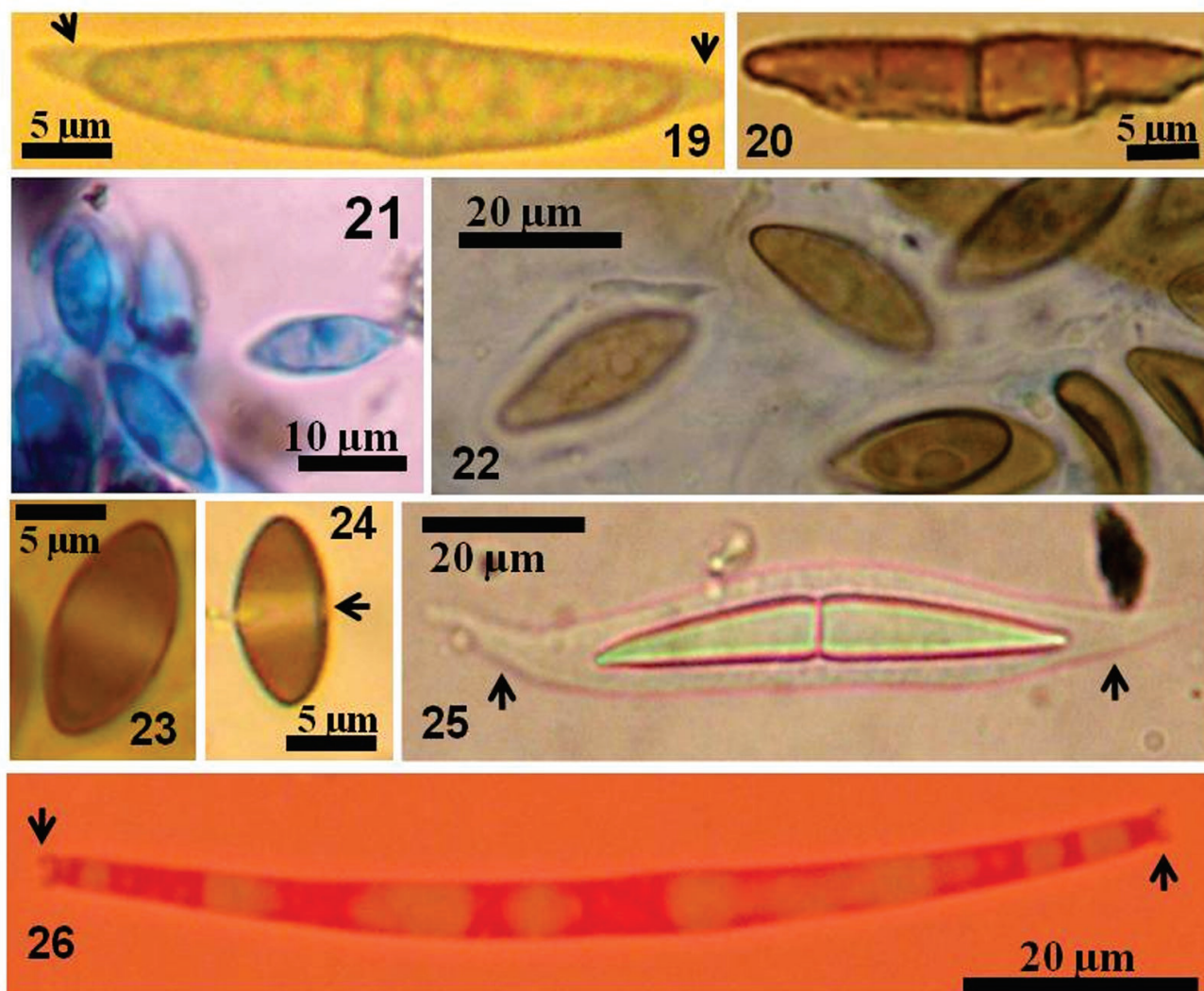
Figuras 1-9. Fungos da serrapilheira de Arecaceae na Bahia e em Pernambuco. Aspectos dos ascomas no substrato: 1 - *Byssosphaeria schiedermayeriana*, 2 - *Coccostromopsis diplothemii*, 3 - *Coccostromopsis palmicola*, 4 - *Fascistispora petrakii*, 5 - *Javaria samuelsii*, 6 - *Pemphidium zonatum*. Seção vertical dos ascomas: 7 - *B. schiedermayeriana*, 8 - *C. diplothemii*, 9 - *C. palmicola*.





Figuras 10-18. Fungos da serrapilheira de Arecaceae na Bahia e em Pernambuco. Aspectos dos ascomas no substrato: 10 - *F. petrakii*, 11 - *J. samuelsii*, 12 - *P. zonatum*. Morfologia dos ascos: 13 - *B. schiedermayeriana*, 14 - *C. diplothemii*, 15 - *C. palmicola*, 16 - *F. petrakii*, 17 - *J. samuelsii*, 18 - *P. zonatum*.





Figuras 19-26. Fungos da serrapilheira de Arecaceae na Bahia e em Pernambuco. Morfologia dos ascósporos: 19-20 - *B. schiedermayeriana*, 21 - *C. diplothemii*, 22 - *C. palmicola*, 23-24 - *F. petrakii*, 25 - *J. samuelsii*, 26 - *P. zonatum*.

### Literatura Citada

- BARR, M. E. 1984. *Herpotrichia* and its segregates. Mycotaxon 20 (1):1-38.
- BARR, M. E. 1990. Prodrum to nonlichenized, pyrenomycetous members of the class Hymenoascomycetes. Mycotaxon 39:43-184.
- BOISE, J. 1986. New and interesting fungi (Loculoascomycetes) from the Amazon. Acta Amazonica (Brasil) Suplemento 14 (1-2): 49-53.
- FRÖHLICH, J.; HYDE, K. D. 2000. Palm Microfungi. [Fungal Diversity Research Series 3]. Hong Kong, Fungal Diversity Press. 380p.
- HYDE, K. D. 1993. Fungi from palms III. The genus *Pemphidium* Montagne (Ascomycotina). Sydowia 45(1):5-14.
- HYDE, K. D.; FRÖHLICH, J. 1998. Fungi from palms XXXVII. The genus *Astrosphaeriella*, including ten new species. Sydowia 50 (1): 81-132.

- HYDE, K. D. et al. 1999. *Byssosphaeria*, *Chaetosphaeria*, *Niesslia* and *Ornatisspora* gen. nov., from palms. *Mycological Research* 103 (11):1423-1439.
- SOUZA, C. A. P. et al. 2008. *Camarotella brasiliensis* sp. nov. (Phyllachoraceae) on *Syagrus schizophylla* (Arecaceae) from Brazil. *Mycotaxon* 103:313-317.
- TABARELLI, M. et al. 2006. Nordeste; Piauí; Ceará; Rio Grande do Norte; Paraíba; Pernambuco e Alagoas: O Pacto Murici. In: Campanili, M.; Prochnow, M. orgs. *Mata Atlântica: uma rede pela floresta*. Brasília, Rede de ONGs da Mata Atlântica. pp.149-170.
- VITÓRIA, N. S. 2012. Diversidade de Ascomycota em palmeiras nativas e exóticas em áreas de Mata Atlântica. Tese de Doutorado. Recife, UFPE. 220p.
- VITÓRIA, N. S. et al. 2008. *Camarotella torrendiella* comb. nov. e *C. acrocomiae*: agentes etiológicos das lixas do coqueiro. *Tropical Plant Pathology (Brasil)* 33(4):295-301.
- VITÓRIA, N. S. et al. 2010. A simplified DNA extraction method for PCR analysis of *Camarotella* spp. *Brazilian Archives of Biology and Technology (Brasil)* 53(2):249-252.
- VITÓRIA, N. S. et al. 2011a. *Arecomyces* new to Brazil, including *A. attaleae* sp. nov. *Cryptogamie Mycologie* 32(1):103-108.
- VITÓRIA, N. S. et al. 2011b. *Endocalyx melanoxanthus* var. *melanoxanthus* (Ascomycota): a new to Brazil and three new hosts. *Mycotaxon* 117:109-113.
- VITÓRIA, N. S. et al. 2012a. *Brunneiapiospora brasiliensis* sp. nov. (Clypeosphaeriaceae) on palms from Brazil. *Nova Hedwigia* 94(1-2): 245-250.
- VITÓRIA, N. S. et al. 2012b. *Lasiodiplodia theobromae*: A new host and a revision of plant hosts reported in Brazil. *Agrotrópica (Brasil)* 24 (1):63-66.



## FUNGOS ENDÓFITOS E DO FILOPLANO DE *Caesalpinia echinata* LAM. DA ESTAÇÃO ECOLÓGICA DE TAPACURÁ, PE

*Thaís Emanuelle Feijó de Lima, Marilene da Silva Cavalcanti*

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Micologia, Laboratório de Fungos Aquáticos, Centro de Ciências Biológicas. Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brasil.  
thaisfeijo@gmail.com, silva.cordeiro@globo.com

O presente trabalho teve como objetivo o levantamento de fungos endófitos e do filoplano isolados de folhas sadias de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) da Estação Ecológica de Tapacurá, São Lourenço da Mata, Pernambuco, Brasil. Durante os períodos seco (março) e chuvoso (julho) de 2007, foram coletadas 360 folhas sadias de *C. echinata* em cinco pontos da Estação de Tapacurá e levadas ao laboratório para análise. Todo o material foi fragmentado em discos de 5mm de diâmetro, totalizando 360 discos. Metade dos discos passou pelo processo de desinfestação em álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito (NaOCl) 3% por 4 minutos, novamente em álcool 70% por 30 segundos, em seguida, lavados em água destilada esterilizada, e plaqueados em Batata Dextrose Ágar (BDA), acrescido de cloranfenicol (50 mL<sup>-1</sup>), e a outra metade foi esterilizado segundo a técnica de lavagens sucessivas em água destilada esterilizada e plaqueados em câmara-úmida. Os fragmentos foram incubados em triplicata, à temperatura ambiente (28 ± 2°C), durante três a quinze dias, para o desenvolvimento das colônias fúngicas e posterior identificação. Foram obtidas 12 espécies endófitas e 40 espécies do filoplano, representantes dos fungos anamórficos e do filo Zygomycota. *Pestalotiopsis maculans* (endófito = 42,86%; filoplano = 37,5%) foi a espécie mais frequente no estudo. *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia pallescens*, *Lasiodiplodia theobromae*, *P. maculans* e *Scopulariopsis fimicola* foram espécies comumente isoladas como endófitas e do filoplano de pau-brasil.

**Palavras-chave:** *Pestalotiopsis maculans*, mata atlântica, pau-brasil

**Endophytes and phylloplane fungi of *Caesalpinia echinata* Lam. of Estação Ecológica de Tapacurá, PE.** The aim of the current study was to survey fungal endophytes and phylloplane isolates from healthy leaves of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazil wood) at Tapacurá Echological Station in São Lourenço da Mata, Pernambuco, Brazil. During the dry (March) and rainy (July) season in 2007, were collected from 360 healthy leaves of *C. echinata* in five points Station Tapacurá and taken to the laboratory for analysis. The material was fragmented in 5mm diameter discs, totaling 360 foliar discs. Half of the discs passed the disinfestation process in ethanol 70% for 1 minute, hypochlorite (NaOCl) 3% for 4 minutes, again in ethanol 70% for 30 seconds to remove the excess of hypochlorite, then washed in distilled and sterilized water and plated were plated in Potato Dextrose Agar (PDA) added with chloramphenicol (50 mL<sup>-1</sup>) and the other half was sterilized according to the technique of successive washes in sterile water and plated in moist chambers. The fragments were incubated in triplicate at room temperature (28 ± 2 °C) for three to fifteen days the development of fungal colonies and subsequent identification. We obtained 12 endophytes species and 40 species of phylloplane, representatives of anamorphic fungi and of the phylum Zygomycota. *Pestalotiopsis maculans* (endophyte = 42.86%; phyloplan = 37.5%) was the most frequent species in the study. *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia pallescens*, *Lasiodiplodia theobromae*, *P. maculans* and *Scopulariopsis fimicola* species were commonly isolated as endophytes and phylloplane Brazil wood.

**Key words:** *Pestalotiopsis maculans*, rain forest, Brazil wood

## Introdução

A Mata Atlântica é um dos biomas tropicais com maior diversidade biológica e que apresenta muitas espécies vegetais endêmicas (Peixoto, 1992). Dentre elas destaca-se o pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), uma espécie endêmica brasileira, típica da floresta atlântica, cuja ocorrência consiste numa área que se estende desde o Estado do Rio Grande do Norte ao Rio de Janeiro (Carvalho, 1994), que em função da exploração predatória/comercial sofrida durante a ocupação da costa brasileira, reduziu sua distribuição a pequenos remanescentes na atualidade (Mello Filho, 1992; Cardoso et al., 1998; Barbosa e Thomas, 2002).

Os fungos desempenham importante função nos ecossistemas, onde vivem como sapróbios, parasitas de plantas, animais, de outros fungos ou em simbiose, formando associações com vários organismos (Dudka, 1974). Como cosmopolitas, colonizam diferentes ambientes e substratos (Maia et al., 2002), tais como as superfícies foliares (fungos de filosfera) ou o interior de diferentes partes de plantas sadias, sem causar danos (fungos endofíticos) (Carrol, 1989). Os fungos endófitos podem inicialmente habitar a superfície da planta como epífitas, penetrando através dos estômatos da folha ou feridas (Maccheroni Jr. et al., 2004). As folhas são órgãos com maior incidência de estudos endofíticos, apresentando altas taxas de infecção (Arnold, 2007).

Estudos anteriores já relacionaram diferentes grupos de fungos ao pau-brasil, vivo ou morto (Auer et al., 1989; Bezerra e Costa, 2001; Araújo et al., 2005; Santos e Vinha, 1982; Grandi e Silva, 2003; Grandi e Silva, 2006). Porém, devido à importância, representatividade no quadro histórico nacional e contemporâneo, e o risco de extinção, sobrando apenas pequenas populações isoladas dessa espécie (IBAMA, 2006), este trabalho teve como objetivo o levantamento de fungos filamentosos do filoplano e endófitos de folhas sadias de *C. echinata* da Estação Ecológica de Tapacurá, no município de São Lourenço da Mata, um dos principais remanescentes de pau-brasil do Estado de Pernambuco.

## Material e Métodos

Durante os períodos seco (março) e chuvoso (julho) de 2007, foram realizadas duas coletas, em cinco pontos

equidistantes, de 360 folhas sadias (180 por coleta) de *C. echinata* na Estação Ecológica de Tapacurá, São Lourenço da Mata, Pernambuco, Brasil (8°05'S e 35°13'W) e levadas ao laboratório para análise.

### Isolamento de fungos endófitos e do filoplano

As folhas foram fragmentadas em discos foliares de 5mm de diâmetro com um furador comum esterilizado, totalizando 360 discos (180 por coleta) retirados principalmente da porção mediana das folhas.

Metade dos discos (90) passou pelo processo de desinfestação em etanol 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio a 3% (4 minutos), novamente em álcool 70% por 30 segundos, e três lavagens com água destilada esterilizada (Araújo et al., 2002; Pereira et al., 1993). Após a assepsia, seis discos foram transferidos para placas de Petri, em triplicata, contendo o meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), acrescido de cloranfenicol (50mL<sup>-1</sup>), totalizando assim 15 placas e 90 discos incubados por coleta. As placas foram deixadas a temperatura ambiente (28 ± 2°C) e observadas diariamente por 3-10 dias quanto ao crescimento de fungos endófitos. Foram totalizados 15 placas e 90 discos incubados por coleta. À medida que ocorria formação de colônias nas bordas dos discos, as mesmas foram transferidas para tubos de ensaio contendo o meio BDA (Pereira et al., 1993).

Para o isolamento de fungos do filoplano, a outra metade do material (90 discos) foi submetida à técnica de lavagens sucessivas em água destilada esterilizada por 10 vezes (Grandi e Gusmão, 1998). Durante cada lavagem, os frascos foram agitados vigorosamente por um minuto, e os discos acondicionados (seis por placa), em triplicata, em câmara-úmida. As placas foram incubadas à temperatura ambiente de 28 ± 2°C, durante cinco a quinze dias (período de isolamento dos fungos) e acrescida de água destilada esterilizada para manter a umidade (Grandi, 1998; 1999). O processo de isolamento dos fungos foi procedido sob microscópio estereoscópico, onde as estruturas reprodutivas foram transferidas dos discos para placas, contendo o meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) acrescido de cloranfenicol (50 mL<sup>-1</sup>).

A identificação das espécies foi efetuada através da observação macroscópica das colônias, seguida de elaboração de lâminas com visualização e exame das características microestruturais, análise comparativa



com parâmetros estabelecidos na taxonomia convencional, de acordo com a literatura especializada: Ellis (1971; 1976), Sutton (1980), Domsch et al. (1993), dentre outras.

### Análise de dados

A frequência de ocorrência das espécies fúngicas foi calculada, segundo Araújo et al. (2002) e classificadas nas seguintes categorias: muito frequente ( $F > 70\%$ ), frequente ( $F < 70 > 30\%$ ), pouco frequente ( $F < 30 > 10\%$ ) e esporádica ( $F < 10\%$ ). O índice de Sorensen (1948) foi aplicado para análise da similaridade entre os substratos.

## Resultados e Discussão

Dos fragmentos de folhas sadias de *C. echinata* semeados em meio de cultura, foram assinalados 11 gêneros distribuídos em 12 espécies pertencentes aos fungos anamórficos (Tabela 1). Essas espécies foram classificadas como esporádicas (maioria), pouco frequentes e frequentes endófitos de folhas de pau-brasil. Dentre os fungos identificados, *Pestalotiopsis maculans* (42,86%) e *Colletotrichum gloeosporioides* (28,56%) foram os mais isolados.

O gênero *Colletotrichum* abrange espécies fitopatógenas que provocam grandes perdas econômicas em todo o mundo, sendo também predominantemente isolado em diversas variedades de plantas sadias como endófito (Pereira et al., 1993), podendo estar em seu estado latente (Azevedo et al., 2002) sem causar qualquer doença aparente, e até atuar na defesa da planta por produção de metabólitos bioativos (Souza et al., 2004).

*Pestalotiopsis*, gênero com ampla distribuição mundial, pode ocorrer em vários substratos (Wang et al., 2005). Como endofítica, *Pestalotiopsis* sp. foi isolada de palmeiras (Rodrigues e Samuels, 1990), *Rhizophora* (Kumaresan e Suryanarayanan, 2002), bananeiras (Photita et al., 2001) e umbuzeiro (Freire e Bezerra, 2001).

*Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Geotrichum*, *Lasiodiplodia*, *Nigrospora*, *Paecilomyces*, *Pestalotiopsis*, *Scopulariopsis* e *Trichoderma*, isolados em *C. echinata* da Estação de Tapacurá, estão enquadrados,

como gêneros endofíticos de comum isolamento entre plantas de regiões tropicais e subtropicais (Mendes et al., 2004; Costa et al., 2011) e de algumas culturas de importância econômica, como soja (*Glicine Max* L.), cacau (*Theobroma cacao* L.), cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), citrus (*Citrus limon* L.), milho (*Zea mays* L.), fumo (*Nicotina tabacum* L.) e café (*Coffea arabica* L.) (Franken et al., 1998; Araújo, 2001; Mendes, et al., 2001; 2004; Mendes e Azevedo 2007; Raviraja, 2005; Sette et al., 2006; Tejesvi et al., 2005, 2006; Gond et al., 2007).

Nas amostras de filoplano de *C. echinata*, foram isolados 22 gêneros, distribuídos em 40 espécies (Tabela 1), dos quais 99,4% pertencem aos fungos anamórficos e 0,60% ao filo Zygomycota. A maioria dessas espécies foram classificadas como esporádicas para o filoplano de pau-brasil. Dos fungos identificados, *Acremonium strictum* (14,34%), *Beltrania rhombica* (9,50%), *Colletotrichum gloeosporioides* (9,16%) e *Pestalotiopsis maculans* (37,50%), foram os mais isolados no material pesquisado.

*Pestalotiopsis maculans* foi o táxon mais representado durante os períodos de coleta, sendo principalmente encontrado no período chuvoso, juntamente com *C. gloeosporioides* e *B. rhombica*, enquanto que *A. strictum* foi mais evidenciado no período seco. Espécies de *Acremonium* são citadas por Eicker (1973) como presente no filoplano na forma de propágulos.

*Colletotrichum gloeosporioides* é bastante comum para o filoplano de diferentes plantas (Lira, 1990; Cabrera, 2003; Urdenata e Delgado, 2007), apresentando ampla distribuição e estando relacionado a queimas de folhas, manchas foliares (Obazee e Ikozun, 1985) e antracnoses (Urdenata e Delgado, 2007).

Espécies do gênero *Pestalotiopsis* são em sua maioria fitopatógenas de plantas (Barguil et al., 2008), podendo apresentar-se também como sapróbias (Zhang et al., 2003).

