Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau
(*Theobroma cacao* L.)

Cristina Sayuri Maki

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2006

Cristina Sayuri Maki

Bióloga

Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.)

Orientador:

Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas**

Piracicaba

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Maki, Cristina Sayuri

Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau
(*Theobroma cacao* L.) / Cristina Sayuri Maki. - - Piracicaba, 2006.
127 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Biodiversidade 2. Cacau 3. Fungo endofítico I. Título

CDD 633.74

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Aos meus pais, Toshiyuki e Norimi; aos meus irmãos, Marcio, Claudia e Mauricio e ao Paulo. Porque sem o conforto de seu amor e apoio incondicional, a caminhada teria sido muito mais árdua.

OFEREÇO

Aos orientadores, professores e companheiros de vida acadêmica e científica. Porque tudo valeu muito a pena!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que esteve comigo em todos os momentos dessa caminhada. Pelo discernimento, pela paciência e pelas dificuldades transpostas;

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação e preciosos ensinamentos. Realmente foi um privilégio desenvolver esse trabalho sob sua orientação e integrar seu grupo de pesquisa;

Ao Dr. Welington Luiz de Araújo, pela exaustiva dedicação às discussões e sugestões ao trabalho. Seu apoio, confiança e amizade foram fundamentais para o bom desenvolvimento desse trabalho;

À Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner, por toda a colaboração e concessões ao desenvolvimento do trabalho e pela oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa;

Ao Dr. Allan W. V. Pomella, Dr. Augusto Etchegaray; Dr. Ricardo Azevedo, Dra. Salete Gaziola, Dr. Valdemar Tornisielo e Vanderlei Varisi, pelos auxílios prestados na execução dos experimentos;

Aos meus pais e irmãos, Toshiyuki Maki, Norimi Hassegawa, Marcio Hiroshi, Claudia Kazumi e Mauricio Satoshi, por compreenderem a minha ausência em tantas ocasiões familiares e mesmo assim, encorajarem meu trabalho por acreditarem ser o melhor para mim;

Ao Paulo A. de Araújo, pela paciência nos momentos de maior estresse, mas sobretudo, pelo seu amor, companheirismo e apoio;

À Lúcia, Agostinho, Márcia, Lucilene e Luana: minha segunda família. Pela acolhida, carinho e amor;

Aos queridos amigos Alcione Rezende, Andréa Guelfi, Clarice, Claudete e Pida Teodoro, Cristina Almeida, Marilda Oliveira, Mayra Martins e Nivia Silva, pela acolhida sempre carinhosa. Amo vocês;

Aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos, que muito me auxiliaram no trabalho prático da tese, meu sincero reconhecimento e agradecimento: Carolina Quecine, Cristina Almeida, Heloíze Milano, Joelma Marcon, José Antônio da Silva, Luciana Cursino, Mayra Martins, Priscilla Rossetto, Rodrigo Stuart, Ricardo Yara e Welington de Araújo;

Aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos, pelos bons momentos que passamos nesses anos todos: Adalgisa Torres, Ágata Giancoli, Aldo Procópio, Aline Romão, Beatriz Rodrigues, Carlos Vildoso, Cláudia Gai, Cristina Brum, Daiane, Eliandra Sia, Fernanda Souza, Fernando Andreote, Francisco Andreote, Julia Sobral,

Léia Fávaro, Manuella Dourado, Marise Suzuki, Natalie Andreoli, Paulo Lacava, Rodrigo Mendes, Rudi Procópio, Sônia Minami, Taís Lana, Uirá Belmonte e Vivian Pietrobon;

À secretária da pós-graduação, Cândida Vanderléia Oliveira (Léia), pelas informações e inúmeros auxílios prestados;

Aos funcionários do Departamento de Genética da Esalq/USP, pela atenção de sempre: Beth, Berdã, Fernando, Glória, Neusa, Valdir e Vitor.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da ESALQ, pela oportunidade;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	14
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Revisão bibliográfica	16
1.1.1 Microrganismos endofíticos	16
1.1.2 Fungos endofíticos e suas potencialidades	18
1.1.3 O cacaueteiro (<i>Theobroma cacao</i> L.): características botânicas e taxonômicas	20
1.1.4 Importância econômica do cacaueteiro	21
1.1.5 <i>T. cacao</i> : reprodução e variabilidade	22
1.1.6 Germoplasma de <i>T. cacao</i>	24
1.1.7 A vassoura de bruxa: doença mais expressiva de cacaueteiros no Brasil	25
1.1.8 Introdução da doença na Bahia	27
1.1.9 Métodos de controle da vassoura de bruxa	29
1.1.9.1 Controle genético	29
1.1.9.2 Controle biológico	32
1.1.9.3 Controle cultural	33
1.1.9.4 Controle químico	35
1.1.9.5 Resistência sistêmica adquirida (RSA)	37
1.1.9.6 Utilização de substâncias naturais	38
Referências	39
2 DIVERSIDADE GENÉTICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CACAU	50
Resumo	50
Abstract	51
2.1 Introdução	52
2.2 Desenvolvimento	52
2.2.1 Revisão bibliográfica	52
2.2.2 Material e métodos	57
2.2.2.1 Isolamento de fungos endofíticos de cacau	57

2.2.2.2. Grupos morfológicos e de crescimento	57
2.2.2.3 Caracterização morfológica do isolado endofítico de cacau 42.3	58
2.2.2.4 Extração de ácidos nucleicos	58
2.2.2.5 Quantificação e diluição do DNA	58
2.2.2.6 Amplificação de regiões conservadas ITS do rDNA	59
2.2.2.7 Análises de ARDRA	59
2.2.2.8 Sequenciamento e análise dos dados	60
2.2.3 Resultados e discussão	60
2.2.3.1 Análise morfológica	60
2.2.3.2 Análise molecular	62
2.3 Considerações finais	73
Referências	74
Anexo 1	78
3 POTENCIAL DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CACAU COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Crinipellis perniciosa</i> E OUTROS FITOPATÓGENOS ..	84
Resumo	84
Abstract	85
3.1 Introdução	86
3.2 Desenvolvimento	86
3.2.1 Revisão bibliográfica	87
3.2.2 Principal fitopatógeno do cacaueiro no Brasil: <i>Crinipellis perniciosa</i>	91
3.3 Material e Métodos	92
3.3.1 Material biológico	92
3.3.2 Caracterização de <i>C. perniciosa</i>	92
3.3.3 Avaliação do potencial de fungos endofíticos de cacau como agentes de controle biológico de <i>C. perniciosa</i>	94
3.3.4 Extração de metabólitos secundários do endófito antagonista	94
3.3.5 Avaliação da inibição de fitopatógenos por fungos endofíticos de cacau	95
3.3.6 Amplificação e sequenciamento de um gene relacionado à produção de antifúngicos ...	96
3.4 Resultados e discussão	96
3.4.1 Caracterização de <i>C. perniciosa</i>	97

3.4.2 Seleção de endófitos de cacauzeiro como potenciais agentes de controle biológico de <i>C. perniciosus</i>	99
3.4.3 Extração de metabólitos secundários do endófito antagonista	101
3.4.4 Endófitos de cacau como inibidores de fitopatógenos	103
3.4.5 Amplificação de gene relacionado à produção de antifúngicos	103
3.5 Considerações finais	104
Referências	106
4 INTERAÇÃO ENDÓFITO-PLANTA E ENDÓFITO PATÓGENO	111
Resumo	111
Abstract	112
4.1 Introdução	113
4.2 Desenvolvimento	113
4.2.1 Revisão bibliográfica	114
4.2.2 Material e métodos	117
4.2.2.1 Material biológico	117
4.2.2.2 Investigação da interação endófito-planta utilizando microscopia eletrônica de varredura	117
4.2.2.3 Investigação da interação endófito-patógeno utilizando eletroforese em gel de acrilamida para proteínas totais	118
4.2.3 Resultados e discussão	119
4.2.3.1 Interação endófito-planta	119
4.2.3.2 Interação endófito- <i>C. perniciosus</i>	122
4.2.4 Considerações finais	123
Referências	125

DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CACAU (*Theobroma cacao* L.)

Resumo

Endófitos são todos os microrganismos, cultiváveis ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais, não causando danos ao hospedeiro e nem o desenvolvimento de estruturas externas, excluindo, dessa forma, bactérias noduladoras e micorrizas. *Theobroma cacao* L. é importante para as indústrias alimentícia e cosmética, por constituir a matéria prima para a produção de manteiga de cacau. Considerando a importância do estudo do cacaueiro e sua comunidade fúngica endofítica associada, os objetivos desse trabalho foram: i) estudar a diversidade da comunidade endofítica de cacau; ii) avaliar o potencial dessa comunidade para o controle biológico de *Crinipellis perniciosa*, o agente causal da vassoura de bruxa e outros fitopatógenos e iii) estudar a interação endófito-patógeno e endófito-hospedeiro. O trabalho foi iniciado com o isolamento de fungos endofíticos de cacau, que foram caracterizados com base em características morfológicas e moleculares. A diversidade foi avaliada por análises de rDNA (regiões ITS1, ITS2 e 5.8) (ARDRA e sequenciamento). A análise de ARDRA gerou 64 haplótipos, os quais incluíram no mínimo, 16 espécies. A seguir, fungos endofíticos antagonistas de cacau foram selecionados *in vitro* contra *C. perniciosa*. Foi observado que, dentre os 145 isolados avaliados, 38.6% foram classificados como antagonistas, enquanto 13.1% foram classificados como parasitas. Após a seleção, os isolados foram usados para extração de metabólitos secundários e outras caracterizações. Também foi feita a detecção do gene da δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valin (ACV), que é a precursora das β -lactanas, antibióticos como as penicilinas e cefalosporinas. A amplificação desse gene gerou um fragmento de 600 pb em 9.1% dos isolados avaliados. Alguns isolados foram testados contra fungos fitopatogênicos (*Colletotrichum falcatum*, *C. sublineorum*, *Erythricium salmonicolor*, *Rhizoctonia solani*, *Ceratocystis paradoxa*, *Phytophthora* sp., *P. parasitica*, *P. palmivora* e *Fusarium moniliforme*). Apenas *C. sublineorum* de sorgo e *Ceratocystis paradoxa* de cana-de-açúcar foram inibidos *in vitro* pelos endófitos 42.3 e 2, respectivamente. Foi feita a investigação da habilidade de penetração e colonização do fungo endofítico 42.3 em cacau comum suscetível, usando as técnicas de RAPD e SEM. A penetração do fungo foi iniciada entre 3 e 6 horas após a inoculação. A interação entre o endófito de cacau 42.3 com *C. perniciosa* 281 (patogênico), foi avaliada por SDS-PAGE, visando a detecção de proteínas expressas pelo patógeno e pelo endófito. A SDS-PAGE permitiu a visualização de bandas expressas na interação, quando os microrganismos foram crescidos juntos. Na presença do substrato de crescimento do endófito, *C. perniciosa* não expressou proteínas visíveis, ou distinguíveis em SDS-PAGE, mas o co-cultivo desses fungos, geraram bandas não observadas em análises prévias.

Palavras-chave: endófitos, cacau, diversidade.

DIVERSITY AND BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF THE CACAO (*Theobroma cacao* L.) ENDOPHYTIC FUNGI

Abstract

Endophytes are all microorganisms, culturable or not, that inhabit the interior of plant tissues, causing no harm to the host, and that do not develop external structures, excluding in this way, nodulating bacteria and mycorrhizal fungi. *Theobroma cacao* L. is important to food and cosmetic industry due the fact that it is used for production of cacao butter. Considering the importance of cacao and associated endophytic fungal community studies, the objectives of this work were to: i) study the diversity on endophytic community of cacao; ii) evaluate the potential of this community to biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease and other phytopathogens and iii) study the interaction endophyte-pathogen and endophyte-host. The work began with isolation of the cacao endophytic fungi that was characterized based on morphological and molecular characters. The diversity was evaluated by rDNA (ITS1, ITS2 e 5.8 subunit regions) analyses (ARDRA and sequencing). The ARDRA analysis generated 64 haplotypes, which included at least 16 species. Following, antagonistic endophytic fungi from cacao were selected *in vitro* against *C. pernicioso*. It was observed that in 145 evaluated isolates, 38.6% was classified as antagonistic, while 13.1% were classified as parasitic. After the selection, isolates were used for secondary metabolites extraction and further characterization. Also, detection of δ -(L- α -aminoadipil)-L-cysteinil-D-valin (ACV) gene, which is the precursor of β -lactams, antibiotics like penicilins and cephalosporins, was carried out. The amplification of this gene generated a fragment of 600pb in 9.1% of the isolates evaluated. Some isolates were further evaluated against phytopathogenic fungi (*Colletotrichum falcatum*, *C. sublineorum*, *Erythricium salmonicolor*, *Rhizoctonia solani*, *Ceratocystis paradoxa*, *Phytophthora* sp., *P. parasitica*, *P. palmivora* and *Fusarium moniliforme*). Only *C. sublineorum* of sorghum and *Ceratocystis paradoxa* of sugarcane were *in vitro* inhibited by the endophytes 42.3 and 2, respectively. The investigation of the penetration and colonization ability of endophytic fungus 42.3 on susceptible cacao common was carried out, using RAPD and SEM techniques. The penetration of the fungus was initiated between 3 and 6 hours after inoculation. The interaction between cacao endophyte 42.3 with *C. pernicioso* 281 (pathogenic), was evaluated by SDS-PAGE, aiming the detection of expressed proteins by pathogen and endophyte. The SDS-PAGE allowed the visualization of bands expressed in the interaction, when the microorganisms were grown together. In the presence of the endophyte growth substrate, *C. pernicioso* do not express visible proteins or, at least, distinguishable in SDS-PAGE, but the co-culture of these fungi generated non observed bands in previously analysis.

Key words: endophytes, cocoa, diversity, biological control.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Estrutura do cluster gênico que codifica para RNA ribossômico. As setas escuras indicam as regiões flanqueadas pelos *primers* ITS 1 e ITS 4, que foram utilizadas no trabalho (Fonte: Fungaro, 2000 – modificado) 55
- Figura 2 – Distribuição dos grupos morfológicos de endófitos de cacau segundo a frequência desses isolados dentro das classes de coloração micelial.
Legenda: (I) isolados brancos; (II) isolados cinzas; (III) isolados amarelos; (IV) isolados pretos; (V) isolados verdes; (VI) isolados marrons; (VII) isolados vermelhos; (VIII) isolados róseos; (IX) isolados alaranjados 60
- Figura 3 – Conídios de *Fusarium* sp. (isolado 42.3), observados em microscópio óptico. Em (A), conídios observados em aumento de 400X; em (B), conídios observados em aumento de 1000X. As setas vermelhas indicam os macroconídios e as setas brancas indicam os microconídios 63
- Figura 4 – Gel de agarose 1% com fragmentos amplificados de regiões ITS de fungos endofíticos de cacau. Legenda: M (marcador molecular de 1Kb – Fermentas), 1 = CM5, 2=CM49, 3=CM30, 4=CM3, 5=CM83, 6=CM26, 7=CM17, 8=CM4 e 9=CM18 64
- Figura 5 – Diferetens haplótipos de ARDRA obtidos por restrição dos fragmentos de ITS, utilizando as enzimas de restrição *Mbo* I e *Hinf* I. Legenda: (M) marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas) 66
- Figura 6 – Árvore filogenética mostrando a relação entre fungos endofíticos de cacau (Gêneros *Fusarium*/*Nectria*/*Gibberella*) e outras espécies de fungos. A árvore foi construída baseada em fragmentos de sequências de rDNA (ITS1, 5,8S e ITS2), utilizando o método de *neighbor-joining*. Uma análise de *bootstrap* foi feita com 1000 repetições..... 69
- Figura 7 – Árvore filogenética mostrando a relação entre fungos endofíticos de cacau (Gêneros *Lasiodiplodia*/*Botryosphaeria*) e outras espécies de fungos. A árvore foi construída baseada em fragmentos de sequências de rDNA (ITS1, 5,8S e ITS2), utilizando o método de *neighbor-joining*. Uma análise de *bootstrap* foi feita com 1000 repetições 70

Figura 8 – Árvore filogenética mostrando a relação entre fungos endofíticos de cacau (Gêneros <i>Phomopsis</i> / <i>Diaporthe</i>) e outras espécies de fungos. A árvore foi construída baseada em fragmentos de sequências de rDNA (ITS1, 5,8S e ITS2), utilizando o método de <i>neighbor-joining</i> . Uma análise de <i>bootstrap</i> foi feita com 1000 repetições	71
Figura 9 – Árvore filogenética mostrando a relação entre fungos endofíticos de cacau (Gêneros Diversos) e outras espécies de fungos. A árvore foi construída baseada em fragmentos de sequências de rDNA (ITS1, 5,8S e ITS2), utilizando o método de <i>neighbor-joining</i> . Uma análise de <i>bootstrap</i> foi feita com 1000 repetições	72
Figura 10 – Viabilidade do micélio de <i>C. pernicioso</i> inoculado em meio BDA e V-8 10%, na presença e ausência de luz	98
Figura 11 – Exemplos de comportamento parasítico entre isolados endofíticos de cacau e <i>C. pernicioso</i> . Em (A), o controle positivo, com <i>Trichoderma</i> sp. parasitando hifas de <i>C. pernicioso</i> . Em (B), a hifa de <i>Trichoderma</i> sp. dentro do micélio de <i>C. pernicioso</i> . Em (C) <i>Phomopsis</i> sp. (isolado 69C), parasitando as hifas de <i>C. pernicioso</i> com formação de nós, indicados pelas setas; e em (D) <i>Fusarium oxysporum</i> (isolado 44.1), entrelaçando-se na hifa de <i>C. pernicioso</i>	100
Figura 12 – Crescimento de <i>C. pernicioso</i> na presença dos metabólitos secundários extraídos do (A) meio de crescimento do endófito e (B) do micélio do endófito. À direita de cada figura, está ilustrada a placa de controle negativo, contendo papel de filtro umedecido com solventes orgânicos. À esquerda, as placas-teste	102
Figura 13 – Inibição dos fitopatógenos <i>Colletotrichum sublineorum</i> pelo fungo endofítico de cacau 42.3 em (A) e <i>Ceratocystis paradoxa</i> pelo fungo endofítico de cacau 2 em (B)	104
Figura 14 – Gel de amplificação de antibióticos peptídicos, cuja banda de 600 pb corresponde ao alvo desejado	105
Figura 15 – Esquema de inoculação dos fungos para estudo da expressão de proteínas totais em (A) <i>Crinipellis pernicioso</i> , (B) <i>C. pernicioso</i> + endófito 42.3, (C) endófito 42.3 e (D) <i>C. pernicioso</i> + substrato de 42.3	119

- Figura 16 – As fotos mostram em (A) a placa de re-isolamento do endófito dos caules de cacaueteiro após 15 dias da inoculação dos esporos nas gemas axilares e em (B) o gel de RAPD, mostrando o perfil de bandamento, onde foram empregados três *primers* diferentes, do isolado original (1) e do re-isolado (2) 120
- Figura 17 – MEV, ilustrando as diferentes fases do desenvolvimento do endófito 42.3: em (A) superfície da folha de cacaueteiro sem inoculação do endófito, em (B) 3 horas após a inoculação, em (C) 3 horas após a inoculação, mostrando a afinidade dos esporos pelas nervuras da folha de cacau, em (D) 6 horas após a inoculação, mostrando claramente a penetração do tubo germinativo do endófito nos tecidos do cacaueteiro, em (E) 15 horas após a inoculação, mostrando praticamente nenhuma mudança no aspecto da interação e em (F) 33 horas após a inoculação, onde pode ser observado o micélio de *Fusarium sp.* 42.3 emergindo da folha de cacaueteiro 121
- Figura 18 – Gel de SDS-PAGE, mostrando diferentes perfis de cadeias polipeptídicas: em (1) endófito 42.3, em (2) *Crinipellis pernicioso* 281, em (3) *C. pernicioso* + endófito 42.3, crescidos juntos, em (4) *C. pernicioso* crescido na presença do substrato de crescimento do endófito 42.3. Em (M), marcador de peso molecular. As setas indicam bandas diferencialmente e superexpressas 123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Calendário recomendado pela CEPLAC para a prática das podas fitossanitárias, na região cacaueira da Bahia.....	34
Tabela 2 – Fungos endofíticos de cacau: haplótipos, frequência e procedência	64
Tabela 3 – Descrição dos haplótipos definidos por ARDRA, segundo espécies, hospedeiro e isolado de fungos endofíticos de cacau	79
Tabela 4 – Alguns biopesticidas disponíveis comercialmente para controle de doenças de plantas	88
Tabela 5 – Isolados utilizados nos ensaios de avaliação de biocontrole de fitopatógenos	93
Tabela 6 – Crescimento micelial de isolados de <i>C. pernicioso</i> , em centímetros, quando incubados em BDA e V-8, na presença e ausência de luz	97

1 INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos são aqueles cultiváveis ou não, que penetram a planta e vivem em seu interior, interagindo com outras espécies de microrganismos, sem causar algum dano ou prejuízo ao seu hospedeiro, ou mesmo, estruturas externas visíveis. Há evidências da influência desses microrganismos em diversas características expressas pela planta, dentre as quais podemos citar: a produção de hormônios de crescimento e antibióticos, a proteção contra herbivoria (pela produção de alcalóides), entre outros. Há alguns anos, não se imaginava a grande potencialidade dos endófitos e por isso, apesar da descoberta desses microrganismos no interior das plantas, pouca importância foi dada a esse grupo. Recentemente o interesse aumentou, e hoje, além de se descobrir a cada dia novas características de importância envolvendo esses microrganismos, é sabido que aparentemente todas as plantas são habitadas por uma comunidade endofítica, composta principalmente por fungos e bactérias. Esses microrganismos endofíticos colonizam praticamente todas as espécies de plantas, sendo potenciais fontes de estudo para características de interesse fora e dentro da planta.

O cacauieiro, *Theobroma cacao* L., pertence à família Sterculiaceae, que possui cerca de 50 gêneros, compreendendo 750 espécies. Desta família, *Theobroma* é o gênero de maior importância, devido à relevância econômica do cacauieiro, traduzida pelo grande consumo de manteiga e mel de cacau, que são utilizados em grande parte na indústria alimentícia para a fabricação de chocolate, licores, sucos, geléias e, mais recentemente, na indústria cosmética, como matéria prima para a elaboração de hidratantes, cremes, xampus, condicionadores, entre outros produtos.

O Brasil já foi o principal produtor de cacau, mas devido à vassoura de bruxa, causada pelo basidiomiceto *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, o Brasil é hoje, o quinto produtor mundial de cacau, sendo essa cultura, a principal fonte de renda agrícola para o estado da Bahia. Dessa forma, dada a importância dessa cultura, são vários os estudos existentes sobre o controle desta doença que ataca cacauieiros nas regiões sudeste da Bahia e Amazônica.

A produção brasileira de cacau na safra 1990/91 foi de quase 713 mil toneladas, tendo caído bruscamente nos últimos anos, sendo observado apenas 170,7 mil toneladas na safra de 2003. Esta redução se deve principalmente à introdução da vassoura de bruxa na região sudeste da Bahia. Porém, a vassoura de bruxa, inicialmente detectada em Uruçuca, espalhou-se rapidamente por toda a região produtora de cacau, prejudicando lavouras inteiras da cultura e mesmo após

quase duas décadas, continua representando a maior ameaça da cultura de cacau, mesmo porque não existem métodos realmente eficazes para o controle da doença, sendo utilizados atualmente, com maior eficiência, o manejo integrado.

O estudo da variabilidade de espécies que compõem a comunidade endofítica de cacau, a observação das interações endófito-patógeno e a análise das interações endófito-planta foram os objetivos principais que originaram a idéia deste trabalho, uma vez que vários fatores devem ser considerados quando se visa estudar a interação entre endófitos, seus hospedeiros vegetais e um patógeno, especialmente quando muito pouco é conhecido acerca dessa associação. Fatores abióticos e bióticos podem exercer pressões seletivas que favoreçam um ou outro personagem em um dado ambiente. Assim, um hospedeiro pode albergar diferentes comunidades endofíticas de microrganismos, dependendo da localização e condição às quais está sendo submetido. Dessa forma, é esperado que esse trabalho possa vir a contribuir para investigações futuras acerca das associações do cacaueiro com seus endófitos e *C. perniciosa*.

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 Microrganismos endofíticos

A diversidade de microrganismos existentes na Terra é excepcional. Fungos, bactérias e arqueas, são encontrados habitando seres vivos, ar, água, solo, comprovando a versatilidade desses seres em se desenvolverem em habitats, por muitas vezes, inóspitos. Embora popularmente microrganismos estejam associados a doenças, falta de higiene e matéria em decomposição, são muitas as espécies utilizadas para a fabricação de alimentos, fármacos, enzimas, bebidas, etc., visando o bem estar e saúde do homem. Dentre os microrganismos considerados benéficos, podemos citar os chamados endófitos, grupo este que vem despertando o interesse de pesquisadores há algumas décadas, por habitarem tecidos vegetais, sem causar-lhes danos ou prejuízos. Ao contrário, vários estudos têm apontado para características de interesse expressas por endófitos, as quais podemos citar a produção de antibióticos, hormônios, enzimas.

As comunidades endofíticas, cuja composição varia em função do hospedeiro e das condições ambientais, se inter-relacionam dentro da planta, em um balanço harmônico. O

desequilíbrio dessa harmonia afeta o comportamento de todos os integrantes de comunidade, dando condições para que fungos oportunistas manifestem seu potencial patológico ao hospedeiro.

A separação de grupos ditos patogênicos, endofíticos e oportunistas é meramente didática, uma vez que a distância de um estágio para outro pode ser muito pequena. Assim, um microrganismo pode ser considerado endofítico, mas com a redução dos mecanismos de defesa da planta, pode se comportar como um patógeno (PEIXOTO-NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Freeman e Rodrigues (1993) induziram mutações em *Colletotrichum* sp. e *C. magna*, obtendo vários mutantes que diferiram do tipo selvagem em apenas um gene, sugerindo que em alguns casos, a diferença entre um patógeno e um endófito avirulento pode ser bem pequena. A variabilidade de fungos endofíticos varia de hospedeiro para hospedeiro. Um exemplo claro foi relatado por Arnold et al. (2003), que isolaram *Colletotrichum* spp. em 88,9% das folhas de *Theobroma cacao*, 33,3% das folhas de *Ouratea lucens* e não isolaram esse gênero de *Heisteria concinna*. E dentre todos os gêneros isolados desses três hospedeiros, 65,5% foram restritos a apenas um hospedeiro. No trabalho de Carroll e Carroll (1978), foi observado que uma ou duas espécies dominam como endófitos em um dado hospedeiro enquanto outros isolados são raros e pouco freqüentes.

Na literatura, os fungos endofíticos são divididos em dois grupos principais: *balansiaceous* e não-*balansiaceous*. Endófitos *balansiaceous* são fungos ascomicetos pertencentes aos gêneros *Epichloe* e *Balansia* (anamorfos *Neotyphodium* e *Ephelis*), que se desenvolvem sistêmica e intercelulamente e são transmitidos verticalmente através de sementes (SCHULZ; BOYLE, 2005). Além disso, são dependentes de nutrientes do apoplasto e produzem uma extensa lista de metabólitos secundários, dentre os quais podemos citar as peraminas e lolinas (alcalóides inseticidas) e as lolitrem B e ergovalinas (alcalóides anti-vertebrados), citados por Schulz e Boyle (2005). Além disso, endófitos *balansiaceous* mantêm uma dinâmica de infecção dentro do hospedeiro que é inteiramente uma função da sobrevivência relativa, crescimento e reprodução de plantas infectadas e não infectadas (CLAY; MARKS; CHEPLICK, 1993).

Endófitos não-*balansiaceous* são diversos, tanto filogeneticamente quanto em relação à sua estratégia de vida. São transmitidos horizontalmente (ARNOLD et al., 2003) e a maioria dos fungos pertencentes a este grupo pertence à classe Ascomicetos, tendo sido isolados de praticamente todas as plantas. A colonização pode ser inter ou intracelular, localizada ou sistêmica (SCHULZ; BOYLE, 2005).

A taxa de fungos endofíticos presentes no hospedeiro é tanto maior, quanto maior for o regime de chuvas do local (CARROLL; CARROLL, 1978), quanto maior for o isolamento do hospedeiro em relação a outras plantas e quanto maior for a idade das folhas (BERNSTEIN; CARROLL, 1977; ARNOLD et al., 2003).

Arnold et al. (2003) acreditam que névoas, chuvas (CARROLL; CARROLL, 1978) e orvalho são importantes fontes de inóculo de esporos de fungos, que penetram os tecidos vegetais e colonizam a planta como endófitos, nos estágios iniciais da planta.

1.1.2 Fungos endofíticos e suas potencialidades

Fungos endofíticos podem conferir resistência à planta contra herbivoria por meio de dois mecanismos principais: 1) estímulo direto do vigor da planta e 2) produção de metabólitos que aumentam a resistência à herbivoria (CLAY; MARKS, CHEPLICK, 1993). *Neotyphodium*, por exemplo, é um endófito de *Festuca aerundinacea* que beneficia seu hospedeiro aumentando a tolerância à seca (WHITE JR. et al., 2002), o crescimento da raiz, a produção de sementes, a germinação, a captação de fósforo e a resistência a nematóides e insetos (PANACCIONE et al., 2001). Clay e Schardl (2002) também estudaram endófitos de *F. aerundinacea* e outras gramíneas de clima temperado, observando que esses fungos são transmitidos verticalmente, por meio de sementes. Os endófitos colonizam a planta como um todo e o hospedeiro recebe proteção contra herbivoria, pela produção de toxinas alcalóides por esses endófitos. Tal é a eficiência dos endófitos na proteção de seus hospedeiros, que alguns autores relatam a preferência dos herbívoros à ingestão de plantas e/ou folhas que não contêm endófitos (CLAY; MARKS; CHEPLICK, 1993; WHITE JR. et al., 2002).

