

DIRCEU MACAGNAN

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOSPOROGÊNICAS E DO TIPO
ACTINOMICETOS VISANDO O BIOCONTROLE DA VASSOURA-DE-BRUXA
(*Crinipellis perniciosa*) E DA PODRIDÃO-PARDA (*Phytophthora* spp.) DO
CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L) E ESTUDO DOS MECANISMOS DE
ANTAGONISMO AO FUNGO *Crinipellis perniciosa*.

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
graduação em Fitopatologia, para
obtenção do título de “Doctor
Scientiae”

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M113i
2005

Macagnan, Dirceu, 1975-
Isolamento e seleção de bactérias endosporogênicas
e do tipo actinomicetos visando o biocontrole da vassou-
ra-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) e da podridão-parda
(*Phytophthora spp.*) do cacauero (*Theobroma cacao L*)
e estudo dos mecanismos de antagonismo ao fungo
Crinipellis perniciosa / Dirceu Macagnan. – Viçosa :
UFV, 2005.
xiii, 109f. : il. ; 29cm.

Orientador: Reginaldo da Silva Romeiro.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Cacau - Doenças e pragas - Controle biológico.
2. *Crinipellis perniciosa* - Controle biológico.
3. *Phytophthora* - Controle biológico.
4. Competição - (biologia).
5. *Theobroma cacao*. I. Universidade Federal Viçosa. II.Título.

de

CDD 22.ed. 633.7494

DIRCEU MACAGNAN

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOSPOROGÊNICAS E DO TIPO
ACTINOMICETOS VISANDO O BIOCONTROLE DA VASSOURA-DE-BRUXA
(*Crinipellis pernicioso*) E DA PODRIDÃO-PARDA (*Phytophthora* SPP.) DO
CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L) E ESTUDO DOS MECANISMOS DE
ANTAGONISMO AO FUNGO *Crinipellis pernicioso*.

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
graduação em Fitopatologia, para
obtenção do título de “Doctor
Scientiae”

APROVADA: 20 de julho de 2005.

Prof. José Rogério de Oliveira

Prof. Leandro Grassi de Freitas

Prof^a. Maria Cristina Baracat Pereira
(Conselheira)

Dr. Alan William Vilela Pomella
(Conselheiro)

Prof. Reginaldo da Silva Romeiro
(Orientador)

Aos meus queridos pais

Danilo e Geni Maria Macagnan,

A “nona” Ignez (*In memoriam*)

Com todo o carinho,

dedico este humilde trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das bolsas de estudos desde a iniciação científica ao Doutorado;

À Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP pelo financiamento de parte do projeto;

Aos meus pais, Danilo e Geni Maria Macagnan, pelo constante e incondicional apoio e incentivo e, pela compreensão de minha ausência durante a realização do curso.

A Daniela, pelo carinho, companheirismo e paciência durante todo o decorrer do curso.

Ao meu orientador, Prof. Reginaldo da Silva Romeiro, pelos ensinamentos, paciência, exemplos de honestidade, dedicação ao trabalho, exemplo de grande ser humano, pela orientação e acima de tudo, pela amizade. Para sempre lhe serei grato!

À professora Maria Cristina Baracat Pereira pela atenção dispensada, pela preocupação em sempre dar a melhor orientação e pelo carinho que sempre teve com os dados apresentados.

À Hebréia Oliveira Almeida pela disposição e tão preciosa ajuda nas análises bioquímicas.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da UFV, Bernardo, Harllen Sandro, Flávio Garcia, Hέλvio, Daniela Cararro, Janaína Horta e Henrique pela companhia e pelos momentos agradáveis que tornaram a realização deste trabalho muito mais prazerosa. Agradecimento especial aos estudantes de Iniciação Científica Gisele Batista e Roberto Lanna Filho pela preciosa ajuda na execução de ensaios em casa-de-vegetação e laboratório, pelos inúmeros momentos de descontração e pelo desafio de servir-lhes de exemplo.

Ao Prof. Robert W. Barreto pela concessão das câmaras para indução de produção de basidiocarpos da Clínica de Doenças de Plantas.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, Délio, Brás, Dora, Cecília e Rita sempre muito prestativos às minhas solicitações.