*Alternaria alternata*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Nigrospora sphaerica*, foram constatadas com alta frequência no filoplano de *Theobroma cacao* L. (cacau) na Venezuela (Urdenata e Delgado, 2007). Os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Cylindrocladium*,

Tabela 1. Frequência das espécies endófitas e do filoplano isoladas de folhas de *Caesalpinia echinata* da Estação Ecológica de Tapacurá, 2007

Espécies	Endófito	Frequência (%)	Categoria de frequência	Filoplano	Frequência (%)	Categoria de frequência
<i>Absidia corymbifera</i> (Cohn) Sacc. & Trotter (= <i>Lichtheimia corymbifera</i> (Cohn) Vuill.)				+	0,32	Esporádica
<i>Acremonium kiliense</i> Grütz (= <i>Sarocladium kiliense</i> (Grütz) Summerb.)				+	0,91	Esporádica
<i>A. murorum</i> (Corda) W. Gams. (= <i>Gliomastix murorum</i> (Corda) S. Hughes)				+	0,32	Esporádica
<i>A. strictum</i> W. Gams (= <i>Sarocladium strictum</i> (W. Gams) Summerb.)				+	14,34	Pouco frequente
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.				+	0,91	Esporádica
<i>Aspergillus alliaceus</i> Thom & Church.				+	0,32	Esporádica
<i>A. awamori</i> Nakaz.				+	0,32	Esporádica
<i>A. caespitosus</i> Raper & Thom				+	2,14	Esporádica
<i>A. flavipes</i> (Bainier e R. Sartory) Thom & Church				+	0,32	Esporádica
<i>A. flavus</i> Link.				+	1,53	Esporádica
<i>A. fumigatus</i> Fresen.				+	1,53	Esporádica
<i>A. oryzae</i> (Ahlb.) E. Cohn (= <i>Aspergillus flavus</i> var. <i>oryzae</i> (Ahlb.) Kurtzman, M.J. Smiley, Robnett & Wicklow)				+	0,61	Esporádica
<i>A. parasiticus</i> Speare				+	0,32	Esporádica
<i>A. tamarii</i> Kita				+	0,32	Esporádica
<i>A. wentii</i> Wehmer				+	1,23	Esporádica
<i>Beltrania rhombica</i> Penz.				+	9,50	Esporádica
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	+	1,06	Esporádica	+	0,32	Esporádica
<i>C. sphaerospermum</i> Penz	+	1,06	Esporádica			
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	+	28,56	Pouco frequente	+	9,16	Esporádica
<i>Cunninghamella elegans</i> Lendn.				+	0,32	Esporádica
<i>Curvularia pallescens</i> Boedijn (= <i>Pseudocochliobolus pallescens</i> Tsuda & Ueyama)	+	5,82	Esporádica	+	1,83	Esporádica
<i>Cylindrocladium parvum</i> P.J. Anderson (= <i>Cylindrocladiella parva</i> (P.J. Anderson) Boesew.)				+	0,61	Esporádica
<i>Dictyochaeta assamica</i> (Agnihotr.) Aramb., Cabello & Mengasc.				+	0,91	Esporádica
<i>Drechslera australiensis</i> Bugnic. ex M.B. Ellis (= <i>Cochliobolus australiensis</i> (Tsuda & Ueyama) Alcorn)				+	0,32	Esporádica
<i>D. hawaiiensis</i> Bugnic. ex M.B. Ellis (= <i>Cochliobolus hawaiiensis</i> Alcorn)				+	0,61	Esporádica
<i>D. rostrata</i> (Drechsler) M.J. Richardson & E.M. Fraser (= <i>Setosphaeria rostrata</i> K.J. Leonard)	+	1,59	Esporádica			
<i>Fusarium heterosporum</i> Nees & T. Nees (= <i>Gibberella gordonii</i> C. Booth)				+	1,53	Esporádica
<i>F. lateritium</i> Nees (= <i>Gibberella baccata</i> (Wallr.) Sacc.)				+	0,91	Esporádica

## Continuação

<i>F. moniliforme</i> J. Sheld. (= <i>Gibberella fujikuroi</i> (Sawada) Wollenw.)				+	1,53	Esporádica
<i>F. oxysporum</i> Schltdl.				+	0,61	Esporádica
<i>Geotrichum</i> sp. Link	+	1,06	Esporádica			
<i>Humicola grisea</i> Traaen				+	0,91	Esporádica
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griffon & Maubl.	+	7,94	Esporádica	+	2,44	Esporádica
<i>Nigrospora oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch (= <i>Khuskia oryzae</i> H.J. Huds.)	+	4,23	Esporádica			
<i>N. sphaerica</i> (Sacc.) E.W. Mason (= <i>Khuskia oryzae</i> H.J. Huds.)				+	0,61	Esporádica
<i>Penicillium citreonigrum</i> Dierckx				+	0,32	Esporádica
<i>P. islandicum</i> Sopp (= <i>Talaromyces islandicus</i> (Sopp) Samson, Yilmaz, Frisvad & Seifert)				+	0,32	Esporádica
<i>P. purpurogenum</i> Stoll (= <i>Talaromyces purpurogenus</i> (Stoll) Samson, Yilmaz, Frisvad & Seifert)				+	0,91	Esporádica
<i>Pestalotiopsis maculans</i> (Corda) Nag Raj	+	42,86	Frequente	+	37,50	Frequente
<i>Phomopsis archeri</i> B. Sutton				+	0,61	Esporádica
<i>Scopulariopsis brumptii</i> Salv.-Duval				+	0,32	Esporádica
<i>S. fimicola</i> (Costantin & Matr.) Vuill. (= <i>Scopulariopsis coprophila</i> (Cooke e Massee) W. Gams)	+	1,06	Esporádica	+	0,32	Esporádica
<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.) Bainier	+	3,70	Esporádica			
<i>T. harzianum</i> Rifai				+	1,23	Esporádica
<i>Verticillium albo-atrum</i> Reinke & Berthold				+	0,91	Esporádica
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>100</b>	<b>-</b>	<b>40</b>	<b>100</b>	<b>-</b>

*Drechslera*, *Humicola*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma* e *Verticillium*, encontrados no filoplano de plantas de *C. echinata* da Estação Ecológica de Tapacurá, também foram isolados em folhas de bananeiras (*Musa* sp.) (Urdenata et al., 2002).

*Alternaria alternata*, *N. sphaerica* e espécies de *Curvularia*, *Verticillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* e *Drechslera* são fungos cosmopolitas presentes em regiões tropicais, estes podem viver como saprófitas, epífitas ou como fracos parasitas, podendo ocasionar lesões foliares em uma ampla diversidade de cultivos (Cabrera, 2003; Urdenata et al., 2002; Urdenata e Delgado, 2007), juntamente com *L. theobromae*, estão relacionados à morte regressiva da planta, afetando diversas culturas na Venezuela como: manga, abacate, citros, goiaba e outros, causando podridão em frutos (Capriles de Reyes, 1979; Farr et al., 1995; Pereira, 2000).

*Beltrania rhombica* é uma espécie com ampla distribuição em regiões tropicais e temperadas (Grandi e Gusmão, 2002), juntamente com *A. alternata* e *H. grisea*, foram isoladas em *C. echinata*, como decompositores do folheto (Grandi e Silva, 2006), sendo, agora, também constatados no filoplano desta vegetação na Estação Ecológica de Tapacurá.

O gênero *Aspergillus* foi bastante representativo no filoplano (8,64%), com a identificação de 10 espécies. Esse gênero também tem sido isolado da filosfera de samambaias (Scheidegger e Payne, 2003).

Ao comparar as espécies endófitas com as isoladas do filoplano de pau-brasil, constatou-se baixa similaridade (2,5%), e o isolamento de apenas seis espécies comuns: *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia pallescens*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis maculans* e *Scopulariopsis fimicola*.

Segundo Gamboa (1998) é comum à variação entre as comunidades de fungos endófitos e epifíticos no mesmo substrato.

### Conclusão

Constatou-se a associação de várias espécies de fungos anamórficos em folhas de pau-brasil na reserva de Tapacurá. Mais pesquisas devem ser realizadas para conhecer a diversidade de fungos nesta planta, devido, principalmente, a sua importância histórica para o Brasil.

### Literatura Citada

- ARAÚJO, W. L. 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology* 47:229-236.
- ARAÚJO, W. L. et al. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interactions with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environment Microbiology* 68:4906-4914.
- ARAÚJO, C. F. L.; GRAMACHO, K. P.; BEZERRA, J. L. 2005. Reestudo de *Anthomyces brasiliensis* em *Caesalpinia echinata* no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 30:510-515.
- ARNOLD, A. E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology* 21:51-66.
- AUER, C. G., CAMARGO, L. E. A.; NUNES, M. E. T. 1989. *Ganoderma* sp. Associado com declínio de árvores de sombra. *Fitopatologia Brasileira* 14:122.
- AZEVEDO, J. L. et al. 2002. Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. In: Seraffini, L.A. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. Caxias do Sul, RS, EDUQS. pp. 235-268.
- BARBOSA, M. R. V.; THOMAS, W. W. 2002. Biodiversidade, conservação e uso sustentável da Mata Atlântica no Nordeste. In: Biodiversidade, Conservação e Uso Sustentável da Flora do Brasil. Recife, UFPE, Sociedade Botânica do Brasil. Seção Regional Pernambuco. pp. 19-26.
- BARGUIL, B. M. et al. 2008. Ocorrência de *Pestalotiopsis neglecta* em *Ananas lucidus*. *Summa Phytopathologica* 34(1):96.
- BEZERRA, J. L.; COSTA, J. C. B. 2001. *Anthomyces brasiliensis* parasitando folhas de pau-brasil, na Bahia. *Fitopatologia Brasileira* 26 (Suplemento): 351-352.
- CABRERA, M. G. et al. 2003. Actualización del conocimiento sobre los microorganismos presentes em follaje de soja del NEA. In: Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional Del Nordeste.
- CAPRILES de REYES, L. 1979. Enfermedades del cacao en Venezuela. Fondo Nacional Del Cacao. 79p.
- CARDOSO, M. A. et al. 1998. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae - Caesalpinoideae). *Molecular Ecology* 7:601-608.
- CARROL, G. 1989. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69(1):2-9.
- CARVALHO, N. M. 1994. A secagem de sementes. Jaboticabal, SP, FUNEP. 165p.
- COSTA, I. P. M. W.; et al. 2011. Checklist of endophytic fungi from tropical regions. *Mycotaxon* 119:494.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. 1993. Compendium of soil fungi. Verlag, IHW. 1264p.
- DUDKA, I. A. 1974. Fungi as a component of freshwater biocenoses. *Mikologia Fitopatologia* 8(5):444-449.
- EICKER, A. 1973. Mycoflora of Eucalyptus maculata leaf litter. *Soil Biology and Biochemistry* 4 (5): 441-448.
- ELLIS, M. B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Kew, England. Commonwealth Mycological Institute. 608p.
- ELLIS, M. B. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. Kew, England. Commonwealth Mycological Institute. 507p.



- FARR, D. et al. 1995. Fungi on plants productis in the United States. St. Paul, Minnesota. The American Phytopathological Society Press.
- FRANKEN, P.; BUTEHORN, B.; VARMA, A. 1998. *Piriformospora indica*, a cultivable root cell-infecting fungus promotes the growth of a broad range of plant species. In: International Conference on Mycorrhiza, 2nd. Uppsala, Swenden.
- FREIRE, F. C. O.; BEZERRA, J. L. 2001. Foliar endophytic fungi of Ceará State (Brazil): a preliminary study. *Summa Phytopathologica* 27(3):304-308.
- GAMBOA, M. A. 1998. Ecología de comunidades y genética de hongos endófitos en hojas de *Guarea guidonia* (Meliaceae). Tesis de maestría. San Juan, Puerto Rico. Universidad de Puerto Rico, Departamento de Biología.
- GOND, S. K. et al. 2007. Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Correae (Rutaceae) from Varanasi (India). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23:1371-1375.
- GRANDI, R. A. P. 1998. Hyphomycetes decompositores do folheto de *Alchornea triplinervia* (Spreng.) Müll. Arg. *Hoehnea* 25:133-148.
- GRANDI, R. A. P. 1999. Hifomicetos decompositores do folheto de *Euterpe edulis* Mart. *Hoehnea* 26: 87-101.
- GRANDI, R. A. P.; GUSMÃO, L. F. P. 1998. A técnica da lavagem sucessiva de substratos de plantas como subsídio para estudos da associação fungo/substrato e diversidade de Hyphomycetes nos ecossistemas. In: Simpósio Brasileiro de Ecossistemas Brasileiros, 4. 1998. São Paulo. pp. 80-90.
- GRANDI, R. A. P.; GUSMÃO, L. F. P. 2002. Hyphomycetes decompositores de folheto de *Tibouchina pulchra* Cogn. *Revista Brasileira de Botânica* 25:79-87.
- GRANDI, R. A. P.; SILVA, T. V. 2003. Hyphomycetes sobre folhas em decomposição de *Caesalpinia echinata* Lam.: ocorrências novas para o Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 26:489-493.
- GRANDI, R. A. P.; SILVA, T. V. 2006. Fungos anamorfos decompositores de folheto de *Caesalpinia echinata* Lam. *Revista Brasileira de Botânica* 29(2):275-287.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. IBAMA. 2006. Lei N° 6.607, de 07 de dezembro de 1978. [http://ibama2.ibama.gov.br/cnia2/renima/cnia/lema/lema\\_texto/6607-78.htm](http://ibama2.ibama.gov.br/cnia2/renima/cnia/lema/lema_texto/6607-78.htm) (acesso em 01/01/2006).
- KUMARESAN, V.; SURYANARAYANAN, T. S. 2002. Endophyte assemblages in young, mature and senescent leaves of *Rhizophora apiculata*: evidence for the role of endophytes in mangrove litter degradation. *Fungal Diversity* 9:81-91.
- LIRA, R. V. F. 1990. Levantamento da micoflora do coqueiro (*Coco nucifera* L.) em diferentes áreas do Nordeste do Brasil. Dissertação de Mestrado. Recife, PE, UFRPE. 170p.
- MAIA, L. C.; YANO-MELO, A. M.; CAVALCANI, M. A. 2002. Diversidade de Fungos no Estado de Pernambuco. In: Tabarelli, M.; Silva, J.M.C. Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco. SECTMA, Recife, PE, Editora Massangana. pp.15-50.
- MACCHERONI JR., W.; ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S. 2004. Ecologia: habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. In: Esposito, E., Azevedo J. L. eds. Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul, RS, Educs. pp. 451-490.
- MELLO FILHO, L. E. 1992. A Floresta Atlântica. In: Monteiro, S.; Kaz, L. eds. Floresta Atlântica. Rio de Janeiro, RJ. Edições Alumbamento. pp.17-21.
- MENDES, R. et al. 2001. Monitoring soybean endophytic fungal community associated with glyphosate. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 21. 2001. Foz do Iguaçu, São Paulo. Sociedade Brasileira de Microbiologia. 242p.
- MENDES, R. et al. 2004. Variability of fungal populations associated to genetically modified sugar cane. In: Reunião de Genética de Microrganismos, 24. 2004. Gramado, Rio Grande do Sul.

- MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. 2007. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: Congresso Brasileiro de Micologia, 5. Recife. Micologia, Avanços no Conhecimento. pp.129-140.
- OBAZEE, E. N.; IKOZUN, T. 1985. The occurrence of a leaf spot disease of coconut palm caused by *Pestalotia palmarum* Cook in Nigéria. Fitopatologia Brasileira 10(1):197-199.
- PEIXOTO, A. L. 1992. A vegetação da Costa Atlântica. In: Monteiro, S.; Kaz, L. eds. Floresta Atlântica. Rio de Janeiro, RJ. Edições Alumbamento. pp. 33-42.
- PEREIRA, J. 2000. Perspectivas para el control de las enfermedades del cacao. In: Memórias del primer Congreso Venezolano del Cacao y su Industria. 1992. Producciones Publicitarias Sancler. Caracas, Venezuela. pp. 93-109.
- PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. 1993. Brief Article: Endophytic fungi of *Stulosanthes*: A first report. Mycology 85(3):362-364.
- PHOTITA, W. et al. 2001. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. Mycological Research 105(12):1508-1513.
- RAVIRAJA, N. S. 2005. Fungal endophytes in five medicinal plant species from Kudremukh Range, Western Ghats of India. Journal of Basic Microbiology 45:230-235.
- RODRIGUES, K. F.; SAMUELS, G. J. 1990. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. Mycological Research 94(6):827-830.
- SANTOS, M. O.; VINHA, S. G. 1982. Ocorrência de micorrizas em árvores nativas do Sul da Bahia. 1. Estação Ecológica do Pau-brasil. Revista Theobroma (Brasil) 12:261-265.
- SETTE, L. D. et al. 2006. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22:1185-1195.
- SCHEIDEGGER, K. A.; PAYNE, G. A. 2003. Unlocking the secrets behind secondary metabolism: A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. Journal of Toxicology-Toxin Reviews 22(2-3):423-459.
- SORENSEN, T. A. 1948. A method of establishing of equal amplitud in plant sociology based on similitarity on species content, and its application to analysis of the vegetation on Danish commons. Kongelige Danske Videnskabsnernes Selskab Biol. Skr. 5(4):1-34.
- SOUZA, A. Q. L. et al. 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benth. Acta Amazônica 34:185-195.
- SUTTON, B. C. 1980. The Coelomycetes. Kew, England. Commonwealth Mycological Institute. 696p.
- TEJESVI, M.V. et al. 2005. Endophytic fungal assemblages from inner bark and twig of *Terminalia arjuna* W. and A. (*Combretaceae*). World Journal of Microbiology and Biotechnology 21:1535-1540.
- TEJESVI, M.V. et al. 2006. Fungal endophyte assemblages from ethnopharmacologically important medicinal trees. Canadian Journal of Microbiology 52:427-435.
- URDENATA, L. M.; DELGADO, A. E. 2007. Identificación de la micobiota del filoplano del cacaotero (*Theobroma cacao* L.), en el municipio Carraciolo Parra Olmedo, estado Mérida, Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía 24:47-68.
- URDENATA, L. M. et al. 2002. Micobiota del filoplano en plátano Harton (*Musa AAB*), en el municipio Francisco Javier Pulgar del estado Zulia, Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía 19:95-108.
- WANG, Y.; GUO, L. D.; HYDE, K. D. 2005. Taxonomic placement of sterile morphotypes of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in northeast China based on rDNA sequences. Fungal Diversity 20:235-60.
- ZHANG, J. X.; XU, T.; GE, Q. X. 2003. Notes on *Pestalotiopsis* from Southern China. Mycotaxon 85:91-92.



## FUNGOS NEMATÓFAGOS DA RIZOSFERA DE HELICÔNIAS COMO POTENCIAIS ANTAGONISTAS À *Rotylenchulus reniformis*

Sheila Matos Viana Soares Almeida<sup>1</sup>, Arlete José da Silveira<sup>1</sup>, Pedro Luiz Martins Soares<sup>2</sup>,  
Sérgio José Ribeiro de Oliveira<sup>1</sup>, Maria Aparecida Leão Bittencourt<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) - Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, 45662-900, Ilhéus, BA, Brasil; <sup>2</sup>Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP)/Departamento de Fitossanidade, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. arletesilveira@uesc.br.

As helicônias apresentam inflorescências com potencial de comercialização, pois além da beleza de cores e formas, produzem flores em quantidade e têm uma resistência excepcional após o corte. O Brasil, principalmente a região Nordeste, apresenta condições favoráveis para o desenvolvimento e produção de flores tropicais. Sabe-se que um dos principais problemas que acometem as helicônias são a ocorrência de nematoides e fungos. O sucesso econômico e ecológico do manejo dos fitonematoides requer a adoção de práticas combinadas, e neste contexto, o controle biológico poderá se constituir numa alternativa viável. Trinta e quatro amostras de solo da rizosfera de *Heliconia* spp. de diversos ecossistemas do sul da Bahia foram processadas para a identificação e isolamento de fungos nematófagos. Foram realizados experimentos *in vitro* com o objetivo de avaliar o potencial dos fungos mais frequentes (*Arthrobotrys conoides*, *A. musiformis*, *A. oligospora*, *Monacrosporium thaumasium* e *M. eudermatum*) no controle de *Meloidogyne incognita* raça 1. Os mais promissores nos testes *in vitro* (*A. musiformis*, *M. thaumasium* e *A. oligospora*) foram utilizados no experimento em casa de vegetação, onde, *Heliconia richardiana* e *H. rostrata* foram plantadas em solo naturalmente infestado com *Rotylenchulus reniformis* (920 e 612 nematoides/100 cm<sup>3</sup>, respectivamente). Aos 45 dias de aclimação foi inoculado, nas helicônias, um coquetel preparado com os três fungos mais promissores. Verificou-se que 30 dias após a primeira aplicação houve uma redução populacional significativa ( $P < 0,05$ ) de *R. reniformis* (em solo e raízes) nas duas espécies de helicônias comparado ao tratamento testemunha. A mortalidade de *R. reniformis* após a segunda e terceira aplicação do coquetel não foi significativa para solo e raízes de *H. rostrata*, porém, em *H. richardiana* a redução acentuada de nematoides presentes nas raízes ocorreu após a terceira aplicação.