Outra característica interessante a respeito dos fungos endofíticos é a promoção de crescimento vegetal pela síntese de fitormônios e fixação de nitrogênio (PEIXOTO-NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). White Jr. et al. (2002), acreditam que fungos produtores de hormônios de crescimento vegetal o fazem para modificar a fisiologia e estrutura da planta, visando a extração de nutrientes para si. No trabalho de Varma et al. (1999), os autores estudaram o basidiomiceto *Piriformospora indica*, um endófito de raiz e afirmam a capacidade desse endófito em promover o crescimento vegetal de *Zea mays*, *Nicotiana tabaccum* e *Petroselinum*

crispum L., uma vez que a inoculação do fungo nessas plantas, favorece o aumento de biomassa e, conseqüentemente, o crescimento vegetal.

A produção de enzimas também é citada na literatura como uma característica expressa por fungos endofíticos. Uma vez que a planta é colonizada por endófitos, ocorre a resposta de defesa bioquímica induzida, com a produção de altos níveis de peroxidases, H_2O_2 , fenilalanina amônio liases (FAL), proantocianidinas e fenilpropanóides, como ocorre na colonização da planta com *Cladosporium fulvum*, analisado por Osbourn (2001). Essa produção de enzimas em resposta à colonização do endófito, pode ter um papel fundamental na limitação de crescimento do endófito e/ou patógeno e na virulência dos mesmos (BOYLE et al., 2001; ARNOLD et al., 2003; SCHULZ; BOYLE, 2005).

A interação de um fungo com seu hospedeiro vegetal varia e, depende do modo pelo qual o fungo infecta seu hospedeiro e da extensão da resposta de defesa da planta. A colonização pode ser sistêmica ou local, inter ou intracelular. Os fungos endofíticos, que colonizam seus hospedeiros assintomaticamente (BOYLE et al., 2001; AZEVEDO; ARAÚJO, 2006), são fortes candidatos ao controle biológico de fitopatógenos, por ocuparem o mesmo nicho ecológico destes. Tanto é a importância dessa característica dos endófitos, que pesquisadores no mundo todo têm mostrado que os endófitos fornecem ao seu hospedeiro defesa efetiva contra patógenos (CLAY, 2004). Arnold et al. (2003) estudaram a resposta de plantas de cacauete axênicas (isentas de microrganismos) inoculadas com endófitos do próprio hospedeiro e com o patógeno *Phytophthora* sp.. Os autores observaram que as plantas inoculadas com os endófitos apresentaram menos necrose e mortalidade das folhas, se comparadas aos controles, inoculados apenas com o patógeno. Os autores também relatam uma maior eficiência da proteção em folhas velhas se comparadas às jovens, o que pode ser explicado pela existência de inúmeros metabólitos secundários sendo produzidos em folhas maduras. Segundo Schulz e Boyle (2005), aproximadamente 80% dos fungos endofíticos produzem compostos biologicamente ativos (antibacterianos, fungicidas e herbicidas). Liu et al. (2001) estudaram a atividade antifúngica de fungos endofíticos isolados de *Artemisia annua* sobre os fitopatógenos *Gaeumannomyces graminis*, *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia cerealis*, *Phytophthora capsici*, *Helminthosporium sativum* e *Gerlachia nivalis*, encontrando isolados com ação inibidora para todos os patógenos avaliados. Aproximadamente 7,5% do total de endófitos isolados de *Ulex europaeus* e *U. gallii* foram promissores na produção de antibióticos, destacando-se *Conyothyrium* e *Microsphaeropsis* como maiores produtores (FISHER; ANSON; PETRINI, 1986). Além da produção de

antimicrobianos, fungos endofíticos podem excluir patógenos que ocupem o mesmo nicho ecológico, por competição, como relatado por Bao e Lazarovits (2001) com *Fusarium*. Tendo em vista a extensa lista de trabalhos publicados envolvendo a capacidade de endófitos antagonizarem fitopatógenos, além da grande quantidade de fungos ainda a serem descritos, é provável que nos próximos anos, muitos outros metabólitos e outras substâncias de interesse produzidas por endófitos venham a ser descobertas e descritas.

1.1.3 O cacau (Theobroma cacao L.): características botânicas e taxonômicas

O cacau pertence à família Sterculiaceae (PURDY; SCHMIDT, 1996), que possui cerca de 50 gêneros, compreendendo 750 espécies e formada, principalmente, de árvores e arbustos, todas predominantemente tropicais, cultivadas na faixa equatorial entre os paralelos 20° de latitudes norte e sul (PURSEGLOVE, 1968). Desta família, *Theobroma* é o gênero de maior importância, devido à relevância econômica do cacau (SILVA; FIGUEIRA; SOUZA, 2001). Todas as espécies do gênero *Theobroma* são diplóides, com $2n=20$ cromossomos.

Segundo Silva, Figueira e Souza (2001), a espécie *T. cacao* compreende plantas perenes, alógamas, monóicas e umbrófilas (especialmente nas etapas iniciais do desenvolvimento da planta). Árvores mais altas (p. ex.: *Erythrina* sp., conhecida como eritrina ou corticeira) são plantadas dentro do cacau, a fim de fornecer sombra para o crescimento vegetativo e produção de amêndoas (FULTON, 1989). Nas maiores áreas produtoras, a média de pluviosidade atinge níveis médios entre 1250 a 2800 mm, sendo ideais para o cultivo de cacau (PURDY; SCHMIDT, 1996).

As flores são hermafroditas, apresentam de 40-60 óvulos e se desenvolvem por toda a extensão das ramificações principais e secundárias da planta. São produzidas em grande número, geralmente 3 a 5 mil/planta, mas apenas cerca de 5% são polinizadas e menos de 1% (10 a 120) resultam em frutos (FULTON, 1989). A polinização é feita por moscas do gênero *Euprojoannisia* (PURDY; SCHMIDT, 1996) e *Forcypomia*, esta última, podendo carregar de 73 a 173 grãos de pólen, muito embora formigas e outros insetos possam colaborar com a polinização das flores, carregando em média, 30 grãos de pólen aderidos ao corpo (YAMADA; GURIES, 1998; SOUZA; DIAS, 2001).

A produção de frutos é iniciada após dois a três anos do plantio e se prolonga por muitos anos, existindo lavouras com até 100 anos de idade, dependendo da variedade e das condições edafoclimáticas (PURDY; SCHMIDT, 1996). Devido ao florescimento rítmico durante a estação chuvosa, frutos em diferentes estágios podem ser encontrados no cacaueiro e dentro desses frutos, 30 a 40 amêndoas podem se desenvolver (FULTON, 1989).

1.1.4 Importância econômica do cacaueiro

O cacaueiro é conhecido principalmente por fornecer matéria prima para a produção do chocolate, um alimento energético e nutritivo, bastante consumido no mundo todo. Além disso, a manteiga de cacau tem sido utilizada também na indústria cosmética e farmacêutica e a polpa vem conquistando mercados, inclusive internacionais, sendo explorada para fabricação de vinho, vinagre, licores e geléias de boa qualidade (MENEZES; CARMO-NETO, 1993).

Durante décadas, a cultura do cacau teve seus altos e baixos na bacia caribenha e na América Latina. Essa flutuação se deve principalmente aos preços de mercado, políticas, doenças e a natureza sociológica da cultura (FULTON, 1989). Para a Bahia, o cultivo do cacau já foi o principal produto agrícola gerador de capital, chegando a constituir mais de 50% das exportações. Na Amazônia brasileira, até a década de 70, o cultivo do cacaueiro foi estabelecido com sementes provenientes de populações naturais de cacaueiros ou de plantações cultivadas à beira dos rios (ALMEIDA; ANTÔNIO NETO, 2000). A utilização de sementes de variedades melhoradas no Brasil ocorreu somente a partir dos anos 60, com a criação do CEPEC (Centro de Pesquisas do Cacau) pela CEPLAC (Comissão do Plano da Lavoura Cacaueira), que orientou a implantação de cerca de 356 mil hectares, na Bahia, até início dos anos 90 (MENEZES; CARMO-NETO, 1993).

O Brasil é o quinto produtor mundial de cacau e tem o quinto maior parque industrial chocolateiro do mundo. Apesar de ter sido, até recentemente, grande exportador, na atualidade o Brasil importa cacau para manter sua indústria funcionando. Desde 1987, o setor cacaueiro vem passando por uma profunda crise, desencadeada pelos baixos preços recebidos pelo produto, o monocultivo, a presença da doença vassoura de bruxa na região sulbaiana, a descapitalização e o endividamento dos produtores desestimulados por políticas governamentais inócuas. Além disso, existe a baixa competitividade do setor, que opera com custos relativamente altos e a exploração

de plantações antigas e pouco produtivas, submetidas a um manejo inadequado (SOUZA; DIAS, 2001).

1.1.5 *T. cacao*: reprodução e variabilidade

A reprodução de *T. cacao* é feita por duas vias principais: por meio de sementes e de propagação vegetativa. Considerando a via sexual, além de se tratar de um tipo de polinização predominantemente cruzada (30% da polinização natural), como já comentado, vale salientar que boa parte do germoplasma de cacau apresenta auto-incompatibilidade, a qual pode, inclusive, ser responsável pelo baixo rendimento de algumas lavouras quando a presença de árvores auto-incompatíveis é elevada (YAMADA; GURIES, 1998). Segundo Seavey e Bawa (1986), o sistema de compatibilidade em cacau é complexo, envolvendo inclusive, depressão por endogamia.

Várias técnicas *in vitro* têm sido desenvolvidas para cacau, incluindo regeneração e micropropagação, preservação de germoplasma e conservação por criopreservação. Uma vez otimizadas, essas técnicas poderão auxiliar em programas de melhoramento, seleção assistida, multiplicação e engenharia genética (GOTSCH, 1997).

O cacaueiro é uma planta nativa da bacia Amazônica e seu centro de origem abrange as regiões próximas às nascentes dos rios Amazonas e Orenoco (PURDY; SCHMIDT, 1996; FERREIRA, 1997). Registros históricos apontam a América Central como a sede dos primeiros cultivos de cacau, iniciados há mais de dois mil anos (PURSEGLOVE, 1968; HANSEN, 1991). Com base nas características de frutos e sementes e na distribuição geográfica, as muitas formas ou tipos botânicos conhecidos são consensualmente classificados em dois grandes grupos raciais (CUATRECASAS, 1964): *Criollo* e *Forastero*, os quais contêm características distintas para produção, resistência a pragas e doenças e adaptação ambiental (DIAS, 2001). Ainda segundo Dias (2001), as populações de *Criollos* foram originalmente cultivadas na América Central, desde o México até o sul da Costa Rica. Apresentam sementes grandes, arredondadas, cotilédones brancos ou violeta claro, rusticidade e baixa produtividade; porém, o chocolate produzido a partir de suas sementes é mais fino, de melhor sabor e qualidade (RISTERUCCI et al., 2000; MARITA et al., 2001). Seus frutos maduros são roxos ou amarelos quando maduros, dotados de casca macia com dez sulcos profundos e superfície rugosa. Cacaueiros *Criollos*, apesar de pouco cultivados

atualmente, podem ser divididos com bases geográficas em: Mexicanos, Nicaragüenses, Venezuelanos, Colombianos, Baixo Amazonas e Alto Amazonas.

Por outro lado, os cacaueiros denominados *Forasteros*, existem em estado silvestre na região da Bacia Amazônica. São geneticamente mais diversos e exibem melhor performance agrônômica. Produzem sementes púrpuras e achatadas, que originam chocolates relativamente amargos. São altamente rústicos, produtivos e seus frutos maduros apresentam-se amarelos, com casca dura, superfície lisa e dez sulcos pouco pronunciados. Cacaueiros *Forasteros* ainda sofrem a divisão conforme a razão comprimento/diâmetro: calabacilo (inferior a 1,5:1), amelonado (inferior a 2:1), angoleta (2:1 sem gargalo) e cundeamor (2:1 com gargalo) (MARITA et al., 2001).

Segundo Allen e Lass (1983), *Criollos* e *Forasteros* constituem diferentes materiais originados de populações silvestres de cacau. Em 1740, *Forasteros* do Baixo Amazonas foram introduzidos no sudeste da Bahia, onde são identificadas quatro variedades tradicionais: Pará, Parazinho, Maranhão e Comum. Em 1824, o cacau da Bahia foi levado para a África pelos portugueses, gerando os Amelonados. Na República dos Camarões, o cacau foi introduzido pelos alemães, havendo predominância dos tipos conhecidos como Trinitários, que constituem híbridos naturais entre *Forasteros*, *Criollos* e Amelonados. Daí saíram também as sementes que originaram as primeiras plantações no sudeste asiático e na Oceania (DIAS, 2001). Assim, a variabilidade genética reconhecida em cacaueiros no mundo todo é bastante ampla, dificultando a separação das variedades existentes em grupos, segundo critérios definidos.

Castro et al. (1989), utilizaram descritores da flor para caracterizar 9, 4, 3, 5, 4, 2, 2 e 2 clones das séries CEPEC, EEG, SIAL, BE, MA, RB, CA e CAS, respectivamente. Esses autores observaram diferenças significativas a 1% de probabilidade para todos os descritores, evidenciando, assim, que há variabilidade entre materiais, tendo em vista apenas descritores para flor e fruto. Segundo Sakharov e Ardila (1999), a produção do sabor é devido a dois grupos básicos de compostos: peptídeos e aminoácidos (sabor agradável) e fenóis (sabor desagradável e adstringência). O balanço perfeito para um chocolate de sabor refinado é a ação enzimática que permite a formação de peptídeos e aminoácidos por hidrólise de proteínas e a quebra de fenóis por enzimas do tipo polifenoloxidasas e peroxidases.

Visando estudar as relações filogenéticas entre diferentes cacaueiros, pesquisadores têm utilizado análise de isoenzimas para produzir mapas de ligação e para o mapeamento de locos de caracteres quantitativos (*Quantitative Trait Loci* – QTL) (GOTSCH, 1997) e para análises de paternidade (YAMADA; LOPES, 1999). Porém, segundo Yamada e Guries (2000), *T. cacao*

possui menor nível de polimorfismo baseado em isoenzimas se comparado ao comumente observado para plantas arbóreas.

1.1.6 Germoplasma de *T. cacao*

A preservação e manejo dos recursos genéticos usando caracterização morfológica, tecnológica e agronômica além dos descritores botânicos, têm sido preocupação da maioria das instituições de pesquisa, visando evitar a erosão genética e conservar o germoplasma para uma futura utilização em programas de melhoramento (CASTRO et al., 1989; GOTTSCH, 1997).

O interesse pela preservação e ampliação dos recursos genéticos de *T. cacao* na Amazônia brasileira, surgiu com a criação das primeiras instituições de pesquisa da região, incluindo o Instituto Agrônomo do Norte (IAN), hoje Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (CPATU/Embrapa), o CEPEC da CEPLAC e o Departamento Especial da Amazônia (DEPEA) (ANDEBRHAN; ALMEIDA; NAKAYAMA, 1998). Porém, o número de coleções de cacau é relativamente pequeno, mesmo em termos internacionais.

Os principais Bancos de Germoplasma são encontrados nos seguintes países:

- ✓ Trinidad (2.436 acessos);
- ✓ Brasil (1.012 acessos na CEPLAC/CEPEC, localizado em Itabuna (BA) e 1.800 acessos clonais + acessos seminais na CEPLAC/Estação Experimental de Recursos Genéticos José Haroldo – ERJOH, localizado em Belém (PA));
- ✓ Costa Rica (aproximadamente 700 acessos no *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza* – CATIE, em Turrialba) e
- ✓ Equador (aproximadamente 250 acessos).

Além dessas coleções, uma outra está sendo organizada no México, visando resgatar o tipo *Criollo*. O Conselho Internacional de Recursos Genéticos Vegetais (*International Board for Plant Genetic Resources* – IBPGR), designou o Banco Genético Internacional de Cacau (*International Cacao Genebank* – ICGT) de Trinidad, como também a coleção do CATIE na Costa Rica, como coleções universais, levando em consideração a sua complementaridade. A coleção de germoplasma disponível no Banco de Germoplasma do CEPLAC/CEPEC é considerada uma das mais completas, uma vez que contém acessos oriundos de diversos países, contemplando, portanto, ampla variabilidade genética (ALMEIDA; DIAS, 2001).

1.1.7 A vassoura de bruxa: doença mais expressiva de cacauzeiros no Brasil

O cacauzeiro enfrenta vários patógenos de expressão, dependendo da área na qual está estabelecido. No Brasil, devido principalmente ao clima e regime de chuvas, a doença que mais se destaca é a vassoura de bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa*. O nome da doença provém do sintoma típico que a planta suscetível exhibe quando infectado por esse fungo: superbrotamento dos ramos, que se tornam semelhantes a uma vassoura.

O patossistema vassoura de bruxa é contínuo na Bahia, ou seja, há sempre produção de tecidos suscetíveis à infecção pelo patógeno e basidiósporos, que constituem a forma infectiva do fungo. Além dos ramos, todos os tecidos em desenvolvimento são alvo para o patógeno. Frutos jovens, gemas, folíolos e almofadas florais, quando em desenvolvimento, servem como porta de entrada para que hifas do fungo possam penetrar a planta e iniciar a colonização biotrófica e intercelular (fase das chamadas vassouras verdes). Frutos de 13 a 15 semanas de idade e folhas maduras de cacau podem ser infectados, mas a doença não se manifesta. Frutos se mantêm suscetíveis por aproximadamente 15 semanas (PURDY; SCHMIDT, 1996).

Bastos e Pereira (1994) estudaram os níveis de nutrientes e açúcares totais em tecidos de cacauzeiros sadios e infectados por *C. perniciosa*, tendo observado que os níveis de Ca, Mg, P, Zn e Mn foram reduzidos e os níveis de açúcares totais aumentaram em vassouras verdes. Vassouras secas apresentaram quantidades bem inferiores, sugerindo que a energia armazenada foi utilizada para a formação de basidiocarpos do fungo.

Dabydeen e Sreenivasan (1989) observaram que, citologicamente, as dimensões radiais de todos os tecidos, especialmente as do córtex, aumentam em caules doentes. Além disso, há profundas modificações no floema, que se torna menos diferenciado e estratificado; todas essas modificações ocorrem sem refletir em um aumento de peso seco (KRUPASAGAR; SEQUEIRA, 1969; SILVA; MATSUOKA, 1999; MOTILAL; SIRJU-CHARRAN; SREENIVASAN, 2003), enquanto que no xilema, ocorre hipertrofia (ALMEIDA et al., 1998). Durante a fase biotrófica, acredita-se que o patógeno seqüestra reservas nutritivas para seu próprio uso, enquanto mantém o sistema do hospedeiro funcionando a níveis reduzidos. Essa estratégia faz com que as reservas cotiledonares sejam menos utilizadas e que os cotilédones permaneçam muito mais tempo intactos e aderidos à planta, conforme observado por Motilal; Sirju-Charran e Sreenivasan (2003).

O tipo de crescimento distorcido associado à vassoura de bruxa sugere uma alteração no balanço entre reguladores de crescimento (BASTOS; PEREIRA, 1994). Porém, Orchard et al. (1994) não encontraram alterações nos níveis de citocininas em tecidos sadios e doentes de cacaueiro. No trabalho de Krupasagar e Sequeira (1969), foi verificada a produção de peroxidases e lacases pelo micélio de *C. pernicioso* em meio de cultura, que promovem a destruição de auxinas. Essa habilidade pode ser significativa na patogênese de *C. pernicioso*, pois a perda de dominância apical e a proliferação de vassouras axilares sugerem modificações no balanço entre AIA e suas oxidases.

É relatada ainda a aparição de bolhas e glóbulos de material acelular exsudado nos ramos das vassouras verdes. A exsudação em si, geralmente é devida a uma reação patológica do hospedeiro à infecção e em alguns casos, está associada com a desintegração do tecido do hospedeiro. Em tecidos infectados de cacau, o processo de exsudação provavelmente é iniciado devido à alta pressão interna gerada pelo aumento de volume do córtex (DABYDEEN; SREENIVASAN, 1989). Após a fase biotrófica, o patógeno passa a colonizar o hospedeiro intracelularmente, causando necrose e morte do tecido. A causa da morte não é conhecida, mas existem duas hipóteses para explicar o fato. Uma hipótese é que as células do hospedeiro morrem como resultado da infecção e esta morte tem como consequência, a dicarionização do fungo, iniciando a fase saprofítica. A outra hipótese é que a dicarionização ocorre primeiro, resultando na fase saprofítica, que causa a morte da vassoura (SREENIVASAN; DABYDEEN, 1989), com consequente formação dos basidiocarpos, que produzirão os basidiósporos (formas infectivas do patógeno).

As mais importantes fontes de basidiocarpos são vassouras necróticas vegetativas na copa do cacaueiro, vassouras descobertas e caídas dentro do cacaueiro, vassouras ou almofadas florais doentes e frutos doentes (ALMEIDA; BASTOS; FERREIRA, 1995; COSTA et al., 1997). As vassouras vegetativas podem produzir dezenas de centenas de basidiocarpos por estação, e cada basidiocarpo pode produzir centenas de milhares de basidiósporos durante sua vida útil (PURDY; SCHMIDT, 1996). Assim, em uma região como o sudeste da Bahia, onde as condições climáticas favorecem a produção contínua de basidiósporos, o cuidado com as lavouras de cacau deve ser constante.

1.1.8 Introdução da doença na Bahia

O cultivo de cacau na região sudeste da Bahia, constitui um maciço cacaueiro contínuo, com mais de 300 km de extensão. Tal situação expõe o cultivo ao risco constante de entrada de pragas ou patógenos de grande poder destrutivo, capaz de ocasionar catástrofe regional (SOUZA; DIAS, 2001). Em 1746, sementes de cacau isentas de doença, provenientes do Pará, foram plantadas no município de Canavieiras, no estado da Bahia. Durante quase 250 anos, a produção de cacau no Brasil sofreu altos e baixos, em função de outros agravantes, que não doenças e epidemias. Em meio a esse período livre de *C. pernicioso*, ocorreu a descrição da vassoura de bruxa no Suriname em 1895 e a descrição do patógeno em 1904. Assim, os cacaueiros da Bahia se desenvolveram e permaneceram sem *C. pernicioso* até o final da década de 80. No Brasil, todos os registros e informações disponíveis dos órgãos encarregados da defesa fitossanitária vegetal indicavam que a vassoura de bruxa estava presente somente na região amazônica – seu local de origem – até ser identificada no sul da Bahia, em 1989 (PERIERA et al., 1990; PURDY; SCHMIDT, 1996), tendo sido trazida das regiões endêmicas (PEREIRA; ALMEIDA; SANTOS, 1996). Essa primeira manifestação identificada da vassoura de bruxa na Bahia ocorreu na Fazenda Conjunto Santana, localizada no município de Uruçuca, em maio de 1989 (PERIERA et al., 1990). Essa região é conhecida como Agrossistema Almada, econômica e tradicionalmente a mais importante na região (PEREIRA; ALMEIDA; SANTOS, 1996). Apesar dos esforços e ações desencadeadas por técnicos, produtores e trabalhadores no sentido de se estabelecer um cinturão de segurança ao redor da região infectada, a fim de se erradicar totalmente a doença, a vassoura de bruxa voltou a ser identificada em Camacã aos 26 de outubro e em Uruçuca, aos 06 de dezembro do mesmo ano (FERRAZ, 1989). Em fevereiro de 2001, a doença foi constatada em duas fazendas no estado do Espírito Santo, no município de Linhares (SILVA et al., 2002).

Atualmente, a doença está disseminada na maioria dos municípios que compõem a região cacaueira da Bahia, em níveis variáveis de infestação, atingindo uma área aproximada de 460 mil hectares, envolvendo cerca de 16 mil propriedades (MACEDO, 1995), de tal forma que cerca de 92,7% de toda a área produtora de cacau está infectada com o patógeno (FERREIRA, 1997; ANDEBRHAN et al., 1999). Santos-Filho; Freire e Carzola (1998) estudaram as perdas de produção de cacau causadas pela vassoura de bruxa na Bahia e concluíram que os percentuais calculados para as safras de 1994/95 e 1996/97, período de maior incidência da doença,

corresponderam a um volume total de cerca de 105 mil toneladas, o que equivale a aproximadamente ¼ da produção máxima registrada no país.

A vassoura de bruxa do cacau ocorre nos seguintes países (o ano de sua detecção está entre parênteses): Bolívia, Brasil, Peru e Venezuela (antiguidade); Suriname (1895); Guiana (1906); Colômbia (1917); Equador (1921); Trinidad (1928); Tobago (1939); Grenada (1948); São Vicente (1988); Panamá (1989) e Bahia (Brasil) (1989) (PURDY; SCHMIDT, 1996). Além dessas introduções, outro agravante é a presença de *C. perniciosa* em hospedeiros alternativos, o qual tem sido freqüentemente relatado na literatura.

Na Amazônia, devido ao fato de não receberem nenhum trato cultural, os cacauzeiros são densamente sombreados, com elevados números de troncos por touceira e de baixa produtividade. Estas características aliadas aos efeitos anuais das enchentes, reduzem drasticamente a atividade fisiológica do cacauzeiro, reduzindo a disponibilidade de tecidos meristemáticos durante o período de ocorrência de inóculo, o que explica os baixos níveis de severidade da doença (ANDEBRHAN, ALMEIDA; NAKAYAMA, 1998).

Antes da chegada da vassoura de bruxa no estado da Bahia, a produção média de amêndoas de cacau era superior a 300 mil toneladas/ano. Atualmente, a produção é de aproximadamente 130 mil toneladas. Assim, de país tipicamente exportador, o Brasil passou a importar amêndoas de cacau. Dessa forma, em 2000, o volume de importação chegou a 71 mil toneladas. Além disso, esse declínio da cultura cacauzeira no Brasil refletiu na diminuição significativa da geração de empregos diretos e indiretos no sudeste baiano (FERREIRA, 1997; PINTO; PIRES, 1998).

Atualmente, o estado da Bahia ainda constitui a maior região produtora de cacau do Brasil, e, segundo informações do Ministério da Agricultura, o Brasil é o quinto maior produtor mundial, perdendo posição apenas para a Costa do Marfim, Indonésia, Gana e Nigéria.

Arruda et al. (2003), sugerem uma introdução recente da vassoura de bruxa na Bahia, considerando as similaridades em perfis do tipo Consenso Intergênico Repetitivo de Enterobactérias (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* – ERIC) entre isolados de diferentes regiões na Bahia. Yamada; Andebrhan e Furtek (1998) observaram por análise de Polimorfismo de Fragmentos Amplificados ao Acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA* – RAPD), que a maioria dos isolados de solanáceas são distintas daqueles de cacauzeiros. Além disso, isolados amazônicos de solanáceas e cacau não promovem infecção cruzada e são

somaticamente incompatíveis (BASTOS; EVANS, 1985; BASTOS; ANDEBRHAN; ALMEIDA, 1988).

1.1.9 Métodos de controle da vassoura de bruxa

Com o aparecimento da vassoura de bruxa na região cacaujeira da Bahia, as pesquisas passaram a ser intensificadas, na busca de soluções econômicas e viáveis para o controle da doença, em um espaço de tempo mais curto possível (OLIVEIRA, 2000). Para controle da vassoura de bruxa em cacaujeiro, são utilizados vários métodos, dentre os quais destacam-se os controles genético, biológico, cultural e químico, a resistência sistêmica adquirida – RSA e a utilização de substâncias naturais.

1.1.9.1 Controle genético

As doenças constituem o principal fator limitante da produção de cacau. Considerando-se a variabilidade genética de *C. perniciosa*, é necessária a obtenção de novas fontes de resistência para a ampliação da diversidade em cultivo, para evitar a monocultura varietal e para elevar o nível de estabilidade e de resistência. A mais importante medida de controle tem sido a utilização de genótipos resistentes, por ser a mais econômica, estável e ambientalmente desejável. Nos últimos 15 anos, vários acessos foram identificados como fontes de resistência. Por essa razão, o melhoramento para resistência vem se tornando prioritário em muitos países (PINTO; PIRES, 1998). A utilização de sementes de variedades melhoradas de cacau no Brasil ocorreu somente a partir dos anos 60, com a criação do Centro de Pesquisas do Cacau – CEPEC, pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC, que orientou a implantação de cerca de 356 mil hectares, na Bahia, até início dos anos 90 (ALMEIDA; ANTÔNIO-NETO, 2000). Até então, o cultivo do cacaujeiro fora feito com a utilização de sementes não melhoradas, provenientes de populações naturais de cacaujeiros ou de plantações cultivadas às margens dos rios.

As populações de cacau exibem ampla variabilidade para resistência, provavelmente de natureza poligênica (RIOS-RUIZ, 2001) e para se utilizar o controle genético na contenção de doenças em plantas, três etapas básicas são necessárias:

- (1) a busca, seleção e identificação de germoplasma contendo genes de resistência;
- (2) a incorporação desse(s) gene(s) em cultivares comerciais por meio de métodos de melhoramento genético e
- (3) o estudo de estratégias para que a resistência seja durável.

