

NOVOS BIÓTIPOS DE *Trichoderma stromaticum*, AGENTE DE BIOCONTROLE DA VASSOURA-DE-BRUXA DE CACAUEIRO RESISTENTES A RADIAÇÃO ULTRA-VIOLETA

ÁTILA D. O. P. PINTO¹, ITAMAR S. MELO², ROSELY N. SANTOS³

N^o 0702001

Resumo

A vassoura-de-bruxa causada pelo fungo *Crinipellis pernicioso*, é uma das mais destrutivas doenças de cacauero. Os métodos de controle utilizados atualmente têm se mostrado ineficientes, pois ainda não se dispõem de variedades de cacaueros resistentes ao patógeno. Uma alternativa que tem suscitado efeitos positivos de controle é o emprego do fungo *Trichoderma stromaticum*, capaz de colonizar os basidiocarpos do patógeno, evitando sua disseminação. Este trabalho teve como objetivo obter mutantes melhorados de *T. stromaticum* capazes de parasitar *C. pernicioso* e resistentes à radiação ultra-violeta (UV). Três novos mutantes (5.15, 5.06 e 5.02) foram eficientes em parasitar estruturas vegetativas de *C. pernicioso* e com maior resistência à UV do que a linhagem selvagem (TVC).

Abstract

The witch's broom, disease of cacao caused by the fungi *Crinipellis perniciosus*. The methods of control used currently have been shown inefficient and an alternative that has had positive effect of its control is the fungi *Trichoderma stromaticum*. This fungus is capable of colonize the reproductive structure of the pathogen, preventing its dissemination. This work had as objective to obtain improved resistant mutants of *T. stromaticum* to ultra-violet radiation (UV) capable to parasite *C. perniciosus* .Three new mutants (5,15; 5,06 and 5,02) should efficient in inhibit the

¹ Orientado: Graduação em Ciências Biológicas, PUC-Campinas, Campinas-SP, atila.danielop@yahoo.com.br

² Orientador: Pesquisador, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP

³ Colaborador: Bióloga, Técnica do LMA, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP

growth and the parasite the pathogen; at the some time that showed to be resistant to UV. The best conditions for sporulation was found with near UV light.

Introdução

O fungo basidiomiceto *Crinipellis pernicioso* agente causal da vassoura-de-bruxa (VB) é um conhecido e destrutivo patógeno das lavouras cacaeiras. Este fungo é um patógeno hemibiotrófico, que ataca tecidos meristemáticos quando na fase biotrófica e, mais tarde, cresce saprofiticamente em tecidos mortos, formando o basidiocarpo.

O controle correto da vassoura-de-bruxa é dependente da fitossanitização (Bastos, 2000; Rudgard, 1987; Wheeler, 1987) que é caracterizada pela remoção de grupos de vassouras infectadas, nas quais os basidiocarpos são formados antes da estação chuvosa (Andebrhan et al., 1995), aplicação de fungicidas químicos e seleção de hospedeiros resistentes.

O *Trichoderma stromaticum* tratar-se de um micoparasita necrotrófico que apresenta grande eficácia no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos. Detém a capacidade de produção de enzimas líticas extracelulares degradadoras da parede celular de muitos fungos, tais como celulases, quitinases, α -1-D-glucanases, α -1,4-glucosidases e proteases. É um micoparasita heterotrófico e necrotrófico natural do solo e adaptado a suportar diferentes condições ambientais. A espécie é descrita como antagonista específico, com potencialidade para reduzir a produção de inóculos de *C. pernicioso* (*Cp*). Nesta interação antagônica, comprovou-se que o mecanismo mais relevante para o biocontrole da vassoura-de-bruxa é, de fato, o micoparasitismo. Além disso, a espécie *T. stromaticum* (*Ts*) apresenta capacidade de recombinação sexual (BEZERRA ET al., 2003) o que pode favorecer o surgimento de isolados diferentes geneticamente, que apresentem graus de atividade antagônica distintos entre si (CARVALHO, 2006).

Neste trabalho, visou-se a obtenção de novos isolados mutantes de *T. stromaticum*, por meio de indução de mutação por irradiação UV e verificação de sua resistência às condições ambientais de campo.

Material e Métodos

Conídios (10^8 conídios por ml) de *Trichoderma stromaticum* foram irradiados com diferentes dosagens (0,10", 20",30") de radiação ultra-violeta (254nm) emitidas por uma fonte com $97.00 \mu\text{w}/\text{cm}^2 \times 10$ a distância de 17 cm. Após radiação, os conídios foram incubados em meio BDA (batata dextrose ágar) por 7 dias no escuro. Conídios germinados e colônias formadas foram contados e estudados quanto ao parasitismo. A avaliação do parasitismo de mutantes de *T. stromaticum* em *C. pernicioso* foi realizada por visualização em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Blocos de ágar foram cortados em pequenos pedaços com hifas de conídios e fixados em Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,5, CaCl₂ 0,001M) sendo, posteriormente, fixado em ósmio 2% e desidratado em acetona com concentrações crescentes, submetidos a ponto - crítico de secagem, metalizados com ouro e visualizados em MEV, Leo 982 (Zeiss+Leica).

