

Anais da I Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental



Documentos 35

Anais da I Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

Levy de Carvalho Gomes
José Jackson Bacelar Nunes Xavier
Marcos Vinícius Bastos Garcia
Eduardo Lleras Pérez
Luadir Gasparotto
Adônis Moreira

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental

Rodovia AM-010, km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

Caixa Postal 319

Fone: (92) 621-0300

Fax: (92) 3621-0320 / 3621-0317

www.cpa.embrapa.br

sac@cpaa.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Jackson Bacelar Nunes Xavier

Membros: Adauto Maurício Tavares

Cíntia Rodrigues de Souza

Edsandra Campos Chagas

Francisco Célio Maia Chaves

Gleise Maria Teles de Oliveira

José Clério Rezende Pereira

Maria Augusta Abtibol Brito

Maria Perpétua Beleza Pereira

Paula Cristina da Silva Ângelo

Raimundo Nonato Vieira da Cunha

Sebastião Eudes Lopes da Silva

Revisor de texto: Maria Perpétua Beleza Pereira

Normalização bibliográfica: Maria Augusta Abtibol Brito

Diagramação e arte: Gleise Maria Teles de Oliveira

Capa: Doralice Campos Castro

1ª edição

Todos os direitos reservados.

**A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).**

**Cip-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Amazônia Ocidental.**

Gomes, Levy de Carvalho et al.

Anais da I Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental / (editado por) Levy de Carvalho Gomes et al.

- Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2004.

137 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos; 35).

ISSN 1517-3135

1. Pesquisa. 2. Ciência. I. Título. II. Série.

CDD 501

Produção de basidiocarpos de *Crinipellis perniciosa* e avaliação de clones de cupuaçuzeiro quanto a resistência à vassoura-de-bruxa

Wenceslau Nascimento de Melo⁽¹⁾ e Maria Geralda de Souza⁽²⁾

⁽¹⁾Universidade Federal do Amazonas (Ufam), Departamento de Ciências Florestais, Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3.000, Campus Universitário, Reitoria, Bairro Coroado I, CEP 69077-000, Manaus, AM. E-mail: wenceslaumelo@ufam.edu.br; ⁽²⁾Embrapa Amazônia Ocidental, Rodovia AM 010, km 29, Zona Rural, Caixa Postal 319, 69010-970. Manaus - AM. E-mail: geralda@cpaa.embrapa.br

Resumo - A cultura do cupuaçu vem se destacando dentre as fruteiras nativas da Amazônia, por apresentar opções de caráter rentável significativas. Além do consumo da polpa e suas diferentes utilizações, as amêndoas são utilizadas na fabricação do cupulate. Entretanto a vassoura-de-bruxa, doença causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa*, vem acarretando os maiores prejuízos aos ciclos vegetativos e produtivos do cupuaçuzeiro. O uso de cultivares resistentes ao patógeno é a forma mais eficaz e econômica de controle dessa enfermidade. Os basidiósporos, liberados pelos basidiocarpos, são a única forma infectiva desse patógeno. Objetivando a obtenção desses esporos para a inoculação e avaliação da resistência de clones de cupuaçuzeiro, estudou-se o aperfeiçoamento e adaptação, para as nossas condições, da metodologia para a produção de basidiocarpos, em condições de temperatura e umidade controladas. Para tanto, instalou-se vassoureiro no campo e procedeu-se ao cultivo do fungo em meio de cultura artificial (bolachas).

Termos para indexação: *Crinipellis perniciosa*, vassoura-de-bruxa, cupuaçu, fitopatologia.

Production of basidiocarps of *Crinipellis perniciosa* and valuation of clones of cupuaçu about its resistance to witches' broom

Abstract - Culture of cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) detaches among native fructiferous trees from Amazonia, by presenting significant profitable options. Besides the use of pulp and its different utilizations, almonds are used in the cupulate's manufacture. Nevertheless whitches' broom, a disease caused by the fungus *Crinipellis perniciosa*, have been causing the greatest damages to vegetative and productive cycles of cupuaçu. The use of resistant cultivars to the patogen is the most efficient and economic way to control this infirmity. Basidiospores, released by basidiocarps, are the single infective structure of this pathogen. With the objective of obtain these spores, to the inoculation of the disease and valuation of the clones of cupuaçu's resistance, were studied the improvement and the adaptation to our conditions of the methodology of production of basidiocarps in temperature and moistness controled conditions. For all of these, a support to witches's broom was placed in field and tillage of fungus in arificial way of culture (crackers) was proceeded.