Nesse sentido, a CEPLAC vem travando uma verdadeira guerra contra a vassoura de bruxa, tendo firmado vários convênios e estabelecido parcerias com a EMBRAPA/CENARGEN e NESTLÉ, importando da América Central progênies de clones nativos resistentes à vassoura de bruxa. O grande número de genótipos envolvidos no programa e o conceito de que a imunidade poderia ser a solução do problema prejudicaram a análise criteriosa da reação ao patógeno e fez com que genótipos de interesse fossem ignorados sob o ponto de vista da resistência potencial (ANDEBRHAN; ALMEIDA; NAKAYAMA, 1998).

De todo esse trabalho, duas plantas de uma mesma família se destacaram por se apresentarem consistentemente livres de infecção. Esta família foi designada Scavina – SCA e as duas plantas selecionadas foram denominadas de SCA 6 e SCA 12 (PURDY; SCHMIDT, 1996; PINTO; PIRES, 1998). Em testes visando estudar a penetração de *C. perniciosa* em cacau SCA 12, Silva e Matsuoka (1999) perceberam a existência de alguma resistência à colonização já na fase parasítica. Porém, SCA 6 e SCA 12 foram severamente infectados no Equador (ANDEBRHAN; ALMEIDA; NAKAYAMA, 1998), onde provavelmente encontraram isolados mais agressivos (FONSECA; WHEELER, 1990).

A partir do cruzamento do clone SCA 6 proveniente do Peru (resistente à vassoura de bruxa e de baixa produtividade), com o clone ICS 1 procedente de Trinidad e Tobago (suscetível à vassoura de bruxa e de alta produtividade), a CEPLAC desenvolveu a variedade Theobahia, que apresenta níveis bastante promissores de resistência e tolerância ao patógeno. Suas sementes já vêm sendo distribuídas aos produtores da Bahia desde 1997. Em vários ensaios realizados, a variedade mostrou-se muito produtiva e bastante resistente à vassoura de bruxa, quando comparada a outras variedades comuns (FERREIRA, 1997).

Além da Theobahia, outros cinco clones resistentes à vassoura de bruxa e apresentando altíssima produtividade, sendo quatro deles importados da América Central e um desenvolvido pelo CEPEC/CEPLAC, também estão sendo multiplicados e distribuídos aos produtores, sob a

forma de mudas para fins de enxertia nas plantas doentes. São eles: TSH 1188, TSH 516, TSH 565, procedentes de Trinidad; EET 397, procedente do Equador; e CEPEC 42, desenvolvido pela CEPLAC (FERREIRA, 1997; PINTO; PIRES, 1998).

Os propágulos resistentes são enxertados diretamente nas plantas doentes. Depois do pegamento, a parte doente da planta é decepada e a principal vantagem desse método é que a produção de cacau ocorre antes mesmo do segundo ano (FERREIRA, 1997). A técnica de enxertia tem sido adotada para a formação de jardins clonais, de grande homogeneidade genética e, portanto, representando risco de quebra de resistência, devido à alta pressão de seleção. Portanto, é considerada uma alternativa interessante a curto prazo, mas que requer prudência e preocupação com a busca de novas alternativas de controle.

Outra forma de controle genético é a utilização de engenharia genética. Gotsch (1997) relata a transformação genética de cacaueiro pela introdução de genes conferindo resistência a doenças e pragas. O objetivo seria obter embriões somáticos (TEIXEIRA; MARBACH, 2002) contendo os genes de interesse inseridos por meio de *Agrobacterium tumefaciens* ou biobalística, regenerando plantas resistentes. Entretanto, o autor comenta a dificuldade em se obter transformantes, dada a baixa taxa de transformação observada para essa cultura. Um detalhe que pode dificultar esta estratégia seria a aceitação no mercado, do chocolate obtido de cacaueiro transgênico.

Acredita-se que a resistência a doenças em *T. cacao* é multigênica e estima-se que mais de 1% do total de genes expressos pela planta representam genes de resistência ou seus homólogos (KUHN et al., 2003). Queiroz et al. (2003), identificaram um QTL no cromossomo 11 de cacau, associado à resistência à vassoura de bruxa. Esses autores mapearam 124 marcadores RAPD e 69 marcadores do tipo polimorfismo no comprimento dos fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism* – AFLP) ao longo dos 25 grupos de ligação, explicando 35% da resistência através desse QTL.

Além disso, métodos para identificação de níveis de resistência a *C. perniciosa* têm sido descritos na literatura (SURUJDEO-MAHARAJ et al., 2003): alguns autores detectaram maior quantidade de fenóis em tecidos infectados em relação a tecidos sadios, sugerindo que estes fazem parte dos mecanismos de defesa de cacaueiro contra *C. perniciosa* (EVANS; BASTOS, 1979; NOJOSA et al., 2003). Outras substâncias, como a ornitina descarboxilase também representam inibidores na inibição do crescimento do patógeno (ZARB; WALTERS, 1993). Iwaro;

Sreenivasan e Umaharan (1998) sugeriram que o fator de resistência para frutos de cacau a *Phytophthora spp.* estão localizados e concentrados a 3 mm de profundidade da parede do fruto.

Bastos e Albuquerque (2000), extraíram seiva elaborada de cacaueiros adultos e testaram contra basidiósporos de *C. perniciosa*, verificando a não germinação dos mesmos. Evans e Bastos (1980) relatam que tecidos ativos de cacau contêm uma substância modificadora (ácido ferúlico) que altera o crescimento do tubo germinativo, inibindo a formação do micélio dicariótico (saprofítico) e promovendo a patogenicidade de *C. perniciosa* através da formação do micélio monocariótico.

1.1.9.2 Controle biológico

Controle biológico é a regulação de populações de organismos vivos como um resultado de interações antagônicas como parasitismo, predação e competição. Alguns microrganismos como *Aspergillus giganteus*, *A. terreus*, *Bacillus subtilis*, *Cladobotrium amazonense*, *Clonostachys rosea*, *Dactylium sp.*, *Eurotium sp.*, *Penicillium sp.*, *P. lilacium*, *P. purpurescens*, *Trichoderma sp.*, *T. harzianum*, *T. stromaticum*, *T. virens* e *Verticillium lamellicola* já foram descritos como antagonistas a *C. perniciosa* (BASTOS, 1978, 1979, 2000, 2004; BELL; WELLS; MARKHAM, 1982; ELAD et al., 1983; FERRAZ, 1989; BASTOS; DIAS, 1992; INBAR; MENENDEZ; CHET, 1996; AZEVEDO; MARCO; FELIX, 2000; MARCO et al., 2000; SAMUELS, 2000; KRAUSS; SOBERANIS, 2002; SANOGO et al., 2002). Bastos (1978) relata também a eficiência da utilização de uma mistura de antagonistas. Várias espécies de *Trichoderma* são aptas a controlar fitopatógenos por micoparasitismo, produção de toxinas e enzimas (AZEVEDO; MARCO; FELIX, 2000; VITERBO et al., 2001; MARCO; FELIX, 2002; MARCO; VALADARES-INGLIS; FELIX, 2004), competição e indução de defesa em plantas (HOWELL, 2003). Em cultura pareada, não é observada zona de inibição visível, pois *Trichoderma* cresce, sobrepondo a colônia de *C. perniciosa*, que cessa o crescimento. O antagonista também esporula na superfície do micélio de *C. perniciosa* e sua hifa enrola-se em torno da hifa do patógeno, penetrando-a, causando lise (ELAD et al., 1983) e morte do patógeno (BASTOS, 1996). Em vassouras, *T. stromaticum* coloniza após seis dias, não permitindo a formação dos basidiocarpos. Assim, são utilizados conídios dessa espécie, para o tratamento do material removido pelas práticas fitossanitárias (FERRAZ, 1989). Elad et al. (1983) acredita que

T. stromaticum não produz uma substância antibiótica e atua apenas por parasitismo e talvez, na competição por espaço, crença essa que é contradita por Bastos (1988), que cita autores, os quais sugerem o antagonismo por antibiose entre *C. perniciosa* e *T. stromaticum*.

Inglis; Queiroz e Valadares-Inglis (1999), mostraram a utilidade da tecnologia da proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein* – GFP), um método mais elaborado e elegante para visualizar artificialmente fungos dentro da planta (SCHULZ; BOYLE, 2005), para o estudo de interações de biocontrole entre *T. harzianum* (linhagem 1051) e *C. perniciosa in vitro*. Esses autores co-transformaram *T. harzianum* com o gene *gfp*, um marcador detectável *in vivo*, utilizando resistência a benomyl como um co-marcador dominante e selecionável. A transformação de *C. perniciosa* através do tratamento de protoplastos com polietilenoglicol/cloreto de cálcio – PEG/CaCl₂ também mostrou ser viável e eficiente (LIMA et al., 2003).

Uma outra perspectiva promissora para o controle biológico de *C. perniciosa* é a utilização de microrganismos endofíticos antagonísticos, pois estes habitam os espaços intercelulares da planta, podendo atuar contra a infecção logo após a penetração do tubo germinativo de *C. perniciosa* no tecido hospedeiro. No trabalho de Arnold et al (2003), os autores mostram o efeito protetor dos endófitos em relação à inoculação de *Phytophthora* sp., o principal patógeno da cultura do cacau no Panamá. Plantas inoculadas com endófitos e *Phytophthora* sp. apresentaram menos lesões e necrose, enquanto que plantas inoculadas apenas com *Phytophthora*, apresentaram efeitos bem mais dramáticos. Rubini et al. (2005), avaliaram o atagônismo de fungos endofíticos de cacau sobre *C. perniciosa in vitro* e *in vivo*, obtendo quatorze potenciais isolados de endófitos capazes de inibir o desenvolvimento de *C. perniciosa*. Porém, um isolado de *Gliocladium catenulatum* mostrou maior eficiência, apresentando 70,84% de redução dos sintomas de vassoura de bruxa em casa de vegetação.

1.1.9.3 Controle cultural

As práticas recomendadas para o controle cultural da vassoura de bruxa, além de serem fundamentais para a sobrevivência dos cacaueiros infectados (AZEVEDO; MARCO; FELIX, 2000), auxiliam no manejo da cultura. Em plantações onde as práticas são realizadas de acordo com as recomendações, consegue-se manter um nível de perdas na produção de 5 a 10%

(ALMEIDA; ANDEBRHAN, 1989). Existem dois métodos de controle cultural rotineiramente utilizados, que constituem a poda fitossanitária e o rebaixamento da copa.

A poda fitossanitária tem como função a eliminação de material infectado da copa das árvores, visando reduzir a quantidade de inóculo. Assim, são removidos ramos secos, lançamentos foliares, almofadas florais, frutos morango e/ou cenoura, secos ou apresentando manchas. Há controvérsias sobre a eficiência da prática das podas fitossanitárias: Sanogo et al. (2002), afirma que a retirada de 95% de tecidos infectados reduz 50% de redução na perda de frutos. Por outro lado, Macedo (1995), atesta que em plantações onde as práticas são realizadas de acordo com as recomendações caso-específicas, consegue-se manter um nível de perdas na produção de 5 a 10%. Em um estudo realizado por Almeida e Andebhran (1989), foram aplicados diferentes tratamentos fitossanitários, sendo que todos apresentaram alto índice de sucesso na redução da incidência da doença. A eficiência das práticas foi evidenciada pela redução das perdas de produção e de evolução da doença. A quantidade de pontos infectados/planta foi reduzida de 468 para 6, porém a partir do momento em que o controle fitossanitário deixou de ser realizado, o nível de infecção voltou a se elevar.

Após a remoção, o material contaminado é empilhado dentro da plantação, picado e coberto com folhagem para impedir que basidiocarpos sejam formados (a formação dos basidiocarpos é dependente de luz). Quando possível, é aplicada uma suspensão de conídios de *Trichoderma viride* (sin.: *T. stromaticum*), um antagonista de *C. pernicioso* que parasita o patógeno, impedindo seu desenvolvimento e conseqüentemente, a formação dos basidiocarpos (BASTOS, 1988).

Segundo Macedo (1995), existem calendários gerais (Tabela 1) para a prática da poda fitossanitária, mas freqüentemente, a recomendação é feita especificamente para cada lavoura, uma vez que condições ambientais e níveis de infecção podem requerer maior ou menor intervalo entre as podas (PURDY; SCHMIDT, 1996).

Outro método de manejo fitossanitário das lavouras de cacau é o procedimento de rebaixamento da copa, que tem por objetivos: i) eliminar a dominância de uma planta para outra; ii) facilitar a prática da poda fitossanitária; iii) reduzir a incidência e severidade da vassoura de bruxa e iv) elevar a produtividade das lavouras de cacau.

É recomendado que o rebaixamento seja feito gradualmente, ano a ano, visando manter a copa em altura média de 3 a 4 metros. Outra meta a ser atingida nessa prática é eliminar o entrelaçamento entre copas vizinhas, procurando manter apenas o estado “bate-folhas”. De uma

forma geral, o rebaixamento e adequação da copa traduzem, na prática, uma série de vantagens (MACEDO, 1995):

- elimina a dominância de uma planta sobre a outra;
- dispensa gasto com escoramento;
- eleva a produtividade;
- facilita os tratamentos fitossanitários;
- aumenta o rendimento do trabalho, na colheita;
- diminui a incidência e a severidade das doenças e
- reduz os custos operacionais e materiais.

Tabela 1 - Calendário recomendado pela CEPLAC para a prática das podas fitossanitárias, na região cacaueira da Bahia

Período	Características da cultura
janeiro/fevereiro	Meses que antecedem ao período de lançamentos foliares
abril/maio	Meses de floração da safra principal
julho/agosto	Meses que antecedem a novos períodos de lançamentos foliares
outubro/novembro	Meses de floração da safra temporã

Fonte: Macedo (1995)

1.1.9.4 Controle químico

O controle químico protetor é recomendado para plantações que apresentem índices promissores de floração e de colheita, capazes de suportar e compensar os custos com defensivos e mão de obra (MACEDO, 1995; PINTO; PIRES, 1998), uma vez que é mais eficiente quando integrado a podas fitossanitárias, resultando em elevado custo de produção (OLIVEIRA, 2000).

Essa recomendação é baseada no fato de que o alvo do patógeno no hospedeiro constitui tecidos meristemáticos (BASTOS, 1988; MUSE et al., 1996). Esses tecidos, em constante

desenvolvimento por toda a copa da planta, requerem aplicações freqüentes de fungicidas protetores, resultando em encarecimento do método, promovendo uma relação custo-benefício negativa (BASTOS, 1989; PURDY; SCHMIDT, 1996). Quando a aplicação de fungicidas protetores é recomendada, o mais eficaz tem sido o óxido cuproso, aplicado mensalmente na dosagem de 2 (COSTA; MATUO, 1999) a 3 g/planta (MACEDO, 1995; ALMEIDA; NIELLA; BEZERRA, 1998), pois além de controlar a vassoura de bruxa, também é eficiente no controle da podridão parda. Além disso, não são observados sinais visuais de fitotoxicidade quando aplicado na dose máxima de 9 g de ingrediente ativo (i.a.)/planta e nem foi constatado efeito depressivo sobre a produção de amêndoas de cacau (ALMEIDA; NIELLA; BEZERRA, 1998). A pluviosidade pode desencadear diferenças nas dosagens requeridas para proteção do cacauzeiro, uma vez que a chuva constitui o principal agente de remoção do fungicida (COSTA; MATUO, 1999).

Apesar da eficiência do óxido cuproso como fungicida protetor, alguns autores relatam a ineficiência deste no controle de infecções de *C. perniciosa* nas gemas vegetativas e almofadas florais (ALMEIDA; NIELLA; BEZERRA, 1998b; COSTA; MATUO, 1999). Oliveira (2000), em seus experimentos, demonstrou que a utilização de óxido cuproso promoveu 17,38% de inibição do crescimento micelial de *C. perniciosa* e, testando 36 fungicidas protetores e sistêmicos, concluiu que fungicidas sistêmicos apresentam melhor desempenho, onde se destacam os pertencentes ao grupo dos triazóis: tebuconazol, cyproconazol, hexaconazol, fluquinconazol, difenoconazol, triadimenol e propiconazol. Bastos (1989) testou quatro fungicidas sistêmicos: etiltrianol, edifenfos, triadimenol e flutriafol. Destes, o etiltrianol a 1 ppm foi o mais eficaz, promovendo 100% de inibição tanto no crescimento micelial como na germinação dos basidiósporos, comprovando sua eficácia como agente protetor e/ou curativo. Triadimenol e edifenfos inibiram completamente o crescimento micelial do patógeno na concentração de 5 ppm, enquanto que na germinação de basidióspors, apenas edifenfos foi efetivo na concentração de 20 ppm. A formação de basidiocarpos foi significativamente suprimida por todos os fungicidas. No geral, as concentrações efetivas ficaram entre os limites de 0,014 a 1,572 µg do i.a./mL de meio de cultura. Oliveira (2000) testou sete fungicidas sistêmicos, tendo merecido destaque o tebuconazol, que preveniu o aparecimento dos sintomas da doença quando aplicados antes da inoculação do patógeno, muito embora o autor tenha observado um ligeiro efeito de toxicidade (encurtamento dos entrenós e redução de crescimento das plântulas). O tebuconazol também demonstrou ser um importante agente anti-esporulante, sendo registrada redução na produção de

basidiomas em quase 100%, na avaliação aos 45 dias e 81,76% aos 75 dias após uma única aplicação do produto à concentração de 1.600 ppm do i. a., mesmo nas condições em que o ensaio foi realizado, onde as vassouras eram molhadas diariamente. Porém, fungicidas sistêmicos são polêmicos, uma vez que podem contaminar as amêndoas de cacau (PURDY; SCHMIDT, 1996).

1.1.9.5 Resistência sistêmica adquirida (RSA)

Peixoto-Neto; Azevedo e Araújo (2002), consideram a RSA como o mecanismo mais importante de controle biológico de doenças. Uma das metodologias vigentes consiste na inoculação de linhagens avirulentas ou hipovirulentas do patógeno, pois elas podem colonizar a planta sem causar doenças, mas são reconhecidas pelo hospedeiro, que ativa o seu sistema de defesa.

O ácido salicílico (AS) foi o primeiro composto derivado de plantas e comprovadamente indutor de RSA. O AS e seus análogos (ácido 2, 6 dicloroisonicotínico – INA, ácido benzo-(1, 2, 3)-tiadizole-7 carbotióico – BTH e acibenzolar-S-methyl – ASM) são considerados os mais importantes compostos nesta classe de indutores de RSA, embora muitos deles tenham ação tóxica para a maioria das plantas cultivadas (GORLACH et al., 1996).

O AS e o BTH levam à síntese de cafeína, a qual é induzida pelo ataque de patógenos ou ativadores químicos de defesa. Em folhas jovens, a cafeína pode funcionar como uma fitoalexina (composto antimicrobiano de baixo peso molecular, sintetizado pela planta e que se acumulam nas células vegetais em resposta à infecção microbiana (PASCHOLATI; LEITE, 1995)).

A RSA induzida por BTH (RESENDE et al., 2000) e ASM (RESENDE et al., 2002), segundo esses autores, têm mostrado maior ou mesma eficiência que o controle químico com tebuconazol e óxido cuproso. Resende et al. (2000), classificaram o BTH como um produto químico de pouca ação fungitóxica para a germinação e crescimento micelial de *C. perniciosa*. Em vários outros organismos se mostrou inofensivo e praticamente atóxico. Nos experimentos desses autores, foi obtida uma maior proteção contra a incidência de vassoura de bruxa quando a aplicação de BTH foi realizada 30 dias antes da inoculação, independente da dosagem utilizada. Caso o produto agisse como fungicida, sua melhor atuação certamente seria obtida quando aplicado três dias antes da inoculação.

O ASM pode ser usado separadamente ou em combinação com fungicidas, tendo a função de ativar mecanismos de defesa expressos como barreiras bioquímicas e estruturais (p. ex.: lignina

e fitoalexinas) (RESENDE et al., 2002). A proteção contra o patógeno pode ser local ou sistêmica, dependendo do intervalo de tempo entre o tratamento inicial (indutor) e a inoculação do patógeno. A duração da proteção pode ser de dias, de semanas ou por toda a vida da planta (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

1.1.9.6 Utilização de substâncias naturais

A utilização de produtos naturais extraídos de vegetais, poderá eventualmente se tornar uma alternativa interessante para o manejo integrado, com a vantagem de redução dos gastos em relação ao controle químico e da ausência dos impactos ambientais (BASTOS, 1997).

Segundo Fulton (1989), o tratamento de vassouras secas com óleo mineral evita a produção de basidiocarpos. Bastos (1997) avaliou o efeito do óleo mineral no crescimento micelial e germinação dos basidiósporos, atingindo 100% de eficiência nas concentrações de 50 e 100 μ L, respectivamente. O óleo também mostrou eficiência na redução do crescimento de fitopatógenos como *Phytophthora palmivora* e *Colletotrichum gloeosporioides*.

Chalfoun e Carvalho (1987) estudaram o efeito do extrato e do óleo industrial de alho sobre a inibição do desenvolvimento de *Gibberella zeae*, *Alternaria zinniae* Pape e *Macrophomina phaseolina*, uma vez que o óleo de alho apresenta propriedades preventivas e terapêuticas sobre várias enfermidades que afetam o homem. Todos os fungos avaliados tiveram seu crescimento drasticamente reduzido, na presença de ambos. Bastos (1992), também utilizando o extrato de alho, verificou 100% de inibição de basidiósporos de *C. pernicioso* e zoosporângios de *Phytophthora palmivora* na concentração de 1000 ppm.

Walters et al. (2004) estudaram o efeito inibitório dos ácidos linolênico, linoléico, oléico e erúcico sobre fungos fitopatogênicos: *C. pernicioso*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* e *Pyrenophora avenae*, encontrando dosagens efetivas diferentes para cada espécie.

Referências

ALLEN, J. B.; LASS, R. A. London cocoa trade amazon project. Final report phase1. **Cocoa Growers' Bulletin**, v. 34, p. 1-72, 1983.

ALMEIDA, L. C.; ANDEBRHAN, T. Recuperação de plantações de cacau com alta incidência de vassoura de bruxa na Amazônia brasileira. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 1, p.133-136, 1989.

ALMEIDA, C. M. V. C.; ANTÔNIO NETO, F. Custo de produção de sementes de variedades híbridas de cacau em Rondônia, Brasil. **Agrotrópica**, Itabuna, 12, p. 129-134, 2000.

ALMEIDA, C. M. V. C.; DIAS, L. A. S. Recursos Genéticos. In: DIAS, L. A. S (Ed.). **Melhoramento Genético do Cacaueiro**. Viçosa: FUNAPE, UFG, 2001. cap. 5, p. 163-216.

ALMEIDA, L. C.; BASTOS, C. N.; FERREIRA, N. P. Produção de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso* em dois sistemas de cultivo do cacaueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 60-64, 1995.

ALMEIDA, L. C. C.; NIELLA, G. R.; BEZERRA, J. L. Efeito de remoções de partes doentes do cacaueiro associadas a intervalos de aplicação de óxido cuproso no controle da vassoura de bruxa na Bahia. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 10, p. 95-102, 1998.

ALMEIDA, A. A. F.; AGUILAR, M. A. G.; ARAÚJO, I. S.; VALLE, R. R. Anatomical modifications in two cacao genotypes infected by *Crinipellis pernicioso*. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 10, p. 199-202, 1998.

ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L. C.; NAKAYAMA, L. H. I. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer: a experiência da Amazônia Brasileira. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 10, p. 49-60, 1998.

ANDEBRHAN, T.; FIGUEIRA, A.; YAMADA, M. M.; CASCARDO, J. FURTEK, D. B. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, p. 167-175, 1999.

ARNOLD, A. E.; MEJÍA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 26, p. 15649-15654, 2003.

ARRUDA, M. C. C.; MILLER, R. N. G.; FERREIRA, M. A. S. V.; FELIPE, M. S. S. Comparison of *Crinipellis pernicios*a isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. **Plant Pathology**, London, v. 52, p. 236-244, 2003.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. (2005). Diversity and Applications of Endophytic Fungi Isolated from Tropical Plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Ed.). **Fungi: Multifaceted Microbes**, New Delhi: Anamaya Publishers, 2006. No prelo.

AZEVEDO, A. M. C.; MARCO, J. L. FELIX, C. R. Characterization of an amylase produced by a *Trichoderma harzianum* isolate with antagonistic activity against *Crinipellis pernicios*a, the causal agent of witches' broom of cocoa. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 188, p. 171-175, 2000.

BAO, J. R.; LAZAROVITS, G. Differential colonization of tomato roots by nonpathogenic and pathogenic *Fusarium oxysporum* strains may influence *Fusarium* wilt control. **Phytopathology**, Lancaster, v. 91, p. 449-456, 2001.

BASTOS, C. N. Antagonismo ao fungo *Crinipellis pernicios*a (Stahel) Singer, causador da vassoura de bruxa do cacauero. **Revista Theobroma**, Itabuna, v. 8, p. 147-150, 1978.

BASTOS, C. N. Hiperparasitismo do fungo *Dactylium sp.* a *Crinipellis pernicios*a (Stahel) Singer em "vassoura de bruxa" do cacauero. **Revista Theobroma**, Itabuna, v. 9, p. 197-200, 1979.

BASTOS, C. N. Resultados preliminares sobre a eficácia de *Trichoderma viride* no controle da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicios*a) do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, p. 340-343, 1988.

BASTOS, C. N. Avaliação de fungicidas sistêmicos no controle da vassoura de bruxa do cacauero. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 1, p. 128-132, 1989.

BASTOS, C. N. Inibição do crescimento micelial e germinação de esporos de *Crinipellis pernicios*a e *Phytophthora palmivora* por extrato de bulbo de alho (*Allium sativum*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 454-457, 1992.

BASTOS, C. N. Mycoparasitic nature of the antagonism between *Trichoderma viride* and *Crinipellis pernicios*a. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 50-54, 1996.

BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 441-443, 1997.

BASTOS, C. N. *Trichoderma stromaticum* sp. nov. na produção de basidiomas e infecções de ramos e almofadas florais do cacaueiro por *Crinipellis perniciosa*. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 12, p. 59-62, 2000.

BASTOS, C. N. Ação de *Trichoderma stromaticum* sp. nov. sobre a produção de basidiomas de *Crinipellis perniciosa* em vassouras de cupuaçuzeiro. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 30, p. 63-65, 2004.

BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Witches' broom disease assessment for resistance in cocoa clones using phloem sap. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 556-558, 2000.

BASTOS, C. N.; DIAS, J. C. Redução na produção de basidiocarpos de *Crinipellis perniciosa* por *Trichoderma viride*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 18, p. 235-238, 1992.

BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. **Plant Pathology**, London, v. 34, p. 306-312, 1985.

BASTOS, C. N.; PEREIRA, G. C. Teores de nutrientes em tecidos de cacaueiro sadios e infectados por *Crinipellis perniciosa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 245-247, 1994.

BASTOS, C. N.; ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L. C. Comparação morfológica de isolados de *Crinipellis perniciosa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, p. 202-206, 1988.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, Lancaster, v. 72, p. 379-382, 1982.

BERNSTEIN, M. E.; CARROLL, G. C. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 55, p. 644-653, 1977.

BOYLE, C.; GOTZ, M.; DAMMANN-TUGEND, U.; SCHULZ, B. Endophyte-host interactions III. Local vs. systemic colonization. **Symbiosis**, Rehovot, v. 31, p. 259-281, 2001.

CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 56, p. 3034-3043, 1978.

CASTRO, G. C. T.; PEREIRA, T. N. S.; CARLETTO, G. A.; BARTLEY, B. G. D. Caracterização de recursos genéticos do cacauero. III. Flor das seleções CEPEC, EEG, SIAL, MA, RB, CA e CAS. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 1, p. 27-33, 1989.

CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. D. Efeito do extrato de óleo industrial de alho sobre o desenvolvimento de fungos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, p. 234-236, 1987.

CLAY, K. Fungi and the food of the gods. **Nature**. London, 427:401-402. 2004.

CLAY, K.; SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. **American Naturalist**, Chicago, v. 160, p. S99-S127, 2002.

CLAY, K.; MARKS, S.; CHEPLICK, G. P. Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. **Ecology**, Brooklyn, v. 74, p. 1767-1777, 1993.

COSTA, A. Z. M.; MATUO, T. Determinação de níveis de fungicida óxido cuproso em frutos de cacaueros para o controle da vassoura-de-bruxa. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 11, p. 77-82, 1999.

COSTA, J. C. B.; MAFFIA, L. A.; ANDEBRHAN, T.; CARVALHO, A. L. P. Produção de basidiomas de *Crinipellis pernicioso* em diferentes fontes de inóculo na região amazônica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 507-512, 1997.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contributions from the United States National Herbarium**, Washington, v. 35, p. 379-614, 1964.

DABYDEEN, S.; SREENIVASAN, T. N. Occurrence, anatomy and morphology of “blisters” on cocoa seedlings inoculated with *Crinipellis pernicioso*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 73, p. 481-484, 1989.

DIAS, L. A. S. Origem e Dispersão de *Theobroma cacao* L.: um novo cenário. In: DIAS, L. A. S. (Ed.). **Melhoramento Genético do Cacauero**. Viçosa: FUNAPE, UFG, 2001. cap. 3, p.81-127.

ELAD, Y.; BARAK, R.; CHET, I.; HENIS, Y. Ultrastructural studies of the interaction between *Trichoderma spp.* and plant pathogenic fungi. **Phytopath. Z.**, v. 107, p. 168-175, 1983.