**Palavras-chave:** controle biológico, nematoide reniforme, *Heliconia* spp., *Arthrobotrys*, *Monacrosporium*.

**Predacious fungi from the rhizosphere of heliconias as potential antagonists to *Rotylenchulus reniformis*.** The heliconias have inflorescences with commercial potential, as well as the beauty of colors and forms, produce flowers in quantity and have exceptional strength after harvest. Brazil, especially the Northeast, has favorable conditions for the development and production of tropical flowers. We know that one of the main problems that affect the heliconias are the occurrence of nematodes and fungi. The economic and ecological success of the management of nematodes requires the adoption of combined practice, and in this context, biological control may constitute a viable alternative - four soil samples from the rhizosphere of *Heliconia* spp. diverse ecosystems of southern Bahia were processed for identification and isolation of nematophagous fungi. *In vitro* experiments were conducted with the objective to evaluate the potential of the fungi most frequent (*Arthrobotrys conoides*, *A. musiformis*, *A. oligospora*, *Monacrosporium thaumasium* and *M. eudermatum*) in the control of *Meloidogyne incognita* race 1. The most promising *in vitro* tests (*A. musiformis*, *M. thaumasium* and *A. oligospora*) were used in the experiment in a greenhouse, where *Heliconia richardiana* *H. rostrata* planted in soil naturally infested with *Rotylenchulus reniformis* (920 and 612 nematodes/100 cm<sup>3</sup>, respectively). At 45 days of acclimation was inoculated in heliconias, a cocktail prepared with the three fungi most promising. It was found that 30 days after the first application there was a significant population reduction ( $P < 0.05$ ) of *R. reniformis* (in soil and roots) in the two species of heliconias compared to the control treatment. The mortality of *R. reniformis* after second and third application of the cocktail was not significant for soil and roots of *H. rostrata*, however, in *H. richardiana* the marked reduction of nematodes present in the roots occurred after the third application.

**Key words:** biological control, reniform nematode, *Heliconia* spp., *Arthrobotrys*, *Monacrosporium*

## Introdução

As helicônias são plantas de porte herbáceo, apresentam diversos tamanhos e podem chegar a 10 m de altura. Pertencem à família Heliconiaceae e ao gênero *Heliconia* L., têm origem Neotropical e aparecem naturalmente em clareiras, bordas de florestas e matas ciliares, na América Central e América do Sul (Mosca et al., 2004). A inflorescência apresenta cores e tamanhos variados e pode ser explorado comercialmente, pois além da beleza, produzem flores em quantidade e têm uma boa resistência após a colheita (Lamas, 2004). O Brasil, principalmente a região Nordeste, apresenta condições favoráveis para o desenvolvimento e produção de flores tropicais, devido à diversidade de clima e solo existentes (Castro et al., 2007). Uma das alternativas econômicas para a região sul da Bahia é o cultivo de flores, folhagens e plantas ornamentais tropicais. Dentre estas, as helicônias cujas inflorescências se destacam por serem rústicas e apresentarem tolerância a doenças, contudo, os fatores ambientais, principalmente as temperaturas elevadas, têm propiciado a ocorrência de epidemias.

O cultivo de helicônia em larga escala por meio de propagação vegetativa (rizomas) e o intercâmbio indiscriminado de germoplasmas, muitas vezes sem a quarentena necessária, causa um desequilíbrio no agroecossistema com ocorrência de pragas e doenças (Assis et al., 2002). As principais pragas desta cultura são cochonilhas, ácaros, nematoides, formigas e pulgões (Santos et al., 2010).

Em levantamento de fitonematoides associados a Zingiberales ornamentais (*Etlingera elatior* (Jack) R.M. Sm., *Zingiber spectabilis* Griff., *Alpinia purpurata* (Vieillard) K. Schumann, *Musa coccinea* Andrews, *Tapeinochilos ananassae* (Hassk.) K. Schum e *Heliconia* spp.) em áreas produtoras de Pernambuco constatou-se ocorrência frequente dos seguintes gêneros: *Pratylenchus* Taylor, *Rotylenchulus* Linford & Oliveira, *Meloidogyne* Goeldi, *Helicotylenchus* Steiner e *Criconemella* Grisse & Loof. Sintomas da meloidoginose foram constatados em 100% das áreas de plantios. As espécies de *Meloidogyne* detectadas foram *M. incognita* (Kofoid and White) Chitwood, *M. arenaria* Chitwood e *M. javanica* (Treub) Chitwood (Assis

et al., 2012). Em sete municípios da região litoral Sul do estado da Bahia foram detectados em variedades de helicônias: *Helicotylenchus erythrinae* (Zimmermann) Golden, *H. crenacauda* Sher, *H. dihystra* (Cobb) Sher, *Hemicycliophora* sp., *Meloidogyne incognita*, *Mesocriconema* sp., *Pratylenchus* sp., *Pratylenchus zae* Graham e *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira (Mattos Sobrinho et al., 2012).

*Rotylenchulus reniformis* é um importante patógeno que causa danos significativos a várias culturas de interesse econômico, tais como, soja, algodão (Asmus e Richetti, 2010), entre outras. A ampla faixa de hospedeiros é um fator limitante para a utilização da rotação de culturas como medida de manejo (Soares et al., 2004). Por não existir agrotóxicos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para serem utilizados no controle de pragas e doenças em helicônias, outras táticas devem ser adotadas no manejo, tais como a incorporação de matéria orgânica ao solo, a sanidade do material de propagação, uso de *Azadirachta indica* A. Jussieu (Orsini et al., 2010), além de fungos nematófagos predadores como espécies de *Arthrobotrys* Corda e *Monacrosporium* Oudemans (Silveira, 2000; Silveira et al., 2001; Soares et al., 2009; Martinelli e Santos, 2010) e fungos oportunistas, que têm se mostrado promissores no biocontrole de fitonematoides pois são parasitos facultativos, o que facilita a multiplicação *in vitro* e a sobrevivência no solo (Ferraz e Santos, 1995) e são os mais frequentes em solos brasileiros.

Os estudos e levantamentos de pragas e doenças na cultura da helicônia na região sul da Bahia são escassos. A expansão do plantio de helicônias e o clima úmido e quente têm favorecido os problemas fitossanitários, destacando-se os fitonematoides. O presente trabalho teve como objetivos: i) avaliar a atividade predatória *in vitro* de fungos nematófagos isolados da rizosfera de helicônias sobre *Panagrellus redivivus* L. e de *Meloidogyne incognita* raça 1, ii) em condições de casa de vegetação avaliar a potencialidade dos isolados que se mostraram mais promissores sobre *R. reniformis*, em *Heliconia richardiana* Miq. e *H. rostrata* Ruiz e Pavan plantadas em solo naturalmente infestado.



## Material e Métodos

### Deteção, isolamento e identificação dos fungos nematófagos

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia/Nematologia e em casa de vegetação da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - BA. O solo foi coletado da rizosfera de helicônias de diversos ecossistemas da região Sul da Bahia. Os fungos foram isolados pelo método de espalhamento de solo, modificado por Santos et al. (1991). Os conídios produzidos em nematoides de vida livre (NVL) *P. redivivus* adicionados às placas foram transferidos para tubos de ensaio contendo BDA e, posteriormente, para placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura.

Após cinco a sete dias de desenvolvimento dos fungos, foram removidos quatro discos de 5 mm de diâmetro dos bordos das colônias, transferindo-os para placas de Petri com ágar-água (AA) a 2%. Cinco dias após, adicionou-se 1 mL de uma suspensão concentrada (cerca de 100 indivíduos/mL) de NVL que foram cultivados em placas de Petri com aveia (Heintz, 1978). Após 10 dias foi constatado que havia nematoides predados. Após esporulação dos fungos, estes foram repicados com o auxílio de um estilete flambado, sob um microscópio estereoscópio e, em câmara de fluxo laminar, transferiram-se esporos individuais dos fungos para tubos de ensaio contendo BDA inclinado. As culturas foram comparadas com as originais. Lâminas foram preparadas com as principais estruturas morfológicas dos fungos e dos NVL predados pelos diferentes tipos de armadilha de captura e observadas sob microscópio estereoscópico e óptico para a identificação das espécies (Haard, 1968; Liu e Zhang, 1994).

### Produção de inóculo de *M. incognita* raça 1

Tomateiros (*Solanum lycopersicom* L.) cv. Santa Cruz Kada foram semeados em bandejas de isopor, com substrato formado de mistura de solo e areia (1:2), previamente autoclavado, e após 15 dias as mudas foram transplantadas para vasos plásticos (6 L) contendo o mesmo tipo de substrato. Dez dias após o tratamento, as mudas foram inoculadas com populações puras de *M. incognita* raça 1 e mantidas em casa de vegetação. Decorridos 45 dias, as raízes

foram removidas e lavadas cuidadosamente, e as massas de ovos foram coletadas sob microscópio estereoscópio e em seguida desinfestadas conforme Boneti e Ferraz (1981). A suspensão de juvenis de segundo estágio (J2) foi obtida pelo método de Cliff e Hirschmann (1985), onde foi colocada em placas de Petri esterilizadas uma tela plástica e, sobre esta, um papel de espessura fina onde foram depositados os ovos, em seguida, foram adicionados 20 mL de água destilada e estéril. Estas placas foram mantidas a temperatura de 28°C por um período de cinco dias. Os J2 obtidos a partir do terceiro dia da eclosão foram utilizados para o teste de patogenicidade. Os juvenis coletados destas câmaras, com auxílio de pipeta de Pasteur foram mantidos em geladeira a 5°C em béqueres de 100 mL. A calibração final da suspensão com J2 foi ajustada para 100/mL sob microscópio óptico, utilizando-se lâmina de Peters.

### Patogenicidade dos fungos nematófagos à *P. redivivus* e *M. incognita* raça 1

Foi utilizado apenas um isolado de cada espécie fúngica predadora mais frequente encontrada na rizosfera de diferentes espécies de helicônia. Portanto, as espécies fúngicas *Arthrobotrys conoides* Drechsler, *A. musiformis* Drechsler, *A. oligospora* Fresenius, *M. thaumasium* Fresenius e *M. eudermatum* (Drechsler) Subramanian foram cultivadas em meio BDA à temperatura de 27°C para o teste de patogenicidade *in vitro*. Dos bordos de cada cultura foram retirados quatro discos (5 mm de diâmetro) e transferidos para placa de Petri com meio AA a 2% em cinco repetições (uma placa por repetição). Após cinco dias de incubação a 27°C adicionaram-se 100 J2 de *M. incognita* raça 1 e mantiveram-se as placas no escuro. A testemunha foi incubada apenas com nematoides. Repetiu-se o mesmo procedimento para os NVL. Os nematoides capturados foram removidos para outra placa com AA a 2% e deles realizados o reisolamento dos fungos infectantes em meio BDA para a comparação com as culturas originais.

O total de J2 de *M. incognita* raça 1 e NVL capturados foram estimados adotando valores cumulativos após 24 h, 48 h, 72 h e 92 h da adição dos mesmos, como descrito anteriormente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, para as

análises estatísticas os dados foram transformados em  $\arcsin(x/100)$ . Em seguida foi realizada a ANOVA e o teste de comparação de médias das porcentagens acumuladas de juvenis predados. Para o NVL foi utilizado apenas a variável porcentagem de nematoides predados, no quarto dia de avaliação.

### **Efeito do coquetel de fungos predadores no controle de *R. reniformis* em espécies de helicônia**

Para os testes em casa de vegetação foram empregadas duas espécies de helicônia (*H. richardiana* e *H. rostrata*), adquiridas em plantio comercial no município de Itabuna, BA. As mudas foram transplantadas em vasos plásticos (10L) tendo como substrato o solo coletado da propriedade. O ambiente na casa de vegetação, com temperatura média de 33°C, é adequado para a cultura e para o desenvolvimento dos nematoides. Para obtenção da população inicial dos nematoides, estes foram extraídos de amostras de 100 cm<sup>3</sup> de solo pelo método de flutuação centrífuga em solução de sacarose (Jenkins, 1964), e de amostras de 10g de raízes de plantas coletadas antes do transplante pelo método de Coolen e D'Herde (1972).

As análises prévias em solo e raiz de *H. rostrata* revelaram uma população inicial de 920 *R. reniformis* no solo e 12 nas raízes, em solo e raiz de *H. richardiana* foram encontradas 612 e 20 de *R. reniformis* respectivamente. Outras espécies de nematoides foram detectadas nas análises de solo e raízes, porém, em populações muito baixas, por isso, estas foram desconsideradas nesse estudo.

O delineamento experimental foi de blocos casualizados consistindo-se num esquema bifatorial, com os fatores: Inóculo e Tratamento. Consideraram-se como fator Inóculo: os tempos de aplicação do coquetel a 30, 60 e 90 dias e como Tratamento: 1 com aplicação do coquetel e 2 testemunha com aplicação de água destilada. Cada tratamento foi constituído por cinco plantas em linha, totalizando 20 plantas por bloco por espécie.

Para a preparação do coquetel fúngico utilizado no Tratamento 1, foram escolhidos um isolado de cada espécie que apresentou maior predação nos testes *in vitro*: *Arthrobotrys oligospora*, *A. musiformis* e *M. thumasi*. Estes foram multiplicados em NVL, no

interior de placas de Petri com AA a 2% (Santos e Ferraz, 2000). Foram adicionados 5 mL de água destilada e esterilizada, em cada placa para recolher os nematoides infectados pelos fungos. A suspensão final, para cada fungo, foi ajustada utilizando-se lâmina de contagem de Peters para 300 nematoides infectados pelo fungo por mL. Após 45 dias de aclimação das plantas adicionaram-se 30 mL do coquetel fúngico preparado, sendo 10 mL para cada fungo. Os tratamentos foram aplicados distribuindo-se, com conta gotas, o coquetel para o tratamento 1 e a água destilada para a testemunha (tratamento 2) em depressões de 8 cm próximas as raízes das helicônias. As plantas foram inoculadas novamente 30, 60 e 90 dias após a primeira aplicação. Foi avaliada a população dos nematoides após 30 dias, de cada aplicação, retirando-se aleatoriamente três amostras compostas de dez subamostras de solo e raízes das plantas inoculadas. O mesmo procedimento foi realizado para as plantas testemunhas. Para as análises estatísticas os dados foram transformados em  $(x+1)$  ou  $\log(x+1)$ , conforme a variável, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

## **Resultados e Discussão**

### **Deteção, isolamento e identificação dos fungos nematófagos**

A partir das análises de 34 amostras de solo, foram obtidos 94 isolados de fungos nematófagos, sendo detectadas espécies dos gêneros *Arthrobotrys* e *Monacrosporium*, todas predadoras por meio de redes tridimensionais adesivas (Tabela 1). Estes fungos crescem em diferentes meios de cultura e, ou substratos facilitando sua utilização e multiplicação em larga escala no biocontrole de fitonematoídeos (Soares et al., 2009).

Observou-se também, a ocorrência em duas amostras do fungo endoparasita *Nematoctonus concurrens* Drechsler, estes são considerados parasitos obrigatórios, sendo portanto, de difícil cultivo *in vitro*. Os fungos nematófagos estavam presentes em 100% das amostras analisadas. A predominância de fungos nematófagos encontrados em rizosfera de helicônias corrobora com resultados obtidos por Ribeiro et al. (1999, 2003), Lima (1996), Naves e Campos (1991), em relação aos fungos mais frequentes detectados em solos do Brasil. Em levantamento realizado no sul de

Tabela 1 - Fungos nematófagos detectados e isolados a partir de amostras de solo da rizosfera de helicônias, oriundas da região sul da Bahia, no período de 2006 e 2007

Amostra	Local de coleta	Fungos detectados
01- <i>Heliconia psittacorum</i>	Rodovia Ilhéus-Itabuna Km 10	<i>Arthrobotrys musiformis</i> e <i>Monacrosporium thaumasium</i>
02- <i>H. psittacorum</i>	Rodovia Ilhéus-Itabuna Km 16	<i>A. musiformis</i> , <i>M. megalospora</i> e <i>A. conoides</i>
03- <i>H. psittacorum</i>	Rodovia Ilhéus-Itabuna Km 16	<i>A. conoides</i> e <i>M. megalospora</i>
04- <i>H. psittacorum</i>	Rodovia Ilhéus-Itabuna Km 16	<i>A. musiformis</i> e <i>M. thaumasium</i>
05- <i>H. psittacorum</i>	Rodovia Ilhéus-Itabuna Km 16	<i>A. musiformis</i> e <i>M. thaumasium</i>
06- <i>H. psittacorum</i>	Rodovia Ilhéus-Itabuna Km 16	<i>A. musiformis</i> , <i>M. megalospora</i> , <i>M. thaumasium</i> e <i>M. eudermatum</i>
07- <i>H. psittacorum</i>	Rodovia Ilhéus-Itabuna Km 18	<i>A. musiformis</i> e <i>M. thaumasium</i>
08- <i>H. psittacorum</i>	Rodovia Ilhéus-Itabuna Km 18	<i>A. oligospora</i> , <i>A. musiformis</i> e <i>M. eudermatum</i>
09- <i>H. psittacorum</i>	Rodovia Ilhéus-Itabuna Km 21	<i>M. thaumasium</i> , <i>A. oligospora</i> e <i>A. musiformis</i>
10- <i>H. psittacorum</i>	Rodovia Ilhéus-Itabuna Km 21	<i>M. eudermatum</i> , <i>A. musiformis</i> e <i>A. oligospora</i>
11- <i>H. rostrata</i>	Ecoparque – Una	<i>M. thaumasium</i> , <i>A. oligospora</i> e <i>A. musiformis</i>
12- <i>H. richardiana</i>	Ecoparque – Una	<i>A. musiformis</i> , <i>M. eudermatum</i> , <i>A. oligospora</i> e <i>A. conoides</i>
13- <i>H. richardiana</i>	Ecoparque – Una	<i>A. musiformis</i> e <i>M. megalospora</i>
14- <i>H. richardiana</i>	Ecoparque – Una	<i>M. thaumasium</i> , <i>A. musiformis</i> e <i>M. megalospora</i>
15- <i>H. rostrata</i>	Ecoparque – Una	<i>M. thaumasium</i> , <i>A. musiformis</i> , <i>A. conoides</i> e <i>Nematoctonus concurrens</i>
16- <i>H. richardiana</i>	Ecoparque – Una	<i>M. megalospora</i> , <i>A. musiformis</i> e <i>A. conoides</i>
17- <i>Heliconia</i> sp.	Ecoparque – Una	<i>A. musiformis</i> , <i>A. oligospora</i> e <i>A. conoides</i>
18- <i>H. rostrata</i>	Fazenda Boa Lembrança - Ilhéus	<i>M. thaumasium</i> , <i>M. eudermatum</i> , <i>A. oligospora</i> e <i>A. musiformis</i>
19- <i>H. bihai</i>	Fazenda Boa Lembrança - Ilhéus	<i>M. thaumasium</i> , <i>Arthrobotrys</i> sp., <i>A. musiformis</i> e <i>A. conoides</i>
20- <i>H. bihai</i>	Fazenda Boa Lembrança - Ilhéus	<i>A. conoides</i> e <i>A. musiformis</i>
21- <i>H. rostrata</i>	Fazenda Boa Lembrança - Ilhéus	<i>A. musiformis</i> , <i>M. eudermatum</i> e <i>A. conoides</i>
22- <i>H. psittacorum</i>	Fazenda Boa Lembrança - Ilhéus	<i>M. thaumasium</i> e <i>A. musiformis</i>
23- <i>H. rostrata</i>	Fazenda Boa Lembrança - Ilhéus	<i>M. thaumasium</i> e <i>A. musiformis</i>
24- <i>H. psittacorum</i>	Fazenda Boa Lembrança - Ilhéus	<i>A. conoides</i> , <i>M. eudermatum</i> e <i>A. musiformis</i>
25- <i>H. psittacorum</i>	Fazenda Boa Lembrança - Ilhéus	<i>A. musiformis</i> e <i>A. oligospora</i>
26- <i>H. psittacorum</i>	Fazenda Boa Lembrança - Ilhéus	<i>Monacrosporium</i> sp., <i>A. oligospora</i> e <i>A. musiformis</i>
27- <i>H. psittacorum</i>	Fazenda Boa Lembrança - Ilhéus	<i>Monacrosporium</i> sp., <i>Arthrobotrys</i> sp., <i>M. thaumasium</i> e <i>A. musiformis</i>
28- <i>H. rostrata</i>	Fazenda Boa Lembrança - Ilhéus	<i>A. oligospora</i> e <i>A. musiformis</i>
29- <i>H. spathocircinata</i>	Fazenda Boa Lembrança - Ilhéus	<i>A. musiformis</i> e <i>A. oligospora</i>
30- <i>H. psittacorum</i>	Fazenda Boa Lembrança - Ilhéus	<i>A. conoides</i> e <i>A. musiformis</i>
31- <i>H. spathocircinata</i>	Faz. Conquistadora Rod. Ilhéus-Itabuna	<i>M. thaumasium</i> e <i>A. musiformis</i>
32- <i>H. pendula</i>	Faz. Conquistadora Rod. Ilhéus-Itabuna	<i>Monacrosporium</i> sp., <i>A. musiformis</i> e <i>M. eudermatum</i>
33- <i>H. pendula</i>	Faz. Conquistadora Rod. Ilhéus-Itabuna	<i>Nematoctonus concurrens</i> , <i>A. musiformis</i> e <i>Monacrosporium</i> sp.
34- <i>H. psittacorum</i>	Faz. Conquistadora Rod. Ilhéus-Itabuna	<i>A. javanica</i> , <i>Monacrosporium</i> sp. e <i>A. musiformis</i>

Minas Gerais encontraram apenas espécies de *Arthrobotrys*, sendo que todas formavam redes adesivas como estruturas de captura (Naves e Campos, 1991). Dentre os isolados de *Arthrobotrys* detectados em vários municípios brasileiros, 87% deles eram formadores de redes adesivas tridimensionais (Lima, 1996) e espécies do gênero *Monacrosporium* apresentaram ampla distribuição em solos brasileiros e 92% dos isolados detectados, também, formavam redes

adesivas (Ribeiro et al., 1999). Em 22 amostras de solos de bananais analisadas, foram obtidos 16 isolados fúngicos pertencendo aos gêneros *Arthrobotrys* e *Monacrosporium* (Ribeiro et al., 2003).