A Almirante Cacau, na pessoa do Sr. William Martin Aitken, pelo financiamento de parte do projeto; ao Dr. Alan Pomella pelas sugestões, críticas, amizade e pelo empenho em fazer sempre mais e melhor; aos técnicos Agnaldo, Alício, Iara, Livia, Rui e Cosme pela solicitude e amizade. Aos funcionários Dona Rosa, Marystella, Antonio, Hélia, Nice, Angélica, Antonio “Percebes” Edísio, Pedro, Miranildo, Carlão, pela amizade e dedicação aos seus afazeres cujo conjunto muito contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho. Ao motorista Wolnei (“Voca”) pela preciosa ajuda e disposição na coleta das amostras de frutos em lavouras ao sul da região cacauceira da Bahia.

Ao agrônomo Edmundo Mandarino e a Dra. Regina Cele Rebouças Machado pela amizade, disposição em compartilhar seus conhecimentos e pelos momentos de boa e proveitosa conversa.

Aos trabalhadores de campo, Aílton, “Tony Blair”, Zenildo, Manoel Messias, Manoel Francisco, Renilton Bispo dos Santos, Ramon e Genilson, pelo sempre pronto, indispensável e zeloso apoio nos ensaios de campo. Vocês fizeram a diferença!

Aos colegas da Casa-do-estudante em Itabuna e demais estudantes da Almirante, Heron Salazar, Taís Lana, Alessandra Rezende, Alexandre Fontes, Rogério Hanada, Joseane, Carlos Martins e Aítala Carvalho pela superagradável companhia em todos os momentos e acima de tudo pelo bom humor nos momentos difíceis.

Ao povo Brasileiro principalmente aos anônimos Josés, Marias, Pedros, Joãos... que talvez nunca ouviram falar em Pasteur, Kock, Einstein (exceto por aquela foto linguaruda), De Bary, Newton, Oppenheimer, Darwin, Galileu Galilei, Watson, Crick, Leeuwenhoek, Linnaeus, Fleming, Mendel, Mullis, Hawking, Avery, Lederberg, Tatum especialmente aqueles que não tiveram acesso nem mesmo às primeiras letras mas que mesmo assim, com o suor de seu rosto, ajudaram a gerar a riqueza que custeou meus estudos do ensino fundamental ao doutorado

A todas as pessoas que porventura não estejam aqui citadas nominalmente e que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

DIRCEU MACAGNAN, filho de Danilo e Geni Macagnan nasceu na cidade catarinense de Concórdia em 22 de julho de 1975. Em 1995, formou-se Técnico em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal de Concórdia e, em 1999, recebeu o grau de Licenciado em Ciências Agrícolas pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Em fevereiro de 2000, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, na área de concentração em Bacteriologia de Plantas, obtendo o título de Mestre sob orientação do Prof. Reginaldo da Silva Romeiro em agosto de 2001. Neste mesmo mês e ano iniciou o curso de Doutorado em Fitopatologia submetendo sua tese à banca examinadora em 20 de julho de 2005.

RESUMO

MACAGNAN, Dirceu, D.S. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2005.
Isolamento e seleção de bactérias endosporogênicas e do tipo actinomicetos visando o biocontrole da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) e da podridão-parda (*Phytophthora* spp.) do cacauero (*Theobroma cacao* L) e estudo dos mecanismos de antagonismo ao fungo *Crinipellis pernicioso*.
Orientador: Reginaldo da Silva Romeiro. Conselheiros: Alan William Vilela Pomella e Maria Cristina Baracat Pereira.

Durante a realização deste trabalho teve-se por objetivo isolar da superfície de frutos de cacauero bactérias endosporogênicas e actinomicetos e selecionar os isolados mais eficientes visando o biocontrole da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) e da podridão-parda (*Phytophthora* spp) em frutos de cacauero. Foram obtidos um total 203 isolados de endosporogênicas e 94 de actinomicetos. À coleção adicionaram-se mais 39 isolados de bactérias antagônicas a patógenos do cacauero obtidas em trabalhos anteriores, totalizando 336 isolados. A seleção dos mais promissores foi feita com base na capacidade dos isolados inibirem a germinação de basidiósporos na superfície de frutos destacados do genótipo TSH 516, com 20-30 dias de idade. Numa primeira fase, cada isolado foi testado em um único fruto. Os isolados que inibiram a germinação de pelo menos 50 % dos basidiósporos foram novamente testados, desta vez cada isolado foi aplicado a três frutos. Foram obtidos como os mais promissores os isolados Ac4, Ac19, Ac26, Ac68, e Ac79 todos pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Verificou-se que o uso de células vegetativas provenientes do cultivo desses antagonistas em meio líquido era mais eficiente que o uso dos esporos desses mesmos isolados na inibição da germinação dos basidiósporos. Adicionalmente, o sobrenadante proveniente do cultivo desses isolados em meio líquido mostrou-se tão eficiente quanto o uso de células vegetativas. A seleção final dos antagonistas foi também baseada na inibição da germinação de basidiósporos do patógeno porém, em condições de campo quando o isolado Ac79 foi considerado como o mais promissor. Os isolados pré-selecionados