- EVANS, H. C.; BASTOS, C. N. Uma reavaliação do ciclo de vida da vassoura de bruxa (*Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer do cacau. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, p. 104, 1979.
- EVANS, H.; BASTOS, C. N. Basidiospore germination as a means of assessing resistance to *Crinipellis pernicioso* (witches broom disease) in coca cultivars. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 74, p.525-536, 1980.
- FERRAZ, E. C. A. **A vassoura de bruxa na Bahia: plano integrado de ações**. Ilhéus: CEPLAC, 1989, 43p.
- FERREIRA, L. T. Clones tecnológicos, a salvação da lavoura do cacau. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 3, nov./dez. 1997. Disponível em: http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio03/3hp_7.pdf. Acesso em: 11 jan. 2006.
- FISHER, P. J.; ANSON, A. E.; PETRINI, O. Antibiotic activity of some endophytic fungi from *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. **Botanica Helvetica**, v. 96, p.37-41, 1986.
- FONSECA, S. E. A.; WHEELER, B. E. J. Assessing resistance to *Crinipellis pernicioso* using coca callus. **Plant Pathology**, London, v. 39, p. 463-471, 1990.
- FREEMAN, S.; RODRIGUES, R. J. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a non pathogenic endophytic mutualist. **Science**, Washington, v. 260, p. 75-58, 1993.
- FULTON, R. H. The cacao disease trilogy: black pod, monilia pod rot, and witches' broom. **Plant Disease**, St. Paul, v.7, p.601-603, 1989.
- GORLACH, J.; VOLRATH, S.; KANAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K. H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadizole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance activates gene expression and disease reduction in wheat. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 629-643, 1996.
- GOTSCH, N. Cocoa Biotechnology: Status, Constraints and Future Prospects. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 15, p. 333-352, 1997.
- HANSEN, M. Cacao. In: JANZEN, D. H. (ed.). Historia Natural de Costa Rica. **Editorial de la Universidad de Costa Rica**, San Jose, p. 82-84. 1991.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, p. 4-10, 2003.

INBAR, J.; MENENDEZ, A.; CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 28, p. 757-763, 1996.

INGLIS, P. W.; QUEIROZ, P. R.; VALADARES-INGLIS, M. C. Transformation with green fluorescent protein of *Trichoderma harzianum* 1051, a strain with biocontrol activity against *Crinipellis perniciosus*, the agent of witches' broom disease of cocoa. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 45, p. 63-67, 1999.

IWARO, A. D.; SREENIVASAN, T. N.; UMAHARAN, P. Cacao resistance to *Phytophthora*: effect of pathogen species, inoculation depths and pod maturity. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, p. 11-15, 1998.

KRAUSS, U.; SOBERANIS, W. Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. **Biological Control**, San Diego, v. 24, p. 82-89, 2002.

KRUPASAGAR, V.; SEQUEIRA, L. Auxin destruction by *Marasmius perniciosus*. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 56, p. 390-397, 1969.

KUHN, D. N.; HEATH, M.; WISSER, R. J.; MEEROW, A.; BROWN, J. S.; LOPES, U.; SCHNELL, R. J. Resistance gene homologues in *Theobroma cacao* as useful genetic markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 107, p. 191-202, 2003.

LIMA, J. O.; SANTOS, J. K.; PEREIRA, J. F.; RESENDE, M. L. V.; ARAÚJO, E. F.; QUEIROZ, M. V. Development of a transformation system for *Crinipellis perniciosus*, the causal agent of witches' broom disease in cocoa plants. **Current Genetics**, New York, v. 42, p. 236-240, 2003.

LIU, C. H.; ZOU, W. X.; LU, H.; TAN, R. X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 88, p. 277-282, 2001.

MACEDO, L. F. V. **Manual de Recomendações para o Controle da Vassoura de bruxa**. Itabuna: CEPLAC, 1995, 16p.

MARCO, J. L. de; FELIX, C. R. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. **BioMed Central Biochemistry**, London, v. 3, p. 1-7, 2002.

MARCO, J. L. de; VALADARES-INGLIS, M. C.; FELIX, C. R. Purification and characterization of an N-acetylglucosaminidase produced by a *Trichoderma harzianum* strain which controls *Crinipellis pernicioso*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, p. 70-75, 2004.

MARCO, J. L. de; LIMA, L. H. C.; SOUSA, M. V.; FELIX, C. R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.16, p. 383-386, 2000.

MARITA, J. M.; NIENHUIS, J.; PIRES, J. L.; AITKEN, W. M. Analysis of genetic diversity in *Theobroma cacao* with emphasis on witches' broom disease resistance. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 1305-1316, 2001.

MENEZES, J. A. S.; CARMO-NETO, D. **A modernização do agribusiness cacau**. Fundação Cargill, Campinas (2 ed.). 1993. 56p.

MOTILAL, L. A.; SIRJU-CHARRAN, G.; SREENIVASAN, T. N. Effect of *Crinipellis pernicioso* infection on abscission of cacao cotyledons, reserve mobilization and dry matter partitioning. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, p.546-552, 2003.

MUSE, R. B.; COLLIN, H. A.; ISAAC, S.; HARDWICK, K. Effects of the fungus *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease, on cell and tissue cultures of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Plant Pathology**, London, v. 45, p. 145-154, 1996.

NOJOSA, G. B. A.; RESENDE, M. L. V.; AGUILAR, M. A. G.; BEZERRA, K. M. T.; ANHERT, D. E. Componentes fenólicos e enzimas oxidativas em clones de *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 148-154, 2003.

OLIVEIRA, M. L. Seleção de fungicidas *in vitro* e *in vivo* para o controle da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro na região sul da Bahia. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 12, p. 111-118, 2000.

ORCHARD, J.; COLLIN, H. A.; HARDWICK, K.; ISAAC, S. Changes in morphology and measurement of cytokinin levels during the development of witches' brooms on cocoa. **Plant Pathology**, London, v. 43, p. 65-72, 1994.

OSBOURN, A. Host-microbe interactions: fungi – Molecular intimacy exposed: probing plant-fungus interactions. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.4, p. 363-364, 2001.

PANACCIONE, D. G.; JOHNSON, R. D.; WANG, J.; YOUNG, C. A.; DAMRONGKOOL, P.; SCOTT, B.; SCHARDT, C. L. Elimination of ergovaline from a grass-*Neotyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte. **Proceedings of the Natural Academy of Sciences**, Washington, v. 98, p. 12820-12825, 2001.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**, vol. 1 São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 417-453, v 1.

PEIXOTO-NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, 2002. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/micro.asp>>. Acesso em: 14 nov. 2005.

PEREIRA, J. L.; ALMEIDA, L. C. C.; SANTOS, S. M. Witches' brooms disease of cocoa in Bahia: attempts at eradication and containment. **Crop Protection**, Guildford, v. 15, p. 743-752, 1996.

PERIERA, J. L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J. M.; ALMEIDA, L. C. C. First occurrence of witches' broom disease in the principal cocoa-growing region of Brazil. **Tropical Agriculture**, Peradeniya, v. 67, p. 188-189, 1990.

PINTO, L. R. M.; PIRES, J. L. **Seleção de plantas de cacau resistentes à vassoura de bruxa**. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC, 1998. 35p. (Boletim Técnico, 181)

PURDY, L. H.; SCHIMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology and management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 573-594, 1996.

PURSEGLOVE, J. W. **Tropical Crops: dicotyledons**. Harlow: Longmans, 1968. 453p.

QUEIROZ, V. T.; GUIMARÃES, C. T.; ANHERT, D.; SCHUSTER, I.; DAHER, R. F.; PEREIRA, M. G.; MIRANDA, V. R. M.; LOGUERCIO, L. L.; BARROS, E. G.; MOREIRA. Identification of major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. **Plant Breeding**, Berlin, v. 122, p. 1-5; 2003.

RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; AGUILAR, M. A. G.; SILVA, L. H. C. P.; NIELLA, G. R.; CARVALHO, G. A.; GIOVANINI, G. R.; CASTRO, R. M. Perspectivas da indução de resistência em cacauero contra *Crinipellis pernicioso* através do benzotiadiazole (BHT). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 149-156, 2000.

RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; CAVALCANTI, L. S.; AGUILAR, M. A. G.; SILVA, L. H. C. P.; PEREZ, J. O.; ANDRADE, G. C. G.; CARVALHO, G. A.; CASTRO, R. M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, London, v. 51, p. 621-628, 2002.

RIOS-RUIZ, R. A. Melhoramento para resistência a doenças. In: DIAS, L. A. S. (Ed.) **Melhoramento Genético do Cacauero**. Viçosa: FUNAPE, UFG, 2001. cap. 7, p. 289-324.

RISTERUCCI, A. M.; GRIVET, L.; N'GORAN, J. A. K.; PIERETTI, I.; FLAMENT, M. H.; LANAUD, C. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.101, p.948-955, 2000.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R. AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease. **International Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v. 1, p.24-33, 2005.

SAMUELS, G. J.; PARDO-SCHULTHEISS, R.; HEBBAR, K. P.; LUMSDEN, R. D.; BASTOS, C. N.; COSTA, J. C.; BEZERRA, J. L. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches' broom pathogen. **Mycological Research**, Cambridge, v.104, p.760-764, 2000.

SANOGO, S.; POMELLA, A.; HEBBAR, P. K.; BAILEY, B.; COSTA, J. C. B.; SAMUELS, G. J.; LUMSDEN, R. D. Production and germinations of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis pernicioso* on cacao. **Phytopathology**, Lancaster, v. 92, p.1032-1037, 2002.

SANTOS FILHO, L. P.; FREIRE, E. S.; CARZOLA, I. M. Estimativas de perdas de produção de cacau causadas por vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer) na Bahia. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 10, p. 127-130, 1998.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, p. 661-686, 2005.

SEAVEY, S.; BAWA, K. Late-acting self incompatibility in angiosperms. **Botanical Review**, New York, v. 52, p. 195-219, 1986.

SILVA, C. R. S.; FIGUEIRA, A. V. O.; SOUZA, C. A. S. Diversidade no gênero *Theobroma*. In: DIAS, L. A. S. (Ed.) **Melhoramento Genético do Cacaueiro**. Viçosa: FUNAPE, UFG, 2001. cap. 2, p.49-80.

SILVA, S. D. V. M.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Crinipellis perniciosa* em cacaueiros suscetível e resistente à vassoura de bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p.54-59, 1999.

SILVA, S. D. V. M.; LUZ, E. D. M. N.; ALMEIDA, O. C.; GRAMACHO, K. P.; BEZERRA, J. L. Redescrição da sintomatologia causada por *Crinipellis perniciosa* em cacaueiro. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 14, p. 1-24, 2002.

SREENIVASAN, T. N.; DABYDEEN, S. Modes of penetration of young cocoa leaves by *Crinipellis perniciosa*. **Plant Disease**, St. Paul, 73(6):478-481. June, 1989.

SOUZA, C. A. S.; DIAS, L. A. S. Melhoramento ambiental e sócio-economia. In: DIAS, L. A. S. (Ed.) **Melhoramento Genético do Cacaueiro**. Viçosa: FUNAPE, UFG, 2001. cap. 1, p.1-48.

SURUJDEO-MAHARAJ, S.; UMAHARAN, P.; BUTLER, D. R.; SREENIVASAN, T. N. An optimized screening method for identifying levels of resistance to *Crinipellis perniciosa* in cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant Pathology**, London, v. 52, p. 464-475, 2003.

TEIXEIRA, J. B.; MARBACH, P. A. S. Otimização do processo de embriogênese somática em cacau (*Theobroma cacao* L.). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, nov./dez. 2002. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/cacau.asp>>. Acesso em: 11 jan. 2006.

VARMA, A.; VERMA, S.; SAHAY, S. N.; BUTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2741-2744, 1999.

VITERBO, A.; HARAN, S.; FRIESEM, D.; RAMOT, O.; CHET, I. Antifungal activity of a novel endochitinase gene (chit36) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 200, p. 169-174, 2001.

WALTERS, D.; RAYNOR, L.; MITCHELL, A.; WALKER, R.; WALKER, K. Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. **Mycopathologia**, Dordrecht, v.157, p. 87-90, 2004.

WHITE JR., J. F.; BELANGER, F.; MEYER, W.; SULLIVAN, R. F.; BISCHOFF, J. F.; LEWIS, E. A. Clavicipitalean fungal epibionts and endophytes – development of symbiotic interaction with plants. **Symbiosis**, Rehovot, v. 33, p. 201-213, 2002.

YAMADA, M. M.; GURIES, R. P. Mating system analysis in cacao (*Theobroma cacao* L.). **Agrotrópica**, Itabuna, v. 10, p. 165-176, 1998.

YAMADA, M. M.; GURIES, R. P. Methodology, polymorphism and electrophoretic analysis of cacao (*Theobroma cacao* L.) isozymes. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 1, p. 1-6, 2000.

YAMADA, M. M.; LOPES, U. V. Paternity analysis of cacao trees selected for resistance to witches' broom in plantations of Bahia, Brazil. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 11, p. 83-88, 1999.

YAMADA, M. M.; ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D. B. Genetic variability among isolates of *Crinipellis pernicios* from solanaceous hosts and their relationship to isolates from *Theobroma cacao*. **Agrotrópica**. Itabuna, v. 10, p. 123-126, 1998.

ZAIM, M.; SAMAD, A. Association of phytoplasmas with a witches' broom disease of *Withania somnifera* (L.) Dunal in India. **Plant Science**, Shannon, v. 109, p. 225-229, 1995.

ZARB, J.; WALTERS, D. R. The effect of ornithine decarboxylase inhibition on growth, enzyme activities, and polyamine concentrations in *Crinipellis pernicios*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 47, p. 44-50, 1993.

2 DIVERSIDADE GENÉTICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CACAU

Resumo

Microorganismos endofíticos estão presentes em quase todas as plantas e são representados, na maioria dos casos por fungos e bactérias. Eles vivem em equilíbrio dentro do hospedeiro, colonizando os mesmos nichos ecológicos dos seus fitopatógenos. Existem gêneros e espécies de fungos prevalentes, caracterizados pela alta capacidade de colonização dos tecidos hospedeiros, se comparados com outros gêneros comumente isolados. Como esses fungos vivem silenciosamente dentro do hospedeiro, sem indução de sintomas típicos nem estruturas de frutificação, a melhor maneira de estudá-los é pelo seu isolamento ou caracterização molecular. *Theobroma cacao* L. é uma cultura importante para o estado da Bahia e foi estudada por ser uma planta tropical, que comporta uma comunidade endofítica pouco estudada. O estudo dos endófitos de plantas tropicais é interessante e o cacau tem sido uma importante ferramenta para esse tipo de trabalho. As sementes de cacau são fonte de matéria prima para a produção de chocolate, um alimento energético consumido no mundo todo. Entretanto, esse estudo incluiu a análise da biodiversidade dos fungos endofíticos de folhas e caules de cacau. Os isolados foram caracterizados morfolologicamente, de acordo com a coloração micelial e taxa de crescimento. A análise de ARDRA com as enzimas de restrição *Hinf I* e *Mbo I* identificou no mínimo, 64 haplótipos, que não foram relacionados às plantas hospedeiras. A comunidade endofítica incluiu *Aschersonia* sp.; *Botryosphaeria rhodina*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cordyceps sobolifera*, *Crinipellis perniciosa*, *Diaporthe phaseolorum*, *D. helianthi*, *Fusarium* sp.; *F. chlamydosporum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. polyphialidicum*, *Gibberella fujikuroi*, *G. zae*, *Glomerella cingulata*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Myrothecium atroviride*, *Nectria haematococca*, *Pestalotiopsis microspora*, *Phomopsis amygdali*, *P. columnaris*, *Podospora curvicolla*, *Pseudofusarium purpureum*, *Rhizopycnis vagum* e *Verticillium luteo-album*. Também foi observado que *B. rhodina*, *D. helianthi* e *Phomopsis* spp. foram isolados principalmente de plantas resistentes de cacau ou essas espécies podem ter evoluído com a resistência de cacau a *C. perniciosa*.

Keywords: variabilidade, endófitos, cacau, ARDRA, ITS, sequenciamento

GENETIC DIVERSITY OF CACAO ENDOPHYTIC FUNGI

Abstract

Endophytic microorganisms are present in almost all plants, and are represented in most cases by fungi and bacteria. They live in equilibrium inside the host, colonizing the same ecological niches of those phytopathogens. There are prevalent genera and species of fungi, characterized by the high colonization capacity of the host tissues, if compared with other genera commonly isolated. These fungi live in silence inside the host, without induction of typical symptoms nor fructification structures, so, the best approach to study them is by isolation or molecular characterization. *Theobroma cacao* L. is an important crop for Bahia state and was studied, because it is a tropical plant, which has an endophytic community poorly studied. The study of endophytes from tropical plants is interesting, and cacao has been an important tool for this kind of approach. From cacao beans is obtained the material for chocolate production, an energetic food consumed in the whole world. Therefore, this study included the analysis of the biodiversity of endophytic fungi from cacao stems and leaves. The isolates were characterized morphologically, according to mycelial colour and growth rate. The ribosomal DNA was used to evaluate the genetic diversity of this endophytic community. ARDRA analysis with *Hinf I* e *Mbo I* restriction enzyme identified at least 64 haplotypes, which were not related to host plants. The endophytic community included *Aschersonia* sp.; *Botryosphaeria rhodina*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cordyceps sobolifera*, *Crinipellis pernicioso*, *Diaporthe phaseolorum*, *D. helianthi*, *Fusarium* sp.; *F. chlamydosporum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. polyphialidicum*, *Gibberella fujikuroi*, *G. zae*, *Glomerella cingulata*, *Lasioidiplodia theobromae*, *Myrothecium atroviride*, *Nectria haematococca*, *Pestalotiopsis microspora*, *Phomopsis amygdali*, *P. columnaris*, *Podospora curvicolla*, *Pseudofusarium purpureum*, *Rhizopycnis vagum* e *Verticillium luteo-album*. Also, it was observed that *B. rhodina*, *D. helianthi* and *Phomopsis* spp. were mainly isolated from cocoa resistant plant or this species could be evolved with cocoa resistance against *C. pernicioso*.

Keywords: variability, endophytes, cocoa, ARDRA, ITS, sequencing

2.1 Introdução

O estudo da diversidade genética de microrganismos endofíticos de determinada cultura é um evento particular, uma vez que a estrutura da comunidade endofítica varia em função do ambiente ao qual a planta está adaptada, bem como a oscilações de fatores abióticos, tais como temperatura, regime de chuvas e predominância de espécies de microrganismos presentes naquele ambiente e adaptados a ele.

Assim, foi escolhido para esse trabalho o cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.), visando isolar os fungos endofíticos desse hospedeiro e caracterizá-los, utilizando ferramentas convencionais e moleculares. Os endófitos foram isolados no Laboratório de Genética de Microrganismos da Esalq/USP e todos os testes para sua caracterização morfológica e molecular também foram feitos no mesmo laboratório, no período entre 2002 e o primeiro semestre de 2005.

O cacauzeiro constitui uma importante cultura para o Brasil, sobretudo para a região sudeste da Bahia, cuja produção ocupa o quinto lugar no ranking dos maiores produtores mundiais da cultura. A importância da cultura, bem como o interesse na exploração do potencial biotecnológico dos fungos endofíticos associados ao cacauzeiro auxiliaram no delineamento dos objetivos propostos para esse capítulo, que foram: i) isolar fungos endofíticos de cacau; ii) estudar a diversidade de fungos endofíticos de cacau; iii) caracterizar morfológicamente os endófitos; iv) caracterizar molecularmente os endófitos, visando coletar o máximo de informações a respeito dos fungos isolados.

Com esse trabalho, é esperado que sejam abertas novas perspectivas para o estudo de microrganismos endofíticos de cacau e que desses estudos possam ser descobertos novos potenciais, sempre visando um melhor entendimento da dinâmica de interação entre endófitos e seus hospedeiros, bem como a exploração de potenciais visando um melhoramento na cultura do cacauzeiro.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Revisão bibliográfica

Segundo Osbourn (2001), apenas uma pequena proporção de fungos é apta a colonizar o interior das plantas. E quando existe essa aptidão, fungos e bactérias penetram e colonizam seu hospedeiro tão sutilmente, que se torna necessária a utilização de microscopia para sua percepção no interior do hospedeiro (BERNSTEIN; CARROLL, 1977).

As interações entre plantas e microrganismos já são conhecidas há muito tempo. Porém, com exceção das associações micorrízicas, sempre foi dado um enfoque fitopatológico para essas interações. Atualmente, sabe-se que praticamente toda planta é colonizada por microrganismos.

Endófitos são todos os microrganismos, cultiváveis ou não, que habitam o interior das plantas, não causando dano ao hospedeiro, nem estruturas externas, excluindo desse grupo, bactérias noduladoras e fungos micorrízicos (AZEVEDO; ARAÚJO, 2006).

A idéia de que esses microrganismos poderiam conferir características de interesse à planta, fez com que o interesse em se estudar esses seres aumentasse muito nos últimos 20 anos (ARAÚJO et al., 2002). O conhecimento da comunidade endofítica começa com o isolamento e caracterização destes microrganismos (ARAÚJO et al., 2002), com conseqüente estudo da diversidade de espécies e gêneros que compõem a comunidade em estudo. Uma vez conhecida a diversidade da comunidade, o programa de buscas a novos compostos ativos é uma alternativa promissora (PELÁEZ et al., 1998).

Os resultados obtidos por Arnold et al. (2003) indicam que folhas ou plântulas de cacau em fase de emergência, não apresentam endófitos cultiváveis. Porém, com a molha das plantas pela chuva, orvalho ou névoa, os microrganismos se tornam aptos a penetrar a planta e colonizá-la persistentemente como endófitos, sem causar dano aparente.

Endófitos são distintos dos microrganismos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais. Várias espécies de fungos endofíticos são conhecidas por serem taxonomicamente relacionadas a patógenos virulentos dos mesmos hospedeiros relacionados, podendo refletir em recente especiação. Groppe et al. (1999) afirma que associações gramíneas-endófitos são interessantes, por oscilarem do mutualismo à patogenicidade, em um gradiente evolutivo. Exemplificando, em pinheiros, os endófitos *Lophodermium pinastri* e *L. conigenum* pertencem ao mesmo gênero do patógeno *L. seditionum*. Os patógenos *Rhabdocline weirii* e *R. pseudotsugae* são taxonomicamente relacionados a *R. parkieri* que é um endófito de Douglas-fir. O anamorfo de *R. parkieri*, *Meria* é morfológicamente idêntico e, provavelmente, um parente próximo de *Meria laricis*, um patógeno de *Larix* spp.

Existe uma série de razões para que se aprofundem os estudos com endófitos. Primeiro, a falta de informações para elucidar a base biológica dessas interações. Segundo, porque os endofíticos são vantajosos, visto que muitos benefícios para a planta têm sido atribuídos à presença deles, tais como:

- ❑ vários endófitos são capazes de produzir antibióticos e outros metabólitos secundários de interesse farmacológico (FISHER; ANSON; PETRINI, 1986; AZEVEDO, 1998; PEIXOTO-NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; AZEVEDO; ARAÚJO, 2006);
- ❑ têm sido usados como agentes de controle biológico de pragas e doenças (AZEVEDO, 1998, AZEVEDO et al., 2000);
- ❑ têm sido usados como bioherbicidas (AZEVEDO, 1998);
- ❑ são usados como vetores para introdução de genes em plantas hospedeiras e conferem proteção à herbivoria (CLAY; MARKS; CHEPLICK, 1993, AZEVEDO et al., 2000);
- ❑ promovem crescimento vegetal por meio da produção de fitormônios (VARMA et al., 1999; PEIXOTO-NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; SCHULZ; BOYLE, 2005; KUKLINSKY-SOBRAAL et al., 2005);
- ❑ fornecem tolerância ao estresse para seus hospedeiros (BOYLE et al., 2001).

Em gramíneas do gênero *Festuca* e *Lolium*, a herbivoria causada por *Spodoptera frugiperda* pode ser reduzida pela colonização da planta pelo endófito *Acremonium* spp. (CLAY; MARKS; CHEPLICK, 1993). Besouros “elm bark” dispensam árvores que sejam colonizadas por *Phomopsis oblonga*; quando esses besouros são forçados a cruzarem em ramos colonizados por esse endófito em laboratório, poucas progênies emergem dos ramos (CARROLL, 1995). Fisher, Anson e Petrini (1986) estudaram a produção de antibióticos por endófitos isolados de *Ulex europaeus* e *U. gallii*, encontrando quatro produtores de antibióticos dentre os 25 isolados analisados.

Os microrganismos constituem fáceis materiais para manipulação em laboratório. Nos últimos anos, novas abordagens metodológicas, principalmente de genética molecular, têm sido muito úteis na geração de um quadro mais completo sobre a ecologia microbiana em um dado habitat (FUNGARO; VIEIRA, 1998).

A PCR é uma técnica descrita em meados da década de 80, por Saiki et al. (1985), constituindo importante ferramenta para diagnóstico em fungos (FUNGARO, 2000). Ela teve um impacto muito grande, porque permite inúmeras cópias de um dado segmento de DNA. Após a descrição da técnica de PCR, várias técnicas baseadas em PCR vieram a ser descritas, visando

fornecer mais informações para as análises, incluindo inferências filogenéticas (ARRUDA et al. (2003b).

Para análise de variabilidade em fungos, tem sido empregada a amplificação de fragmentos do rDNA. O DNA que codifica para RNA ribossômico se apresenta como um cluster gênico, no qual se tem o gene 18S, o gene 5,8S e o gene 28S (Figura 1).

Figura 1 – Estrutura do cluster gênico que codifica para RNA ribossômico. As setas escuras indicam as regiões flanqueadas pelos *primers* ITS 1 e ITS 4, que foram utilizadas no trabalho (Fonte: FUNGARO, 2000 – modificado)

Esses genes são separados por regiões denominadas ITS 1 e ITS 2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico maduro (ARRUDA et al., 2003a). O fato de esse cluster gênico apresentar algumas regiões altamente conservadas (rDNA) e outras variáveis (ITS), tem permitido a análise de variação de diferentes níveis taxonômicos (FUNGARO, 2000; ARRUDA et al., 2003b). A região 18S, por exemplo, é a mais conservada e por isso é utilizada apenas para comparação de organismos distantemente relacionados. A porção 28S é mais variável e portanto, é apropriada para comparação de diferentes gêneros ou, em alguns casos, de diferentes espécies (FUNGARO, 2000).

No trabalho de Rubini et al. (2005), os autores isolaram fungos endofíticos de cacau e analisaram a diversidade genética dentre os isolados, utilizando sequenciamento de regiões ITS e obtendo grande variedade de espécies.

Chambers; Liu e Cairney (2000), utilizaram a amplificação de regiões ITS para inferir sobre a relação taxonômica entre isolados endofíticos de uma Ericaceae, *Woollsia pugnans*. Dos 14 endófitos analisados, os autores puderam separá-los em seis táxons geneticamente diferentes.

Uma técnica que vem sendo bastante utilizada paralelamente à PCR, é a análise de restrição do rDNA amplificado (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* – ARDRA), que faz uso de endonucleases de restrição para clivar os fragmentos amplificados em sítios específicos, originando um novo padrão de dois ou mais fragmentos que poderão inferir mais especificamente na variabilidade entre isolados. Oliveira e Costa (2002), amplificaram fragmentos de ITS de *Fusarium solani* e atestaram a eficiência do ARDRA como marcador molecular eficiente em estudos de grupos de complexa classificação taxonômica, incluindo *formae specialis*.

Lana (2004), utilizou o ARDRA para verificar se o padrão de polimorfismo era capaz de diferenciar isolados patogênicos e endofíticos de *Crinipellis perniciosa*, agente causal da vassoura de bruxa em cacau. Porém, o autor considera que não foi possível o estabelecimento dessa diferenciação, concordando com Arruda et al. (2003a), que amplificaram as regiões ITS1, ITS2 e 5,8S de *C. perniciosa*, revelando um produto de 750 pb em todos os 120 isolados examinados. Foram selecionadas algumas enzimas de restrição para a clivagem desses fragmentos (*Hinf* I, *Hinp* I e *Msp* I), não sendo encontrada diferença entre isolados. Os autores sugerem que as regiões ITS do rDNA podem ser usadas para diferenciações interespecíficas, mas ao nível intraespecífico, a variabilidade geralmente é muito baixa, fator este que pode reduzir a eficiência do ARDRA. Da mesma forma, Kuklinsky-Sobral (2003), aplicando ARDRA para fragmentos de 16S rDNA de *Burkholderia gladioli* e *Pseudomonas oryzae*, não obtiveram sucesso na distinção entre isolados de mesmo gênero. Por outro lado, a utilização de três enzimas de restrição (*Alu* I, *Hae* III e *Mbo* I) permitiu a separação de dois haplótipos, exclusivos de cada um dos dois grupos estudados, ambos capazes de utilizar glifosato como única fonte de carbono.

Em um estudo com espécies endofíticas e patogênicas de *Fusarium*, Martins (2005) encontrou ampla variabilidade genética. Utilizando ARDRA, esse autor não conseguiu vislumbrar diferenças genéticas entre isolados patogênicos e endofíticos. Em um mesmo hospedeiro, as raças de *Fusarium* se mostraram também, bastante variáveis.