Foram encontradas 34 cepas de *A. musiformis*, 11 de *A. conoides*, 11 de *A. oligospora*, uma de *A. javanica*, duas de *Arthrobotrys* sp., 15 de *M. thaumasium*, oito de *M. eudermatum*, seis de *M. megalospora* e quatro de *Monacrosporium* sp.,

fungos ectoparasitos (Tabela 1). Foi isolado, em duas amostras, o fungo *N. concurrens* que, por se tratar de um endoparasita foi preservado em placa de Petri com AA a 2% e adição de NVL. A predominância de fungos ectoparasitos encontrada no levantamento pode ser devido à sua maior capacidade saprofítica, podendo-se nutrir de outras fontes na ausência de nematoides, facilitando a sobrevivência no solo (Ferraz e Santos, 1995).

Dentre os ectoparasitos, *A. musiformis* foi o mais frequente, presente em 35% das amostras. *A. oligospora* foi detectado em 11,6% das amostras. Mundialmente este fungo é o mais frequentemente detectado em amostras de solos (Olsson e Persson, 1994). Não se tem resposta, ainda, da relação entre ocorrência, origem e distribuição das espécies de *Arthrobotrys* isoladas de diferentes localidades brasileiras e de diferentes culturas (Oliveira et al., 2002).

#### Patogenicidade dos fungos à *P. redivivus* e *M. incognita* raça 1

Os testes *in vitro* evidenciaram que os fungos *A. musiformis*, *M. thaumasium* e *A. oligospora*, que produzem redes adesivas como estruturas de captura, foram os mais efetivos no controle de *Meloidogyne incognita* raça 1 causando mortalidade de 90,4%, 77% e 73,2%, respectivamente. Fungos que possuem esse tipo de estratégia de captura aderem facilmente ao nematoide, promovendo a relação de parasitismo, podendo ser considerados mais eficientes nessa captura, além disso, esses fungos são capazes de crescerem rapidamente em meio de cultura e são facilmente isolados (Araújo et al., 1999). Segundo Drechsler (1937) após a apreensão do nematoide sua cutícula é rompida e há a penetração da hifa, a partir

daí o fungo é capaz de absorver todo conteúdo do nematoide. O fungo *A. conoides* apresentou uma porcentagem de predação mais baixa (44,3%), quando comparado à maioria dos isolados e, *M. eudermatum* de 4,4% (Tabela 2). Estes organismos apresentam a capacidade de capturar, matar ou digerir os nematoides (Lopes et al., 2007). Contudo, ocorre especificidade de natureza bioquímica entre os fungos e os nematoides. Se houver reconhecimento entre as lecitinas das armadilhas de captura do fungo e açúcares presentes na cutícula do nematoide, pode ser estabelecida a relação de parasitismo (Nordbring-Hertz, 1972). Diferenças na capacidade predatória entre isolados de uma mesma espécie de *Arthrobotrys* às juvenis de *Meloidogyne* sp., também foram observadas por Araújo et al. (1993) e, entre isolados de *M. thaumasium*, *M. sinense* Xing Z. Liu e K.Q. Zhang e *M. appendiculatum* (Mekht.) Xing Z. Liu e K.Q. Zhang à J2 de *M. incognita* raça 3 (Gomes et al., 1999).

Entre os fungos testados a porcentagem de predação de *P. redivivus* variou de 83,0% a 99,4% (Tabela 2). Em testes *in vitro* realizados por Putzke et al. (2007) ocorreu 97,0% de predação por fungos nematófagos, entre outros. Este nematoide tem sido usado como “isca” em testes de laboratório (Soares, 2006) e relatado como mais suscetível que *M. incognita* por diferentes espécies de *Monacrosporium* e de *Arthrobotrys* (Gomes et al., 2000).

Para *M. incognita* raça 1, no primeiro período de avaliação, não houve diferença significativa entre os fungos testados ( $P < 0,05$ ) (Tabela 3). Este resultado está de acordo com os dados de Silveira (2000), quanto à patogenicidade *in vitro* de J2 de *M. incognita* por 11 fungos nematófagos.

Tabela 2 - Capacidade predatória média de espécies fúngicas mais frequentes, encontradas na rizosfera de *Heliconia* spp.

Espécie fúngica	Porcentagem de nematoides predados em quatro dias	
	<i>Panagrellus redivivus</i>	<i>Meloidogyne incognita</i> raça 1
<i>Monacrosporium eudermatum</i>	83,0	4,4
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	97,8	73,2
<i>A. musiformis</i>	99,4	90,4
<i>A. conoides</i>	99,0	44,3
<i>M. thaumasium</i>	99,0	77,0
Testemunha	0,8	3,8

Testemunha: sem adição de fungo.



Tabela 3 - Porcentagem de *Meloidogyne incognita* raça 1 predados *in vitro* por espécies de *Monacrosporium* e *Arthrobotrys* entre os períodos de tempo avaliados para cada espécie fúngica testada

Tempo em horas	Testemunha	<i>M. thaumasium</i>	<i>A. musiformis</i>	<i>A. oligospora</i>	<i>A. conoides</i>	<i>M. eudermatum</i>
24	0,00 a <sup>1</sup>	0,00 a	0,60 a	0,00 a	0,00 a	0,20 a
48	0,60 a	19,20 b	52,00 a	24,00 c	17,20 b	0,40 c
72	1,60 a	48,80 a,b	76,80 a,b	37,00 a,b	37,80 b	2,80 c
96	3,80 a	77,00 a	90,40 b	73,20 a	44,30 b,c	4,40 c

<sup>1</sup>Médias não transformadas seguidas de mesma letra, em cada coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade CV(%) = 15,59.

*Monacrosporium eudermatum* apresentou a menor porcentagem de parasitismo nos quatro dias de avaliação, às juvenis de *M. incognita* raça 1, em relação aos demais fungos, não diferindo da testemunha. Os demais fungos diferiram da testemunha a partir do segundo dia de avaliação. *Monacrosporium thaumasium* não diferiu de *A. musiformis* e *A. oligospora* em 72 horas de avaliação. *Arthrobotrys musiformis* obteve uma predação de 52%, no segundo dia de avaliação, apresentando a maior porcentagem de predação e, *A. conoides* a menor, nos períodos avaliados (Tabela 3). Foi observado que após uma aplicação da mistura de *A. musiformis* e *A. oligospora* antes do transplante de mudas de pimentão (*Capsicum annum* L.) cv. Elisa em solo infestado por *M. incognita* resultou em melhor desenvolvimento das plantas (Soares, 2006).

#### Efeito do coquetel de fungos predadores no controle de *R. reniformis* em espécies de helicônia

Nos ensaios em casa de vegetação com *H. rostrata* e *H. richardiana* plantadas em solo naturalmente infestado ocorreram reduções significativas ( $P < 0,05$ ) na população inicial de *R. reniformis* no solo e nas raízes para as duas espécies, 30 dias após a aplicação do tratamento 1 (coquetel com *A. musiformis*, *A. oligospora* e *M. thaumasium*), em relação ao tratamento 2 (testemunha com adição de água destilada) (Tabelas 4 e 5). *Arthrobotrys musiformis*, *A. oligospora* e *Monacrosporium* spp. são fungos abundantes nos solos, de fácil cultivo em meios de cultura elaborados com produtos tais como sementes e grãos ou subprodutos da agroindústria e podem ser fortes aliados no manejo de nematoides em cultivos de hortifrutigranjeiros e de ornamentais. Quando um coquetel de cinco fungos nematófagos (*A. oligospora*,

*A. musiformis*, *Dactylela leptospora*, *M. robustum* e *Paecilomyces lilacinus* produzidos em um preparado especial de arroz foi testado em larga escala em crisântemo de corte em estufas, altamente infestadas por *M. javanica*, os fungos exibiram eficácia no controle do nematoide. Na área tratada com os fungos, rendeu flores com hastes de melhor qualidade e maior tamanho e diâmetro (Soares, 2006). Bionemáticas foram formulados pela indústria e aplicados no controle de fitonemátodes, como o Royal 300® e Royal 350® desenvolvidos na França, porém estes foram considerados de baixa eficácia e por isso seu uso foi descontinuado. Pesquisas indicaram uma boa redução na população de nematoides em ambientes controlados, como em casa de vegetação, porém quando estes foram utilizados em áreas abertas esse índice diminuiu, provavelmente por fatores bióticos e abióticos relacionados (Cayrol et al., 1978; Cayrol e Frankowski, 1979).

A mortalidade de *R. reniformis* após a segunda e terceira aplicação do coquetel não foi significativa para solo e raízes de *H. rostrata*, porém, em *H. richardiana* a terceira aplicação do coquetel obteve uma redução mais acentuada da população do nematoide nas raízes, mesmo não sendo esta significativa (Tabela 5). Não ocorreu aumento da população de nematoides no tratamento 1 (solo e raízes) nas duas espécies de helicônias.

A redução significativa obtida 30 dias após a aplicação da mistura fúngica no solo das helicônias pode ser explicado pelo ciclo de vida do nematoide reniforme em que os juvenis de 2º, 3º e 4º estádios e os machos não são infectivos encontrando-se livres no solo (Sivakumar e Sishadre, 1971), facilitando, dessa maneira, a ação dos fungos predadores. Além de tratar-se de um nematoide de hábito semi-endoparasito sedentário ficando mais vulnerável à ação de agentes

Tabela 4 - População de *Rotylenchulus reniformis* presentes no solo e nas raízes de *Heliconia rostrata*, após 30, 60 e 90 dias de reinoculação, em casa de vegetação

	Solo				Raiz			
	RIn0 <sup>2</sup>	RIn30 <sup>2</sup>	RIn60 <sup>2</sup>	RIn90 <sup>2</sup>	RIn0 <sup>2</sup>	RIn30 <sup>2</sup>	RIn60 <sup>2</sup>	RIn90 <sup>2</sup>
Tratamento 1 <sup>1</sup>	30,043 a <sup>3</sup>	4,823 b	3,902 b	2,230 b	24,425 a	3,363 b	2,426 b	2,426 b
Tratamento 2 <sup>1</sup>	30,043 a	29,176 a	29,223 a	29,266 a	24,425 a	22,670 a	23,457 a	24,453 a

<sup>1</sup>Tratamento 1: aplicação do coquetel; Tratamento 2: testemunha só com água destilada. <sup>2</sup>RIn0: população de *R. reniformis* sem Inocular; RIn30: população de *R. reniformis* 30 dias após a primeira Inoculação; RIn60: população de *R. reniformis* 30 dias após a segunda Inoculação e RIn90: população de *R. reniformis* 30 dias após a terceira Inoculação. <sup>3</sup>Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%. CV Solo = 4,30%; CV Raiz = 23,11%.

Tabela 5 - Efeito do coquetel fúngico sobre a população de *Rotylenchulus reniformis* presentes no solo e nas raízes de *Heliconia richardiana*, após 30, 60 e 90 dias de reinoculação, em casa de vegetação

	Solo				Raiz			
	RIn0 <sup>2</sup>	RIn30 <sup>2</sup>	RIn60 <sup>2</sup>	RIn90 <sup>2</sup>	RIn0 <sup>2</sup>	RIn30 <sup>2</sup>	RIn60 <sup>2</sup>	RIn90 <sup>2</sup>
Tratamento 1 <sup>1</sup>	14,0596 a <sup>3</sup>	3,1516 b	3,0065 b	0,9428 b	4,0597 a	3,1516 b	3,0065 b	0,9428 b
Tratamento 2 <sup>1</sup>	14,0596 a	15,8096 a	15,7063 a	16,1515 a	4,6872 a	4,4305 a	4,4253 a	4,5379 a

<sup>1</sup>Tratamento 1: aplicação do coquetel; Tratamento 2: testemunha só com água destilada. <sup>2</sup>RIn0: população de *R. reniformis* sem Inocular; RIn30: população de *R. reniformis* 30 dias após a primeira Inoculação; RIn60: população de *R. reniformis* 30 dias após a segunda Inoculação e RIn90: população de *R. reniformis* 30 dias após a terceira Inoculação. <sup>3</sup>Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%. CV Solo = 6,44%; CV Raiz = 27,98%.

do controle biológico do que as espécies de hábito endoparasita (Duncan e Noling, 1998).

Os dados obtidos nos ensaios em relação à redução populacional de *R. reniformis*, utilizando-se fungos nematófagos também foi constatada por Soares (2006) onde avaliaram a eficácia de *A. musiformis* e *A. oligospora* à *M. incognita* e *R. reniformis* em cultivo de alface, em estufa. Castillo et al. (2010) observaram redução significativa de *R. reniformis* pela ação de *Drechslera dactyloides* Drechsler, *D. brochopaga* (Drechsler) M. Scholler, Hagedorn e A. Rubner e *P. lilacinus*, em casa de vegetação.

Não foram observadas diferenças populacionais após a segunda e terceira aplicação do coquetel fúngico, embora há relato que aplicações sucessivas de fungos nematófagos favorecem a ação desses microrganismos para que eles atuem na redução populacional dos nematoides (Campos e Campos, 1997). A utilização de formulações de fungos nematófagos pode vir a ser o recurso mais adequado para o manejo de nematoides em hortaliças produzidas em volta dos centros urbanos, assim como em parques e jardins (Soares, 2006). Também não foi constatado o aumento da população do *R. reniformis* nas plantas

testemunhas, provavelmente, pela presença de outros antagonistas presentes no solo naturalmente infestado.

## Conclusões

Em condições de casa de vegetação, a adição do coquetel fúngico (*Arthrobotrys musiformis*, *A. oligospora* e *Monacrosporium thaumasium*) reduz significativamente a poluição de *Rotylenchulus reniformis* em solo cultivado com *Heliconia richardiana* e *H. rostrata*.

## Agradecimentos

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa de estudo durante o curso de mestrado do primeiro autor, a Luciano Ramos de Lima pelo fornecimento das mudas de helicônia.

## Literatura Citada

ARAÚJO, J. V. et al. 1993. Antagonistic effect of predacious *Arthrobotrys* fungi on effective

- Haemonchus placei* larvae. Journal of Helminthology 67:136-138.
- ARAÚJO, J. V.; STEPHANO, M. A.; SAMPAIO, W. M. 1999. Passage of nematode trapping fungi through the gastrointestinal tract of calves. Veterinarni arhiv 69(2):69-78.
- ASMUS, G. L.; RICHETTI, A. 2010. Rotação de culturas para o manejo do nematoide reniforme em algodoeiro. Dourados, MS. Embrapa Agropecuária Oeste. Boletim Técnico. 28p.
- ASSIS, S. M. P. et al. 2002. Doenças e Pragas das Helicônias. Recife, PE, UFRPE. 102p.
- ASSIS, T. C. de. et al. 2012. Fitonematoides associados à Zingiberales tropicais e estimativas do número de amostras para monitoramento. Pesquisa Agropecuária Pernambucana 17(1):83-89.
- BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira 6:553.
- CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P. 1997. Efeito da época e forma de aplicação dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* no controle de *Meloidogyne exigua* no cafeeiro. Fitopatologia Brasileira 22:261-265.
- CASTILLO, J. D. et al. 2010. Evaluation of *Drechslerella dactyloides*, *Drechslerella brochopaga* and *Paecilomyces lilacinus* for biocontrol of *Rotylenchulus reniformis*. Nematropica 40:71-85.
- CASTRO, A. C. R. et al. 2007. Hastes florais de helicônia sob deficiência de macronutrientes. Pesquisa Agropecuária Brasileira 42(9):1299-1306.
- CAYROL, J. C., FRANKOWSKI, J. P. 1979. Une méthode de lutte biologique contre les nématodes à galles des racines appartenant au genre *Meloidogyne*. Revue Horticole 193:15-23.
- CAYROL, J. C. et al. 1978. Contre les nématodes en champignonnière. Mise au point d'une méthode de lutte biologique à l'aide d'un hyphomycete prédateur: *Arthrobotrys robusta* souche antipolis (Royal300). Revue Horticole 184:23-30.
- CLIFF, G. M.; HIRSCHMANN, H. H. 1985. Evaluation of morphological variability in *Meloidogyne arenaria*. Journal of Nematology 17(4):445 - 449.
- COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. 1972. A method for the quantitative extraction of nematodes from tissue. State Agricultural Research Center. 77p.
- DRECHSLER, C. S. 1937. Hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. Mycologia 29:447-552.
- DUNCAN, L. W.; NOLING J. W. 1998. Plant and nematode interactions. In: Barker, K. R. et al. Agricultural sustainability and nematode integrated pest management. Madison American Society of Agronomy. pp.251-288.
- FERRAZ, S.; SANTOS, M. A. 1995. Controle biológico de fitonematoides pelo uso de fungos. Revisão Anual de Patologia de Plantas (Brasil) 3:283-314.
- GOMES, A. P. S.; ARAÚJO, J. V.; RIBEIRO, R. C. F. 1999. Differential *in vitro* pathogenicity of predatory fungi of the genus *Monacrosporium* for phytonematodes, free-living nematodes and parasitic nematodes of cattle. Brazilian Journal of Medicine and Biological Research 32(1):79-83.
- GOMES, A. P. S. et al. 2000. *In vitro* activity of brazilian strains of the predatory fungi *Arthrobotrys* spp. on free-living nematodes and infective larvae of *Haemonchus placei*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 95: 873-876.
- HAARD, K. 1968. Taxonomic studies on the genus *Arthrobotrys* Corda. Mycology 60:140-1159.
- HEINTZ, C. E. 1978. Assessing the predacity of nematode-trapping fungi *in vitro*. Micology 70:1088-1100.
- JENKINS, W. R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter 48:692.
- LAMAS, A. M. 2004. Flores: produção, pós-colheita e mercado. Fortaleza, CE, Instituto Frutal. 109p.
- LIMA, R. D. 1996. Caracterização de isolados e avaliação da patogenicidade de *Arthrobotrys* spp. a fitonematoides. Tese Doutorado. Viçosa, MG, UFV. 88p.
- LIU, X. Z.; ZHANG, K. Q. 1994. Nematode-trapping species of *Monacrosporium* with special reference to two new species. Mycological Research 98: 862-868.
- LOPES, E. A. et al. 2007. Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira 31(2):78-84.