Index terms: *Crinipellis perniciosa*, witches' broom, cupuaçu, phytopathology.

Introdução

A cultura do cupuaçu vem se destacando dentre as fruteiras nativas da Amazônia, por apresentar opções de caráter rentável significativas. Além do consumo da polpa e suas diferentes utilizações, as amêndoas são utilizadas na fabricação do cupulate. Um dos principais fatores limitantes para o aumento

da produtividade da cultura é a vassoura-de-bruxa. Trata-se de uma doença causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa*, considerada a principal enfermidade do cupuaçuzeiro. O fungo *C. perniciosa* Stahel (Singer) pertence à divisão Eumycota, subdivisão Basidiomycotina, ordem agaricales e família Tricholomataceae.

A família Tricholomataceae é constituída de espécies com basidiomas pilados, estipitados, lignícolas e capazes de reativação após a secagem quando são umedecidos (Luz et al., 1997). *C. pernicioso* é um fungo hemibiotrófico com dois tipos de micélio: em tecidos ainda verdes, o micélio é espesso com 5-8 μm , biotrófico ou parasítico e sem a formação de grampo de conexão, crescendo intercelularmente. Quando as vassouras secam, o micélio torna-se saprofítico ou necrotrófico, cresce inter e intracelularmente, sendo menos espesso (1,5 - 5 μm) e apresentando grampo de conexão (Evans, 1980). A formação do grampo de conexão em hifas de cultura monospórica, a dicarionização de hifas monocarióticas derivadas de um único basídio uninucleado e a produção de basidiocarpos a partir de culturas monospóricas indicam que *C. pernicioso* é um fungo primariamente homotático (Purdy et al., 1983); (Griffith e Hedger, 1994).

A temperatura ótima para a germinação e desenvolvimento de *C. pernicioso* varia em torno de 25°C, com limites mínimo e máximo entre 15 e 30°C (Baker e Holliday, 1957). A germinação dos esporos é uma das fases mais delicadas para a sobrevivência do patógeno e, portanto, para a continuidade do ciclo de vida. É controlado por uma série de fatores, tanto genéticos quanto ambientais (Bastos, 1989). Em regra, após a germinação dos basidiósporos formam-se apressórios, hifas infectivas que penetram no hospedeiro via abertura estomacal ou por penetração direta (Baker e Holliday, 1957). Após a penetração dos basidiósporos nos tecidos meristemáticos, ocorre a formação dos sintomas característicos da doença, como hiperplasia e hipertrofia, que resultam do desequilíbrio hormonal durante a interação patógeno-hospedeiro, com formação anormal de frutos, flores e brotos vegetativos (Evans, 1978). Com a morte desses tecidos, o fungo persiste como saprófita, muitas vezes por vários anos, produzindo periodicamente os corpos de frutificação, os basidiocarpos (Bastos, 1989). A produção de basidiocarpos é fornecida pela ocorrência de dias chuvosos, seguidos por dias secos ou vice-versa, e o período de produção é dependente das condições climáticas de cada região (Dalla Pria & Camargo, 1997).

O ciclo de vida do fungo compreende uma fase parasítica alternada com uma fase saprofítica. Pegus (1972), citado por Bastos (1980), postulou a teoria dual e micelial para explicar como o fungo existe em diferentes estados miceliais, e que o micélio primário, monocariótico (ou homocário), representa a fase biotrófica, enquanto a fase necrotrófica é induzida pelo micélio secundário, dicariótico (ou heterocário). O monocário é o micélio primário que se desenvolve da germinação de um esporo sexual simples. O dicário é o micélio secundário que predomina na natureza e é o micélio a partir do qual se desenvolvem os corpos de frutificação.

O micélio monocariótico da fase parasítica depende do tecido vivo do hospedeiro, onde o fungo cresce com a planta e obtém nutrientes das células vivas para sustentar seu crescimento e desenvolvimento (Bastos, 1990). Entretanto, quando tal crescimento torna-se inibido, os nutrientes solúveis tendem a tornar-se limitantes, o que leva o fungo a invadir, colonizar e matar os tecidos, obtendo seus nutrientes necrotroficamente, usando seu arsenal enzimático, mediante enzimas degradativas típicas de um parasita facultativo (Evans, 1981); (Nakayama, 1995). O micélio do fungo não é infectivo, somente os esporos são aptos a induzir doenças.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na Unidade da Embrapa Amazônia Ocidental, em campo e em laboratório, no ano de 2003 e no primeiro semestre de 2004.