2.2.2 Material e métodos

2.2.2.1 Isolamento de fungos endofíticos de cacau

Os ramos de plantas de cacau com e sem sintomas de vassoura de bruxa, foram coletados na Bahia, em cinco diferentes localidades: Camacã, Fazenda Brasileira, F. Santa Rita, F. Sempre Viva e Luiz Moura. Trazidos ao laboratório, os caules foram lavados em água corrente, e foi seguido o protocolo de desinfecção do tecido descrito por Araújo et al. (2002). Após a desinfecção superficial, as extremidades e a casca dos ramos foram desprezadas e o material resultante foi fragmentado em pedaços pequenos (aproximadamente 0,5 cm), com auxílio de um bisturi e pinça autoclavados. Os fragmentos foram plaqueados em meio Batata Dextrose Agar – BDA (Biobrás) contendo 0,1% de tetraciclina – Tc (50 µg/mL) e 0,1% de estreptomicina – St (50 µg/mL) para inibição do crescimento de bactérias, e logo em seguida, foram incubados em estufa BOD a 28°C. Diariamente, as placas foram analisadas quanto ao crescimento dos fungos. As colônias desenvolvidas foram purificadas para placas contendo BDA + St + Tc, as quais foram novamente submetidas à incubação. Após o crescimento, os fungos foram armazenados em frascos contendo meio BDA.

2.2.2.2 Grupos morfológicos e de crescimento

Os fungos isolados foram caracterizados quanto à sua morfologia (282 isolados) e quanto ao seu crescimento vegetativo (150 isolados). A análise morfológica consistiu na atribuição de cores exibidas pelo micélio do fungo, quando crescido em meio BDA a 28°C. A análise de crescimento consistiu na inoculação do fungo em placas contendo meio BDA e na marcação do intervalo de tempo necessário para que fungo completasse seu crescimento sobre a superfície do meio de cultura em placa de 10 cm de diâmetro.

Com relação aos grupos de crescimento, os 150 endófitos analisados foram incluídos em três grupos: A) de crescimento rápido, que atingem 10 cm de diâmetro em 3 dias; B) de

crescimento mediano, que atingem 10 cm de diâmetro em 4 a 8 dias e C) de crescimento lento, que atingem 10 cm de diâmetro em 9 dias. Obviamente, essa classificação é meramente didática.

2.2.2.3 Caracterização morfológica do isolado endofítico de cacau 42.3

O isolado 42.3 foi inoculado em placa de petri contendo meio BDA e incubado a 28°C durante 10 dias. Em uma lâmina de vidro, foi depositado 10 µL de lactofenol-cotton blue e sobre o corante, foram depositados fragmentos de micélio e conídios, obtidos pela raspagem da superfície da cultura com espátula de metal. Em seguida, uma lamínula foi depositada sobre o material e a lâmina foi levada ao microscópio óptico, onde o material foi analisado segundo padrões morfológicos para identificação do isolado.

2.2.2.4 Extração de ácidos nucleicos

Os isolados endofíticos de cacau foram crescidos em meio Batata-Dextrose – BD (2% dextrose; q.s.p. 1000 mL de caldo de batata) durante 15 dias, em cultura estática e submersa, em estufa BOD a 28°C. Após esse período, o micélio foi separado do meio de cultura por filtração e lavado por três vezes com água destilada autoclavada. A massa micelial obtida foi triturada em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido e o pó obtido, transferido para microtubos de 2 mL. Em seguida, os microtubos foram armazenados a -80°C, onde foram mantidos até a extração de ácidos nucleicos. O protocolo de extração foi aquele descrito por Raeder e Broda (1985). Após extraído, os ácidos nucleicos foram armazenados a -20°C.

2.2.2.5 Quantificação e diluição do DNA

O DNA foi quantificado em gel de agarose 1% juntamente com os padrões de DNA de fago λ íntegro (25 ng/µL). Foram aplicados no gel, 2, 4, 6, 8 e 10 µL de DNA de fago λ para comparação com as amostras de DNA dos endófitos. Os géis foram submetidos a uma voltagem de 100V e após a corrida do gel, o mesmo foi corado com solução 0,01% de brometo de etídeo (Sigma) durante 20 minutos. As bandas foram visualizadas em transluminador UV e o gel foi

fotodocumentado. Visando quantificar o DNA extraído, as amostras de DNA dos fungos endofíticos de cacau foram comparados com os padrões de DNA de fago λ e após a comparação, os DNAs foram diluídos para 10 ng/ μ L, para utilização nas reações de PCR para amplificação dos fragmentos de ITS do DNA ribossômico.

2.2.2.6 Amplificação de regiões conservadas ITS do rDNA

A amplificação do ITS1-5.8S-ITS2 rDNA foi realizada por meio da técnica de PCR, onde foram utilizados os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). As reações apresentaram um volume final de 50 μ L, contendo 20 ng de DNA molde; 0,4 μ M de cada *primer*; 0,2 mM de cada dNTP; 7,4 mM de $MgCl_2$; 2 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1X de tampão da enzima. O volume foi completado com água MilliQ autoclavada. Em todas as reações foi utilizado um controle negativo sem o DNA molde. Os microtubos contendo as reações foram submetidos ao termociclador *Gene Amp® PCR System 9700 (PE Applied Biosystems)*, em uma seqüência composta pelos seguintes passos: desnaturação inicial (94°C por 5 minutos) seguida de 25 ciclos composta por uma etapa de desnaturação (94°C durante 30 segundos), uma etapa de anelamento (55°C durante 30 segundos) e uma etapa de extensão (72°C durante 30 segundos), seguida de uma etapa final de 72°C durante 7 minutos.

Após a reação de PCR, 5 μ L da reação foram aplicados em gel de agarose 1,2%, com marcador de peso molecular *Gene Ruler™ 1Kb DNA ladder* (Fermentas). Foi aplicada à cuba de eletroforese, uma voltagem de 100V. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo, durante 20 minutos, as bandas foram visualizadas em transiluminador de luz UV e o gel foi fotodocumentado.

2.2.2.7 Análises de ARDRA

A reação de clivagem foi realizada por meio da digestão dos fragmentos de rDNA, onde foram utilizadas as enzimas *Mbo I* e *Hinf I*. Os mixes de digestão apresentaram um volume de 11

μL, contendo 7 μL do produto de amplificação da região ITS do rDNA; 3 unidades da enzima de restrição e 1X de tampão da enzima. O volume foi completado com água MilliQ autoclavada.

Em uma primeira etapa, foi feita uma triagem de enzimas que fornecessem um padrão mais polimórfico de fragmentos de restrição. Foram avaliadas as enzimas *Alu I*, *Bam HI*, *Cla I*, *Hha I*, *Pvu II*, *Kpn I*, *Hinf I* e *Mbo I*, clivando os fragmentos de ITS de seis gêneros diferentes de endófitos de cacau (*Diaporthe*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Verticillium*, *Botryosphaeria* e *Nectria*).

Após a clivagem, os fragmentos foram avaliados em gel de agarose 2,4% juntamente com marcador molecular 100 pb (Invitrogen) em uma corrida a 100V. Após a corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo durante 20 minutos, as bandas foram visualizadas em transiluminador de luz UV e o gel foi fotodocumentado. Os padrões de clivagem foram transferidos para papel milimetrado para posterior comparação e análise.

2.2.2.8 Sequenciamento e análise dos dados

Foram selecionados representantes de cada haplótipo para o sequenciamento, de forma a permitir a avaliação da variabilidade genética intrínseca dos haplótipos observados. As amostras contendo fragmentos amplificados da região ITS do rDNA foram enviadas à equipe do Dr. Ricardo Harakava do Instituto Biológico – IB da Universidade de São Paulo – USP, onde foram seqüenciadas. As seqüências foram contrastadas com os depósitos do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), por meio do *Blast_n*, a fim de que fossem encontradas seqüências semelhantes. De posse de todas as seqüências, foi feito um alinhamento seguido da construção de árvores filogenéticas, utilizando o programa *ClustalX*, BioEdit e Tree View pelo método de *neighbor-joining* com *bootstrap* de 1000 repetições.

2.2.3 Resultados e discussão

2.2.3.1 Análise morfológica

Os isolados foram separados em grupos morfológicos e grupos de crescimento, conforme sua coloração e taxa de crescimento micelial *in vitro*. Com relação à coloração micelial, os 282 endófitos analisados apresentaram grande variabilidade, muito embora os grupos morfológicos tenham sido classificados segundo as tonalidades branco, cinza, amarelo, preto, verde, marrom, vermelho, rosa e alaranjado, segundo a cor predominante (Figura 2). Fungos brancos e cinza perfizeram a metade do total de isolados.

Fungos de crescimento lento *in vitro* predominaram em quantidade de isolados resgatados dos tecidos de cacau, totalizando 53,8% dos isolados analisados, possivelmente devido ao fato de não encontrarem no meio sintético as mesmas condições nutricionais presentes no interior da planta hospedeira. Fungos de crescimento rápido totalizaram 33,8% e os demais, de taxa de crescimento intermediário, 12,4%. Embora tenham sido predominantes, os isolados de crescimento lento não necessariamente se encontram em maior número sob condições naturais, ou seja, no interior do hospedeiro em campo.

Figura 2 – Distribuição dos grupos morfológicos de endófitos de cacau segundo a frequência desses isolados dentro das classes de coloração micelial. Legenda: (I) isolados brancos; (II) isolados cinzas; (III) isolados amarelos; (IV) isolados pretos; (V) isolados verdes; (VI) isolados marrons; (VII) isolados vermelhos; (VIII) isolados róseos; (IX) isolados alaranjados

Muito provavelmente, esses fungos apresentam outras habilidades que não são expressas *in vitro*, que permitam a eles, no hospedeiro, competir em igualdade com os outros fungos, de crescimento rápido. Essa seria uma hipótese a ser considerada, uma vez que, por estarem em maior número, é observado seu sucesso na colonização do hospedeiro, face aos concorrentes de maior velocidade de crescimento. Segundo Carroll (1995), fungos de crescimento rápido irão predominar em todas as situações, porém, muito pouco se sabe sobre o comportamento competitivo das espécies dentro do hospedeiro e na presença de outras espécies de microrganismos. Além disso, fungos mais frequentemente isolados não são necessariamente os colonizadores primários. Alguns gêneros são comuns em plantas de clima temperado e tropical, tais como *Fusarium*, *Phomopsis*, *Phoma* e outros predominam em hospedeiros tropicais, como é o caso de *Xylaria*, *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Phyllosticta* e *Pestalotiopsis* (SCHULZ; BOYLE, 2005). Os conídios do isolado 42.3 observados em microscópio óptico (Figura 3), puderam ser classificados em macro e microconídios, tipicamente característicos do gênero *Fusarium*. Martins (2005) também caracterizou morfologicamente isolados de *Fusarium sp.*, os quais são muito semelhantes aos observados nesse trabalho. Naturalmente, poderia ter sido feita a amplificação das regiões ITS do rDNA seguido de sequenciamento. Porém, esse isolado não foi amplificado facilmente, impossibilitando a identificação do isolado por sequenciamento.

2.2.3.2 Análise molecular

A amplificação de regiões ITS1, 5.8S e ITS2 do rDNA gerou um fragmento de aproximadamente 600 pb para ascomicetos e 750 pb para basidiomicetos (Figura 4). Foi observado, por meio desta análise que, dentre os 132 isolados analisados, há uma predominância de endófitos ascomicetos em cacauero.

Dentre as espécies consideradas potencialmente patogênicas para *T. cacao* (*Ceratocystis fimbriata*, *Phytophthora palmivora*, *Moniliophthora roreri* e *Crinipellis perniciososa*), apenas um isolado de *C. perniciososa* foi observado na comunidade avaliada. Esse basidiomiceto representa a espécie mais danosa aos cacaueros na região da Bahia, por ser o agente causal da vassoura de bruxa. Porém, esse isolado foi obtido de uma planta sem sintomas desta doença, indicando forte possibilidade de realmente ser um fungo endofítico ou um isolado hipovirulento. Lana (2004),

discute em seu trabalho a possibilidade de que isolados resgatados de tecidos sadios de cacauero, possam ser, na realidade, formas latentes do patógeno, uma vez que, a partir de análises moleculares de variabilidade genética, esse autor não encontrou diferenças entre isolados considerados endofíticos e patogênicos. Martins (2005), fez análise de ITS, ARDRA e sequenciamento para diferenciação de isolados patogênicos e endofíticos de *Fusarium* spp., isolados os de vários hospedeiros, não encontrando correlação entre os dois caracteres.

Figura 3 - Conídios de *Fusarium* sp. (isolado 42.3), observados em microscópio óptico. Em (A), conídios observados em aumento de 400X; em (B), conídios observados em aumento de 1000X. As setas vermelhas indicam os macroconídios e as setas brancas indicam os microconídios

No presente trabalho, foram observados 26 espécies, distribuídas em 18 gêneros de fungos: *Aschersonia*, *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Cordyceps*, *Crinipellis*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Glomerella*, *Lasiodiplodia*, *Myrothecium*, *Nectria*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Podospora*, *Pseudofusarium*, *Rhizopycnis* e *Verticillium* (Tabela 2). Rubini et al. (2005) isolaram de cacau, praticamente todos os gêneros também isolados neste trabalho, com exceção de *Aschersonia*, *Glomerella*, *Myrothecium*, *Podospora* e *Crinipellis*, reforçando a idéia de Lana (2004), apresentada anteriormente sobre a hipovirulência de patógenos, que acabam por viver dentro da planta como endófitos.

Figura 4 – Gel de agarose 1% com fragmentos amplificados de regiões ITS de fungos endofíticos de cacau. Legenda: M (marcador molecular de 1Kb – Fermentas), 1 = CM5, 2 = CM49, 3 = CM30, 4 = CM3, 5 = CM83, 6 = CM26, 7 = CM17, 8 = CM4 e 9 = CM18

Tabela 2 – Fungos endofíticos de cacau haplótipos, frequência e procedência

(continua)

<i>Espécies</i>	Haplótipos	Número de isolados	Hospedeiro
<i>Aschersonia sp</i>	10, 12, 21	3	Suscetível
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	7, 4, 12, 36,	7	Catongo resistente
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	59	1	Indeterminado
<i>Cordyceps sobolifera</i>	57, 58, 63	3	Catongo suscetível
<i>Crinipellis pernicioso</i>	5	1	Indeterminado
<i>Diaporthe helianthi</i>	35, 19, 42, 32	4	Catongo resistente Híbrido resistente Resistente
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	11	1	Comum suscetível
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	4, 36, 38	3	Suscetível
<i>Fusarium equiseti</i>	7	1	Híbrido suscetível
<i>Fusarium oxysporum</i>	7, 34, 4, 30	5	Híbrido suscetível Resistente

Tabela 2 – Fungos endofíticos de cacau haplótipos, frequência e procedência

(conclusão)

<i>Espécies</i>	Haplótipos	Número de isolados	Hospedeiro
<i>Fusarium polyphialidicum</i>	37	1	Suscetível
<i>Fusarium sp</i>	4, 10, 4, 2, 7, 56, 3, 12,	9	Catongo resistente Híbrido suscetível Suscetível
<i>Gibberella fujikuroi</i>	28	1	Indeterminado
<i>Gibberella zeae</i>	47	1	Indeterminado
<i>Glomerella cingulata</i>	48, 18, 25, 10,	4	Híbrido suscetível Suscetível
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	7, 51, 1, 12,	10	Catongo suscetível Comum resistente
<i>Myrothecium atroviride</i>	1	1	Indeterminado
<i>Nectria haematococca</i>	2, 26	2	Comum suscetível
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	7	2	Comum suscetível
<i>Phomopsis amygdali</i>	16	1	Indeterminado
<i>Phomopsis columnaris</i>	17, 36, 43	3	Indeterminado
<i>Phomopsis sp</i>	40, 31, 41, 46	4	Catongo resistente
<i>Podospora curvicolla</i>	61	1	Indeterminado
<i>Pseudofusarium purpureum</i>	61	1	Indeterminado
<i>Rhizopycnis vagum</i>	44	1	Indeterminado
<i>Verticillium luteo album</i>	13	1	Indeterminado

A comunidade fúngica endofítica de cacauzeiro foi avaliada por meio da técnica de ARDRA. Para isso, foram utilizadas, inicialmente, as enzimas de restrição *Alu I*, *Bam HI*, *Cla I*, *Hha I*, *Pvu II*, *Kpn I*, *Hinf I* e *Mbo I*, clivando os fragmentos de ITS de seis gêneros diferentes de endófitos de cacau (*Diaporthe*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Verticillium*, *Botryosphaeria* e *Nectria*). Após essa seleção, foram utilizadas somente as enzimas *Hinf I* e *Mbo I*, que forneceram um número maior de bandas polimórficas para os gêneros analisados.

A análise combinada dos perfis de restrição dos fragmentos de ITS dos fungos endofíticos de cacau, obtidos com a utilização das enzimas *Hinf I* e *Mbo I*, gerou 64 diferentes haplótipos (Figura 5), sendo os mais frequentes os haplótipos 4, 7 e 12, com 11, 22 e 12 isolados, respectivamente (Anexo 1 – Tabela 3). Não foi observada relação entre haplótipos e hospedeiros. Torres (2005), encontraram 20 haplótipos diferentes de enterobactérias endofíticas de soja dentre 68 isolados analisados, com a utilização de três enzimas de restrição: *Alu I*, *Hae III* e *Mbo I*, evidenciando a utilidade da técnica para estudo de diversidade em diferentes microrganismos.

Figura 5 – Diferentes haplótipos de ARDRA obtidos por restrição dos fragmentos de ITS, utilizando as enzimas de restrição *Mbo I* e *Hinf I*. Legenda: (M) marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas)

Amostras dos haplótipos foram sequenciadas para identificação das espécies representadas. De acordo com os resultados obtidos, foi observado que os haplótipos 4, 7 e 12 (mais frequentes) abrigaram isolados identificados como *Botryosphaeria/Lasiodiplodia* (haplótipos 4, 7 e 12), *Fusarium* (haplótipos 4, 7 e 12), *Pestalotiopsis* (haplótipo 7) e *Aschersonia* (haplótipo 12). Foi observado que o ARDRA não foi eficiente na separação dos gêneros de fungos endofíticos de cacau, uma vez que foi observada uma grande mistura de gêneros dentro de cada haplótipo e também, fungos de mesmo gênero sendo agrupados separadamente em haplótipos diferentes

(Anexo 1 – Tabela 3), mostrando uma grande diversidade dentro destes haplótipos. Quanto maior o número de enzimas utilizadas na análise, melhor será a análise dos dados. Entretanto o haplótipo 2 foi representado pelas espécies *Fusarium/Nectria*, mostrando que para este grupo, a técnica foi eficiente para a caracterização dos isolados.

Arnold et al. (2003), analisando endófitos de cacau, encontraram grande quantidade de isolados pertencentes aos gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium/Nectria* e *Xylaria*. Pereira; Azevedo e Petrini (1993), por sua vez, isolaram 13 espécies de fungos endofíticos de folhas de *Stylosanthes guianensis*, sendo os gêneros mais abundantes *Phomopsis*, *Xylaria* e *Glomerella*. Assim, a afirmação de Schulz e Boyle (2005) de que os gêneros *Fusarium*, *Phomopsis*, *Phoma*, *Xylaria*, *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Phyllosticta* e *Pestalotiopsis* são comumente isolados de plantas tropicais, confirma os resultados obtidos nesse trabalho, assim como os trabalhos de Arnold et al. (2003) e Pereira; Azevedo e Petrini (1993).

Isolados como *Botryosphaeria rhodina*, *Diaporthe helianthi* e *Phomopsis* sp. parecem ser relacionados a tipos específicos de hospedeiros, uma vez que sete isolados de *B. rhodina* e *Phomopsis* sp. foram isolados apenas de cacaueiro Catongo resistente; os quatro isolados de *D. helianthi*, por sua vez, foram isolados de diferentes tipos de hospedeiro, mas todos exibindo resistência a *C. pernicioso*. Assim, é possível inferir sobre um possível papel desses fungos no aumento de resistência da planta ao patógeno causador da vassoura de bruxa, quer seja por competição com o patógeno, produção de substâncias antibióticas ou mesmo, induzindo modificações fisiológicas no hospedeiro, tornando os tecidos do hospedeiro inabitáveis para o patógeno. Também, há a possibilidade de que estas espécies foram capazes que colonizar plantas resistentes a *C. pernicioso*.

As 113 seqüências das regiões ITS do rDNA dos fungos endofíticos de cacau foram confrontados com o banco de dados do *GenBank*, por meio do *Blast_n*. A pesquisa no *Blast_n* fornece uma lista de organismos cujas seqüências mais se assemelham àquela seqüência confrontada, fornecendo a porcentagem de bases semelhantes entre os dois organismos e o quão confiável é a correlação entre o isolado confrontado e aquele semelhante, depositado no banco de dados (ALTSCHUL et al., 1997).

Os resultados de confrontação variaram de 90 a 99% de similaridade de bases das seqüências pesquisadas, o que infere boa confiabilidade.

Assim, foi possível inferir sobre a possível identidade dos isolados endofíticos utilizados neste trabalho, bem como as relações de um e outro isolado entre si, por meio da construção de

árvores se similaridade. Como foram obtidas várias seqüências, para fins didáticos, os isolados foram separados em quatro grupos para construção das árvores de similaridade, segundo a frequência: *Fusarium/Nectria* (Figura 6), *Lasiodiplodia/Botryosphaeria* (Figura 7), *Phomopsis/Diaporthe* (Figura 8) e “Diverso” (Figura 9), este último, agrupando isolados pouco freqüentes dentro da comunidade endofítica de cacau.

Assim como não foi possível estabelecer associação entre os haplótipos de ARDRA e as espécies, da mesma forma, no sequenciamento, não foi possível associar os diferentes agrupamentos das árvores filogenéticas com o hospedeiro, para todos os grupos de endófitos.

Foi observado que, quanto maior a similaridade entre os isolados, mais difícil a interpretação dos agrupamentos obtidos, como foi verificado para os grupos *Fusarium/Nectria*, *Lasiodiplodia/Botryosphaeria* e *Phomopsis/Diaporthe*. Por outro lado, o agrupamento dos isolados do grupo “Diversos” foram bastante coerentes, sendo que cada organismo e seu padrão do banco de dados foram agrupados juntos.

Figura 7 – Árvore filogenética mostrando a relação entre fungos endofíticos de cacau (Gêneros *Lasiodiplodia*/*Botryosphaeria*) e outras espécies de fungos. A árvore foi construída baseada em fragmentos de sequências de rDNA (ITS1, 5,8S and ITS2), utilizando o método de *neighbor-joining*. Uma análise de *bootstrap* foi feita com 1000 repetições.

Figura 8 – Árvore filogenética mostrando a relação entre fungos endofíticos de cacau (Gêneros *Phomopsis*/*Diaporthe*) e outras espécies de fungos. A árvore foi construída baseada em fragmentos de sequências de rDNA (ITS1, 5,8S and ITS2), utilizando o método de *neighbor-joining*. Uma análise de *bootstrap* foi feita com 1000 repetições.

Figura 9 – Árvore filogenética mostrando a relação entre fungos endofíticos de cacau (Gêneros Diversos) e outras espécies de fungos. A árvore foi construída baseada em fragmentos de sequências de rDNA (ITS1, 5,8S and ITS2), utilizando o método de *neighbor-joining*. Uma análise de *bootstrap* foi feita com 1000 repetições.

2.3 Considerações finais

De acordo com os resultados obtidos, podemos considerar que:

- ❑ o isolamento de microrganismos endofíticos é uma técnica útil para a recuperação de microrganismos endofíticos de tecidos vegetais, facilitando o estudo das comunidades presentes na planta em estudo;
- ❑ a diversidade morfológica e molecular observada para os isolados de fungos endofíticos de cacau é considerável. Foram encontrados 9 grupos morfológicos e 64 haplótipos na análise da diversidade da comunidade de fungos endofíticos de cacau;
- ❑ o ARDRA não foi eficiente para a separação coerente de haplótipos e para a correlação entre haplótipo e hospedeiros. Porém, foi observado que algumas inferências podem ser feitas, quando se associam os resultados obtidos para espécies x hospedeiro;
- ❑ o sequenciamento permite inferir sobre a possível espécie a que pertence o segmento de DNA analisado, constituindo em ferramenta útil para o estudo de diversidade genética.

Referências

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRA, J.; LACAVA, P. T. **Manual**: isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: Calq, 2002. 86p.
- ARNOLD, A. E.; MEJÍA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 26, p. 15649-15654, 2003.
- ARRUDA, M. C. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; MILLER, R. N. G.; RESENDE, M. L. V.; FELIPE, M. S. S. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis pernicioso* from different geographic origins and hosts. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, p. 25-37, 2003a.
- ARRUDA, M. C. C.; MILLER, R. N. G.; FERREIRA, M. A. S. V.; FELIPE, M. S. S. Comparison of *Crinipellis pernicioso* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, p. 236-244, 2003b.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Ed.). **Fungi**: Multifaceted Microbes, New Delhi: Anamaya Publishers, 2006. No prelo.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI Jr., W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 3, p. 40-65, 2000.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Coord.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa, 1998. cap. 4, p. 117-138.
- BERNSTEIN, M. E.; CARROLL, G. C. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 55, p. 644-653, 1977.
- BOYLE, C.; GOTZ, M.; DAMMANN-TUGEND, U.; SCHULZ, B. Endophyte-host interactions III. Local vs. systemic colonization. **Symbiosis**, Rehovot, v. 31, p. 259-281, 2001.

CARROLL, G. Forest endophytes: pattern and process. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. S1316-S1324, 1995.

CHAMBERS, S. M.; LIU, G.; CAIRNEY, J. W. G. ITS rDNA sequence comparison of ericoid mycorrhizal endophytes from *Woollsia pungens*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 168-174, 2000.

CLAY, K.; MARKS, S.; CHEPLICK, G. P. Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. **Ecology**, Brooklin, v. 74, p. 1767-1777, 1993.

FISHER, P. J.; ANSON, A. E.; PETRINI, O. Antibiotic activity of some endophytic fungi from *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. **Botanica Helvetica**, v. 96, p.37-41, 1986.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia – Diagnóstico e análise de variabilidade. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 14, p. 12-16, 2000. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/>>. Acesso em: 14 nov. 2005.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Aplicações da PCR em Ecologia Molecular. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Coord.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa, 1998, cap. 8, p. 205-228.

GROPPE, K. STEINGER, T.; SANDERS, I.; SCHMID, B.; WIEMKEN, A.; BOLLER, T. Interaction between the endophytic fungus *Epichloe bromicola* and the grass *Bromus erectus*: effects of endophyte infection, fungal concentration and environment on grass growth and flowering. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, p. 1827-1835, 1999.

KUKLINSKY-SOBRAL, J. K. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta**. 2003. 174p. Tese (Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, The Hague, v. 273, p. 91-99, 2005.

LANA, T. G. **Caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis pernicioso***. 2004. 91p. Tese (Doutor em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

MARTINS, M. K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium spp.* e estudo da interação com a planta hospedeira**. 2005. 110p. Tese (Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

OLIVEIRA, V. C.; COSTA, J. L. S. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 631-634, 2002.

OSBOURN, A. Host-microbe interactions: molecular intimacy exposed: probing plant-fungus interactions. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.4, p. 363-364, 2001.

PEIXOTO-NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biотecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, 2002. Disponível em: <<http://www.biотecnologia.com.br/revista/bio29/micro.asp>>. Acesso em: 14 nov. 2005.

PELÁEZ, F.; COLLADO, J.; ARENAL, F.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; DÍEZ-MATAS, M. T.; GARCÍA, J. B.; GONZALEZ DEL VAL, A.; GONZÁLEZ, V.; GORROCHATEGUI, J.; HERNANDEZ, P.; MARTÍN, I.; PLATAS, G.; VICENTE, F. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, p. 755-761, 1998.

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycologia**, Lancaster, v. 85, p. 362-364, 1993.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 17-20, 1985.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v. 1, p. 24-33, 2005.

SAIKI, R. K.; SCARF, S.; FALOONA, F. A.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v. 230, p.1350-1354, 1985.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, p. 661-686, 2005.

TORRES, A. R. **Diversidade genética de enterobactérias endofíticas de diferentes hospedeiros e colonização de *Catharantus roseus* por endófitos expressando o gene *gfp***. 2005. 137p. Tese (Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

VARMA, A.; VERMA, S.; SAHAY, S. N.; BUTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2741-2744, 1999.