- MARTINELLI, P. R. P.; SANTOS, J. M. 2010. Scanning electron microscopy of nematophagous fungi associated *Tylenchulus semipenetrans* and *Pratylenchus jaehni*. Bioscience Journal 26(5): 809-816.
- MATTOS SOBRINHO, C. C. de, et al. 2012. Fitonematoides associados à *Heliconia* spp. em cultivos comerciais no litoral sul da Bahia, Brasil. Nematopica 42(2):349-353.
- MOSCA, J. L. et al. 2004. Heliconia: descrição, colheita e pós-colheita. Fortaleza, CE, Embrapa Agroindústria Tropical. 32p.
- NAVES, R. L.; CAMPOS, V. P. 1991. Ocorrência de fungos predadores de nematoides no sul de Minas Gerais e estudo da capacidade predatória e crescimento “*in vitro*” de alguns de seus isolados. Nematologia Brasileira 15(2):152-162.
- NORDBRING-HERTZ, B. 1972. Scanning electron microscopy of the nematode-trapping organs in *Arthrobotrys oligospora*. Physiologia Plantarum 26:279-284.
- OLIVEIRA, R. D. L. et al. 2002. Caracterização morfológica e isoenzimática de espécies de *Arthrobotrys oligospora* no Brasil. Nematologia Brasileira 26(2):181-197.
- OLSSON, S.; PERSSON, Y. 1994. Transfer of phosphorus from *Rhizoctonia* to the mycoparasite *Arthrobotrys oligospora*. Mycological Research 98:1065-1068.
- ORSINI, I. P. et al. 2010. Flutuação populacional de nematoides em duas épocas de avaliação em solos cultivados com cana-de-açúcar sob diferentes manejos. Nematologia Brasileira 34(3): 159-163.
- PUTZKE, M. T. L. et al. 2007. Taxonomia e importância das espécies de *Hohenbuehelia*, *Resupinatus* e *Pleurotus* no controle de *Meloidogyne javanica*. Caderno de Pesquisa 19:38-81.
- RIBEIRO, R. C. F. et al. 1999. Levantamento de espécies de *Monacrosporium* predadoras de nematoides em diversas regiões brasileiras. Nematologia Brasileira 23(1):40-47.
- RIBEIRO, R. C. F. et al. 2003. Ocorrência de fungos predadores de nematoides sob solos de bananais no Norte de Minas Gerais. UNIMONTES Científica 5(1):1-8.
- SANTOS, M. A.; FERRAZ, S. 2000. Eficiência de cinco isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne* spp. ao longo de três cultivos sucessivos. Nematologia Brasileira 24(2):193- 201.
- SANTOS, M. A.; FERRAZ, S.; MUCHOVEJ, J. J. 1991. Detection and ecology of nematophagous fungi from brazilian soil. Nematologia Brasileira 15(2): 121-134.
- SANTOS, R. M. V. et al. 2010. Ácaros (Arachnida: Acari) associados a plantas ornamentais tropicais na região litoral sul da Bahia. Arquivo do Instituto Biológico (Brasil) 77: 45-48.
- SILVEIRA, A. J. 2000. Isolamento, identificação e potencialidade de fungos como agentes de biocontrole de *Meloidogyne* spp. e *Heterodera glycines*. Tese Doutorado. Jaboticabal, SP, UNESP/FCAVJ. 117p.
- SILVEIRA, A. J.; SANTOS, J. M.; DI MAURO, A.O. 2001. Estudo *in vitro* da habilidade predatório de *Monacrosporium robustum* sobre *Heterodera glycines*. Fitopatologia Brasileira 26 (4):732 -736.
- SIVAKUMAR, C. V.; SISHADRI, A. R. 1971. Life history of the reniform nematode *Rotylenchulus reniformis* Linford and Oliveira, 1940. Journal Indian of Nematology 1:7-20.
- SOARES, P. L. M. 2006. Estudo do controle biológico de fitonematoides com fungos nematófagos. Tese Doutorado. Jaboticabal, SP, UNESP/FCAVJ. 217p.
- SOARES, P. L. M.; SANTOS, J. M.; LEHMAN, P. S. 2004. Estudo morfométrico comparativo de populações de *Rotylenchulus reniformis* (Nemata: Rotylenchulinae) do Brasil. Fitopatologia Brasileira 28(3):292-297.
- SOARES, P. L. M. et al. 2009. Crescimento e esporulação de duas espécies de *Arthrobotrys* Corda em diferentes meios de cultura e dois ambientes. Bioscience Journal 25(2):63-74.





## REAÇÕES DE COMPATIBILIDADE DE CLONES DE CACAUEIROS DA SÉRIE CEPEC

*Milton Macoto Yamada<sup>1</sup>, Fábio Gelape Faleiro<sup>2</sup>, Uilson Vanderlei Lopes<sup>1</sup>,  
José Luis Pires<sup>1</sup>, Ramon Figueiredo dos Santos<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>CEPLAC, Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), Setor de Genética, km 22 Rodovia Ilhéus/Itabuna, caixa postal 7,  
45600-000, Itabuna, BA, Brasil.

<sup>2</sup>Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, BR 020, Km 18, caixa postal 08223, 73310-970, Planaltina, DF, Brasil.

O objetivo desse trabalho foi determinar a autoincompatibilidade de 42 clones da série CEPEC e os fenótipos de compatibilidade em relação aos seus genitores. Esses clones são resultantes das seleções de plantas individuais realizadas nas áreas experimentais de competição de híbridos no Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) da CEPLAC até 1983. Trinta autopolinizações ou cruzamentos foram realizados para cada combinação testada. Clones ou cruzamentos que apresentaram vingamento acima de 5 % foram considerados compatíveis. Todos os clones CEPEC testados foram autoincompatíveis. Os clones IMC 67 e TSA 644 possuem o mesmo alelo recessivo de incompatibilidade. Estes clones não segregam para plantas autocompatíveis por não possuírem alelos Sf de compatibilidade. Sugere-se um provável genótipo de incompatibilidade para os clones IMC 67 e CAS 1 para explicar os resultados encontrados nas suas progênes.

**Palavras-chave:** *Theobroma cacao*, cacau, germoplasma

**Reaction of compatibility in cacao clones of CEPEC series.** The objective of this work was to determine selfincompatibility in 42 clones of CEPEC series and phenotypes of compatibility in relation to ancestors. These clones are resultant of selection of individual plants made in experimental areas of hybrids in Cocoa Research Center (CEPEC) at CEPLAC until 1983. Thirty selfpollinations or crosses were made and setting quantified. Setting above 5 % were considered compatible. The tested clones were selfincompatible. The clone IMC 67 and TSA 644 have the same recessive allele of incompatibility and they do not segregate to selfcompatible plants because they do not have Sf alleles. It was suggested possible genotype for IMC 67 and CAS1 to explain the results of its progenies.

**Key words:** *Theobroma cacao*, cacao, germplasm

## Introdução

A incompatibilidade sexual é um importante fator limitante da produtividade potencial do cacauzeiro, podendo causar perdas de até 38% (Pires et al., 2012). Além disto, em programas de melhoramento, a incompatibilidade dificulta autofecundações e cruzamentos entre indivíduos tendo os mesmos alelos dominantes no loco que controla este caráter.

Em programas de melhoramento do cacauzeiro, como o do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) e de outros países (Malásia, Indonésia, Equador, Colômbia, Costa Rica), que priorizam o desenvolvimento de clones como variedade, a busca de variedades autocompatíveis torna-se ainda mais importante, já que ao final do programa, uns poucos genótipos são recomendados e, sendo estes incompatíveis, limita-se a produtividade potencial em plantios comerciais. Assim, o desenvolvimento de variedades autocompatíveis é facilitado, quando se conhece as relações de incompatibilidade entre os germoplasmas usados no programa de melhoramento.

Em 1983, 60 seleções foram realizadas em populações do programa de melhoramento do CEPEC, com alta resistência a doenças e produtividade, que resultaram nos clones CEPEC-26 a CEPEC-85 (Bartley et al., 1985). Alguns destes clones apresentam alta resistência à vassoura-de-bruxa e outros caracteres de interesse para o programa de melhoramento (Pires et al. 1999). Entretanto, em estudos preliminares realizados no CEPEC, alguns deles mostraram-se autoincompatíveis. Considerando-se o potencial destes para programas de melhoramento, faz-se necessário caracterizar a incompatibilidade destes em autofecundações e em cruzamentos com outros clones do programa de melhoramento.

Knight e Rogers (1955) sugeriu que a incompatibilidade em cacauzeiro é o sistema esporofítico sendo controlado por um único loco com 5 alelos. Os alelos de incompatibilidade, por sua vez, apresentam relações de dominância e co-dominância entre si ( $S1 > S2 = S3 > S4 > S5$ ). Indivíduos com o mesmo alelo dominante de incompatibilidade, além de autoincompatíveis, são incompatíveis entre si. Posteriormente, Cope (1962) sugeriu a adição de dois outros locos envolvidos no controle da incompatibilidade do cacauzeiro. sendo o alelo de

autocompatibilidade ( $Sf$ ) recessivo em relação aos de incompatibilidade.

O presente trabalho teve o objetivo de determinar os fenótipos e genótipos de incompatibilidade de 42 clones da série CEPEC e a incompatibilidade em relação aos seus genitores.

## Material e Métodos

Dentre os 60 clones da Série CEPEC, 42 deles foram testados quanto à autocompatibilidade e à compatibilidade cruzada com os genitores que deram origem aos mesmos. Um grupo destes clones são resultantes dos cruzamentos de IMC 67 com ICS 1 ou clones locais. Outros clones são progênies de TSA 644 (Sca6 x IMC 67) e do cruzamento IMC 67 x CAS 1 (Tabela 1).

Trinta autopolinizações ou cruzamentos controlados por teste foram realizados em plantas com mais de 20 anos de idade no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) e o vingamento foi baseado no critério estabelecido por Yamada et al (1982). Autopolinizações ou cruzamentos feitos no período de Janeiro a Julho de 2012 e de 2013 que apresentaram vingamento acima de 5 % foram considerados compatíveis e quando próximo desse valor, as polinizações foram repetidas.

## Resultados e Discussão

Os clones CEPEC 27 a CEPEC 33 são progênies de ICS 1, IMC 67, SIC 19 e SIAL 169. sendo o ICS 1, SIC 19 e SIAL 169 autocompatíveis. Se o IMC 67 possuísse alelo  $Sf$  de compatibilidade, era de se esperar que alguns destes clones CEPEC fossem, autocompatíveis, o que não foi o caso (Tabela 1). Nos casos do CEPEC 28 e CEPEC 29, sendo autoincompatíveis, mas compatíveis com o IMC 67, indica que devem possuir o alelo recessivo de incompatibilidade do IMC 67 (Tabela 1).

Os clones CEPEC 35 a CEPEC 85 testados foram todos autoincompatíveis e foram cruzados com o Scavina 6 e o IMC 67. Esperava-se que os clones que fossem compatíveis com o Scavina 6 não fossem compatíveis com o IMC 67, caso esses clones CEPEC

Tabela 1. Reação de incompatibilidade de clones da série CEPEC após autopolinização e cruzamentos com seus genitores IMC 67, SCA 6 e CAS 1

Clones	Progenitores	Auto	IMC 67	SCA 6	CAS 1
CEPEC 27	ICS 1x IMC 67	I	I		
CEPEC 28	ICS 1 x IMC 67	I	C		
CEPEC 29	ICS 1x IMC 67	I	C		
CEPEC 30	IMC 67x ICS 1	I	I		
CEPEC 31	IMC 67x ICS 1	I	I		
CEPEC 32	SIC 19 x IMC 67	I	I		
CEPEC 33	SIAL 169x IMC 67	I	I		
CEPEC 35	TSA 644 x ?	I	C	I	
CEPEC 36	TSA 644 x ?	I	C	C	
CEPEC 37	TSA 644 x ?		C	I	
CEPEC 38	TSA 644x SIC 823	I	C	C	
CEPEC 39	SIC 19x TSA 644	I	C	C	
CEPEC 40	TSA 644x SIC 19	I	C	C	
CEPEC 41	TSA 644x SIC 19		C	I	
CEPEC 42	TSA 644x SIC 19		C	I	
CEPEC 44	TSA 644x SIAL 169	I	C	C	
CEPEC 74	TSA 644 x ?		C	I	
CEPEC 75	TSA 644 x ?		C	I	
CEPEC 76	TSA 644 x ?	I	C	C	
CEPEC 77	TSA 644 x ?		I	C	
CEPEC 78	TSA 644 x ?	I	C	I	
CEPEC 79	TSA 644 x ?	I	C	C	
CEPEC 80	TSA 644 x ?	I	C	C	
CEPEC 81	SIC 19xTSA 644	I	C	C	
CEPEC 82	SIC 19x TSA 644	I	C	C	
CEPEC 83	SIC 19x TSA 644		C	C	
CEPEC 84	TSA 644x SIC 19		C	I	
CEPEC 85	TSA 644x SIC 19		C	C	
CEPEC 52	IMC 67x CAS 1		I		C
CEPEC 53	IMC 67X CAS1		C		I
CEPEC 54	IMC 67X CAS 1		C		I
CEPEC 55	IMC 67X CAS 1		I		C
CEPEC 56	IMC 67X CAS 1		I		C
CEPEC 57	IMC 67X CAS 1		C		I
CEPEC 58	IMC 67X CAS 1		C		I
CEPEC 59	IMC 67X CAS1		C		I
CEPEC 60	IMC 67X CAS 1		C		I
CEPEC 69	IMC 67X CAS 1		C		I
CEPEC 70	IMC 67XCAS 1		I		C
CEPEC 71	IMC 67X CAS 1		I		C
CEPEC 72	IMC 67X CAS 1		C		I
CEPEC 73	IMC 67X CAS 1		C		I

possuíssem os alelos dominantes de incompatibilidade do IMC 67. Os resultados obtidos mostram que o clone TSA 644 possui o alelo de IMC na forma recessiva. A única exceção é o CEPEC 77 que é incompatível com IMC 67 (Tabela 1). A origem do CEPEC 77 é desconhecida considerando o TSA 644 como um dos possíveis parentais (Bartley et al., 1985).

Os clones CEPEC 52 a 73 (Tabela 1) são incompatíveis com o IMC 67 ou com o CAS 1. Uma provável explicação seria que um clone possui SaSb e outro SbSc com dominância na seguinte ordem Sa>Sb>Sc. No caso dos clones CEPEC resultantes deste cruzamento, não há necessidade de fazer autopolinização considerando que os clones foram incompatíveis com um dos pais (Tabela 1). Se algum clone CEPEC desse grupo fosse autocompatível seria compatível com ambos os genitores.

### Conclusões

- Todos os clones CEPEC testados foram autoincompatíveis.
- Os cruzamentos com o clone IMC 67 não segregam para as plantas autocompatíveis por não possuir o alelo Sf de compatibilidade.
- O clone TSA 644 possui o alelo recessivo de incompatibilidade do IMC 67.

- Foi atribuído o provável genótipo de IMC 67 e CAS 1 para explicar os resultados encontrados nas suas progênes.

### Literatura Citada

- BARTLEY, B. G. D.; MIRANDA, A. H.; CASTRO, G. C. T. de. 1985. Recursos genéticos. Ilhéus, BA, CEPLAC/CEPEC. Informe de Pesquisas de 1983. pp.5-6.
- COPE, F. W. 1962. The mechanism of pollen incompatibility in *Theobroma cacao* L. Heredity 17:157-182.
- KNIGHT, R.; ROGERS, H. H. 1955. Incompatibility in *Theobroma cacao* L. Heredity 9:69-77.
- PIRES, J. L. et al. 1999. Cocoa breeding for witches' broom resistance at CEPEC, Bahia, Brazil. In: International Workshop on the contribution of disease resistance to cocoa variety improvement. Proceedings. 1999. Salvador, Bahia.
- PIRES, J. L.; ROSA, E. S.; MACÊDO, M. M. 2012. Avaliação de clones de cacauzeiro na Bahia, Brasil. Agrotropica (Brasil) 24(2):79-84.
- YAMADA, M. M. et al. 1982. Herança do fator compatibilidade em *Theobroma cacao* L. Relações fenotípicas na família PA (Parinari). Revista Theobroma (Brasil) 12(3):163-167.





## QTLs DETECTION UNDER NATURAL INFECTION OF *Moniliophthora perniciosa* IN A CACAO F<sub>2</sub> PROGENY WITH SCAVINA-6 DESCENDANTS

**Francisca Feitosa Jucá Santos<sup>1,3</sup>, Uilson Vanderlei Lopes<sup>1</sup>, José Luis Pires<sup>1</sup>, Gilson Roberto Pires Melo<sup>1</sup>, Karina Peres Gramacho<sup>1</sup>, Didier Clément<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>CEPLAC/CEPEC, Rod. Ilhéus-Itabuna, km 22, Itabuna, Bahia, Brasil 45600-000, Brazil. [chicafeitosa@yahoo.com.br](mailto:chicafeitosa@yahoo.com.br); [gramachokp@hotmail.com](mailto:gramachokp@hotmail.com); <sup>2</sup>CIRAD, UMR AGAP, Avenue Agropolis TA 96/03, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz/Programa de Pós graduação em Genética e Biologia Molecular, Rod. Jorge Amado, Km 16, 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil.

Studies to determine the genetic bases to witches' broom disease (WBD) resistance in *Theobroma cacao* L. were carried out in order to identify different genetic sources of resistance and to improve the efficiency of selection using molecular markers. A major QTL for WBD resistance and linked to Scavina 6 - the main source of resistance, was detected in chromosome 9 from a F<sub>2</sub> Scavina 6 x ICS 1 progeny. In this paper, phenotypic quantification of vegetative and flower cushions brooms was done in the same progeny growing in two fields: F<sub>2</sub>-1M and F<sub>2</sub>-1C; respectively with 62 individuals and 142 individuals, observed over a period from 2003 to 2008. QTLs analyses were carried out with MapQTL 5.0 software to confirm the presence in chromosome 9 of the previously detected QTL. A significant instability of this QTL was observed with a LOD and the percentage of variation explained decreasing and moving in the confidence interval of mTcCIR157. Others QTLs of resistance were also detected such as one in Ch2, which was found in an opposite direction. These new QTLs analyzes, under natural infections of *M. perniciosa*, suggest a change in the host and pathogen relationships.

**Key words:** QTL mapping, cacao witches' broom disease, *Theobroma cacao* L.

**Deteção de QTLs sob infecção natural de *Moniliophthora perniciosa* na progênie F<sub>2</sub> com descendência Sca 6.** Estudos para determinar as bases genéticas da resistência à vassoura-de-bruxa do cacaueiro (VBC) a fim de identificar diferentes fontes genéticas de resistência e melhorar a eficiência da seleção por meio de marcadores moleculares. Um QTL de efeito maior para resistência a VBC foi detectado no cromossomo 9 em uma descendência F<sub>2</sub> do cruzamento Scavina 6 x ICS 1. Neste trabalho foram realizadas quantificações fenotípicas do número de vassouras vegetativas e almofadas florais, nesta mesma progênie, em dois campos experimentais F<sub>2</sub>-1M e F<sub>2</sub>-1C, com 62 e 142 indivíduos, respectivamente, no período de 2003 e 2008. As análises de QTLs foram realizadas com o software MapQTL 5.0 para confirmar a presença de um QTL localizado no Ch9, entretanto os resultados indicam uma instabilidade significativa deste QTL com o valor do LOD e a porcentagem de variação explicada reduzida, movendo-se no intervalo de confiança do marcador mTcCIR157. Outros QTLs de resistência também foram detectados, destacando-se um QTL no Ch2, que foi encontrado em sentido oposto. A detecção de novos QTLs sob condições de infecção natural de *M. perniciosa*, sugere mudança nas relações hospedeiro e patógeno.

**Palavras-chave:** mapeamento de QTLs, Vassoura-de-bruxa do cacaueiro, *Theobroma cacao* L.

## Introduction

Witches' broom disease (WBD) of cacao, caused by the basidiomycota *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime-Mora (Aime and Phillips-Mora, 2005) is the main phytopathological problem for cacao production in Brazil (Figure 1). This disease was detected in 1989 in the state of Bahia, the main Brazilian cacao-growing region (Pereira et al., 1989). Different sources of resistance to *M. perniciosa* have been identified (Pires et al., 1999), among them the Scavina (Sca 6) selections which are one of the most important sources of resistance of several cacao producing countries including Brazil, Bahia. Among Sca 6 descendants, the TSH's genotypes such as TSH516, have shown a significant increase in the number of flower cushions brooms (FCB) and vegetative brooms (TB) (Gramacho et al., 2003; Pires, 2003). Whereas, genotypes originated from other sources have showed stability over time. The effects of Sca 6 resistance genes are maintained when associated with resistance genes from other sources (Pires et al., 2012).

The aid of classical and DNA technology using co-dominant markers such as single sequence repeats (SSRs) and single nucleotide polymorphisms (SNPs),

using genetic mapping and phenotypic data of a progeny, have allowed the identification of genomic regions linked to the expression of various traits, named quantitative trait loci (QTLs). The main interest of QTL detection in perennial crops is due to the potential of marker-assisted selection (MAS). However, in most cases, a good deal more information on QTL will be required before they can be successfully utilized for MAS, for example QTL stability over time.

In the cacao breeding programs, QTLs analyses have been carried out for various traits (disease resistance, agronomics and quality traits) from various progenies. The main results of these QTL studies were synthesized in a meta-analysis made by Lanaud et al. (2009). In Bahia, Brazil, at the Cacao Research Center (CEPEC/CEPLAC, Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), QTL studies were carried out to detect resistance genes for Witches' broom disease of cacao (WBD) using an  $F_2$  progeny from Sca 6 x ICS 1. A main QTL, located on chromosome 9, has been identified with based on field observation on the average number of vegetative brooms per tree between 1996 and 2002 (Brown et al., 2005; Faleiro et al., 2006). LOD score and the percentage of variation explained by the QTL were respectively: 10.5 and 51%.



Figure 1. Symptoms of witches' broom disease of cacao. (A) Terminal broom and (B) Flower cushion broom.