Deu-se continuidade à produção de basidiocarpos em vassoureira implantado no campo. As vassouras-de-bruxa depositadas no vassoureira foram obtidas em coletas, em datas aleatórias, com a utilização de tesouras de poda ou aproveitando o material extraído, em grande quantidade, de podas periódicas realizadas na área de plantio de cupuaçu sem caroço. Para o transporte das vassouras-de-bruxa para o vassoureira, utilizaram-se sacos plásticos de vinte litros. As demais áreas de plantio onde foram coletadas vassouras-de-bruxa foram: área do triângulo, PTU, peladão, e área da usina, todas localizadas no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Ocidental

Posteriormente, as vassouras foram dependuradas no vassoureiro de campo, composto de nove arames galvanizados amarrados a seis postes de madeira. A cada dois postes, havendo uma distância de 5 metros, foram esticados três arames com 30 cm de espaçamento entre eles e o primeiro, a 50 cm do solo. Foram confeccionados ganchos a partir de arames de cobre revestidos por plástico, para serem presos às vassouras, e estas, aos arames galvanizados.

Foi instalado um mecanismo de aspersão automatizado constituído de seis bicos aspersores divididos em dois canos de PVC de ½ polegada posicionados a 3,5 m acima do solo e com espaçamento de 1 m entre eles. A aspersão foi abastecida por tubulação proveniente de uma caixa d'água de 500 L dotada de um sistema com bóia, para provê-la de enchimento automatizado. Os bicos aspersores eram acionados por meio de uma balança de mercúrio ligada à rede elétrica; o processo se dá aproximadamente a cada hora e tem duração de 3 minutos. O vassoureiro foi montado em área de capoeira com bom sombreamento natural, e com a adição da névoa formada pela aspersão obteve-se um microclima com níveis de luminosidade e umidade propícios para a produção de basidiocarpos. Novas vassouras-de-bruxa foram regularmente adicionadas à quantidade já existente no vassoureiro.

Foi utilizado, também, um meio artificial (bolachas) para a produção de basidiocarpos em condições controladas (Adaptado de Niella et al., 1999). Para a confecção de 40 bolachas, foram utilizados 350 g de farelo de trigo, 280 g de vermiculita, 42 g de gesso e 10,64 g de calcário, para uma quantidade de 480 mL de água destilada esterilizada. Para o preparo do meio, os ingredientes foram misturados com gradativa adição de água, espremendo-se a mistura com as mãos até que o excesso de água escorresse; após o preparo do meio, foram distribuídos igualmente 35 g da mistura em bandejas de alumínio, tampadas e enroladas em papel alumínio para facilitar o processo de esterilização em autoclave, ao qual as bolachas foram expostas por período de 15-20 minutos. Depois de retiradas e resfriadas, foi inoculado o fungo *C. pernicioso* por meio de 6 discos de meio de cultura BDA (Batata,

Dextrose, Ágar) medindo 5 mm de diâmetro previamente colonizados por micélio branco cotonoso característico; os discos de micélio foram retirados de colônias novas de 20-30 dias. Transferiram-se as bolachas para câmara de crescimento, atentando-se para não agitar as bandejas e não desnivelar as bolachas. Após 15 dias em prateleiras, para crescimento, as bandejas foram abertas para a aplicação da cobertura composta de 80 g de turfa, 20 g de vermiculita, 20 g de calcário à qual foram adicionados 50 mL de água destilada esterilizada. A mistura foi dividida para a cobertura em quantidades individuais de 15 g, pesadas em balança analítica. As porções da mistura foram embaladas em papel alumínio e submetidas ao processo de esterilização por autoclave; após resfriadas, cada porção de 15 g de mistura foi desembalada e distribuída uniformemente sobre uma bolacha, com o auxílio de espátulas, sendo estas regularmente flambadas durante o processo para evitar contaminação. O processo foi finalizado com o fechamento das bandejas.

Após 10 dias, aproximadamente, as bolachas foram retiradas das bandejas de alumínio e dependuradas com arames no interior de câmaras de plástico medindo 1 m de comprimento por 60 cm de largura e 60 cm de altura. Controlou-se criteriosamente a temperatura (em torno de 25-30°C) e a umidade, a fim de viabilizar a produção de basidiocarpos.