ANEXO 1

Tabela 3 – Descrição dos haplótipos definidos por ARDRA, segundo espécies, hospedeiro e isolado de fungos endofíticos de cacau

(continua)

Haplotipo	Espécies	Hospedeiro	Isolado
1	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	indeterminado	60C
1	<i>Myrothecium atroviride</i>	indeterminado	62A
2		catongo resistente	6
2		indeterminado	56.1
2	<i>Fusarium sp.</i>	indeterminado	21.1
2	<i>Nectria haematococca</i>	comum suscetível	13.2
3		suscetível	25.4
3	<i>Fusarium sp.</i>	suscetível	24.2
4		híbrido suscetível	49.3
4		híbrido suscetível	49.4
4		indeterminado	35.4
4		suscetível	23.1
4	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	indeterminado	80B
4	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	indeterminado	31.6
4	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	indeterminado	35.5
4	<i>Fusarium chlamydosporum</i> var. <i>fuscum</i>	indeterminado	42.4
4	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>sp. melonis</i>	resistente	44.1
4	<i>Fusarium sp.</i>	catongo resistente	45.2
4	<i>Fusarium sp.</i>	híbrido suscetível	53.3
5		indeterminado	54.1
5	<i>Crinipellis perniciosa</i>	indeterminado	90A
6		híbrido resistente	5
7		híbrido suscetível	49.2
7		indeterminado	58C
7		indeterminado	58D
7		indeterminado	58E
7		indeterminado	58F

Tabela 3 – Descrição dos haplótipos definidos por ARDRA, segundo espécies, hospedeiro e isolado de fungos endofíticos de cacau

(continuação)

Haplotipo	Espécies	Hospedeiro	Isolado
7		indeterminado	86B
7		indeterminado	37.4
7		indeterminado	56.2
7	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	catongo resistente	9
7	<i>Fusarium equiseti</i>	híbrido suscetível	53.2
7	<i>Fusarium oxysporum</i>	indeterminado	36.3
7	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	híbrido suscetível	49.1
7	<i>Fusarium</i> sp.	indeterminado	37.6
7	<i>Fusarium</i> sp.	indeterminado	55.1
7	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	catongo suscetível	32.2
7	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	comum resistente	52.1
7	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	indeterminado	58B
7	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	indeterminado	59B
7	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	indeterminado	58A
7	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	indeterminado	55.3
7	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	comum suscetível	41.2
7	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	indeterminado	37.2
8		híbrido resistente	48.1
9		indeterminado	59A
9		indeterminado	83A
9		indeterminado	85A
9		indeterminado	96A
10	<i>Aschersonia</i> sp.	indeterminado	55.5
10	<i>Fusarium</i> sp	catongo resistente	12
10	<i>Glomerella cingulata</i>	suscetível	25.2
11	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	comum suscetível	13.1
12		catongo suscetível	32.4

Tabela 3 – Descrição dos haplótipos definidos por ARDRA, segundo espécies, hospedeiro e isolado de fungos endofíticos de cacau

(continuação)

Haplotipo	Espécies	Hospedeiro	Isolado
12		indeterminado	70D
12		indeterminado	86 ^A
12		indeterminado	88B
12		indeterminado	91C
12		indeterminado	92 ^A
12	<i>Aschersonia sp.</i>	suscetível	19.4
12	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	indeterminado	76C
12	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	indeterminado	21.5
12	<i>Fusarium sp.</i>	suscetível	24.1
12	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	indeterminado	82E
12	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	indeterminado	36.4
13	<i>Verticillium úteo-album</i>	indeterminado	31.2
14		indeterminado	73B
15		indeterminado	94 ^A
16		indeterminado	72C
16	<i>Phomopsis amygdali</i>	indeterminado	33.5
17		indeterminado	79B
17		indeterminado	81 ^A
17		indeterminado	81B
17		indeterminado	20.4
17	<i>Phomopsis columnaris</i>	indeterminado	31.5
18		híbrido suscetível	30.2
18	<i>Glomerella cingulata</i>	indeterminado	42.1
19	<i>Diaporthe helianthi</i>	híbrido resistente	8
21		indeterminado	31.4
21	<i>Aschersonia sp.</i>	indeterminado	75 ^A
22		indeterminado	71B

Tabela 3 – Descrição dos haplótipos definidos por ARDRA, segundo espécies, hospedeiro e isolado de fungos endofíticos de cacau

(continuação)

Haplotipo	Espécies	Hospedeiro	Isolado
23		indeterminado	73C
24		indeterminado	71 ^A
25	<i>Glomerella cingulata</i>	indeterminado	40.4
26	<i>Nectria haematococca</i>	indeterminado	80C
27		indeterminado	60D
28	<i>Gibberella fujikuroi</i>	indeterminado	91D
29		indeterminado	33.4
30	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>Sp. Vasinfectum</i>	indeterminado	94B
31	<i>Phomopsis</i> sp.	indeterminado	33.1
32	<i>Diaporthe helianthi</i>	resistente	44.3
33	<i>Pseudofusarium purpureum</i>	indeterminado	20.1
34	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>Sp. Melonis</i>	indeterminado	55.2
35		catongo resistente	45.3
35	<i>Diaporthe helianthi</i>	catongo resistente	45.4
36		indeterminado	42.3
36	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	resistente	39.1
36	<i>Fusarium chlamydosporum</i> var. <i>fuscum</i>	indeterminado	38.1
36	<i>Phomopsis columnaris</i>	indeterminado	35.6
37		suscetível	19.1
37	<i>Fusarium polyphialidicum</i>	suscetível	19.2
38	<i>Fusarium chlamydosporum</i> var. <i>fuscum</i>	suscetível	25.1
39		indeterminado	22.1
40	<i>Phomopsis</i> sp.	catongo resistente	45.1
41	<i>Phomopsis</i> sp.	indeterminado	69C
42	<i>Diaporthe helianthi</i>	indeterminado	93B
43	<i>Phomopsis columnaris</i>	suscetível	19.3
44		híbrido resistente	2

Tabela 3 – Descrição dos haplótipos definidos por ARDRA, segundo espécies, hospedeiro e isolado de fungos endofíticos de cacau

(conclusão)

Haplotipo	Espécies	Hospedeiro	Isolado
44	<i>Rhizopycnis vagum</i>	indeterminado	82D
45		indeterminado	20.5
46	<i>Phomopsis sp.</i>	indeterminado	18.1
47	<i>Gibberella zeae</i>	indeterminado	22.3
48	<i>Glomerella cingulata</i>	híbrido suscetível	30.3
49		comum suscetível	41.1
51		indeterminado	46.2
51	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	comum resistente	52.4
52		indeterminado	69A
53		indeterminado	17.1
53		indeterminado	17.2
54		indeterminado	40.1
55		indeterminado	83B
56		comum resistente	28.1
56	<i>Fusarium sp.</i>	indeterminado	20.3
57	<i>Cordyceps sobolifera</i>	catongo suscetível	32.1
58	<i>Cordyceps sobolifera</i>	indeterminado	43.3
59		indeterminado	88C
59	<i>Colletotrichum gloeosporioides f. sp. aeschynomene</i>	indeterminado	36.2
60		indeterminado	43.1
61	<i>Podospora curvicolla</i>	indeterminado	72B
62		indeterminado	82C
63		indeterminado	80A
63	<i>Cordyceps sobolifera</i>	indeterminado	87B
64		indeterminado	87C

3 POTENCIAL DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CACAU COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO DE *Crinipellis pernicioso* E OUTROS FITOPATÓGENOS

Resumo

Atualmente, a produção agrícola tem aumentado consistentemente, resultando em um aumento significativo da utilização de agroquímicos para o controle de pragas e doenças. Entretanto, a aplicação excessiva de agroquímicos pode ser nociva aos seres humanos e ao ambiente. Assim, a seleção de agentes de controle biológico pode resultar em uma alternativa mais efetiva e menos danosa. A seleção de microrganismos aptos a interagir antagonisticamente com pragas ou patógenos, suprimindo seu desenvolvimento é interessante, mas é desejável que o antagonista seja isolado do mesmo ambiente onde a doença ou praga ocorra. Assim, o controle biológico mediado por endófitos é uma excelente estratégia, uma vez que os endófitos ocupam os mesmo nicho que fitopatógenos, sugerindo adaptação e aptidão para competir por alimento e espaço no mesmo ambiente. Assim, o objetivo desse trabalho foi selecionar fungos endofíticos antagonistas a *C. pernicioso*. Foi observado que dentre 145 isolados avaliados, 38,6% foram classificados como antagônicos, enquanto 13,1% foram classificados como parasitas. Após a seleção, os isolados foram utilizados para extração de metabólitos secundários e outras análises. Também foi feita a detecção do gene da δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valin (ACV), que é precursora das β -lactamas, antibióticos como as penicilinas e cefalosporinas. A amplificação desse gene gerou um fragmento de 600 pb em 9,1% dos isolados avaliados. Alguns isolados foram avaliados contra fungos fitopatogênicos (*Colletotrichum falcatum*, *C. sublineorum*, *Erythricium salmonicolor*, *Rhizoctonia solani*, *Ceratocystis paradoxa*, *Phytophthora* sp., *P. parasitica*, *P. palmivora* e *Fusarium moniliforme*). Apenas *C. sublineorum* de sorgo e *Ceratocystis paradoxa* de cana-de-açúcar foram inibidos *in vitro* pelos endófitos 42.3 e 2, respectivamente. A exploração dos microrganismos endofíticos como agentes potenciais para o controle biológico é promissora, não apenas para o uso destes como inoculo no campo, mas também, como uma fonte de novas drogas para o desenvolvimento de estratégias de controle seguras.

Palavras-chave: Controle biológico, fungos endofíticos, fitopatógenos.

POTENTIAL OF COCOA ENDOPHYTIC FUNGI AS BIOLOGICAL CONTROL AGENTS FOR *Crinipellis pernicioso* AND OTHER PHYTOPATHOGENS

Abstract

Nowadays, the agricultural production has to increase consistently resulting in significant increase in utilization of agrochemicals for pest and disease control. However, the excessive application of agrochemicals may be harmful to human being and to the environment. Therefore, the selection of biological control agents could result in a more effective and less dangerous alternative. The selection of microorganisms able to interact antagonistically with pest or pathogen, suppressing its development is interesting, but it is desirable that the antagonist has been isolated from the same environment where the disease or pest occurs. So, biological control mediated by endophytes is an excellent strategy, once endophytes occupy the same ecological niche of the phytopathogens, suggesting adaptation and aptitude to compete for food and space in the same environment. So, the objective of this work was to select endophytic fungi antagonists to *C. pernicioso* *in vitro*. It was observed that in 145 evaluated isolates, 38.6% were classified as antagonistic, while 13.1% were classified as parasitic. After the selection, isolates were used for secondary metabolites extraction and further characterization. Also, detection of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine (ACV) gene, which is the precursor of β -lactams, antibiotics like penicillins and cephalosporins, was carried out. The amplification of this gene generated a fragment of 600pb in % of the isolates evaluated. Some isolates were further evaluated against phytopathogenic fungi (*Colletotrichum falcatum*, *C. sublineorum*, *Erythricium salmonicolor*, *Rhizoctonia solani*, *Ceratocystis paradoxa*, *Phytophthora* sp., *P. parasitica*, *P. palmivora* and *Fusarium moniliforme*). Only *C. sublineorum* of sorghum and *Ceratocystis paradoxa* of sugarcane were *in vitro* inhibited by the endophytes 42.3 and 2, respectively. The exploration of endophytic microorganisms as potential agents for biological control is promising, not only for using these microorganisms as inoculum in field, but also as source of new drugs for development of a safe control strategy.

Keywords: Biological control, endophytic fungi, phytopathogens

3.1 Introdução

O controle biológico para a agricultura é uma vasta área a ser explorada, uma vez que os agentes de controle de doenças e pragas geralmente são os microrganismos. Dado o relativamente pequeno número de espécies catalogadas, ainda existem muitas bactérias e principalmente fungos a serem descobertos. Dentro desse imenso universo de possibilidades, certamente existem muitos potenciais agentes ainda à espera de descrição. Este capítulo trata, basicamente, dos passos iniciais para a busca de novos agentes de controle biológico para fitopatógenos. A espécie *Theobroma cacao* L. foi utilizado como hospedeiro, cuja comunidade endofítica residente foi analisada quanto ao potencial para inibir algumas espécies de fitopatógenos, dando ênfase a *Crinipellis perniciosa*, o agente causal da doença de maior importância do cacau no Brasil: a vassoura de bruxa. Ainda não existem métodos isolados e eficazes contra essa doença, sendo a principal alternativa o manejo integrado, onde duas ou mais técnicas são empregadas em conjunto, para um melhor resultado e menores perdas nas lavouras de cacau. O controle biológico vem ganhando muito interesse no campo científico, onde se observa um aumento gradativo nos grupos de pesquisa interessados e aplicados a ensaiar novos agentes de biocontrole. Os ensaios, tendo em vista normas de biossegurança, são demorados, mas mesmo assim, já existem vários produtos à base de microrganismos sendo comercializados para fins de controle biológico de diferentes patógenos de culturas. Para a cultura do cacau, seria interessante o emprego de agentes microbianos de controle, uma vez que os elevados custos com agroquímicos e mão de obra para o controle cultural torna, muitas vezes, a atividade pouco lucrativa. Os ensaios descritos neste capítulo tiveram início em março de 2002 e conclusão em dezembro de 2005, tendo por natureza, trabalhos exclusivamente laboratoriais, com análises e resultados obtidos *in vitro*. Foi seguido o seguinte roteiro de análises: 1) caracterização de isolados de *C. perniciosa* quanto ao crescimento micelial e viabilidade; 2) seleção de fungos endofíticos de cacau antagonistas a *C. perniciosa*; 3) extração de metabólitos secundários; 4) inibição de fitopatógenos por endófitos de cacau; 5) amplificação de um gene de ACV, relacionado à biossíntese de antibióticos do grupo das cefalosporinas e das penicilinas.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Revisão bibliográfica

Fungicidas são amplamente utilizados na agricultura, por fornecerem uma resposta rápida no controle de doenças causadas por diversas espécies de fungos fitopatogênicos, em diferentes e importantes culturas no mundo. Essa característica de resposta a curto prazo, tem contribuído de forma significativa com os altos índices de utilização desses controladores químicos por produtores rurais, se comparado a outras alternativas disponíveis. Apesar da alta eficiência dos fungicidas, bem como sua rápida reposta, é de conhecimento geral que os fungicidas oferecem riscos à saúde, à qualidade das águas superficiais e subterrâneas (MELO, 1998), ao ambiente de forma geral, além do risco de desencadear o desenvolvimento de genótipos resistentes.

O desenvolvimento de técnicas alternativas, tais como o controle biológico de pragas e doenças por microrganismos, pode ser uma estratégia bem interessante e eficiente. No contexto do controle biológico, doença é mais do que uma íntima interação com o hospedeiro, influenciada pelo ambiente: é o resultado de uma interação entre hospedeiro, patógeno e diversos não patógenos que habitam o sítio de infecção e que apresentam potencial para limitar a atividade do patógeno ou aumentar a resistência do hospedeiro (COOK; BAKER, 1983).

Assim, a mais simples e direta definição de controle biológico de doenças de plantas como sendo o controle de um microrganismo por meio de outro microrganismo é aceita por uma corrente de fitopatologistas (BETTIOL; GHINI, 1995). Esse controle, geralmente é um resultado de interações antagonicas, tais como antibiose, competição, indução de defesa e parasitismo.

A antibiose é definida como a interação entre organismos na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm efeito danoso sobre o outro, enquanto que parasitismo é usado em referência à situação em que um microrganismo vive sobre e alimenta-se de outro. Os hiperparasitas atacam hifas e estruturas de reprodução e sobrevivência dos patógenos de plantas, reduzindo a infecção e o inóculo dos mesmos (BETTIOL; GHINI, 1995).

O controle biológico de fitopatógenos pode ser alcançado por meio de práticas de manejo para favorecer antagonistas nativos e também por meio da introdução de microrganismos selecionados. Segundo Melo (1998), muitos fungos e bactérias inibem fitopatógenos competindo por nutrientes, parasitando diretamente e/ou produzindo metabólitos secundários (enzimas líticas e antibióticos). Alguns biopesticidas à base de fungos e bactérias já se encontram no mercado (Tabela 4), disponíveis em formulações para o controle biológico de fitopatógenos.

Tabela 4 – Alguns biopesticidas disponíveis comercialmente para controle de doenças de plantas

Organismo	Produto	Organismo-alvo	Fabricante
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> ¹	Polygandron	<i>Gaeumanomyces graminis</i> (agente do mal do pé do trigo);	Monsanto, St. Louis, MO
<i>Peniophora gigantea</i>			
<i>Phytium oligandrum</i> ²		<i>Heterobasidium annosus</i> (plantas florestais); <i>Pythium ultimum</i> (beterraba açucareira)	Ecological Labs
<i>Trichoderma harzianum</i>	BINAB-T	<i>Verticillium malthousei</i> e fungos causadores de podridões de madeira	Bio-Inovation, Eastman Kodak
<i>Trichoderma harzianum</i> ³	F-Stop	<i>Heterobasidium annosus</i> e	Bio Inovation, Eastman
	Trichodex	doenças causadas por	Kodak
	Supravit	<i>Rhizoctonia spp.</i> , <i>Pythium spp.</i> ; <i>Fusarium spp.</i> ; <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i>	
<i>Coniothyrium minitans</i>	Coniothyryn	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em girassol	W. R. Grace

¹ Isolada na Universidade do Estado de Washington (WELLER; COOK, 1983). A Companhia Monsanto recebeu aprovação do governo americano para testar uma nova linhagem recombinante contendo o gene *lac ZY* que facilita o monitoramento dele no ambiente (DRAHOS; HEMMING; McPHERSON, 1986)

² Registrado para uso na Rússia e também comercializado na República Tcheca

³ Registrado para uso em Israel

Fonte: Melo, 1998 (modificado)

Segundo Herr (1995), a efetividade do controle biológico está diretamente relacionada à efetiva colonização da planta pelo fungo, ou seja, na competência da colonização dos tecidos do hospedeiro, onde também deve estar presente o patógeno que se pretende controlar. Apresentando maior competência de colonização, o antagonista pode exibir maior sucesso na inibição do patógeno. Além desse fator, a combinação de dois ou mais agentes de biocontrole compatíveis e apresentando diferentes atributos pode ser benéfica e eficaz para o controle da doença.

No trabalho de Krauss e Soberanis (2002), por exemplo, os autores testaram a eficiência de vários antagonistas, visando obter uma mistura ideal para o controle de três dos principais fitopatógenos do cacau: *Moniliophthora roreri* (monilíase), *Crinipellis perniciosa* (vassoura de bruxa) e *Phytophthora palmivora* (podridão parda). Os autores testaram misturas de cinco isolados de *Clonostachys rosea* (= *Gliocladium roseum*), dois de *Trichoderma* sp., um de *T. longipilis* e um de *T. viride*. De uma forma geral, a mistura com cinco isolados de *C. rosea* foi mais eficiente, uma vez que resultou em um aumento de produção absoluta de frutos de 16,7%. Os isolados de *Trichoderma*, não bastasse sua incompatibilidade com os outros isolados na mistura, foram bastante eficientes para *M. roreri*, mas não para *C. perniciosa*. Por esse motivo, a mistura foi composta apenas por *C. rosea*, que foi eficiente para os três fitopatógenos de cacau. Esse trabalho exemplifica bem a complementariedade que pode existir entre potenciais biocontroladores, visando um resultado melhor e mais efetivo.

Trichoderma spp. é o principal gênero de hiperparasita de fungos relatado na literatura. Sua atividade parasítica abrange várias espécies de fitopatógenos. Na cultura do cacau (BASTOS, 2000; PEIXOTO-NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; SANOGO et al. 2002) e do cupuaçu (BASTOS, 2004), o fungo tem sido utilizado em restos de ramos doentes para o controle do fungo *C. perniciosa* no campo, uma vez que o hiperparasita é capaz de colonizar os ramos infectados e impedir a frutificação do patógeno. Marco et al. (2000), afirmam que esse controle se dá por meio da produção de enzimas, principalmente quitinases e proteases. Um novo gene de quitinase (*chit 36*) de *Trichoderma* foi descrito por Viterbo et al. (2001), o qual apresenta atividade antifúngica sobre *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani* de algodão, sendo a interação de *Trichoderma* com os dois últimos, analisado por Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET por Elad et al. (1983). Além dos trabalhos citados, existem vários outros envolvendo estudos acerca da capacidade de *Trichoderma* spp. no controle biológico de fitopatógenos (BELL; WELLS; MARKHAM, 1982; BASTOS, 1988, 1992, 1996; INBAR; MENENDEZ; CHET, 1996; AZEVEDO; MARCO; FELIX, 2000; SAMUELS et al. 2000; MARCO; FELIX, 2002; HOWELL, 2003; MARCO; VALADARES INGLIS; FELIX, 2004).

Além de enzimas, outras substâncias com efeito inibitório sobre fungos fitopatogênicos têm sido descritas. Neste contexto, Walters et al. (2004) observaram a ação de ácidos graxos (linolênico, linoléico, oléico e erúico) na inibição de fungos fitopatogênicos (*Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Pyrenophora avenae* e *C. perniciosa*), enquanto Liu et al. (2001), estudaram a inibição de fitopatógenos por endófitos isolados de *Artemisia annua*, encontrando potentes

inibidores de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia cerealis*, *Phytophthora capsici*, *Helminthosporium sativum* e *Gerlachia nivalis*, sem, no entanto, analisar a natureza química do composto ativo. Herr (1995) verificaram que *Rhizoctonia* binucleados são usados para controlar doenças causadas por *R. solani* em uma variedade de hospedeiros.

O pareamento de duas culturas em laboratório é uma técnica muito utilizada para avaliar a inibição de um organismo por outro, quer seja por liberação de metabólitos no meio de cultura, ou pela liberação de compostos voláteis. Esses organismos pareados podem ser o hospedeiro e o endófito, ou o patógeno e o endófito: ambas as combinações geralmente fornecem resultados confiáveis. Um aspecto interessante do pareamento de culturas foi obtido por Peters et al. (1998), onde os metabólitos produzidos e liberados no meio pelo calo do hospedeiro resultaram em respostas de crescimento positivo dos endófitos (aumento de biomassa e crescimento em direção ao calo), sugerindo sinalização quimiotática. Os autores também sugerem que os endófitos não são meros oportunistas e sim, que ocorreu uma adaptação entre endófitos e hospedeiros durante o processo evolutivo. Schulz e Boyle (2005) confirmam que o crescimento do fungo correlaciona positivamente com a compatibilidade ao hospedeiro.

Dos metabólitos secundários produzidos por endófitos, 94% não são hospedeiro-específicos (SCHULZ, 1999) e têm um papel importante nas interações entre fungos e seus hospedeiros, tais como sinalização, defesa e regulação da simbiose. Além disso, geralmente não são produzidos em concentrações adequadas ao controle da doença, mas possuem um papel na interação com seus hospedeiros ou uma significância ecológica (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Segundo Peters et al. (1998), tanto endófitos quanto hospedeiros secretam metabólitos tóxicos no meio de cultura visando atingir seu respectivo parceiro. A proporção de interações negativas, tais como competição, inibição ou antagonismo, diferem muito com relação ao substrato. Ou seja, isolados que são eficientes inibidores ou competidores em um dado meio podem não ser em outro (Arnold et al., 2003).

Endófitos também podem conferir resistência ao hospedeiro, sendo que duas hipóteses são propostas para explicar o aumento de resistência da planta aos patógenos, mediada por endófitos. A primeira, chamada de “hipótese do composto microbiano” foi proposta por Yue et al. (2000), a qual propõe que os endófitos secretam compostos antifúngicos nas plantas, o que impede que a doença se manifeste por ocasião da infecção. A segunda, chamada de “hipótese da exclusão de

nicho”, foi proposta por Moy et al. (2000) e sugere que quando os endófitos ocupam determinado nicho nas plantas, o mesmo é prevenido da infecção por patógenos.

3.2.2 Principal fitopatógeno do cacauero no Brasil: *Crinipellis perniciosa*

C. perniciosa foi descrito por Stahel em 1915, como *Marasmius perniciosus*. Em 1942, foi transferido para o gênero *Crinipellis* por Singer e, na revisão da sistemática do fungo, foi mantido o binômio *C. perniciosa* (Stahel) Singer (SILVA et al., 2002). Recentemente, novas espécies silvestres relacionadas a *Crinipellis* e *Marasmius* foram descobertas no Japão (TAKAHASHI, 2002).

Diversas denominações foram dadas à doença causada por *C. perniciosa* no cacauero: *krulloten* usada pela primeira vez no Suriname por Stahel, em 1895; *balai de sorcière*, na França; *escoba de bruja* em países de língua espanhola; *witches' broom* em países de língua inglesa; *lagartão* em algumas partes da Amazônia brasileira e *vassoura de bruxa*, de forma geral, no Brasil (SILVA et al., 2002).

C. perniciosa pertence à Classe Basidiomycetes, Família Tricholomataceae, Ordem Agaricales e é hemibiotrófico, ou seja, apresenta duas fases no seu ciclo de vida (FULTON, 1989): a primeira fase (de vassouras verdes) é biotrófica, de crescimento micelial intercelular no tecido do hospedeiro e a segunda fase (de vassouras secas) é saprofítica, de crescimento micelial intracelular (DELGADO; COOK, 1976; EVANS; BASTOS, 1979; PENMAN et al., 2000). Na fase saprofítica, segundo Penman et al. (2000), há incremento da biomassa fúngica, em cerca de duas vezes àquela detectada na fase biotrófica, o qual pode ser explicado pelo aumento da progressão de colonização do micélio, diretamente relacionado ao aumento de biomassa.

É um fungo homotático (DELGADO; COOK, 1976), cujos basidiocarpos desenvolvem-se a partir do micélio dicariótico e saprofítico presente nas vassouras secas (PURDY; SCHMIDT, 1996). É nas lamelas do basidiocarpo que se formam o basidiósporos, que constituem a forma infectiva exclusiva do fungo. Os basidiósporos germinam e penetram apenas os tecidos meristemáticos dentro de seis horas após a liberação. Acredita-se que tecidos maduros impeçam a penetração do tubo germinativo de *C. perniciosa* por possuírem cutícula e por produzirem metabólitos secundários (MUSE et al., 1996).

3.3 Material e métodos

3.3.1 Material biológico

Neste capítulo, foram utilizados isolados de fungos endofíticos de cacau, de *C. perniciosa* e de fitopatógenos de cana, sorgo, citros, mamoeiro, macieira e cacaueiro. Para fins didáticos, na Tabela 5 estão descritos os materiais biológicos utilizados em cada experimento realizado neste capítulo.

3.3.2 Caracterização de *C. perniciosa*

a) Quanto à viabilidade

O experimento foi desenhado com diferentes meios de cultura, luminosidade e diferentes isolados de *C. perniciosa*. Os meios de cultura testados foram o BDA (Biobrás) e V-8 10% (100 mL suco V-8; 15 g de ágar em 1000 mL de água), a luminosidade foi de claro e escuro e os isolados de *C. perniciosa* foram 281 (patogênico) e 31.1 (endofítico). Ambos os meios de cultura tiveram seus pHs ajustados para 6,8.

Cada um dos isolados de *C. perniciosa* foi inoculado em seis placas contendo BDA e seis placas contendo V-8. Destas, três placas contendo *C. perniciosa* endofítico 31.1 e três placas contendo *C. perniciosa* patogênico 281 foram envoltas em papel alumínio. As outras seis placas foram mantidas em exposição à luz ininterruptamente. Todas as placas foram incubadas em estufa BOD a 28°C, sob exposição contínua de luz.

Após cinco dias de incubação, um disco de micélio de 1cm de diâmetro contendo *C. perniciosa* foi retirado de cada placa e inoculado em meio BDA, visando avaliar a viabilidade do micélio. Esse procedimento foi repetido durante quatro meses, com intervalo de 5 dias entre as retiradas de micélio da placa original para avaliação da viabilidade.

Tabela 5 – Isolados utilizados nos ensaios de avaliação de biocontrole de fitopatógenos

Experimento	Organismo	Isolados
Seleção dos antagonistas	Fungos endofíticos de cacau	2, 5, 6, 8, 12, 13.1, 13.2, 17.1, 17.2, 18, 19.1, 19.2, 19.3, 19.4, 20.1, 20.3, 20.4, 20.5, 21.1, 21.4, 22.1, 22.3, 23.1, 23.2, 24.1, 24.2, 25.2, 25.4, 28, 30.1, 30.2, 30.3, 31.2, 31.4, 31.5, 31.6, 32.1, 32.2, 32.4, 33.1, 33.4, 33.5, 35.4, 35.5, 35.6, 36.2, 36.3, 37.2, 37.4, 37.6, 38, 39.1, 39.2, 40.1, 41.1, 41.2, 42.1, 42.3, 42.4, 43.1, 43.3, 43.4, 44.1, 44.2, 44.3, 45.1, 45.2, 45.3, 45.4, 46.1, 46.2, 48, 49.1, 49.2, 49.3, 49.4, 50, 52.1, 52.4, 53.2, 53.3, 54.1, 55.1, 55.2, 55.3, 55.5, 56.1, 56.2, 58A, 58B, 58C, 58D, 58E, 58F, 59A, 60B, 60C, 60D, 62, 63, 64, 67, 68, 69A, 69C, 70D, 71A, 71B, 72B, 72C, 73B, 73C, 74, 75A, 75C, 76A, 76B, 76C, 77, 79B, 80A, 80B, 80C, 81A, 81B, 81E, 81G, 82C, 82D, 82E, 83A, 83B, 83D, 84, 85A, 86B, 87B, 87C, 88B, 90, 91C, 91D, 93A, 93B, 94A, 94B, 94D, 95 e 96.
Caracterização de <i>C. pernicioso</i>	<i>C. pernicioso</i>	281 (patogênico) e 10.1 (endofítico)
Metabólitos secundários	Endófito de cacaueiro	42.3
	<i>C. pernicioso</i>	281
Teste com fitopatógenos	Endófitos de cacaueiro	2, 8, 42.3
	Fitopatógenos	<i>Coletotrichum falcatum</i> , <i>C. sublineorum</i> , <i>Erythricium salmonicolor</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Ceratocystis paradoxa</i> , <i>Phytophthora</i> sp., <i>P. parasitica</i> , <i>P. palmivora</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> e <i>C. pernicioso</i> (281).
Deteção de gene ACV	Endófitos de cacaueiro	18, 19.1, 19.3, 22.1, 35.6, 39.1, 42.4, 30.2, 42.3, 44.3, 90A

b) Quanto ao crescimento micelial

O experimento teve como variáveis o meio de cultura (BDA e V-8), luminosidade (claro e escuro) e diferentes isolados de *C. pernicioso* (281 e 31.1). Cada isolado de *C. pernicioso* foi semeado em 10 placas contendo BDA e 10 placas contendo V-8, sendo que cinco delas foram mantidas no escuro e as outras cinco foram mantidas expostas à luz. Todas as placas foram incubadas em estufa BOD durante 5 dias, a 28°C, sob exposição contínua de luz.