Para avaliação da esporulação dos mutantes em diferentes regimes de luz, discos de *T. stromaticum* foram colocados em meio aveia-ágar (4%) e incubados em diferentes regimes de luminosidade: luz near-ultravioleta, luz alternada (foto período de 12h), escuro, foto período de 24h. Após esse período os conídios foram contados.

Resultados e discussão

Três mutantes de *T. stromaticum* (5.15, 5.06 e 5.02) obtidos por radiação UV (254 nm), quando submetidos a doses crescentes de UV apresentaram maior nível de resistência do que a linhagem selvagem (TABELA 1).

TABELA 1. Tolerância de conídios de <i>T. stromaticum</i> à luz ultravioleta (254 nm).			
% de Sobrevivência.			
Linhagem	10"	20"	30"
TVC	84.76	86.67	67.62
5.02	86.96	76.09	63.04
5.06	91.53	95.24	93.65
5.15	85.71	85.71	82.14

Agentes de biocontrole, além de apresentar atributos de parasitar eficientemente o patógeno devem crescer e esporular em abundância. A esporulação depende de vários fatores, estando entre eles, a influência da luz, como um dos mais importantes. *T. stromaticum*, por sua vez esporos em abundância quando inoculado sob luz alternada(foto perío de 12h) e escuro total.(tabela 2). estas informações contribuem para a produção massalngo para aplicações de campo.

TABELA 2. Esporulação de <i>T. stromaticum</i> em diferentes regimes de incubação.		
Regime de Luz	Nº de Conídios/ml	
	2 Dias	6 Dias
NUV	6×10^4	$6,4 \times 10^5$
Alternado	$6,8 \times 10^4$	$1,8 \times 10^7$
Luz Total	$5,5 \times 10^4$	$1,9 \times 10^5$
Escuro Total	$6,5 \times 10^4$	$2,3 \times 10^7$

Parasitismo de *Crinipellis perniciososa* por *T. stromaticum*.

Como verificado na figura 1 o mutante 5.15 manteve propriedades antagonistas contra o fungo *C. perniciososa*, característica esta que não foi perdida por ocasião da irradiação; ao tempo que resiste a esse tipo de luz. Assim, esta linhagem poderá ser útil para aplicações foliares.

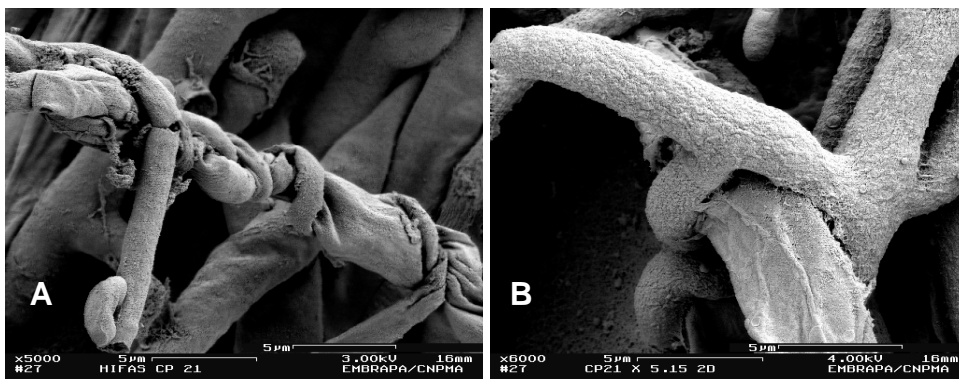


FIGURA 1.

Referências Bibliográficas

ANDERBRHAN, T.; BASTOS, C.N. **Epidemiologia da vassoura-de-bruxa**. Belém: CEPLAC/DEPEA, p.50-55, 1980. (Informe Técnico).

McQUILKEN, M.P.; SUPRIADI; RUDGARD, S. A. Sensitivity of *Crinipellis pernicioso* to two triazole fungicides *in vitro* and their effect on development of the fungus in cocoa. **Plant Pathology**, v.37, p.499-506, 1988.

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

YAMADA, M.M.; ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D.B. Genetic variability among isolates or *Crinipellis pernicioso* from solanaceous host and their relationship to isolates from *Theobroma cacao*. **Agrotropica**, v.10, p.123-126, 1998.

BEZERRA, J.L.; COSTA, J.C.B.; FALEIRO, F.G.; BASTOS, C.N.; BEZERRA, K.M.T; MENEZES, P.V.S. *Hypocrea stromatico* sp. nov. Teleomorfo de *Trichoderma stromatico*. **Fitopatol Bras**, v. 25, p.85, 2002 (Suplemento).

SAMUELS, G.J.; PARDO-SCHULTHEISS, R.; HEBBAR, K.P.; LUMSDEN, R.D.; BASTOS, C.N.; COSTA, J.C.; BEZERRA, J.L. *Trichoderma stromatico* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. **Mycol Res**, v.104, p. 760-64, 2000.

SILVA, M.S.; LUZ, N.E.; DE ALMEIDA, C.A.; GRAMACHO, P.K.; BEZERRA, L.J. Redescrção da sintomatologia causada por *Crinipellis pernicioso* em cacauero. **Agrotropica**, v. 14, p.1-28, 2002.

CARVALHO, C.A. **Bioprospecção de isolados de *Trichoderma Stromaticum* para o controle biológico da Vassoura-de-bruxa do cacauero**. Bahia: Universidade Estadual De Santa Cruz, Ilhéus, p. 13-15, 2006.