foram também testados quanto a sua capacidade em proteger frutos de cacau contra a podridão-parda (*Phytophthora palmivora*) em que destacou-se o isolado Ac26. Em ensaios em laboratório verificou-se que os cinco melhores isolados eram capazes de produzir sideróforos, ácido cianídrico e quitinases porém a estas substâncias atribui-se apenas papel secundário na inibição da germinação de propágulos de *C. pernicioso*. Adicionalmente, verificou-se que os isolados Ac26 e Ac79, em diferentes meios de cultura, produzem substâncias capazes de inibir a germinação de basidiósporos de *C. pernicioso*. As substâncias com essa propriedade produzidas pelo isolado Ac79 apresentam massa molecular inferior a 1 kDa enquanto aquelas produzidas pelo isolado Ac26 apresentam massa molecular entre 1 e 12 kDa. Para esse último, o fracionamento do sobrenadante em colunas e troca aniônica e catiônica permitem afirmar que pelo menos duas substâncias diferentes estão presentes sendo uma aniônica e uma catiônica. Os isolados Ac26 e Ac79 foram testados quanto a sua capacidade em induzir resistência em mudas de cacau. Verificou-se que os isolados foram capazes de induzir aumento na atividade de peroxidases e polifenol oxidases. Porém a não ocorrência de sintomas em mudas inoculadas com *C. pernicioso* dificultou estimar o real significado do aumento da atividade dessas enzimas na proteção das mudas. Ensaio mostraram a incompatibilidade entre os dois antagonistas quando aplicados em mistura porém quando o sobrenadante desses dois antagonistas foram combinados, houve efeito sinérgico na proteção de frutos contra *P. palmivora*. Em campo foi testada a real capacidade dos antagonistas aplicados tanto individualmente como em associação em proteger frutos de cacau contra a incidência natural da podridão-parda e da vassoura-de-bruxa. A efetividade dos isolados foi comparada à efetividade do óxido cuproso e à plantas sem nenhum tratamento. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tratamentos. Esta ausência de controle das doenças é atribuída ao início tardio das aplicações. Com base nos resultados dos diferentes ensaios pode-se concluir que o isolado Ac26 é um antagonista promissor para o biocontrole da podridão-parda enquanto o Ac79 é um antagonista promissor para o biocontrole da vassoura-de-bruxa. Porém são necessários mais estudos visando confirmar a efetividade desses isolados em condições de campo.

ABSTRACT

MACAGNAN, Dirceu, D.S. Universidade Federal de Viçosa, July, 2005. Isolation and selection of endosporegenic bacteria and actinomycetes aiming the biocontrol of witches' broom (*Crinipellis pernicioso*) and black pod (*Phytophthora spp.*) of cocoa (*Theobroma cacao* L) and studies of antagonistic mechanisms against the fungus *Crinipellis pernicioso*. Adviser: Reginaldo da Silva Romeiro. Committee members: Alan William Vilela Pomella and Maria Cristina Baracat Pereira.