Após quatro dias de incubação, as medidas do crescimento micelial (diâmetro em centímetros) foram tomadas para comparação dos tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3.3 Avaliação do potencial de fungos endofíticos de cacau como agentes de controle biológico de *C. pernicioso*

Cada isolado de fungo endofítico de cacau foi pareado com *C. pernicioso* patogênico (281) em placa de petri contendo meio BDA. Após a inoculação (respeitando a diferença de tempo de crescimento dos fungos pareados), a cultura foi incubada a 28°C de 3 a 7 dias, quando foi verificado se houve ou não antagonismo, comparado aos controles negativos. Os eventos classificados como potenciais exemplos de antagonismo por parasitismo, foram avaliados em culturas pareadas em meio agar-água (1,5%). Para esse teste, os dois isolados antagonísticos foram inoculados na extremidade das placas e incubados a 28°C, até o encontro das duas colônias. No local de encontro das colônias, foi depositada uma gota de corante (lactofenol-cotton blue) e uma lamínula. A interação entre hifas foi observada sob microscopia óptica, em busca de enrolamento entre hifas, nós, estrangulamentos, ou seja, eventos que pudessem estar relacionados a um micoparasitismo.

3.3.4 Extração de metabólitos secundários do endófito antagonista

Dois discos de micélio do isolado 42.3 foram inoculados em um frasco erlenmeyer contendo 200 mL de meio batata dextrose – BD (20 g de dextrose; q.s.p. 1000 mL de caldo de batata) e incubados a 28°C em estufa BOD durante 15 dias. Após o crescimento, o micélio foi

separado do meio de cultura por filtração em bomba de vácuo. O micélio e o meio de cultura foram submetidos a diferentes extrações de metabólitos secundários, conforme descrito a seguir.

Extração de metabólitos secundários do micélio: A massa micelial foi transferida para frasco de 200 mL, contendo 100 mL de diclorometano. O frasco foi mantido em descanso e à temperatura ambiente durante 48 horas. Após esse período, a fração solúvel em diclorometano foi armazenada em geladeira (4°C), enquanto que o micélio foi coletado e armazenado em outro frasco de 200 mL, sendo repetido todo o processo, onde foram utilizados, como solventes orgânicos o diclorometano:metanol (1:1) e a seguir, apenas o metanol. Após as três extrações, as três frações foram reunidas em um frasco, o qual foi submetido a rotavapor para concentração das amostras.

Extração de metabólitos secundários do meio de cultura: O meio de cultura foi transferido para frascos de 1 L e a este foi adicionado 200 mL de acetato de etila. Foram misturadas bem as duas fases e o volume total foi transferido para balão de titulação. Foi esperado até que as fases fossem separadas e foi iniciada a coleta da fase aquosa. A fração solúvel em acetato de etila foi recolhida em frasco de 1 L, onde foi misturado a mais 200 mL de acetato de etila, para repetição do processo por mais 2 vezes. Ao final das três extrações, a fração aquosa foi descartada e as três frações solúveis em acetato de etila foram coletas em frasco de 1 L, o qual foi submetido a rotavapor para concentração das amostras.

Teste de inibição de *C. pernicios*a: Após a concentração, foram preparadas placas onde, em uma extremidade, foi inoculado um disco de micélio de *C. pernicios*a. Na extremidade adjacente, foi inoculado um disco de papel de filtro embebido nas frações concentradas de metabólitos secundários – micélio e meio de cultura. No controle negativo, o disco de papel filtro foi embebido em solvente (acetato de etila ou diclorometano). As culturas foram incubadas em estufa do tipo BOD a 28°C para crescimento do micélio de *C. pernicios*a. Após cinco dias de incubação, a leitura do experimento foi realizada, verificando se houve inibição do crescimento de *C. pernicios*a pelos metabólitos secundários extraídos.

3.3.5 Avaliação da inibição de fitopatógenos por fungos endofíticos de cacau

Três isolados de fungos endofíticos de cacau (2, 8 e 42.3) foram selecionados para avaliação de sua atividade fungistática sobre 10 espécies de fungos fitopatogênicos:

Colletotrichum falcatum, *C. sublineorum*, *Erythricium salmonicolor*, *Rhizoctonia solani*, *Ceratocystis paradoxa*, *Phytophthora* sp., *P. parasitica*, *P. palmivora*, *Fusarium moniliforme* e *C. perniciosa*, sendo este último, o controle positivo. No teste, discos de micélio do patógeno foram inoculados com discos de micélio do endófito, em culturas pareadas, sendo que no controle negativo, foi inoculado apenas o fitopatógeno. Foi verificado diariamente o crescimento das colônias, a fim de avaliar se houve inibição dos endófitos sobre fungos fitopatogênicos.

3.3.6 Amplificação e sequenciamento de um gene relacionado à produção de antifúngicos

A amplificação do gene de ACV foi realizada por meio da técnica de PCR, onde foram utilizados os primers GKP (5'-GKPKG-3') e LAR (5'-LARGYLN-3'). As reações apresentaram um volume final de 50 µL, contendo 20 ng de DNA molde; 0,4 µM de cada primer; 0,2 mM de cada dNTP; 3,7 mM de MgCl₂; 2 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1X de tampão da enzima. O volume foi completado com água MilliQ autoclavada. Em todas as reações foi utilizado um controle negativo sem o DNA molde. Os microtubos contendo as reações foram submetidos a termociclador *Gene Amp® PCR System 9700 (PE Applied Biosystems)*, em uma sequência composta pelos seguintes passos: desnaturação inicial (94°C por 5 minutos) seguida de 34 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação (92°C durante um minuto), uma etapa de anelamento (45°C durante um minuto) e uma etapa de extensão (72°C durante dois minutos), seguida de uma etapa final de 72°C durante cinco minutos.

Após a reação de PCR, 5 µL da reação foram aplicados em gel de agarose 1,2%, com marcador de peso molecular *Gene Ruler™ 1Kb DNA ladder* (Fermentas). Foi aplicada à cuba de eletroforese, uma voltagem de 100V. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo, durante 20 minutos, as bandas foram visualizadas em transiluminador de luz UV e o gel foi fotodocumentado.

3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Caracterização de *C. pernicioso*

A melhor condição para o cultivo de *C. pernicioso* foi comprovada pela utilização de um teste de médias (Tukey), a 5% de probabilidade. Através do teste, foi possível separar os grupos em letras, onde a mesma letra indica tratamentos que não diferem significativamente entre si (Tabela 6).

Tabela 6 – Crescimento micelial de isolados de *C. pernicioso*, em centímetros, quando incubados em BDA e V-8, na presença e ausência de luz

Isolados	V-8		BDA	
	luz	escuro	luz	escuro
281	2,50 c	3,50 a	2,80 b	3,40 a
10.1	1,70 b	2,75 a	1,80 b	2,70 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo agrupamento de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade

Foi observado que o melhor crescimento para *C. pernicioso* foi obtido quando as culturas foram incubadas no escuro. Quanto ao meio de cultura, não houve diferenças estatísticas, uma vez que em ambos, o micélio de *C. pernicioso* cresceu em mesma proporção.

Quando submetido à exposição de luz, foi observado que o micélio de *C. pernicioso* adquire uma coloração amarelada rapidamente, o que está diretamente relacionado com a senescência micelial, uma vez que, observado pelo teste de viabilidade, o micélio que entra em senescência adquire essa tonalidade amarelo-castanha progressivamente. O micélio de *C. pernicioso* tende a perder a viabilidade muito rapidamente, quando cultivado *in vitro*. Por esse motivo, é necessário que se repique o fungo periodicamente, o que favorece a contaminação da cultura. Para selecionar uma situação mais favorável para o cultivo de *C. pernicioso*, que contorne esses problemas, foi feito um teste de viabilidade em condições diferentes. Por esse teste, foi

observado que em média, o micélio de *C. pernicioso* permaneceu viável por mais tempo quando incubado em meio V-8 10% e no escuro (Figura 10).

Figura 10 – Viabilidade do micélio de *C. pernicioso* inoculado em meio BDA e V8 10%, na presença e ausência de luz

Os sinais de senescência não foram evidenciados em meio V-8 10% com 90 dias, quando o micélio cultivado em BDA na presença de luz, praticamente perde o vigor e a viabilidade. Assim, em trabalhos com esse fungo, é sugerido cultivar o micélio em meio V-8 10%, tendo o cuidado de manter as placas ao abrigo da luz. O meio V-8 10% é comumente relatado na literatura como um meio comum para o cultivo de fungos, tais como *C. pernicioso* (McGEARY; WHEELER, 1988), *Phytophthora palmivora* e *P. capsici* (IWARO; SREENIVASAN; UMAHARAN, 1998).

Basidiomicetos, de uma forma geral, são fungos que produzem corpos de frutificação macroscópicos (basidiocarpos) (MOORE-LANDECKER, 1996) e estes, são formados em resposta a um sinal ambiental ou mecânico. Um exemplo típico é o cogumelo comestível shiitake (*Lentinula edodes*), cuja indução à frutificação consiste em um choque mecânico seguido de um choque térmico, a fim de estimular o micélio colonizado em toras de eucalipto, nas produções comerciais de shiitake (PACCOLA-MEIRELLES, 2002). Assim, é aceito que a luz constitui um sinal para o fungo, principalmente para *C. pernicioso*, que frutifica em resposta à exposição solar.

Com a determinação de condições ótimas para o desenvolvimento do fungo, fica reduzida a necessidade de repicagem dos fungos em laboratório, reduzindo, conseqüentemente, os riscos de contaminação da cultura e perda do vigor.

3.4.2 Seleção de endófitos de cacauero como potenciais agentes de controle biológico de *C. perniciosa*

A seleção de fungos endofíticos de cacau foi feita com a inoculação em uma das extremidades da placa, de um disco de micélio de *C. perniciosa* (isolado patogênico 281) e na outra extremidade, de disco de micélio do fungo endofítico de cacau. O controle negativo consistiu de placas onde foram inoculados apenas os patógenos. Foram analisadas as interações de 145 endófitos com o agente causal da vassoura de bruxa, utilizando esse método. Foram encontradas basicamente três situações diferentes, quando analisadas essas placas: 1) as colônias crescem, uma em direção à outra, e só cessam o crescimento quando as colônias se tocam. A partir desse ponto, não mais é observado crescimento de ambos os isolados. Esse tipo de interação foi classificado como não antagônico, com 48,3% dos eventos observados; 2) as colônias apresentam crescimento inicial, mas em certo ponto, a colônia do patógeno cessa o crescimento e só se observa o crescimento do endófito. Comparado ao controle, que cresce sem a presença do endófito, a colônia do patógeno se desenvolve nitidamente melhor; essa interação foi classificada como inibição por antibiose com 38,6% dos casos analisados; 3) as colônias crescem em direção à outra, e quando se encontram, há sobreposição de uma sobre a outra. Essa situação foi classificada como possível inibição por parasitismo, com 13,1% dos isolados apresentando esse comportamento.

Após essa seleção, os isolados que apresentaram inibição por parasitismo, foram avaliados microscopicamente. Essa avaliação foi feita com 19 isolados endofíticos de cacauero, pareados com *C. perniciosa*. A maior parte das interações avaliadas, não foi de parasitismo. As hifas simplesmente se encontravam, continuavam a crescer, havendo sobreposição de colônias, sem, no entanto, haver quaisquer indícios de antagonismo, incompatibilidade ou parasitismo. Em quatro pareamentos, foi observado o que poderiam ser sinais de parasitismo, as quais podem ser observadas na Figura 11. Nesses casos, foi observado que o endófito se enrola ao longo da hifa do parasita, e também, há estruturas semelhantes a nós, nos quais a hifa do endófito também se

enovela em algum ponto da hifa do parasita. No controle com *Trichoderma*, é possível observar o comportamento parasítico deste sobre *C. pernicioso*, semelhante ao ocorrido com os endófitos. Além disso, foi observado a hifa de *Trichoderma* dentro do micélio do patógeno evidenciando claro sinal de parasitismo (Figura 11).

Figura 11 – Exemplos de comportamento parasítico entre isolados endofíticos de cacauero e *C. pernicioso*. Em (A), o controle positivo, com *Trichoderma* sp. parasitando hifas de *C. pernicioso*. Em (B), a hifa de *Trichoderma* sp. dentro do micélio de *C. pernicioso*. Em (C) *Phomopsis* sp (isolado 69C), parasitando as hifas de *C. pernicioso* com formação de nós, indicados pelas setas; e em (D) *Fusarium oxysporum* (isolado 44.1) entrelaçando-se na hifa de *C. pernicioso*

O número de isolados endofíticos com capacidade antagonista a fitopatógenos, foi compatível com aqueles reportados na literatura. Arnold et al. (2003) fizeram testes de pareamento em ágar extrato de malte – MEA e encontraram uma proporção de 40% dos endófitos antagonizando, no mínimo, um dos patógenos analisados: *Phytophthora* sp., *Moniliophthora roreri* e *Crinipellis pernicioso*. Um outro grupo não teve efeito algum e os demais, foram eles mesmos antagonizados pelo patógeno. Além disso, os autores sugerem que endófitos que antagonizam uma espécie de patógeno em particular, não antagonizam os demais analisados. Apesar do limitado teste com os fitopatógenos que não *C. pernicioso*, foi observado que a

afirmação de Arnold et al. (2003) não pôde ser aplicada no presente trabalho, uma vez que os mesmos endófitos que inibiram *C. perniciosa* também puderam inibir *Ceratocystis paradoxa* e *Colletotrichum sublineorum*. Porém, os endófitos não foram avaliados quanto à inibição do demais patógenos de cacaueteiro, *Phytophthora sp.* e *Moniliophthora roreri*.

No presente trabalho, foi obtida uma porcentagem de 38,62% dos endófitos analisados, antagonizando um patógeno de cacaueteiro em particular: *C. perniciosa* em meio BDA. Houve isolados que também foram antagonizados pelo patógeno (dados não mostrados). Segundo Peixoto-Neto; Azevedo e Araújo (2002), os microrganismos endofíticos habitam um nicho ecológico semelhante daquele ocupado por fitopatógenos, podendo assim controlá-los por meio da competição por nutrientes, produção de substâncias antagônicas, parasitando o patógeno ou mesmo induzindo a planta a desenvolver resistência. Por esse motivo, endófitos constituem uma excelente ferramenta de trabalho para a busca de novos agente de biocontrole.

Os casos de parasitismo foram bem menos frequentes se comparados ao de antibiose, uma vez que, dos 19 exemplos de interação analisados, apenas três foram confirmados microscopicamente como eventos de micoparasitismo. Por meio de microscopia eletrônica de transmissão, Elad et al. (1983) observaram que durante a interação entre *Trichoderma* e os fitopatógenos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, o primeiro produz uma estrutura semelhante a um apressório ou enrola em torno da hifa do fitopatógeno. Zugmaier; Bauer e Oberwinkler (1994), também, estudaram o micoparasitismo de *Tremella* sobre várias espécies de fungos. Porém, os trabalhos mais comuns envolvendo micoparasitismo são relacionados aos casos de *Trichoderma spp.* parasitando várias espécies de fungos, motivo pelo qual foi selecionado um isolado de *Trichoderma* como controle positivo. Assim, situações tipicamente parasíticas observadas na interação de *Trichoderma* e *C. perniciosa* foram tomadas como exemplos na busca de estruturas semelhantes na interação dos endófitos de cacaueteiro e *C. perniciosa*.

3.4.3 Extração de metabólitos secundários do endófito antagonista

Foram testados os metabólitos secundários extraídos do micélio e do substrato de crescimento do endófito, sendo que as frações solúveis em diclorometano (micélio), não inibiram *C. perniciosa*. Apenas a fração solúvel em acetato de etila inibiu o patógeno (Figura 12).

Tendo em vista os resultados obtidos, é considerada a hipótese de que o micélio não armazene esses metabólitos, pois tão logo sejam produzidos, os mesmos são liberados para o meio de cultura, onde são concentrados a ponto de inibir o crescimento de *C. pernicioso*. Outra hipótese é que a quantidade de metabólito presente no micélio seja muito reduzida, de tal forma a não ser possível a detecção de inibição.

Figura 12 - Crescimento de *C. pernicioso* na presença dos metabólitos secundários extraídos do (A) meio de crescimento do endófito e (B) do micélio do endófito. À direita de cada figura, está ilustrada a placa de controle negativo, contendo papel filtro umedecido com solventes orgânicos. À esquerda, as placas-teste

Com relação aos metabólitos secundários, era esperado que as frações solúveis em diclorometano e acetato de etila inibissem *C. pernicioso*, porém, a fração em diclorometano, cujos metabólitos secundários foram extraídos do micélio, não apresentou compostos ativos inibidores do patógeno. Uma alternativa seria a utilização de diferentes solventes orgânicos, visando avaliar se os compostos do micélio pudessem ser extraídos por outras substâncias, talvez até o acetato de etila, que funcionou bem para o substrato de crescimento. Uma hipótese que também não pode ser descartada, é a de que o micélio não concentra os metabólitos inibidores de *C. pernicioso*; eles apenas são produzidos no micélio e logo liberados para o meio de cultura, conforme relata Carroll (1995) quando diz que, em seu trabalho, as toxinas de endófitos foram todas isoladas a partir de culturas puras *in vitro* e nenhuma delas foi detectada *in vivo*.

A variabilidade na produção de toxinas pelos endófitos é uma prova da complexidade em condições de campo. Schulz e Boyle (2005) dizem que os metabólitos secundários são importantes em várias funções no hospedeiro, tais como: sinalização, defesa e regulação da simbiose. Do ponto de vista da interação endófito-patógeno, não seria interessante para o endófito produzir um determinado metabólito e mantê-lo dentro do micélio. Como a competição por espaço e talvez até por nutrientes possa estar envolvido nessa interação, a liberação para o meio de substâncias inibidoras possa ser interessante para o fungo endofítico.

Este trabalho foi apenas um passo inicial na busca de potenciais agentes de controle biológico para *C. pernicioso* e outros fitopatógenos. Porém, mais testes devem ser feitos para realmente estudar a viabilidade na utilização desses endófitos para o controle biológico em condições de campo e também, no estudo das propriedades químicas desses compostos ativos.

3.4.4 Endófitos de cacau como inibidores de fitopatógenos

De todos os pareamentos realizados entre os três endófitos de cacau (2, 8 e 42.3) e os 10 fitopatógenos de diferentes culturas (*Coletotrichum falcatum* de cana, *C. sublineorum* de sorgo, *Erythricium salmonicolor* de maçã, *Rhizoctonia solani* de feijão, *Ceratocystis paradoxa* de cana, *Phytophthora* sp. de citros, *P. parasitica* de citros, *P. palmivora* de mamão, *Fusarium moniliforme* de cana e *Crinipellis pernicioso* de cacau), apenas foi evidenciada a inibição de *C. sublineorum* e *C. paradoxa* pelos endófitos 42.3 e 2, respectivamente (Figura 13). Nos demais pareamentos, não foi observado nenhum indício de inibição. É possível observar que, mesmo a interação antagônica entre 42.3/*C. sublineorum* e 2/*C. paradoxa*, foi branda, sem a visualização de forte inibição. Este fato talvez ocorra por tratarem-se de fitopatógenos isolados de outras culturas, que não o cacau.

3.4.5 Amplificação de gene relacionado à produção de antifúngicos

A amplificação de gene ACV (WOOD; CHEN; SKATRUD, 1990; GUTIÉRREZ et al., 1991) para os isolados 18, 19.1, 19.3, 22.1, 35.6, 39.1, 42.4, 30.2, 42.3, 44.3 e 90A (fungos endofíticos de cacau) permitiu a obtenção de uma banda de 600 pb e outras bandas inespecíficas

apenas para o isolado 19.3 (Figura 14), evidenciando a expressão do gene de ACV a partir desse isolado, quando cultivado em meio sintético. Como o ACV é um precursor das cefalosporinas, é possível inferir que o isolado 19.3 produz antibióticos dessa classe. O princípio ativo dos demais isolados, podem produzir outras classes de antibióticos, ou mesmo, substâncias que, em contato com *C. perniciosa*, promovem sua inibição.

Figura 13 – Inibição dos fitopatógenos *Colletotrichum sublineorum* pelo fungo endofítico de cacau 42.3 em (A) e *Ceratocystis paradoxa* pelo fungo endofítico de cacau 2 em (B)

Essa amplificação do gene de ACV, abre perspectivas para o sequenciamento e identificação desse antibiótico, produzido pelo endófito 19.3, visando um estudo mais específico para o controle biológico de *C. perniciosa* e outros fitopatógenos.

3.5 Considerações Finais

De acordo com os resultados obtidos neste capítulo, podemos considerar que:

- ❑ A forma mais adequada de armazenar micélio de *C. perniciosa* em laboratório é em meio V-8 10% e no escuro;
- ❑ Endófitos constituem excelente alternativa para a busca de novos agentes de controle biológico de doenças;

- ❑ Endófitos de cacauzeiro com alguma capacidade antagônica a fungos fitopatogênicos de outros hospedeiros são pouco expressivos;
- ❑ Endófitos isolados de um hospedeiro podem apresentar reações antagônicas a patógenos de outras culturas;

Figura 14 – Gel de amplificação de antibióticos peptídicos, cuja banda de 600 pb corresponde ao alvo desejado

Referências

- ARNOLD, A. E.; MEJÍA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 26, p. 15649-15654, 2003.
- AZEVEDO, A. M. C.; MARCO, J. L. de; FELIX, C. R. Characterization of an amylase produced by a *Trichoderma harzianum* isolate with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 188, p. 171-175, 2000.
- BASTOS, C. N. Resultados preliminares sobre a eficácia de *Trichoderma viride* no controle da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacaueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, p. 340-343, 1988.
- BASTOS, C. N. Inibição do crescimento micelial e germinação de esporos de *Crinipellis pernicioso* e *Phytophthora palmivora* por extrato de bulbo de alho (*Allium sativum*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 454-457, 1992.
- BASTOS, C. N. Mycoparasitic nature of the antagonism between *Trichoderma viride* and *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 50-54, 1996.
- BASTOS, C. N. *Trichoderma stromaticum* sp. nov. na produção de basidiomas e infecções de ramos e almofadas florais do cacaueiro por *Crinipellis pernicioso*. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 12, p. 59-62, 2000.
- BASTOS, C. N. Ação de *Trichoderma stromaticum* sp. nov. sobre a produção de basidiomas de *Crinipellis pernicioso* em vassouras de cupuaçuzeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 30, p. 63-65, 2004.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, Lancaster, v. 72, p. 379-382, 1982.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN-FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). 3ed. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap. 36, p. 717-728.

CARROLL, G. Forest endophytes: pattern and process. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. S1316-S1324, 1995.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: APS. 1983, 539p.

DELGADO, J. C.; COOK, A. A. Nuclear condition of the basidia, basidiospores, and mycelium of *Marasmius perniciosus*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 54, p. 66-72, 1976.

DRAHOS, D. J.; HEMMING, B. C.; McPHERSON, S. Tracking recombinant organisms in the environmental: β -galactosidase as a selectable nonantibiotic marker for fluorescent pseudomonads. **BioTechnology**, New York, v. 4, p. 439-444, 1986.

ELAD, Y.; BARAK, R.; CHET, I.; HENIS, Y. Ultrastructural studies of the interaction between *Trichoderma spp.* and plant pathogenic fungi. **Phytopath. Z.**, v. 107, p. 168-175, 1983.

EVANS, H. C.; BASTOS, C. N. Uma reavaliação do ciclo de vida da vassoura de bruxa (*Crinipellis perniciosus* (Stahel) Singer) do cacau. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, p. 104, 1979.

FULTON, R. H. The cacao disease trilogy: black pod, monilia pod rot, and witches' broom. **Plant Disease**, St. Paul, v.7, p.601-603, 1989.

GUTIÉRREZ, S.; DÍEZ, B.; MONTENEGRO, E.; MARTÍN, J. F. Characterization of the *Cephalosporium acremonium pcbAB* gene encoding α -aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase, a large multidomain peptide synthetase: linkage to the *pcbC* gene as a cluster of early cephalosporin biosynthetic genes and evidence of multiple functional domains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 1354-2365, 1991.

HERR, L. J. Biological control of *Rhizoctonia solani* by binucleate *Rhizoctonia spp.* and hypovirulent *R. solani* agents. **Crop Protection**, Guildford, v. 14, p. 179-186, 1995.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, p. 4-10, 2003.

INBAR, J.; MENENDEZ, A.; CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 28, p. 757-763, 1996.

IWARO, A. D.; SREENIVASAN, T. N.; UMAHARAN, P. Cacao resistance to *Phytophthora*: effect of pathogen species, inoculation depths and pod maturity. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, p. 11-15, 1998.

KRAUSS, U.; SOBERANIS, W. Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. **Biological Control**, San Diego, v. 24, p. 82-89, 2002.

LIU, C. H.; ZOU, W. X.; LU, H.; TAN, R. X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 88, p. 277-282, 2001.

MARCO, J. L. de; FELIX, C. R. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. **BioMed Central Biochemistry**, London, v. 3, p. 1-7, 2002.

MARCO, J. L. de; VALADARES INGLIS, M. C.; FELIX, C. R. Purification and characterization of an N-acetylglucosaminidase produced by a *Trichoderma harzianum* strain which controls *Crinipellis pernicioso*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, p. 70-75, 2004.

MARCO, J. L. de; LIMA, L. H. C.; SOUSA, M. V.; FELIX, C. R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.16, p. 383-386, 2000.

McGEARY, F. M.; WHEELER, B. E. J. Growth rates of, and mycelial interactions between isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa. **Plant Pathology**, Oxford, v. 37, p. 489-498, 1988.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Coord.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa, 1998. cap. 1, v. 1, p. 17-67.

MOORE LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. New Jersey: Prentice-Hall, (4th ed.). 1996. 574p.

MOY, M.; BELANGER, F.; DUNCAN, R.; FREEHOFF, A.; LEARY, C.; MEYER, W.; SULLIVAN, R.; WHITE JR., J. F. Identification of epiphyllous mycelial nets on leaves of grasses infected by clavicipitaceous. **Symbiosis**, Rehovot, v. 28, p. 291-302, 2000.

MUSE, R. B.; COLLIN, H. A.; ISAAC, S.; HARDWICK, K. Effects of the fungus *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease, on cell and tissue cultures of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Plant Pathology**, Oxford, v. 45, p. 145-154, 1996.

PACCOLA MEIRELLES, L. D. Genética e melhoramento de cogumelos comestíveis. In: MELO, I. S.; VALADARES INGLIS, M. C.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C. (Ed.). **Recursos Genéticos & Melhoramento**: microrganismos. Jaguariúna: Embrapa, 2002. cap. 13, p. 357-392.

PEIXOTO-NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, 2002. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/micro.asp>>. Acesso em: 14 nov. 2005.

PENMAN, D.; BRITTON, G.; HARDWICK, K.; COLLIN, H. A.; ISAAC, S. Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 671-675, 2000

PETERS, S.; DRAEGER, S.; AUST, H. J.; SCHULZ, B. Interactions in dual cultures of endophytic fungi with host and nonhost plant calli. **Mycologia**, Lancaster, v. 90, p. 360-367, 1998.

PURDY, L. H.; SCHIMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology and management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 573-594, 1996.

SAMUELS, G. J.; PARDO-SCHULTHEISS, R.; HEBBAR, K. P.; LUMSDEN, R. D.; BASTOS, C. N.; COSTA, J. C.; BEZERRA, J. L. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches' broom pathogen. **Mycological Research**, Cambridge, v.104, p.760-764, 2000.

SANOGO, S.; POMELLA, A.; HEBBAR, P. K.; BAILEY, B.; COSTA, J. C. B.; SAMUELS, G. J.; LUMSDEN, R. D. Production and germinations of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis pernicioso* on cacao. **Phytopathology**, Lancaster, v. 92, p.1032-1037, 2002.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, p. 661-686, 2005.

SCHULZ, B.; ROMMERT, A.; DAMMANN, U.; AUST, H.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? **Mycological Research**, Cambridge, v. 103, p. 1275-1283, 1999.

SILVA, S. D. V. M.; LUZ, E. D. M. N.; ALMEIDA, O. C.; GRAMACHO, K. P.; BEZERRA, J. L. Redescrição da sintomatologia causada por *Crinipellis pernicioso* em cacauero. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 14, p. 1-24, 2002.

TAKAHASHI, H. Four new species of *Crinipellis* and *Marasmius* in eastern Honshu, Japan. **Mycoscience**, Tokyo, v. 43, p. 343-350, 2002.

VITERBO, A.; HARAN, S.; FRIESEM, D.; RAMOT, O.; CHET, I. Antifungal activity of a novel endochitinase gene (chit36) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 200, p. 169-174, 2001.

WALTERS, D.; RAYNOR, L.; MITCHELL, A.; WALKER, R.; WALKER, K. Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. **Mycopathologia**, Dordrecht, v.157, p. 87-90, 2004.

WELLER, D. M.; COOK, R. J. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. **Phytopathology**, Lancaster, v. 73, p. 463-469, 1983.

WOOD, J. S.; CHEN, V. J.; SKATRUD, P. L. Gene disruption of the pcbAB gene encoding ACV synthetase in *Cephalosporium acremonium*. **Current Genetics**, New York, v. 18, p. 523-530, 1990.