We report herein new results obtained from QTL analysis on this same progeny in two different fields at CEPEC/CEPLAC. An investigation of temporal QTL stability (from 2003 to 2008) has also been carried out considering the number of vegetative and flower cushion brooms under natural infection.

## Material and Methods

### Plant Material

One hundred and forty-two F<sub>2</sub> Sca 6 x ICS 1 individuals (8 years old), randomly distributed in two experimental fields, were used in this study. This segregating F<sub>2</sub> population was produced at the Cacao Research Center (CEPEC) of CEPLAC in Bahia, Brazil through self-pollinations of the clone TSH516, a selection from the cross between Sca 6 (resistant to WBD) and ICS 1 (susceptible to WBD). The first F<sub>2</sub> field, herein named F<sub>2</sub>-1M, included the 82 individuals in which the first QTL analysis were carried out by Brown et al. (2005) and Faleiro et al. (2006). The second experimental field (8 years old), named F<sub>2</sub>-1C, included the 82 individuals of the first population (F<sub>2</sub>-1M) plus 60 new individuals (not observed in the first QTL study) to finally constitute a population of 142 individuals. In the F<sub>2</sub>-1C, each genotype was replicated three times by grafting on adult cacao tree, randomly distributed in three blocks.

### Phenotypic measurements under natural infection

The individuals of the two field populations F<sub>2</sub>-1M and F<sub>2</sub>-1C, were observed during 6 years from 2003 to 2008 (two times a year) for the number of terminal vegetative (TB) and flower cushion brooms (FCB) aiming to compare the performance of the populations growing in different conditions, i.e., trees age and inoculum pressure, during the period.

Besides the number of brooms, the trunk diameter at 50 cm height was also evaluated aiming to correct TB by the number of potential infection points, which is associated with the vigor of the tree. The tree vigor was assessed in 2008, from the measurement of the cross-section of the trunk in F<sub>2</sub>-1M field and the grafted part of the tree in F<sub>2</sub>-1C field. This trait was noted as C-Sec-Troncor/Yr = 2008. The phenotypic data was

adjusted by regression considering the number of brooms proportional to the trunk diameter of each individual.

### Genetic map

The genetic matrix used in this study was made considering the 142 individuals and 188 co-dominants markers mainly represented by SSRs and some homologous genes of resistance used in the map by Brown et al. (2005). Markers as SSR-ESTs described in two previous studies obtained from the interactions between Cacao-*Moniliophthora pernicioso* (Lima et al., 2010) and Cacao-*Ceratocystis cacaofunesta* (Santos et al., 2013) were also mapped.

### Statistical analyses and detection QTL

Descriptive statistical parameters, variances, normality of phenotypic traits and others specific programs as the regression taking into account the number of brooms proportional to the difference of the cross-section of each individual, were obtained using SAS (Statistical Analysis System, version 9.1.3, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA).

QTL analyses were carried out with MapQTL software, version 5.0 (Van Ooijen, 2004) using the three procedures proposed by this software: (i) "Kruskal-Wallis (KW)" for a nonparametric mapping analyses comparable to an analysis of variance, (ii) "Interval mapping" method developed by Lander and Bostein (1989) and (iii) "MQM or ResMQM mapping" a method based on multiple-QTL models (Jansen and Stam, 1994) using marker cofactors determined by the procedure "Automatic Cofactor Selection" of MapQTL 5.0. For the analysis procedure in simple and composite interval mapping, the significance threshold of the LOD score was determined from the permutation test procedure proposed and using 10.000 interactions. Using a nonparametric procedure (KW), we considered a significant QTL from the K\* value for a threshold corresponding to a significance P-value of 0.005, also represented by four stars in Tables and Figures.

## Results

The first objective of this study was to evaluate, under natural conditions, the evolution of WBD for a



period of six years, from 2003 to 2008. In both fields, the average number of TB and FCB per tree was relatively low from 2003 to 2005 and markedly increased from 2006 to 2008, therefore, characterizing two periods (Figure 2 a, b). For the second period (2006-2008) the curves of the two types of broom were different between themselves. In  $F_2$ -1M field, where the disease was observed since 1996, the TB curve is below the FCB curve. In the  $F_2$ -1C field, where the observation of the disease initiated in 2003, an inverse situation occurred.

Analyses with cumulative data from 2003 to 2008, revealed variation in the average number of brooms per tree between fields, which were, respectively, for TB and FCB:  $107.7 \pm 78.3$  and  $165.9 \pm 185.8$  in  $F_2$ -1M (62 genotypes) and  $60.7 \pm 42.5$  and  $43.8 \pm 54.7$  in the  $F_2$ -1C (142 genotypes replicated three times). The areas of trunk section in these two fields, evaluated in 2008, were:  $108.2 \pm 61.97$  in  $F_2$ -1M and  $56.4 \pm 28.6$  cm<sup>3</sup> in  $F_2$ -1C.

QTL analyses were performed using both individual year data and cumulative data for the periods 2003 to 2005, 2006 to 2008 and 2003 to 2008. Table 1 shows the QTLs associated with WBD in both fields. In the  $F_2$ -1M fields, only one QTL was observed from 2003 to 2005 on chromosome 9. This QTL refer to the main QTL located on chromosome 9 and centered on mTcCIR35, mentioned by Brown et al. (2005) and Faleiro et al. (2006), which in this paper has been named *qWBD-9-1*. QTLs identified in the  $F_2$ -1C field were mainly located on chromosomes 2 and 9 for the different years and also for cumulative data (Table 1, Figure 3). In the  $F_2$ -1C, three QTLs, significant only with KW analyses, were observed; one on chromosome 2 and two in chromosome 9. They were located on the top of chromosome 9, with a peak near mTcCIR266 and LOD = 2.9 (Table 1).

Analyzing the average TB (mTB) data on the first period 2003-2005, the main *qWBD-9-1* was significantly detected. The LOD values and the

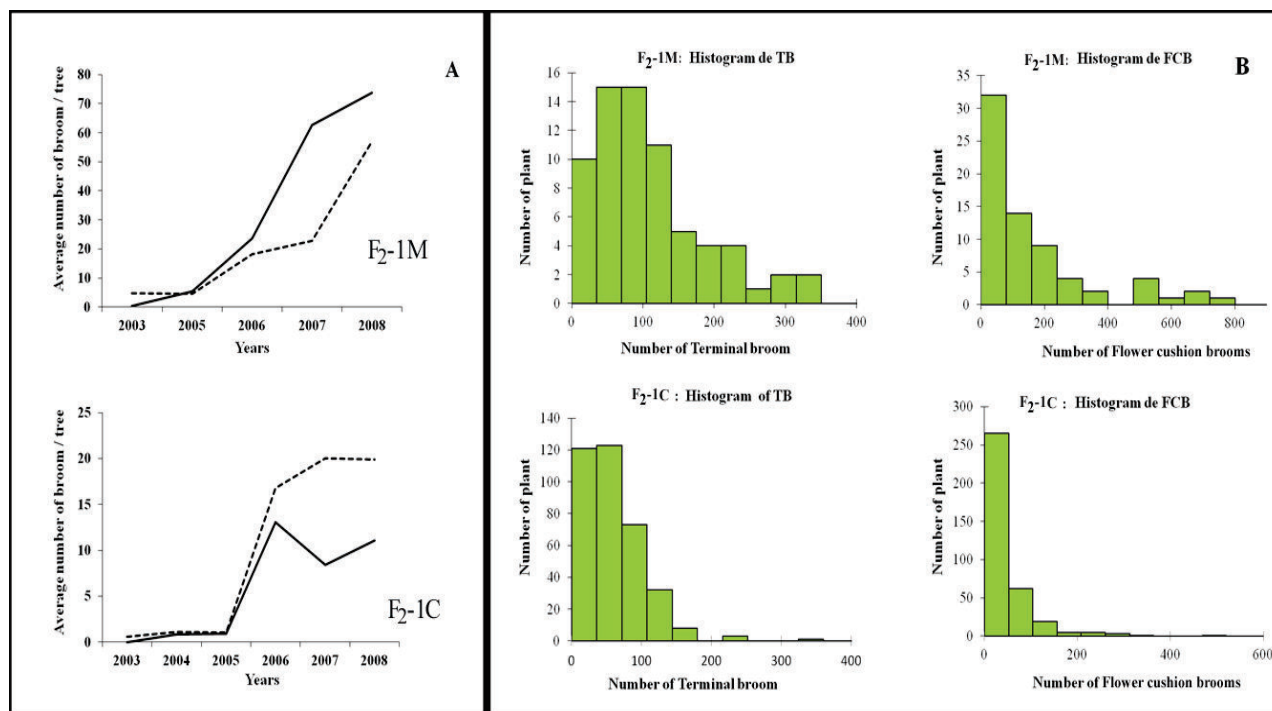


Figure 2. Evolution for vegetative and flower cushion brooms under natural infection in two fields ( $F_2$ -1M and  $F_2$ -1C) at the Cacao Research Center: A- Disease progress from 2003 to 2008 and B- Frequency distribution for total number of brooms over 6 years.  $F_2$ -1M = field population with 82 individuals in which the main QTL analysis were carried out by Brown et al. (2005) and Faleiro et al. (2006);  $F_2$ -1C = field population with 142 individuals, formed by the 82 individuals of the  $F_2$ -1M population plus 60 new individuals (not observed in the first QTL study).



percentage of variance explained by the QTL were respectively 5.52 and 16.9% (Table 1). QTL analyzes from mTBcorr/Yr = 2006-2008 data, showed that the QTL *qWBD-9-1* was detected in the same confidence interval, but the peak of the LOD moved to mTcCIR157, which is located at 4.8 cM of the mTcCIR35 marker. As shown in Figure 2, the numbers of both types of brooms (TB and FCB) have strongly increased during this period and the LOD value and the percentage explained by the QTL *qWBD-9-1* were lower: 3.06 and 8.7%, respectively (Table 1).

Otherwise, as shown in Figure 4, from 2003 to 2008, the evolution of the LOD values of each locus (SSR-markers) located in the region of the QTL *qWBD-9-1* fluctuated and declined. The average number of TB for individuals from the heterozygous class at the mTcCIR157 allele marker was 42.2 brooms (data not shown) and represented the most resistant plants while the average number TB of the individuals from homozygous Sca 6 class and homozygous ICS 1 class, were respectively, 55.1 and 66.2 brooms (data not shown).

Results obtained, from cumulative data mTBcorr/Yr = 2003-2005 with the QTL *qWBD-9-1* (centered on mTcCIR35) have shown that the averages number of TB of the individuals from the homozygous Sca 6, homozygous ICS 1 and heterozygous classes were respectively, 1.9, 5.3 and 2.4 (data not shown).

From cumulative data of average FCB between 2006 and 2008 (Table 1), a QTL was detected just under LOD = 3.28. This QTL was also detected on chromosome 9, centered on the RGH2 marker. The additive effect for this QTL was 8.92, with favorable alleles from Sca 6 (Table 1). QTL detected on chromosome 2 from cumulative data between 2006 and 2008 (Table 1) was near them EST12. The LOD values for mTBcorr/Yr = 2006-2008 and mTBcorr/Yr = 2003-2008 were respectively 3.49 and 4.91 and the variance explained were 11.7 and 15.6 (Table 1). The additive effect of this QTL was negative (Table 1), therefore, in opposite direction to the others QTLs mainly detected on chromosome 9. The mean numbers of TB for the individuals from the homozygous classes Sca 6 and ICS

Table 1. Genomic locations of quantitative trait loci (QTL). Results obtained from natural infections from 2003 and 2008 from F<sub>2</sub>-1 population. Two mapping methods were used; the method considered most appropriate for each QTL is given. The MQM method mapped it to the site identical to SIM, with effects and percent variance explained similar to Res. MQM

F2-1 Fields	Traits field observations	Ch*	QTL Position			Peak or Nearest Marker	LOD peak value	Mapping Method	% variance Explained	additive effect
			Marker-1	Peak	Marker-2					
F <sub>2</sub> -1M	mTB-0305	9	0	7.73	13.52	mTcCIR266	2.89 (ns)	IM	19.30	4.854
F <sub>2</sub> -1M	mTB-0305	9	30.44	38.64	46.22	mTcCIR35	2.54 (ns)	IM	17.10	5.951
F <sub>2</sub> -1M	mTB-0305	9	0	7.73	13.52	mTcCIR266	2.97 (ns)	ResMQM	15.90	4.617
F <sub>2</sub> -1M	Sec-2008	9	44.22	53.16	55.98	mTcCIR178	3.39 (ns)	MQM	16.30	3.603
F <sub>2</sub> -1C	mTB-2004	2	29.99	38.66	45.32	msEST12	2.98 (ns)	MQM	11.50	-0.749
F <sub>2</sub> -1C	mTB-2006	2	29.99	37.66	45.32	msEST12	3.11 (ns)	MQM	11.10	-6.593
F <sub>2</sub> -1C	mTB-2008	2	29.99	34.66	45.32	msEst12	3.45	MQM	10.60	-7.361
F <sub>2</sub> -1C	mTB-0608	2	29.99	38.66	45.32	msEST12	3.49	MQM	11.70	-16.489
F <sub>2</sub> -1C	mTB-0308	2	29.99	38.66	45.32	msEST12	4.91	MQM	15.60	-18.431
F <sub>2</sub> -1C	mTB-2003	9	30.44	35.44	41.44	mTcCIR35	9.03	MQM	32.60	0.765
F <sub>2</sub> -1C	mTB-2004	9	30.44	38.64	41.44	mTcCIR35	4.64	MQM	14.40	0.750
F <sub>2</sub> -1C	mTB-2007	9	35.44	41.44	44.22	mTcCIR157	3.70	MQM	9.70	1.405
F <sub>2</sub> -1C	mTB-0305	9	29.99	38.64	41.47	mTcCIR35	5.52	MQM	16.90	1.631
F <sub>2</sub> -1C	mTB-0608	9	38.64	41.47	44.22	mTcCIR157	3.06 (ns)	MQM	8.70	5.546
F <sub>2</sub> -1C	mTB-0308	9	38.64	41.47	44.22	mTcCIR157	4.15	MQM	11.30	8.921
F <sub>2</sub> -1C	mFCB-2005	9	55.98	68.542	80.19	RGH2	5.49	IM	17.20	10.209
F <sub>2</sub> -1C	mFCB-0608	9	55.98	68.542	80.19	RGH2	3.28 (ns)	IM	10.60	19.619
F <sub>2</sub> -1C	Sec-2008	9	53.16	55.166	67.54	mTcCIR8	5.44	MQM	17.40	4.725

\*Ch=chromosome

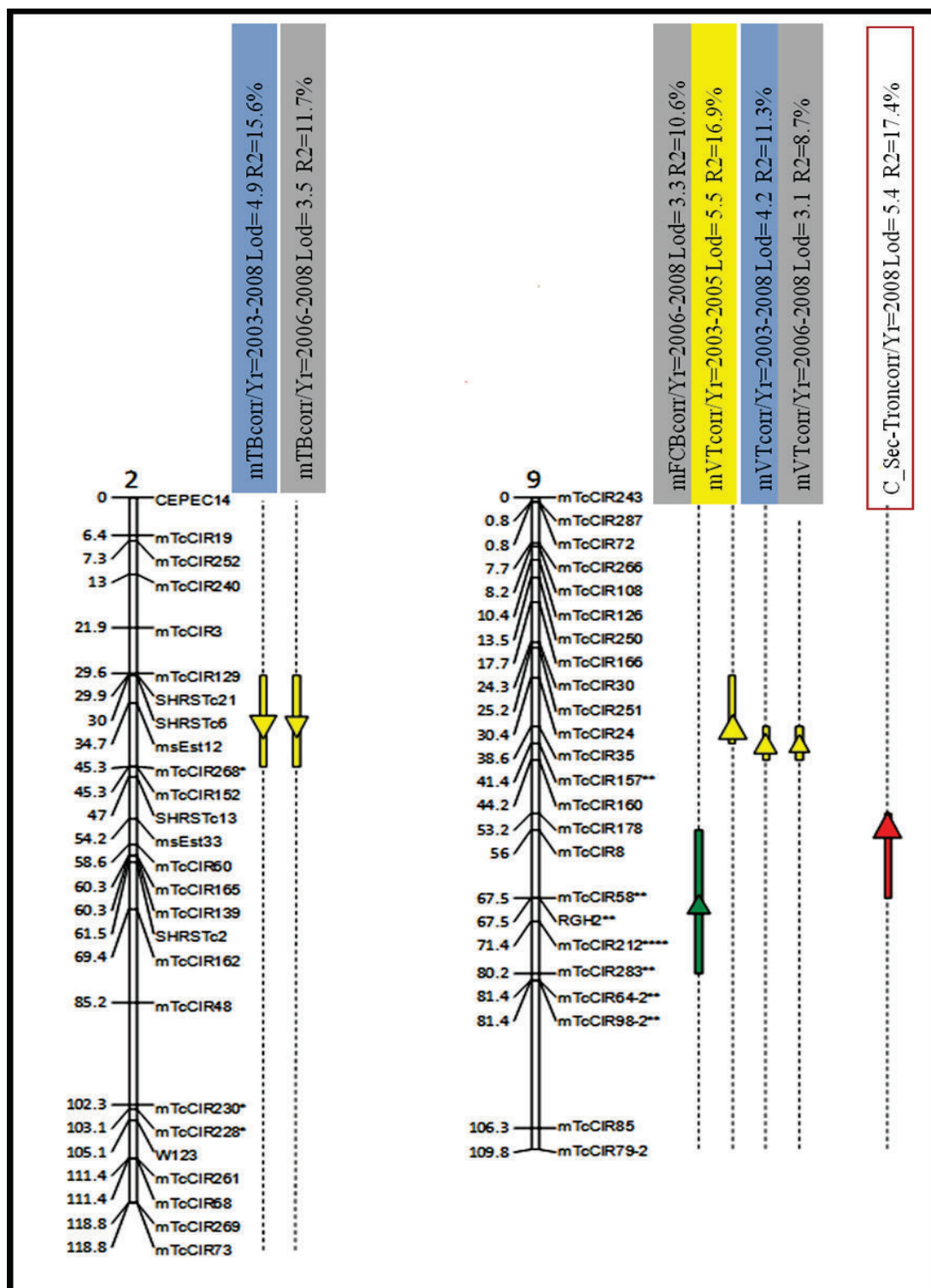


Figure 3. Quantitative trait loci (QTLs) map for chromosomes 2 and 9 based on natural infection data collected 2003 to 2008. mTBcorr and mFCBcorr = average number of vegetative brooms and flower cushion brooms corrected by the measurement of the trunk section. Yr = year. R2 = amount of phenotypic variation in resistance to Witches' broom disease explained by the QTL. C-SEC-Troncorr = section of the trunk corrected.

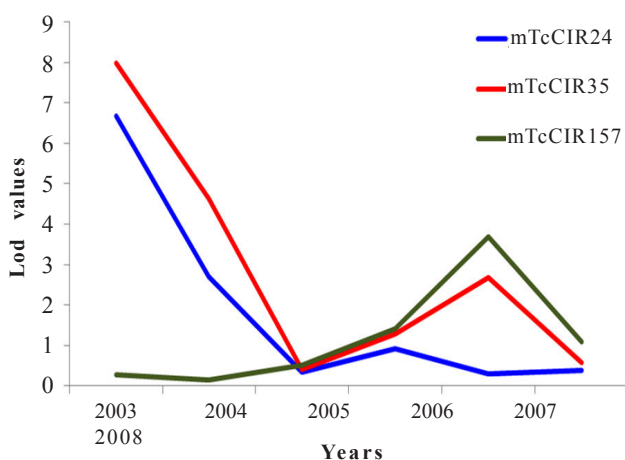


Figure 4. Evolution of the LOD values of each locus Single Sequence Repeats (SSR-markers) located in the main region of the main quantitative trait locus *qWBD-9-1*, throughout the years.

1 and heterozygous class TSH516, were respectively: 86.4, 49.6, and 64.0 (data not shown); therefore, the most resistant individuals came from the homozygous ICS 1 class.

## Discussion

We have showed a decrease in the effect of the main QTL *qWBD-9-1* over time. In the  $F_2$ -1M context, the main QTL *qWBD-9-1*, which was detected by Brown et al. (2005) and Faleiro et al., (2006) with a LOD = 10.5 and 51.1% of variance explained using the cumulative data of TB between 1996 and 2002 showed a drastic fall of the significance level when the remaining 62 individuals of this field were evaluated for WBD during the period of 2003 and 2008. In the context of the  $F_2$ -1C field, on this same period, QTL results showed that at the beginning (2003 to 2005), *qWBD-9-1* was clearly identified with a good significance (LOD = 5.5 and 17% of variance explained) and decreased when WBD increased during the period of 2006 to 2008 (Table 1). During this second period (2006-2008) the evolution curves of both types of broom showed in  $F_2$ -1C that the TB curve was above the FCB curve. A reverse situation was found in the  $F_2$ -1M field. The situation found for the older  $F_2$  tree (62 tree of  $F_2$ -1M) may be compared to the results obtained by Pires (2003) showing that the TSHs clones,

such as TSH 516 or TSH 565, which have Sca 6 as an ancestor, showed an increase in the number of FCB compared to the number of TB. In  $F_2$ -1C, the trees were younger (installed in 2001 from grafting) and the curves of both kind of brooms showed an increased increment. Probably in the initial years the disease appears mainly on the canopy branches and later infects the flower cushions (FCB). Analyzing the period 2006-2008 in  $F_2$ -1C, we observed also a change in the host pathogen relationship. At first concerning a slight displacement of the LOD peak of the QTL *qWBD-9-1* from mTcCIR35 towards mTcCIR157 locus, where a major effect for resistance came respectively from the homozygous Sca 6 and the heterozygous class.