This work had as main objective to isolate from the surface of cocoa fruits sporogenic bacteria as well as actinomycetes and select the ones more efficient for the biocontrol of witches' broom (*Crinipellis pernicioso*) and black pod (*Phytophthora spp.*) in cocoa fruits. A total of 336 isolates was obtained, being 203 of them sporogenic bacteria, 94 actinomycetes and 39 bacteria antagonistic to cocoa pathogens, selected in previous research. The initial screen was accomplished based on the ability of every isolate under investigation to inhibit basidiospore germination onto the surface of 20-30 days old detached fruits (TSH 516 genotype). In a first approach, a single fruit per isolate was used and potential antagonists able to inhibit basidiospore germination in, at least, 50% were selected. In a second approach, selection was done over, by using three fruits per isolate. At the end of the selection procedure, the potential antagonists namely Ac4, Ac19, Ac26, Ac68 and Ac79, all of them actinomycetes belonging to the genus *Streptomyces*, were chosen for continuing the work. It was verified that vegetative cells from liquid cultures were more efficient than spores for inhibiting basidiospore germination as well as that supernates from liquid cultures were as efficient as vegetative cells. Repeating the same procedure under field conditions with the best 5 isolates lead us to select definitely the isolate Ac79. The five selected antagonists were able to protect cocoa fruits against black pod (*Phytophthora palmivora*) and out of the isolate Ac26 was the most efficient in this aspect. In laboratory tests, it was possible to detect that the five isolates were able to produce

siderophores, cyanide and chitinases but apparently those determinants of microbial antagonism seem to have a secondary importance on the inhibition of *C. pernicios* basidiospores. Moreover, it was verified that antagonists Ac26 and Ac79, after being grown in distinct culture media are able to produce substances that inhibit basidiospore germination. Isolate Ac79 synthesizes inhibitory substance with a molecular weight smaller than 1 kDa while the one given off by isolate Ac26 have molecular weights ranging from 1 to 12 kDa. For the latter, resolution of supernates by column chromatography (ion exchange, either anionic or cationic) allowed us to conclude that at least two distinct antimicrobial compounds are present, being one negatively charge and the other one positively. Isolates Ac26 and Ac79 were checked for their ability as resistance inducers in cocoa seedlings and cocoa tissue exposure to their propagules did increase activity of peroxidases and polyphenoloxidases. Nevertheless, lack of symptoms in inoculated seedlings make difficult to evaluate the actual meaning of the aforementioned increases in activity as far as induced resistance is concerned. Compatibility assays indicated that it is impossible to deliver to fruits to be protected a mixture of propagules of both antagonism but the same does not apply to a mixture of their supernates and that this latter mixture has even a synergistic effect in terms of protection of cocoa fruits against an isolate of *P. palmivora*. In the field antagonists were delivered either alone or combined, in attempts to protect cocoa fruits against natural incidence of witches' broom and black pod, being cuprous oxide and water as controls. No significant differences were observed among treatments and the reason might be because sprayings started too late. Results obtained from the aforementioned trials suggest that isolate Ac26 is a good antagonist for black pod while isolate Ac79 may turn into a good biocontrol agent for wiches's broom, in spite of the fact that more tests ought to be performed in order to support this statement.

INDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
PAPER I: Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their activity against the witches' broom and black pod pathogens.....	
SUMMARY.....	13
INTRODUCTION	14
MATERIAL AND METHODS.....	16
Sampling, isolation, and cultivation of the biocontrol agents	16
Pathogen cultivation and inoculum production.....	16
Inoculum of the biocontrol agents	17
Selection of the biocontrol agents under laboratory conditions.....	18
Effect of the type of propagule on the activity of the actinomycetes.....	19
Effect of the formulations.....	19
Activity against <i>Phytophthora palmivora</i>	19
Statistical analyses.....	20
Molecular identification of the actinomycetes.....	20
RESULTS.....	20
Collection of microorganisms.....	20
Selection of the most promising isolates.....	21
Molecular Identification.....	21
Effect of the type of inoculum on the inhibition of <i>C. pernicioso</i> germination.....	21
Inhibition of <i>C. pernicioso</i> germination	21
Assays against <i>P. palmivora</i>	22
DISCUSSION.....	22
ACKNOWLEDGEMENTS.....	24
REFERENCES	25
FIGURES.....	30

ARTIGO II: Detecção de compostos com possível atividade antimicrobiana produzidos por actinomicetos selecionados para o controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero e o envolvimento dessas substâncias na inibição da germinação de basidiósporos do patógeno.....	32
RESUMO.....	32
INTRODUÇÃO.....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
Microrganismos seu cultivo e manutenção:	35
Detecção de HCN:	35
Papel da produção de HCN na germinação de basidiósporos do patógeno:	36
Detecção de sideróforos:	37
Sideróforos e germinação de basidiósporos de <i>C. perniciosa</i> :	38
Detecção de enzimas líticas:.....	38
Produção de quitinases e inibição da germinação de basidiósporos:	39
Quitinases e inibição da germinação de basidiósporos:	40
RESULTADOS	40
Produção de HCN e inibição da germinação de basidiósporos:.....	40
Detecção de sideróforos e inibição da germinação de basidiósporos:.....	41
Produção de enzimas líticas e inibição da germinação:	41
DISCUSSÃO.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
FIGURAS	50