YUE, Q.; MILLER, C. J.; WHITE JR., J. F.; RICHARDSON, M. D. Isolation and characterization of fungal inhibition from *Epichloe festucae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 4687-4692, 2000.

ZUGMAIER, W.; BAUER, R.; OBERWINKLER, F. Mycoparasitism of some *Tremella* species. **Mycologia**, Lancaster, v. 86, p. 49-56, 1994.

4 INTERAÇÃO ENDÓFITO-PLANTA E ENDÓFITO-PATÓGENO

Resumo

A interação endófito-planta pode ser estudada sob vários aspectos. Neste trabalho, foram selecionados a MEV e o RAPD, como metodologias para a investigação da habilidade do fungo endofítico de cacau 42.3, um isolado de *Fusarium sp.*, em penetrar e colonizar os tecidos de cacauzeiro do tipo comum (suscetível à vassoura de bruxa). Para o experimento, folhas de cacauzeiro comum foram desinfetadas superficialmente e inoculadas com esporos do isolado endofítico. As regiões inoculadas foram recortadas, fixadas em solução Karnovsky modificada e preparadas para visualização em MEV. A penetração do fungo foi iniciada após 3 horas da inoculação e com 33 horas, aparentemente foi observado a emergência da hifa do interior da folha, mas não foram observados esporos aderidos à sua superfície. A interação entre *Fusarium sp.* (42.3), endófito de cacauzeiro com o isolado 281 de *C. pernicioso* (patogênico), foi avaliada pela técnica de SDS-PAGE. O fungo endofítico e patogênico foram cultivados separadamente ou juntos, e a expressão protéica foi avaliada. O efeito do sobrenadante do endófito na expressão de *C. pernicioso* também foi avaliado. O SDS-PAGE permitiu a visualização de bandas expressas na interação, apenas quando os dois microrganismos foram crescidos juntos, mas não quando o sobrenadante do endófito foi aplicado em *C. pernicioso* por 24 horas. Esse estudo mostrou que *Fusarium* 42.3 endofítico coloniza endofiticamente plantas de cacau e pode interagir com *C. pernicioso*, sugerindo seu uso como agente de controle biológico desse patógeno. Entretanto, para o uso prático, outros estudos devem ser feitos para avaliar o efeito desse antagonista no desenvolvimento da doença, sob condições de campo.

Palavras-chave: cacauzeiro, endófitos, RAPD, MEV, SDS-PAGE

ENDOPHYTE-PLANT AND ENDOPHYTE-PATHOGEN INTERACTIONS

Abstract

The endophyte-plant interaction may be studied under various aspects. In this work, SEM and RAPD were selected to investigate the ability of the endophytic fungus 42.3, an *Fusarium sp.* isolate, to penetrate and colonize cacao comum tissues (susceptible to witches' broom disease). For this, cacao comum leaves were surface disinfected and further inoculated with spores of the endophytic isolate. The inoculated plant tissues were cutted out, fixed in Karnovsky and prepared for SEM visualization. The fungus penetration began after 3 hours of inoculation and with 33 hours, apparently attached spores was not visualized and was just observed the hyphae emergence. Also, the interaction between *Fusarium sp.* (42.3), the cacao endophyte and the pathogenic *Crinipellis pernicioso* (isolate 281) was evaluated by SDS-PAGE technique. The endophytic and pathogenic fungi were cultivated separated or together and the protein expression was evaluated. The effect of endophyte supernatant on *C. pernicioso* protein expression was also evaluated. The SDS-PAGE allowed the visualization of bands expressed in the interaction, only when both microorganisms were grown together, but not when the endophyte supernatant was applied in *C. pernicioso* for 24 hours. This study showed that the endophytic *Fusarium sp.* 42.3 colonize endophytically cacao plants and may interact with *C. pernicioso*, suggesting that could be used as biological control agent of this pathogen. However, for practical use of this fungus, further studies should evaluate its effect on disease development in field conditions.

Keywords: cocoa, endophytes, RAPD, MEV, SDS-PAGE

4.1 Introdução

A interação do endófito com o hospedeiro foi avaliada neste trabalho, inoculando-se esporos de um fungo endofítico de cacau em plântulas, seguido do re-isolamento do endófito dos tecidos de cacau, após a penetração do tubo germinativo e colonização. Para confirmação da habilidade do fungo em colonizar os tecidos de seu hospedeiro, foi utilizada a técnica de RAPD, para comparar a semelhança entre o endófito inoculado e aquele resgatado dos tecidos de cacau. Uma vez que o endófito foi inoculado em plantas não axênicas, foi esperado que outros fungos pudessem ser isolados do tecido avaliado, justificando o uso do RAPD, que permitiu a inferência sobre a semelhança entre os isolados analisados, seguido do estudo da penetração do endófito nos tecidos do hospedeiro, por meio de MEV. O trabalho de interação endófito-hospedeiro foi realizado no primeiro semestre de 2005 e foi finalizado em novembro do mesmo ano, sendo em parte realizado no Laboratório de Genética de Microrganismos e em parte, realizado no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária – NAP/MEPA, ambos localizados na Esalq/USP.

Já o estudo da interação entre o endófito e o patógeno foi realizado com a extração de proteínas totais desnaturadas do micélio, resolvidas em gel de SDS-PAGE. Foram avaliados os perfis de proteínas do patógeno, do endófito, e da interação entre ambos, crescidos no mesmo ambiente. Esse trabalho foi realizado no primeiro semestre de 2005, no Laboratório de Genética de Microrganismos da Esalq/USP.

Esse trabalho é relevante, pois permite a abertura de perspectivas no estudo da interação de um fungo endofítico antagônico ao principal patógeno do cacau, o basidiomiceto *Crinipellis perniciosus* com o próprio hospedeiro, além de permitir a detecção de proteínas expressas diferencialmente em condições de interação entre os microrganismos.

Assim, os objetivos desse trabalho foram: i) analisar a eficiência de colonização do isolado endofítico de *Fusarium* 42.3; ii) com o auxílio de MEV, observar a germinação do esporo do endófito e a penetração no tecido do hospedeiro e iii) analisar proteínas expressas pelo patógeno ou pelo endófito, por SDS-PAGE.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Revisão bibliográfica

As comunidades endofíticas, cuja composição varia em função do hospedeiro e das condições ambientais, se inter-relacionam dentro da planta, em um balanço harmônico. O desequilíbrio dessa harmonia afeta o comportamento de todos os integrantes da comunidade, dando condições para que fungos oportunistas manifestem seu potencial patológico ao hospedeiro.

A separação de grupos ditos patogênicos, endofíticos e oportunistas é meramente didática, uma vez que a distância de um estágio para outro pode ser muito pequena. Assim, um microrganismo pode ser considerado endofítico, mas com a redução dos mecanismos de defesa da planta, pode se comportar como um patógeno (PEIXOTO-NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

A interação de um fungo com seu hospedeiro vegetal varia, dependendo do modo pelo qual o fungo infecta seu hospedeiro e da extensão da resposta de defesa da planta. A colonização pode ser sistêmica ou local, inter ou intracelular. Os fungos endofíticos, que colonizam seus hospedeiros, assintomaticamente (BOYLE et al., 2001; AZEVEDO; ARAÚJO, 2006), são fortes candidatos ao controle biológico de fitopatógenos, por ocuparem o mesmo nicho ecológico destes.

Tanto é a importância dessa característica dos endófitos, que pesquisadores no mundo todo têm mostrado que os endófitos fornecem ao seu hospedeiro defesa efetiva contra patógenos (CLAY, 2004). Arnold et al. (2003) estudaram a resposta de plantas de cacauete axênicas (isentas de microrganismos) inoculadas com endófitos do próprio hospedeiro e com o patógeno *Phytophthora* sp.. Os autores observaram que as plantas inoculadas com os endófitos apresentaram menos necrose e mortalidade das folhas, se comparadas aos controles, com inoculação apenas do patógeno. Os autores também relatam uma maior eficiência da proteção em folhas velhas se comparadas às jovens, o que pode ser explicado pela existência de inúmeros metabólitos secundários sendo produzidos em folhas maduras. Além da produção de antimicrobianos, fungos endofíticos podem excluir patógenos que ocupem o mesmo nicho ecológico, por competição, como relatado por Bao; Lazarovits (2001) com *Fusarium*.

Uma das técnicas que pode ser muito útil e informativa no estudo da interação de microrganismos endofíticos com seu hospedeiro, é a Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV, a qual permite que seja analisada a superfície do material em estudo. Dentre as várias etapas que devem ser seguidas para o preparo de uma amostra para visualização na MEV, as mais importantes para o estudo de estruturas fúngicas são a fixação, pós-fixação, desidratação, secagem

ao ponto crítico e metalização (KITAJIMA, 1997). A MEV é uma técnica bastante utilizada na pesquisa de ultraestruturas de superfície, abrangendo distintas áreas do conhecimento. No estudo de fungos e suas inter-relações com outros organismos, a utilização da MEV permite inferências das mais diversas, como pode ser exemplificado nos vários trabalhos publicados.

Hajek e Eastburn (2003) utilizaram MEV para o estudo da germinação de esporos de *Entomophaga maimaiga*, um fungo entomopatogênico, sobre a cutícula de *Lymantria dispar*, um lepidóptero, visando o controle biológico do inseto. Torres et al. (2003), por sua vez, estudaram o efeito de fatores abióticos (umidade e temperatura) nas fases iniciais do desenvolvimento de *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* e *Fusarium verticillioides* em milho. Os autores concluíram que ambos os fatores considerados influenciam a germinação dos fungos estudados.

No trabalho de Assante et al. (2004), os autores enfocam o controle biológico de um fitopatógeno por micoparasitismo. *Cladosporium tenuissimum*, o micoparasita, cresce dentro do esporo de *Uromyces appendiculatus* (fitopatógeno), preenchendo seu interior com micélio e emergindo do esporo, formando conidióforos e conídios. Martinez; Rioux e Tweddell (2004), investigaram o processo infectivo de *Helminthosporium solani*, um fungo que causa a doença pós-colheita “silver scurf” em batata (*Solanum tuberosum*) por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET e de varredura – MEV. Os autores observaram que o micélio de *H. solani* penetra os tubérculos por via direta, envolvendo processos mecânicos e enzimáticos (lise da parede celular). Nessa interação, também foi observada a emergência dos conidióforos de *H. solani* dos tubérculos após quatro dias de inoculação.

Além da MEV, outra técnica interessante para o estudo de interação entre microrganismos, é a análise de proteínas por eletroforese em gel de acrilamida – PAGE. Eletroforese é uma técnica que consiste na separação de moléculas ou partículas eletricamente carregadas em uma solução, sob influência de um campo elétrico. Permite separar qualitativa e quantitativamente os componentes de uma mistura de várias espécies iônicas. Num campo elétrico unidirecional, cada íon migra isoladamente em direção ao pólo de carga oposta, sem modificar sua estrutura e propriedade (PACCOLA-MEIRELLES et al., 1988).

A PAGE foi introduzida no início da década de 60 (PACCOLA-MEREILLES et al., 1988). Géis de poliacrilamida são formados pela copolimerização de acrilamida e bis-acrilamida na presença de persulfato de amônia e pela amina terciária NNN’ N’-tetrametiletilenodiamina – TEMED (ALFENAS; BRUNE, 1998). Sistemas de eletroforese contendo dodecil sulfato de sódio – SDS, também chamados de SDS-PAGE, são usados para separação de cadeias polipeptídicas, as

quais são providas de acentuada carga negativa (proporcional ao comprimento da cadeia peptídica). Essas cadeias migrarão com velocidades definidas segundo diferenças de seus tamanhos moleculares. Proteínas marcadoras, de peso molecular conhecido, podem ser usadas para se determinar o tamanho das moléculas de proteína da amostra, segundo Alfenas e Brune (1998).

A PAGE pode ser contínua ou descontínua. A eletroforese descontínua, utilizada nesse trabalho, foi desenvolvida por Davis (1964) e Ornstein (1964). O gel, nesse tipo de eletroforese, consiste de duas fases físicas: o gel empilhador de alta porosidade e o gel separador, de baixa porosidade (BRUNE; ALFENAS, 1998). Além disso, os íons tamponantes do gel (Tris-HCl) são diferentes daqueles dos eletrodos (Tris-Glicina). Esse tipo de sistema fornece melhor resolução que o contínuo (ALFENAS; BRUNE, 1998).

Tecidos vegetativos ou reprodutivos de fungos podem ser empregados para análise eletroforética de proteínas e isoenzimas. É, contudo, fundamental empregar um mesmo tipo de tecido para todas as culturas a serem comparadas, bem como padronizar as condições de cultivo. Essa padronização visa suprimir os efeitos do meio de cultura sobre a expressão diferencial de enzimas indutivas e de genes, de acordo com a diferenciação de tecidos (ALFENAS et al, 1998).

Até meados da década de 60, os estudos genéticos e de melhoramento eram baseados em características fenotípicas, uma vez que estas permitem análise visual, com relativa facilidade. No entanto, atualmente a genética molecular, que tem permitido a confirmação de resultados obtidos pela genética clássica, vem permitindo um avanço considerável nas pesquisas visando melhoramento e delineamento de variabilidade intra e interespecífica (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A técnica de RAPD foi primeiramente descrita em 1990 por dois grupos norte-americanos distintos, que trabalharam independentemente: Williams; Hanafey e Rafalski (1990) e Welsh e McClelland (1990). Segundo Martins (2005), os dados de RAPD são obtidos na forma de matriz composta por um certo número de genótipos que podem ser variedades, isolados ou clones, genotipados para dezenas ou centenas de marcadores RAPD, obtidos com um ou mais *primers*. As vantagens dessa técnica são: 1) ausência de influência do ambiente, uma vez que a análise é feita diretamente de regiões da molécula de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998); 2) a rapidez, 3) o baixo custo e 4) a possibilidade de aplicação sem o conhecimento prévio das seqüências flanqueadoras da região a ser amplificada (MICHELMORE; PARAN; KESSELI, 1991).

4.2.2 Material e métodos

4.2.2.1 Material biológico

O endófito de cacauero utilizado para as análises de interação com *Theobroma cacao* e *Crinipellis perniciosa* foi o isolado de *Fusarium sp.* 42.3, pertencente à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos da Esalq/USP. Para o estudo da interação endófito-planta, foram utilizadas folhas de cacauero comum, um genótipo suscetível à vassoura de bruxa. Por fim, para o estudo de interação endófito patógeno, foi utilizado o isolado 281 de *C. perniciosa*, patogênico a *T. cacao*.

4.2.2.2 Investigação da interação endófito-planta utilizando microscopia eletrônica de varredura

Primeiramente, foi investigada a capacidade do endófito 42.3 em colonizar tecidos de cacauero sob condições controladas: cacaueiros com 30 dias de idade foram inoculados com esporos do isolado 42.3. Quinze dias após a inoculação, foi feito o isolamento do endófito dos caules de *T. cacao*, segundo o protocolo descrito por Araújo et al. (2002).

Após o primeiro experimento, visando avaliar a habilidade do fungo endofítico em colonizar o cacauero, um disco de micélio do endófito 42.3 foi inoculado em uma placa de petri, a qual foi incubada a 28°C durante 10 dias. No décimo dia, 2 mL de solução salina (NaCl 0,8%) autoclavada foi espalhada sobre a colônia do endófito e com o auxílio de uma espátula de alumínio autoclavada, a superfície da colônia foi raspada para liberação dos esporos. Após esse procedimento, a solução com esporos foi coletada com o auxílio de uma micropipeta e transferida para um microtubo de 1,5 mL, o qual foi centrifugado para a sedimentação de fragmentos de micélio. O número de esporos na suspensão foi estimado em Câmara de Neubauer ($3,5 \times 10^7$ esporos/mL).

Uma folha grande de cacauero foi lavada em água corrente e desinfetada superficialmente, segundo o protocolo descrito por Araújo et al (2002), utilizando hipoclorito de

sódio. A folha foi enxugada com papel toalha autoclavado e depositada em uma placa de petri de 20 cm de diâmetro contendo papel filtro umedecido. Três quadrados de aproximadamente 0,3 cm foram recortados com auxílio de um bisturi esterilizado e transferidos para um tubo de 2 mL contendo 1 mL de fixador Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2) e mantidos a 4°C. Na superfície da folha, foram depositadas gotas contendo 3 µL da suspensão de esporos. A coleta das regiões inoculadas foram feitas com intervalos de 3 horas, sendo iniciada com 3 horas e finalizada com 33 horas. A cada coleta, foram fixados três fragmentos de folha contendo o inóculo do endófito. Os fragmentos permaneceram por, no mínimo, 12 horas em fixador. Após a fixação, o fixador foi retirado dos tubos com auxílio de uma pipeta de Pasteur, tomando-se o máximo de cuidado para não ferir as amostras. Aos tubos foram adicionados 1 mL de tampão cacodilato 0,05 M. Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 10 minutos. Após a incubação, o tampão foi retirado e a lavagem com tampão cacodilato foi repetida por mais duas vezes. Após a terceira lavagem em tampão, foi adicionado aos fragmentos, o pós-fixador OsO₄ 1% (Tetróxido de Ósmio em tampão cacodilato). Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 90 minutos.

O ósmio foi descartado e os fragmentos foram transferidos para um novo tubo de 2 mL e lavado com água destilada, seguida de desidratação em série de etanol: 70, 80, 90, 95 e 100%, com duração de 10 minutos cada etapa. Após a desidratação, as amostras foram secas ao ponto crítico. Em seguida, as amostras foram fixadas nos *stubs* e submetidas à metalização com ouro. Os *stubs* foram transferidos ao microscópio e analisados.

4.2.2.3 Investigação da interação endófito-patógeno utilizando eletroforese em gel de acrilamida para proteínas totais

Dois discos de micélio de 1 cm de diâmetro foram inoculados em frascos contendo 100 mL de meio BD (20 g dextrose; 1000 mL de água de batata) e incubados a 28°C durante 10 dias para desenvolvimento do micélio dos fungos. Após esse período, a massa micelial de cada um dos frascos foi filtrada e lavada com água destilada autoclavada em bomba a vácuo. O micélio foi pesado e em seguida, foi feita a extração de proteínas totais, cujo protocolo utilizado foi aquele descrito por Paccola-Meirelles et al. (1988). Foram considerados quatro tratamentos: i) Micélio de

Crinipellis pernicioso crescido em meio BD, ii) Cocultivo de *C. pernicioso* com endófito 42.3; iii) Micélio do endófito 42.3 crescido em meio BD e iv) Efeito do substrato do endófito sobre *C. pernicioso* (Figura 15).

Figura 15 – Esquema de inoculação dos fungos para estudo da expressão de proteínas totais em (A) *Crinipellis pernicioso*, (B) *C. pernicioso* + endófito 42.3, (C) endófito 42.3 e (D) *C. pernicioso* + substrato de 42.3

4.2.3 Resultados e discussão

4.2.3.1 Interação endófito-planta

O fungo endofítico 42.3 (*Fusarium sp.*) é capaz de penetrar e colonizar tecidos de *T. cacao*, quando inoculado diretamente em plântulas. Como o fungo foi inoculado na região dos cotilédones e foi resgatado dos caules, pode ser concluído que o fungo tem a capacidade de translocar dentro dos tecidos do hospedeiro, sendo essa uma observação muito interessante, se traçado um paralelo com o controle biológico. Esse fungo, apesar de ser patogênico para algumas espécies vegetais, é endofítico em cacaueiro e, tendo a capacidade de inibir o crescimento de *C. pernicioso*, a habilidade em translocar dentro da planta é desejável, porque, podendo se

desenvolver dentro da planta, o fungo poderá antagonizar o patógeno, pois ocupam o mesmo ambiente. No isolamento, foram encontrados fungos filamentosos e leveduriformes morfologicamente diferentes ao isolado inoculado na planta. Esse fato era esperado, uma vez que foram utilizadas cacaueiros não axênicos. Os isolados de fungos purificados foram submetidos ao RAPD, onde foi escolhido o isolado com perfil de bandejamento semelhante ao inoculado na planta. Na Figura 16, podemos observar o padrão idêntico de bandas para três primers de RAPD, considerando o isolado original e aquele resgatado por re-isolamento.

Figura 16 – As fotos mostram em (A) a placa de re-isolamento do endófito dos caules de cacaueiro após 15 dias da inoculação dos esporos nas gemas axilares e em (B) o gel de RAPD, mostrando o perfil de bandejamento, onde foram empregados três *primers* diferentes, do isolado original (1) e do re-isolado (2)

Confirmada a capacidade do endófito em colonizar os tecidos de cacaueiro, foi feita a observação da germinação dos esporos e penetração do tubo germinativo na folha de cacaueiro (Figura 17) por MEV, sem a formação de apressório. Foi observado que a germinação do fungo ocorre muito rapidamente (nas primeiras 2 horas após a inoculação) e com 6 horas, já pode ser observada a penetração do tubo germinativo nas folhas de cacaueiro. Das 6 às 30 horas após a inoculação, a aparência geral dos fragmentos de folha inoculados com esporos do endófito permanece praticamente inalterado. Porém, na observação com 33 horas da inoculação, foi

observado o micélio do fungo emergindo das folhas de cacaueteiro e a ausência de esporos aderidos à superfície da folha.

Figura 17 – MEV, ilustrando as diferentes fases do desenvolvimento do endófito 42.3: em (A) superfície da folha de cacaueteiro sem inoculação do endófito, em (B) 3 horas após a inoculação, em (C) 3 horas após a inoculação, mostrando a afinidade dos esporos pelas nervuras da folha de cacaueteiro, em (D) 6 horas após a inoculação, mostrando claramente a penetração do tubo germinativo do endófito nos tecidos do cacaueteiro, em (E) 15 horas após a inoculação, mostrando praticamente nenhuma mudança no aspecto da interação e em (F) 33 horas após a inoculação, onde pode ser observado o micélio de *Fusarium sp.* 42.3 emergindo da folha de cacaueteiro

Kelemu et al. (2001), observou abundante esporulação de *Drechslera sp.*, quando foi feita inoculação artificial de pedaços de folhas sem endófitos, em papel de filtro umedecido colocado em placas de petri. Em contraste, folhas colonizadas com endófitos mostraram pouca esporulação e desenvolvimento de hifas.

A interação de um fungo com sua planta hospedeira varia, dependendo do modo no qual o fungo infecta seu hospedeiro e em que extensão ocorre a reação de defesa da planta. Essa colonização pode ser local ou sistêmica, inter ou intra celular. Os efeitos no hospedeiro também variam, indo do assintomático à doença, mutualístico ou patogênico (Boyle et al., 2001). Normalmente, um fungo endofítico não exhibe estruturas externas após sua colonização nos tecidos do hospedeiro. O fato de ter sido visualizado a hifa de *Fusarium sp.* emergindo do tecido do hospedeiro, pode ser explicado pelas condições às quais o fungo e o tecido vegetal estiveram submetidos durante o experimento. Naturalmente, o fungo não encontraria uma umidade alta como encontrada na câmara úmida e muito menos, a folha destacada da planta, sem reações de defesa como na condição normal em campo. Portanto, não foi exatamente uma surpresa a observação da emergência da hifa da folha durante o teste.

Outro fato interessante observado por meio de MEV foi a preferência de *Fusarium sp.* 42.3 pela adesão e penetração da folha de cacauzeiro nas regiões de nervuras. Esta observação sugere que esse fungo coloniza os tecidos de *T. cacao*, preferencialmente na região dos vasos condutores.

4.2.3.2 Interação endófito – *C. perniciosa*

Foram detectadas quatro bandas diferencialmente expressas na interação endófito-patógeno, mas as mesmas bandas não foram visualizadas quando *C. perniciosa* foi crescido em meio contendo o substrato de crescimento do endófito, sugerindo que a expressão de proteínas na interação entre os dois fungos ocorre apenas durante o co-cultivo dos isolados utilizados (Figura 18). No co-cultivo, a inibição de *C. perniciosa* pelo endófito 42.3 não foi total e na cultura, foi observado o crescimento dos dois micélios, morfológicamente bem diferentes. Uma observação que se faz necessária é que o substrato de crescimento do endófito, na situação (D) descrita na Figura 15, só foi adicionado ao meio de cultura e mantido durante 24 horas, sendo imediatamente extraídas as proteínas totais. Assim, existe a possibilidade de o tempo de exposição não ter sido suficiente para a indução de uma resposta de expressão protéica.

Assim, é sugerido que o composto ativo, responsável pela inibição de *C. perniciosa*, é produzido em função da presença do patógeno *in vitro*. Se as substâncias liberadas pelo patógeno no meio de cultivo não são capazes de provocar uma reação por parte do endófito antagonista, a hipótese é de que talvez seja necessário o reconhecimento físico do patógeno, para que o endófito

possa liberar o composto de inibição. Esse reconhecimento sugere, conseqüentemente, uma produção de metabólitos inibidores visando vantagem competitiva na interação.

Figura 18 – Gel de SDS-PAGE, mostrando diferentes perfis de cadeias polipeptídicas: em (1) endófito 42.3, em (2) *Crinipellis perniciososa* 281, em (3) *C. perniciososa* + endófito 42.3, crescidos juntos, em (4) *C. perniciososa* crescido na presença do substrato de crescimento do endófito 42.3. Em (M), marcador de peso molecular. As setas indicam bandas diferencialmente e superexpressas

4.2.4 Considerações finais

Dos resultados obtidos neste capítulo, podemos considerar que:

- ❑ O isolado 42.3 de cacau coloniza eficientemente os tecidos de cacaueiro, mesmo sob condições de laboratório;
- ❑ O MEV constitui uma técnica útil e ilustrativa na análise do início da colonização de fungos na superfície de tecidos hospedeiros, permitindo determinar o tempo médio para início da penetração do tubo germinativo;
- ❑ Esporos do endófito 42.3 apresentam afinidade de penetração nas nervuras das folhas, sendo que apenas nestas regiões, foram observados esporos aderidos;

- Através de SDS-PAGE, foi possível distinguir cadeias polipeptídicas de pesos moleculares diferentes, sendo expressas diferencialmente no patógeno e no endófito, quando da cultura conjunta.

Referências

- ALFENAS, A. C.; BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. cap. 4, p. 152-182.
- ALFENAS, A. C.; BRUNE, W.; OLIVEIRA, J. R.; ALONSO, S. K.; SCORTICHINI, M. Extração de proteínas para eletroforese. In: ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. cap. 2, p. 85-114.
- ARNOLD, A. E.; MEJÍA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 26, p. 15649-15654, 2003.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRA, J.; LACAVA, P. T. **Manual**: isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: Calq, 2002. 86p.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. (2005). Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Ed.). **Fungi: Multifaceted Microbes**, New Delhi: Anamaya Publishers, 2006. No prelo.
- ASSANTE, G.; MAFFI, D.; SARACCHI, M.; FARINA, G.; MORICCA, S.; RAGAZZI, A. Histological studies on the mycoparasitism of *Cladosporium tenuissimum* on urediniospores of *Uromyces appendiculatus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, p. 170-182, 2004.
- BAO, J. R.; LAZAROVITS, G. Differential colonization of tomato roots by nonpathogenic and pathogenic *Fusarium oxysporum* strains may influence *Fusarium* wilt control. **Phytopathology**, Lancaster, v. 91, p. 449-456, 2001.
- BOYLE, C.; GOTZ, M.; DAMMANN-TUGEND, U.; SCHULZ, B. Endophyte-host interactions III. Local vs. systemic colonization. **Symbiosis**, Rehovot, v. 31, p. 259-281, 2001.
- BRUNE, W.; ALFENAS, A. C. Modalidades da eletroforese. In: ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. cap. 1, p. 25-83.

CLAY, K. Fungi and the food of the gods. **Nature**. London, 427:401-402. 2004.

DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. **Annual New York Academy of Sciences**, New York, v. 121, p. 404-427, 1964.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**, 3 ed., Brasília: Embrapa, 1998. 220p.

HAJEK, A. E.; EASTBURN, C. C. Attachment and germination of *Entomophaga maimaiga* conidia on host and non-host larval cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 82, p. 12-22, 2003.

KELEMU, S.; WHITE Jr, J. F.; MUÑOZ, F.; TAKAYAMA, Y. An endophyte of the tropical forage grass *Brachiaria brizantha*: isolating, identifying, and characterizing the fungus, and determining its antimycotic properties. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p.55-62, 2001.

KITAJIMA, E. W. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 1997. 36p.

MARTINEZ, C.; RIOUX, D.; TWEDDELL, R. J. Ultrastructure of the infectio process of potato tuber by *Helminthosporium solani*, causal agent of potato silver scurf. **Mycological Research**, Cambridge, v. 7, p. 828-836, 2004.

MARTINS, M. K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium spp.* e estudo da interação com a planta hospedeira**. 2005. 110p. Tese (Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. W. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 88, p. 828-982, 1991.

ORNSTEIN, L. Disc eletrophoresis. I Background and theory. **Annual New York Academy of Sciences**, New York, v. 121, p. 321-349, 1964.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; VALARINI, M. J.; AZEVEDO, J. L.; ALFENAS, A. C. **Manual de técnicas eletroforéticas em microrganismos**. Piracicaba: FEALQ, 1988. 54p.

PEIXOTO-NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, 2002. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/micro.asp>>. Acesso em: 14 nov. 2005.

TORRES, M. R.; RAMOS, A. J.; SOLER, J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. SEM study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* and *Fusarium verticillioides* on maize grain. **Internation Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, p. 185-193, 2003.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, J. A. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, New York, v. 218, p. 740-740, 1993.