From clones involving Sca 6 and ICS 1, as THS 516 and TSH 565, Pires et al. (2012) analyzing total brooms collected showed differences of responses to resistance to WBD, which was probably due to the origin of both possible alleles of Sca 6 in association with the ICS 1 alleles. Otherwise, the QTL detected in chromosome 2 (near msEST12) showed in opposite direction of the QTL *qWBD-9-1*. This result is also interesting for the Trinitario origin of ICS 1 that combines alleles from Forastero and Criollo origin (Motamayor et al., 2003). Probably the resistance is provided by the Criollo allele of ICS 1. It is also interesting to mention that results from clone trials obtained by Pires et al., (2012) showed that the clone Chuao 120, from the Chuao region in Venezuela and probably resulting from a Criollo hybridization, like a Trinitario clone, imparted resistance to WBD. However these hypothesis require to be strengthened with a fine mapping of the region analyzed with genome data made from a pure Criollo clone B97/61/B2 from Belize (Argout et al., 2011).

The results presented in this study based on natural infection of WBD, showed an evolution of QTL *qWBD-9-1* and a changing in the relationship between the host and the pathogen, perhaps a response to selection pressure. It would be possible to verify if there is a good correlation between observations from natural infections and artificial inoculations. Also, using appropriate *M. pernicioso* strains carry out a fine mapping of the more interesting QTL regions detected.

## Acknowledgements

This research was carried out in the facilities of the Cacao Research Center-CEPEC/CEPLAC-Molecular Plant Pathology Laboratory and the Genetics fields and the Centre de Cooperation International en Recherche Agronomique pour le Développement (Cirad, France). The authors thank CNPq/FINEP/RENORBIO PROJECT for financially supporting this project and CNPq for providing scholarships to KPG. The work of FFJS was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB, Brazil).

## Literature Cited

- AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) from a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97:1012-1022.
- ARGOUT, X. et al. 2011. The genome of *Theobroma cacao*. *Nature Genetics* 43:101-108.
- BROWN, J. S. et al. 2005. Resistance gene mapping for witches' broom disease in *Theobroma cacao* L. in an F2 population using SSR markers and candidate genes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130(3):366-373.
- FALEIRO, F. G. et al. 2006. Mapping QTLs for witches' broom (*Crinipellis pernicioso*) resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). *Euphytica* 149:227-235.
- GRAMACHO, K. P. et al. 2003. Phylogeography of the witches' broom pathogen in Bahia. In: Conferência Internacional de Pesquisas em Cacao, 14, Accra, Ghana. Proceedings. Lagos, Nigeria, Cocoa Producers Alliance. v.2. pp.1325-1332.
- JANSEN, R. C.; STAM, P. 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136:1447-1455.
- LANAUD, C. et al. 2009. A meta-QTL analysis of disease resistance traits of *Theobroma cacao* L. *Molecular Breeding* 24:361-374.
- LANDER, F. S.; BOTSTEIN, D. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-199.
- LIMA, L. S. et al. 2010. Development, characterization, validation, and mapping of SSRs derived from *Theobroma cacao* L. *Moniliophthora pernicioso* interaction ESTs. *Tree Genetics & Genomes* 6(5):663-676.
- MOTAMAYOR, J. C. et al. 2003. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89:380-386.
- PEREIRA, J. L. et al. 1989. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. *Agrotrópica (Brasil)* 1(1):79-81.
- PIRES, J. L. et al. 2012. Association among sources of resistance to witches' broom disease for the increment of the level and durability of the character. *Agrotrópica (Brasil)* 24(1):27-30.
- PIRES, J. L. 2003. Avaliação quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento do cacaueiro com ênfase na produtividade, qualidade de frutos e resistência a doenças. Tese Doutorado. Viçosa, MG, UFV. 328p.
- PIRES, J. L. et al. 1999. Cocoa breeding for witches broom resistance at CEPEC, Bahia, Brazil. In: International Workshop on the Contribution of Disease Resistance to Cocoa Variety Improvement. 1996. Proceedings. INGENIC, Reading. pp. 91-101.
- SANTOS, R. M. F. et al. 2013. Identification, characterization and mapping of EST-derived SSRs from the cacao-*Ceratocystis cacaofunesta* interaction. *Tree Genetics & Genomes* 9(1):117-127.
- VAN OOIJEN, J. W. 2004. MapQTL.5®, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations. Wageningen, Netherlands, Kyazma BV.



## NOTA CIENTÍFICA

### ASSEMBLEIA DE FORMIGAS DE CAFEZAL DO EXTREMO SUL DA BAHIA E POTENCIAL PARA CONTROLE BIOLÓGICO

*Pâmela Fagundes Pereira<sup>1</sup>, Carlos Dean Ramos de Azevedo<sup>1</sup>, Eltamara Souza da Conceição<sup>2</sup>,  
Antonio de Oliveira Costa Neto<sup>3</sup>, Jacques Hubert Charles Delabie<sup>4</sup>*

<sup>1</sup>UNEB-Campus X, DEDC. Rua SS, s/n. Jardim Caraípe. 45995-000, Teixeira de Freitas, BA. <sup>2</sup>UNEB-Campus II, DCET. Rod. Alagoinhas-Salvador. Km 03. 48.000-000, Alagoinhas, BA. [econceicao@uneb.br](mailto:econceicao@uneb.br). <sup>3</sup>UEFS-DCBio. Av. Transnordestina, s/n. Novo Horizonte. 44036-900. Feira de Santana, BA. [aocneto@uefs.br](mailto:aocneto@uefs.br). <sup>4</sup>CEPLAC, CEPEC, Lab. de Mirmecologia, Convênio UESC. Caixa Postal 7, 45600-970. Itabuna, BA. [jacques.delabie@gmail.com](mailto:jacques.delabie@gmail.com).

O uso de formigas para controle biológico pode ser uma alternativa ao controle convencional de pragas. Objetivou-se avaliar o potencial de formigas para o controle biológico natural num cafezal do Extremo Sul da Bahia. As formigas foram coletadas em 50 cafeeiros assim como na superfície do solo. As espécies mais frequentes nas plantas foram *Camponotus blandus*, *Pheidole grandinodus* e *Tapinoma melanocephalum*. Essas formigas são onívoras, capazes de capturar qualquer presa oferecida. As taxas de ataque às iscas foram superiores a 70%. No entanto, a ocorrência de espécies urbanas na assembleia sugere perda de diversidade da fauna nativa que vive na matriz ambiental.

**Palavras-chave:** Formicidae, Presas, *Coffea canephora*, Conilon, pragas.

**Potential for predation of ants in a coffee plantation of the Extreme South of the State of Bahia, Brazil.** In coffee plantations the use of ants for biological control can be an alternative to conventional pest control. The aim of this study was to evaluate the ant potential for natural biological control in a coffee plantation of the Extreme Southern of the State of Bahia, Brazil. The ants were collected on 50 coffee trees and on the ground. The commonest species were *Camponotus blandus*, *Pheidole grandinodus*, and *Tapinoma melanocephalum*. These ants are omnivorous but are able to capture any kind of offered prey. The predation rate on baits was greater than 70%. However, the occurrence of urban species suggests the loss of diversity of native fauna living in the environmental matrix.

**Key words:** Formicidae, prey, *Coffea canephora*, Conilon, pests.

## Introdução

Como qualquer cultivo de maior expressão, o café está sujeito a um dos problemas mais comuns na agricultura que é o ataque de pragas, que, a depender das condições climáticas, manejo ou desequilíbrio biológico, pode causar danos consideráveis (Costa, 2003). De modo geral, devido à demanda do mercado por produtos agrícolas sem resíduos e que sejam provenientes de cultivos que utilizem práticas agrícolas que proporcionem a preservação da biodiversidade, agricultores encontram restrições para o emprego de inseticidas no manejo de pragas (Venzon et al., 2008).

O manejo de um cultivo pode afetar a diversidade animal como ocorrem em comunidades de formigas em cafezais, cuja diversidade diminui conforme aumenta a intensidade do manejo (Armbrecht e Perfecto, 2003). No entanto, muitas formigas podem naturalmente ser importantes aliadas na solução dos problemas que geram redução da produção.

Em regiões tropicais, as formigas já foram utilizadas com sucesso como agentes de controle biológico em cafezais, coqueirais, pomares cítricos e cacauais (Way e Khoo, 1992; Kenne et al., 1999; Delabie e Mariano, 2001). Entretanto ainda há carência de experimentos aplicados às formigas dos cafeeiros brasileiros (ver Majer e Queiroz, 1993) que evidenciam que estas possam atuar de forma efetiva no controle biológico de pragas, a ponto de suplantarem as possíveis desvantagens que podem ocasionar às plantas (Way e Khoo, 1992; Majer e Queiroz, 1993). Conhecer a fauna de formigas que coloniza esses cafeeiros e seu potencial como predadoras é importante para verificar se há conservação da fauna nativa ou se ocorreu empobrecimento por causa das práticas agrícolas, e a fim de contribuir para sua indicação como agentes de controle natural de pragas. Desenvolveu-se estudo num cafezal plantado com *Coffea canephora*, var. Conillon, no Extremo Sul da Bahia, região onde esse cultivo é ainda escasso mas com potencial para se desenvolver, a fim de verificar quais são as formigas mais frequentes no plantio, bem como avaliar o potencial de algumas espécies como agentes de controle biológico natural.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado num cafezal de 88,3

ha plantado por *Coffea canephora*, var. Conillon, com seis anos de idade e espaçamento de 1x3m, na Fazenda Planalto Baiano, município de Itamarajú, estado da Bahia. A área de estudo está cercada por algumas propriedades com o mesmo cultivo e situa-se a aproximadamente 1,5km da zona urbana (Bairro Corujão).

Os tratos culturais seguem um cronograma de acordo com a necessidade da lavoura, tendo como principais: roçagem mecânica e aplicação de herbicidas para controle de ervas daninhas; duas a três pulverizações foliares anual com fertilizantes, fungicidas ou inseticidas, sendo os últimos utilizados apenas quando necessários; três a quatro adubações a nível do solo por ano. As principais pragas já observadas nessa área foram: a broca-do-café (*Hypothenemus hampei* Ferrari, 1867, Coleoptera Scolytidae), a cochonilha branca (= cochonilha da roseta do cafeeiro, cochonilha dos citros) (*Planococcus citri* (Risso, 1813), Hemiptera, Pseudococcidae), e o ácaro-vermelho (*Oligonychus ilicis* (McGregor, 1917), Acari, Tetranychidae). O efeito dessas pragas é mínimo, uma vez que são continuamente monitoradas enquanto o controle é realizado quando necessário.

Em julho de 2009, foi realizado um inventário dos Formicidae nos cafeeiros da propriedade, a fim de identificar as espécies mais frequentes. Foram amostradas 50 plantas, respeitando um intervalo de 50m entre elas e uma borda de 100m. O método utilizado foi coleta manual. Nos mesmos pontos de coleta, foram instaladas armadilhas do tipo “pitfall” para amostragem das formigas epigeias (Bestelmeyer et al., 2000), a fim de comparar os dois estratos.

Entre as espécies coletadas, destacaram-se as três mais frequentes para avaliação do potencial de predação, o qual foi realizado da seguinte maneira: em janeiro de 2010, o ensaio foi realizado com 10 repetições para cada uma dessas formigas, sendo que foram utilizadas larvas (uma para cada repetição) de cupim do gênero *Nasutitermes* (Isoptera, Termitidae) como iscas, que foram colocadas estrategicamente na parte central de uma inflorescência, onde as espécies-alvo eram encontradas. Foi observado o comportamento das formigas em relação à isca durante 5 minutos em cada planta. Nos testes em que a predação ocorreu, foi medido o tempo transcorrido para que a formiga identificasse e carregasse a presa. O índice de

predação foi calculado através da fórmula:  $IP = Npe \times 100/Nte$ , onde IP é o índice de predação para a espécie estudada; Npe, o número total de observações de predação pela espécie estudada e Nte, o número total de ensaios (Conceição et al., 2009). Calculou-se a média de tempo de predação, ou seja, que cada espécie levou para reconhecer e levar a presa. Em seguida, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar se havia diferença entre as médias de tempo de predação. O programa usado para essas análises foi *Statistica* versão 7.1.

## Resultados e Discussão

Foi encontrado um total de 29 espécies de formigas (Tabela 1). As formigas arborícolas mais frequentes foram *Camponotus blandus* (Smith, 1858), *Pheidole grandinodis* Wilson, 2003 e *Tapinoma melanocephalum* (Fabricius, 1793) e as espécies epígeas: *Odontomachus meinerti* Forel, 1905, *Pheidole gigas* Wilson, 2003 e *Ectatomma brunneum* Smith, 1858. Somente onze espécies (35%) foram comuns aos dois estratos amostrados. *Pheidole grandinosus* era conhecida somente da Amazônia brasileira até o momento (Wilson, 2003).

Nesse estudo, observou-se a ocorrência de espécies típicas de meio urbano, portanto é possível que a introdução do cultivo na região tenha provocado alterações na composição da fauna original. Dias et al. (2008) destacam hipóteses para o impacto negativo do cultivo do café sobre as comunidades de formigas: aplicação de defensivos; retirada da serapilheira; exposição das espécies à maior amplitude térmica e perturbação mecânica. No entanto, apesar da presença de espécies invasoras, a ocorrência de muitas das espécies sugerem que seu patrulhamento na planta pode estar contribuindo a proteger esta contra qualquer herbívoro.

Dentre as espécies coletadas, algumas se destacaram devido a relatos na literatura de

Tabela 1. Frequência relativa das formigas arborícolas e epígeas em um cafezal do município de Itamarajú, BA. Julho de 2009. 1Espécies escolhidas para análise

Subfamília/Espécie	Árvore (%)	Solo (%)
<b>Dolichoderinae</b>		
<i>Dorymyrmex thoracicus</i> Gallardo, 1916	4	0
<sup>1</sup> <i>Tapinoma melanocephalum</i> (Fabricius, 1793)	18	0
<b>Ectatomminae</b>		
<i>Ectatomma brunneum</i> Fr. Smith, 1858	2	30
<i>Ectatomma permagnum</i> Forel, 1908	2	4
<b>Formicinae</b>		
<i>Brachymyrmex heeri</i> Forel, 1874	6	4
<i>Brachymyrmex</i> sp.2	2	0
<sup>1</sup> <i>Camponotus blandus</i> Fr. Smith, 1858	40	10
<i>Camponotus leydigi</i> Forel, 1886	0	2
<i>Camponotus melanoticus</i> Emery, 1894	6	0
<i>Camponotus punctulatus andigenus</i> Emery, 1903	2	0
<i>Camponotus rufipes</i> (Fabricius, 1775)	2	0
<i>Camponotus senex</i> Fr. Smith, 1858	8	4
<i>Nylanderia</i> sp.1	2	0
<i>Nylanderia</i> sp.2	0	10
<b>Myrmicinae</b>		
<i>Atta sexdens</i> (L., 1758)	0	2
<i>Crematogaster victima</i> Fr. Smith, 1858	4	0
<i>Pheidole gigas</i> Wilson, 2003	6	46
<i>Pheidole</i> grupo <i>Fallax</i> sp.4	0	12
<i>Pheidole</i> grupo <i>Fallax</i> sp.5	0	6
<i>Pheidole</i> grupo <i>Flavens</i> sp.6	0	2
<i>Pheidole</i> grupo <i>Tristis</i> sp.7	0	12
<sup>1</sup> <i>Pheidole grandinodis</i> Wilson, 2003	40	12
<i>Pheidole radoszkowskii</i> Mayr, 1884	2	18
<i>Pogonomyrmex naegeli</i> Forel, In Emery, 1878	4	4
<i>Solenopsis geminata</i> (Fabricius, 1804)	6	6
<i>Solenopsis globularia</i> (Fr. Smith, 1858)	0	2
<b>Ponerinae</b>		
<i>Odontomachus meinerti</i> Forel, 1905	12	58
<i>Pachycondyla harpax</i> (Fabricius, 1804)	0	8
<b>Pseudomyrmecinae</b>		
<i>Pseudomyrmex</i> grupo <i>Pallidus</i> sp.1	6	0
<b>Total de espécies</b>	20	20
<b>Total geral de espécies</b>	29	

ocorrência de predação. Como exemplo disso tem-se as espécies de *Camponotus*. O gênero *Camponotus* é encontrado nos mais diversos habitats, podendo algumas espécies utilizar as plantas como local de nidificação, aproveitando ramos, caules escavados por coleópteros ou outros insetos (Battistola et al., 2005). São espécies generalistas, sendo que algumas mantêm relações mutualísticas com hemípteros, tais como ocorre com *C. blandus* (Nascimento, 2006). Muitas vezes, o balanço custo/benefício na associação formiga/hemíptero pode ser positivo para a planta, quando a atuação das espécies como predadoras suplanta os danos provocados pelos hemípteros que protegem (Philpott e Armbricht, 2006).

Já algumas espécies do gênero *Pheidole* que nidificam em domácias possuem operárias que defendem sua planta hospedeira contra herbívoros, garantindo o crescimento de sua colônia e o seu sucesso reprodutivo (Izzo e Vasconcelos, 2002). No entanto, as encontradas no cafezal, como a grande maioria das espécies desse gênero (Wilson, 2003), não são tão especializadas e certamente não nidificam na planta. A espécie exótica *Pheidole megacephala* (Fabricius, 1793) é considerada inimiga

natural da broca do café *H. hampei* nos cafezais de Cuba (Vázquez-Moreno et al., 2009).

As colônias de *T. melanocephalum* são altamente adaptáveis ao meio, por ser poliginas e com colônias que possuem grande facilidade à subdivisão e à migração (Osborne et al., 1995). Já foi observado a capacidade dessa formiga como agente de controle biológico contra uma espécie de importância médica, o Heteroptera *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859), com redução de 62% no crescimento populacional desse percevejo (Nunez, 1971).

Entre as espécies testadas como predadoras potenciais e que apresentaram maiores índices de predação, *P. grandinodus* e *C. blandus*, não houve diferença significativa entre as médias de tempo de predação (Figura 1). Os gêneros a que pertencem são frequentes em ambientes onde há alteração na estrutura da vegetação natural em decorrência do uso da terra com fins agrícolas, com muitas espécies oportunistas e competitivas (Peck et al., 1998). Nota-se que já foi observado que *C. blandus* e algumas espécies de *Pheidole* podem se tornar eficientes predadoras em coqueirais (Conceição et al., 2009).

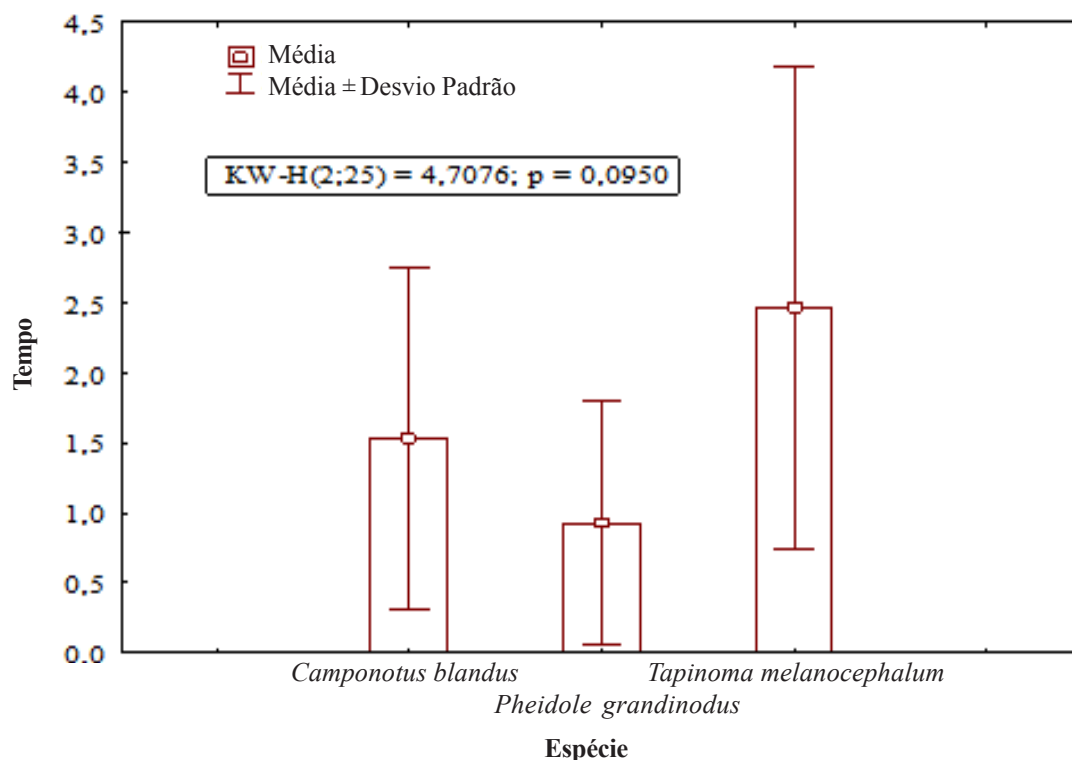


Figura 1. Média do tempo de predação das formigas mais frequentes em um cafezal do município de Itamarajú, BA. Janeiro de 2010.