O umedecimento automatizado das bolachas foi realizado mediante instalação de umidificadores elétricos ligados a temporizadores programados para o acionamento dos umidificadores a cada hora por um período de 15 minutos. O fornecimento de água para as bolachas manteve-se constante e uniforme até que o micélio mudasse de coloração passando a ter aparência amarelada e, por fim, cor-de-rosa, quando o fornecimento de água foi interrompido e as bolachas foram submetidas a estresse hídrico por um período de 5 dias, ao fim do qual o umedecimento voltou a ser aplicado na mesma proporção anterior.

Resultados e Discussão

A produção de basidiocarpos no vassoureiro e no campo foi muito reduzida, mesmo nos meses de maior pico (maio - julho). Esses resultados diferem daqueles citados por Stein et al. (1996). Da mesma forma, a produção de basidiocarpos em meio artificial não atendeu às expectativas; esses resultados também foram discordantes daqueles apresentados pelo autor acima citado (Tabela 1). Conseqüentemente esses

resultados levaram à obtenção de baixa concentração de esporos, ou seja, concentração em glicerol 16% ($<10^5$), visando ao armazenamento desses para posterior utilização em inoculações, não sendo suficiente para inocular clones de cupuaçu para testes de resistência ao patógeno. Estes experimentos deverão ser repetidos com adequação de metodologia, uma vez que a produção de basidiocarpos visando à produção de inóculo se faz necessária nos trabalhos de seleção de clones de cupuaçuzeiro.

Tabela 1. Resultados obtidos no período de junho de 2003 a julho de 2004.

| Origem do material de coleta dos basidiocarpos | N.º Basidiocarpos | Obtenção de esporos ([] em glicerol 16%) | Isolamento em ágar-água a partir de basidiocarpos coletados % de placas geraram colônias |
|------------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Campo | 500 | $<10^5$ | 50 |
| Vassoureiro | 100-150 | $<10^5$ | 50 |
| Bolachas | 50 | $<10^5$ | 50 |

Conclusões

A obtenção de basidiocarpos sob condições controladas de temperatura e umidade não proporcionou resultados satisfatórios que atendessem aos objetivos propostos neste trabalho. Novos estudos e metodologias deverão ser desenvolvidos para adequação às nossas condições ambientais.

Referências Bibliográficas

BAKER, R. E. D.; HOLLIDAY, P. Witches' broom disease of cacao. **Phytopathology**, St. Paul, n. 2, p. 42, 1957.

BASTOS, C. N. Efeito da radiação solar e do período pós-germinativo sobre a viabilidade de basidósporo de *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 261-3, 1989.

BASTOS, C. N. Patogenicidade e características do isolado de *Crinipellis pernicioso* procedente de Uruçuca, Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 3, p. 344-346, set. 1990.

DALLA PRIA, M. D.; CAMARGO, L. E. A. Doenças do Cacaueiro. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia** doenças de plantas cultivadas. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2. p. 176-183.

EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 74, n. 3, p. 515-523, jun. 1980.

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis pernicioso* using a bran-veemiculite médium. **Journal of Plant Pathology**, Netherland, p. 227-230, 1994.

LIMA, M. I. P. M.; SOUZA, A. G. C. **Diagnose das principais doenças do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*)** (Willd. Ex Spreng.) Shum.) e seu controle. Manaus: EMBRAPA-CPAA, 1998. 18 p. (EMBRAPA-CPAA. Documentos, 9).

LUZ, E. D. M. N. et al. Cacao (*Theobroma cacao*). In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa. UFV, 1997. v. 2. p. 611-615.

NIELLA, G. R. et al. Aperfeiçoamento da metodologia de produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis perniciosa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 523-527, dez. 1999.

NAKAYAMA, L. H. I. **Influência da nutrição mineral na manifestação dos sintomas da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer) em cacauero**. 1995. 76 f. Tese (Doutorado) ESALQ, Piracicaba.

PURDY, L. H. et al. Proof of pathogenicity of *Crinipellis perniciosa* to *Theobroma cacao* by using basidiospores produced in vitro cultures. **Theobroma**, Ilhéus, v. 13, n. 3, p. 157-163, jul./set. 1983.

STEIN, R. L. B. et al. **Produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis perniciosa* do cupuaçuzeiro em meio de farelo de vermiculita**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1996. 15 p. (EMBRAPA-CPATU. Boletim de Pesquisa, 167).