As formigas *P. grandinodius* e *C. blandus* são as espécies mais eficientes como predadoras do cafeeiro estudado, no entanto, somente pesquisas futuras permitirão avaliar a relação exata dessas formigas com as pragas do cafeeiro e sugerir sua indicação no controle biológico.

### Agradecimentos

Ao proprietário da Fazenda Planalto Baiano, Sr. Emerson Bronzon, por permitir a instalação do experimento e ao gerente da fazenda, Sr. Roquinho, pela colaboração nos trabalhos de campo.

### Literatura Citada

- ARMBRECHT, I.; PERFECTO, I. 2003. Litter-twig dwelling ant species richness and predation potential within a forest fragment and neighboring coffee plantations of contrasting habitat quality in Mexico. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 97(1):107-115.
- BATTIROLA, L. D. et al. 2005. Composição da comunidade de Formicidae (Insecta, Hymenoptera) em copas de *Attalea phalerata* Mart. (Arecaceae), no Pantanal de Poconé, Mato Grosso, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* 49(1):107-117.
- BESTELMEYER, B. T. et al. 2000. Field techniques for the study of ground-living ants: an overview, description, and evaluation. In: Agosti, D., Majer, J. D., Tennant de Alonso, L., Schultz, T. eds. *Ants: Standart Methods for Measuring and Monitoring Biodiversity*, Washington, Smithsonian Institution. pp.122-144.
- CONCEIÇÃO, E. S. et al. 2009. Atividade de formigas nas inflorescências do coqueiro no sudeste baiano, com enfoque sobre o período entre a antese e a formação de fruto. *Agrotrópica (Brasil)* 21 (2):113-122.
- COSTA, J. N. M. 2003. Pragas do Café na Amazônia: prevenção e controle. In: Seminário Internacional do Agronegócio do Café na Amazônia da EMBRAPA. Rondônia, Porto Velho, Embrapa Rondônia. pp. 67-71.
- DELABIE, J. H. C.; MARIANO, C. S. F. 2001. Papel das formigas (Insecta: Hymenoptera: Formicidae) no controle biológico natural das pragas do cacauzeiro na Bahia: síntese e limitações. In: *International Cocoa Research Conference*, 13. Malásia, Sabah, Cocoa Producer's Alliance. v.1. pp.725-731.
- DIAS, N. S. et al. 2008. Interação de fragmentos florestais com agroecossistemas adjacentes de café e pastagem: respostas das comunidades de formigas (Hymenoptera, Formicidae). *Iheringia, Série Zoologia (Brasil)* 98 (1):136-142.
- IZZO, T. J.; VASCONCELOS, H. L. 2002. Cheating the cheater: domatia loss minimizes the effects of ant castration in an Amazonian ant-plant. *Oecologia* 133(2):200-205.
- KENNE, M.; CORBARA, B.; DEJEAN, A. 1999. Impact des fourmis sur les plantes cultivées en milieu tropical. *L'Année Biologique* 38(3-4): 195-212.
- MAJER, J. D.; QUEIROZ, M. V. B. 1993. Distribution and abundance of ants in a Brazilian subtropical coffee plantation. *Papua New Guinea Journal of Agriculture, Forestry and Fisheries* 36(2):29-35.
- NASCIMENTO, E.L. 2006. História natural e ecologia da interação entre *Chamaecrista debilis* (Vogel) Irwin Barneby (Caesalpiniaceae), as formigas visitantes de seus nectários extraflorais e seus herbívoros no cerrado. Dissertação Mestrado. Ribeirão Preto, SP, USP. 61p.
- NUNEZ, J. C. G. 1971. *Tapinoma melanocephalum* as an inhibitor of *Rhodnius prolixus* populations. *Journal of Medical Entomology* 8(6):735-737.
- OSBORNE, L. S.; PENA, J. E.; OR, D. H. 1995. Predation by *Tapinoma melanocephalum* (Hymenoptera: Formicidae) in Florida greenhouses. *The Florida Entomologist* 78(4): 565-570.
- PECK, S. L.; MCQUAID, B.; CAMPBELL, C. L. 1998. Using ant species (Hymenoptera: Formicidae) as a biological indicator of agroecosystem condition. *Community and Ecosystem Ecology* 27(5): 1102-1110.

- PHILPOTT, S. M.; ARMBRECHT, I. 2006. Biodiversity in tropical agroforests and the ecological role of ants and ant diversity in predatory function. *Ecological Entomology* 31(4):369-377.
- VÁZQUEZ-MORENO, L. L. et al. 2009. Diversidad de especies de hormigas (Hymenoptera: Formicidae) en cafetales afectados por *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Fitosanidad* 13(3): 163-168.
- VENZON, M.; PAULA-JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. 2008. Avanços no controle alternativo de pragas e doenças. Viçosa, MG, EPAMIG. 284p.
- WAY, M. J.; KHOO, K. C. 1992. Role of ants in pest management. *Annual Review of Entomology* 37: 479-503.
- WILSON, E. O. 2003. *Pheidole* in the New World, a dominant, hyperdiverse ant genus. Massachusetts, Cambridge, Harvard University Press. 794p.



## NOTA CIENTÍFICA

### ***Ophioceras leptosporum* NA MATA ATLÂNTICA DO SUL DA BAHIA: NOVO REGISTRO PARA AMÉRICA DO SUL\***

***Dilze Maria Argôlo Magalhães<sup>1</sup>, Edna Dora Martins Newman Luz<sup>1</sup>, Marcos Vinicius Oliveira dos Santos<sup>1,2</sup>, Larissa Argôlo Magalhães<sup>1</sup>, José Luiz Bezerra<sup>2,3</sup>***

<sup>1</sup>CEPLAC/CEPEC, Rod. Ilhéus-Itabuna, km 22, 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil. dilze.argolo@yahoo.com.br; ednadora@yahoo.com.br; lariargolo@yahoo.com.br.

<sup>2</sup>UFPE, Departamento de Micologia, Av. Prof. Nelson Chaves s/n, 50670-420, Recife, PE, Brasil. marcosvos@ymail.com; jlulabezerra@hotmail.com.

<sup>3</sup>UFRB, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - CCAB, Rua Rui Barbosa, 710. 44380-000, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

\*Parte da dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular do primeiro autor - Universidade Estadual de Santa Cruz - Ilhéus-Bahia.

Durante coletas de fungos associados a materiais vegetais em decomposição da serapilheira da Mata Atlântica do Sul da Bahia, foi encontrado o *Ophioceras leptosporum* sobre *Harleyodendron unifoliolatum* em duas Reservas ecológicas: Ecoparque de Una e no Parque Estadual Serra do Condurú. Este é um novo registro do fungo para a América do Sul. Descrição, distribuição geográfica e ilustrações são apresentadas.

**Palavras-chave:** Micota brasileira, serapilheira, taxonomia, biodiversidade, Leguminosae.

***Ophioceras leptosporum* in Atlantic Rainforest of Southern Bahia: a new report to South America.** During a survey of fungi associated with decaying plant material of the Atlantic Rainforest of Southern Bahia, *Ophioceras leptosporum* was found in the litter of *Harleyodendron unifoliolatum* in two ecological parks: Ecoparque de Una and Parque Estadual Serra do Condurú. This fungal is a new report for South America. Description, comments, geographic distribution and illustrations are presented.

**Key words:** Brazilian mycota, litter, taxonomy, biodiversity, Leguminosae.

O gênero *Ophioceras* (Magnaporthaceae, Ascomycota) é caracterizado pela presença de peritécios com pigmentação escura, rostros longos e perifísados, parede peritecial de textura *angularis*; ascos unitunicados com um aparelho apical quitinoide, decíduos; hamatécio com paráfises longas, septadas; ascósporos escoleospóricos, septados (Chen et al., 1999). *Ophioceras* possui ampla disseminação estando presente em substratos como a madeira, dentre outros. Muitas espécies deste gênero também são encontradas em ambientes aquáticos (Kirk et al. 2008). O presente trabalho teve como objetivo identificar uma espécie de *Ophioceras* associada ao folheto de *Harleyodendron unifoliolatum* Cowan em unidades de conservação da Mata Atlântica no sul da Bahia.

As coletas foram feitas em duas unidades de conservação do Bioma Mata Atlântica do sul da Bahia, Brasil: Ecoparque, situada no município de Una e Parque Estadual Serra do Condurú, no município de Uruçuca, Bahia, Brasil.

A espécie botânica estudada foi *Harleyodendron unifoliolatum*, da família Fabaceae, por ser uma planta endêmica, rara e de ampla localização geográfica na Mata Atlântica do sul da Bahia.

As coletas foram realizadas entre dezembro de 2007 a julho de 2008. Em cada área estudada foram aleatoriamente coletadas amostras de folheto de três espécimes de *H. unifoliolatum*. No laboratório de Diversidade de Fungos do Centro de Pesquisa de Cacau (CEPEC), da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), as amostras foram lavadas por uma hora em água corrente, depois acondicionadas em câmaras úmidas, de acordo com Castañeda-Ruiz et al. (2006). Após 72 h o material incubado foi observado em estereomicroscópio e revisado seguidamente por 30 dias.

Material fúngico obtido foi disposto em lâminas com resina de álcool polivinílico e lactofenol (PVL) (Trappe e Schenck, 1982), para a preparação de lâminas semi-permanentes e observações ao microscópio estereoscópio e óptico e identificação.

As folhas colonizadas foram convertidas em exsiccatas e mantidas na coleção micológica no Herbário CEPEC.

***Ophioceras leptosporum*** (S.H. Iqbal) J. Walker, Mycotaxon 11(1): 62 (1980).

A espécie apresenta peritécios negros, irrompentes, subglobosos a piriformes, isolados dispersos na face abaxial das folhas, rostrados,  $240-300 \times 180-200 \mu\text{m}$ ; paredes periteciais de textura *angularis*; rostrado marrom-escuro a negro posicionado centralmente sobre o peritécio, cilíndrico de textura *angularis* com o ápice mais claro,  $300-1200 \times 80-90 \mu\text{m}$ , com uma massa avermelhada formada pelos ascos e ascósporos acumulada na extremidade, tornando-se esbranquiçada posteriormente; canal ostiolar sem perifises. Ascos cilíndricos, retos ou ligeiramente curvos, unitunicados,  $80-100 \times 6-10 \mu\text{m}$ , formados na camada basal da cavidade peritecial, octospóricos, com anel refringente apical não amiloide. Paráfises ausentes. Ascósporos hialinos, avermelhados em massa, filiformes, retos, curvos ou sigmoides, de ápice rotundo e base afunilada,  $70-100 \times 1,5-2,0 \mu\text{m}$  com septos indistintos formados em fascículos paralelos dentro do asco.

**Material examinado:** BRASIL. Bahia: município de Una, Ecoparque, sobre folhas em decomposição de *Harleyodendron unifoliolatum* (S 15° 10' 49,2" e W 039° 02' 09,8"), 12/07/2008, D.M.A. Magalhães s.n. (CEPEC1509); no município de Uruçuca, no Parque Estadual Serra do Condurú, sobre folhas em decomposição de *Harleyodendron unifoliolatum*, (14°23'07,7"S e 39°04'43,6"W), 29/01/2008, D.M.A. Magalhães s.n. (CEPEC 1175), 10/05/2008, D.M.A. Magalhães s.n. (CEPEC 1179).

**Distribuição geográfica:** Inglaterra, Papua Nova Guiné (Walker, 1980) e Brasil (neste trabalho).

**Nota:** Este é o primeiro relato de *Ophioceras leptosporum* na serapilheira de *Harleyodendron unifoliolatum*, na Mata Atlântica do sul da Bahia e primeiro registro deste táxon para a América do Sul.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à CEPLAC pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho; à Secretaria Estadual do Meio Ambiente e ao Instituto de Estudos Socioambientais do Sul da Bahia por autorizarem o estudo nas reservas da Mata Atlântica.



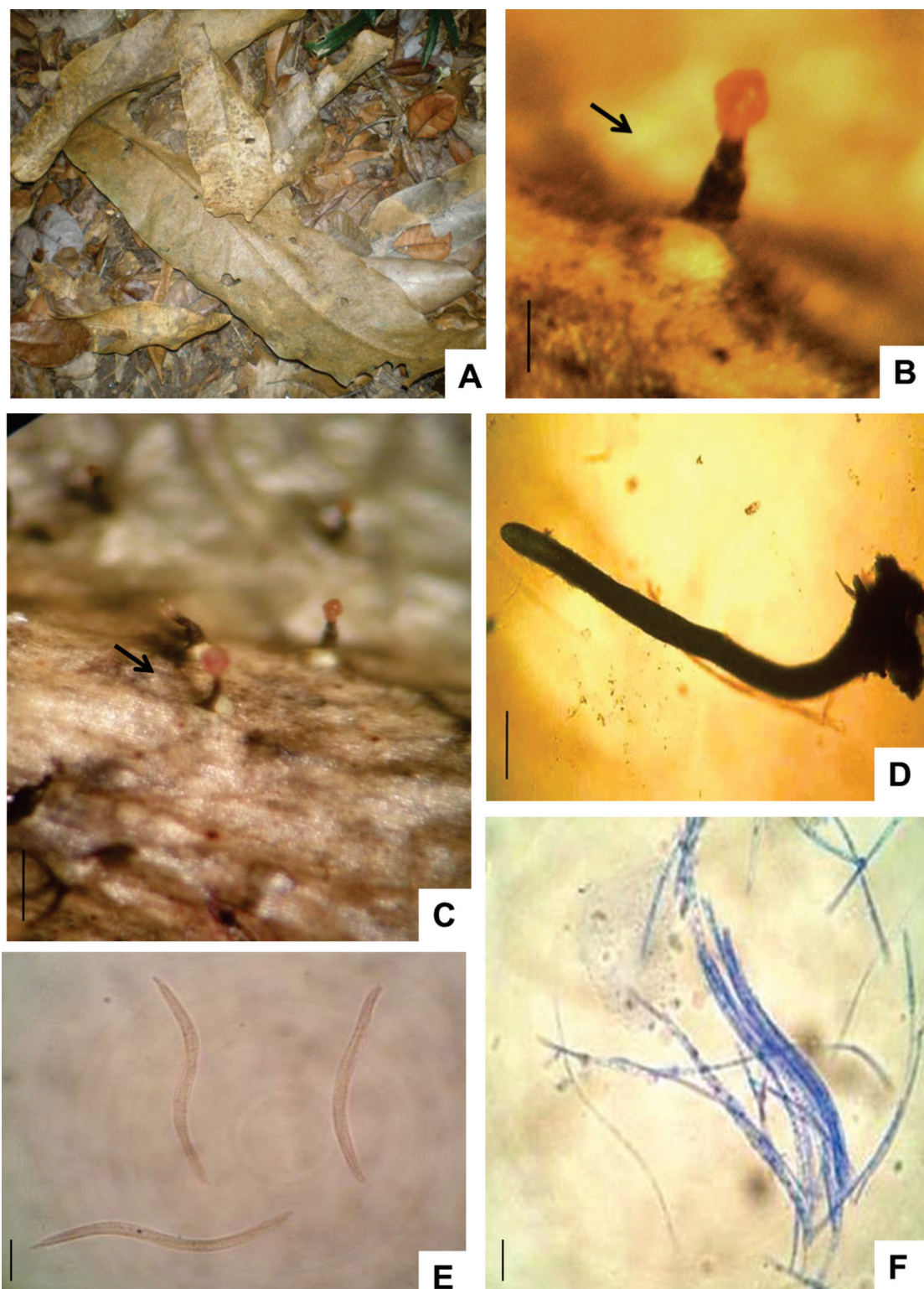


Figura 1- (A-F) *Ophioceras leptosporum* encontrado em folheto de *Harleyodendron unifoliolatum* na Mata Atlântica do Sul da Bahia: (A) serapilheira de *H. unifoliolatum*; (B e C) peritécios com massa de ascósporos apical avermelhada sob folheto; (D) peritécio marrom-negro rostrado; (E-F) ascos e ascósporos hialinos e filiformes. Barras: B e C=300  $\mu$ m; D=50  $\mu$ m; E e F=25  $\mu$ m.

### Literatura Citada

- CASTAÑEDA-RUIZ, R. F. et al. 2006. Some Hyphomycetes from Brazil. Two new species of *Brachydesmiella*. Two new combinations for *Repetophragma*, and new records. Mycotaxon 95:261-270.
- CHEN, W.; SHEARER, C. A.; CRANE, J. L. 1999. Phylogeny of *Ophioceras* spp. based on morphological and molecular data. Mycologia 91(1):84-94.
- INDEX FUNGORUM, CabiBioscience Databases. 2013. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>> Acesso em 01 fev. 2013.
- KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. eds. 2008. Dictionary of the Fungi. 10 ed. Wallingford, CAB International. 771p.
- TRAPPE, J. M.; SCHENCK, N. C. 1982. Taxonomy of the fungi forming Endomycorrhizae. In: Schenck, N. C. ed. Methods and principles of Mycorrhizae research. St. Paul, The American Phytopathological Society. pp.1-9.
- WALKER, J. 1980. *Gaeumannomyces*, *Linocarpon*, *Ophiobolus* and several other genera of scolecosporedascomycetes and *Phialophora* conidial states, with a note on hyphopodia. Mycotaxon 11(1):1-129.
-

## AGRADECIMENTOS AOS CONSULTORES CIENTÍFICOS

O sucesso de uma Revista depende não só da boa qualidade dos artigos submetidos para publicação, como também, dos comentários e sugestões dos assessores científicos, de cujos pareceres a Comissão Editorial não pode prescindir em suas decisões.

A revista *Agrotropica*, através do seu conselho editorial, deseja expressar seu mais profundo agradecimento aos especialistas que, em janeiro a abril de 2014, colaboraram na revisão de um ou mais artigos a eles enviados pelo editor. A publicação de seus nomes é um testemunho do nosso mais profundo reconhecimento pela sua valiosa colaboração com a revista.

- Caio Marcio V. C. de Almeida (2) CEPLAC/SUERO - Porto Velho - RO
- Cidália Gabriela S. Marinho (1) UFSJ - São João Del Rei - RJ
- Dilze Maria Argôlo Magalhães (2) CEPLAC/CEPEC - Ilhéus - BA
- Edna Dora Martins Newman Luz (2) CEPLAC/CEPEC - Ilhéus - BA
- Edson Reis Lopes (1) CEPLAC/CEPEC - Ilhéus - BA
- Elpídio Francisco Santos (1) CEPLAC/SUERO - Porto Velho - RO
- Francisco José Lima Aragão (1) EMBRAPA CERRADOS - Brasília - DF
- Hermes Alves de Almeida (1) UEPB - Campina Grande - PB
- Jadergudson Pereira (1) UESC - Ilhéus - BA
- José Inácio Lacerda Moura (1) CEPLAC/ESMAI - Una - BA
- José Luiz Bezerra (1) UESC - Ilhéus - BA
- José Raimundo Bonadie Marques (1) CEPLAC/CEPEC - Ilhéus - BA
- Lahyre Izaete Silveira Gomes (2) CEPLAC/CEPEC - Ilhéus - BA
- Leonor Costa Maia (1) UFRPE - Recife - PE
- Livia Santos Lima Lemos (2) CEPLAC/CEPEC - Ilhéus - BA
- Milton Macoto Yamada (1) CEPLAC/CEPEC - Ilhéus - BA
- Paulo dos Santos Terra (1) UESC - Ilhéus - BA
- Raul René M. Valle (1) CEPLAC/CEPEC - Ilhéus - BA
- Robério Gama Pacheco (1) CEPLAC/CEPEC - Ilhéus - BA
- Rodrigo Souza Santos (1) UESC - EMBRAPA ACRE - Rio Branco - AC
- Ronaldo Costa Argôlo Filho (1) UESC - Ilhéus - BA
- Wilson Reis Monteiro (1) CEPLAC/CEPEC - Ilhéus - BA

\*Os números entre parênteses, após os consultores, indicam o número de trabalhos revisados.