ARTIGO III: Aumento da atividade de enzimas associadas ao estado de indução e proteção de mudas de cacauero mediadas por dois actinomicetos residentes de filoplano aplicados isoladamente e em associação	52
RESUMO.....	52
INTRODUÇÃO.....	53
MATERIAL E MÉTODOS.....	55
Material vegetal e microrganismos: manutenção, multiplicação e aplicação.	55
Delineamento para as análises enzimáticas:	57
Obtenção dos extratos:.....	57
Determinação da atividade de peroxidases:.....	57
Determinação da atividade de polifenol oxidases:	58

Determinação da atividade de quitinases:	58
Determinação da atividade de β -1,3- glucanases:	58
RESULTADOS	59
Incidência da vassoura-de-bruxa:	59
Concentração de proteína solúvel total:.....	59
Atividade de peroxidases:.....	59
Atividade de polifenol oxidases:	60
Quitinases:	60
β -1,3-glucanases:	60
DISCUSSÃO	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
FIGURAS	67

ARTIGO IV: Proteção de frutos de cacaueteiro contra a podridão-parda por combinações de células vivas e sobrenadantes provenientes do cultivo de dois actinomicetos em dois diferentes meios de cultura.	71
RESUMO.....	71
INTRODUÇÃO.....	72
MATERIAL E MÉTODOS.....	73
Microrganismos e seu cultivo:.....	73
Ensaio de compatibilidade entre isolados:.....	74
Material vegetal e aplicação dos tratamentos:.....	75
Quantificação de efetividade:	75
RESULTADOS	75
DISCUSSÃO	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
FIGURAS	82

ARTIGO V: Dispensa de dois antagonistas em condições de campo visando o controle biológico da vassoura-de-bruxa (<i>Crinipellis perniciosa</i>) e da podridão-parda (<i>Phytophthora</i> ssp.).....	84
RESUMO.....	84
INTRODUÇÃO.....	85
MATERIAL E MÉTODOS.....	86

Antagonistas e sua multiplicação:	86
Material vegetal e tratamentos:.....	86
RESULTADOS	87
DISCUSSÃO	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
FIGURAS	91
ARTIGO VI: Caracterização parcial de substâncias inibidoras da germinação de basidiósporos de <i>Crinipellis perniciosa</i> produzidas por dois actinomicetos selecionados para o biocontrole de doenças do cacauero	
RESUMO.....	92
INTRODUÇÃO.....	93
MATERIAL E MÉTODOS.....	93
Microrganismos e seu cultivo:.....	93
Inibição da germinação de basidiósporos por sobrenadantes provenientes do cultivo dos antagonistas em diferentes meios de cultura:.....	94
Bioensaio de inibição da germinação de basidiósporos de <i>C. perniciosa</i> :.....	95
Cinética da atividade da substância inibidora da germinação de basidiósporos de <i>C. perniciosa</i> por acompanhamento do cultivo dos antagonistas em batelada:.....	95
Estimativa do tamanho das moléculas por diálise em membranas:.....	96
Avaliação da capacidade de absorção de radiação das moléculas:	96
Filtração em gel:	96
Cromatografias de troca aniônica e catiônica:.....	96
RESULTADOS	97
DISCUSSÃO	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
FIGURAS	103
CONCLUSÕES GERAIS.....	109

INTRODUÇÃO GERAL

O cacauieiro, uma planta nativa da bacia amazônica produz frutos, nos trocos e ramos principais, no interior dos quais se desenvolvem as sementes as que após secas e torradas dão origem ao chocolate. Esta planta já era conhecida pelas civilizações pré-colombianas. Os Astecas, na América Central, chamavam as amêndoas de cacau de “manjar dos Deuses” as quais eram usadas em rituais religiosos, como moeda de troca e como presentes. A partir de amêndoas torradas e moídas acrescida de água e milho, os Astecas produziam uma bebida amarga a qual chamavam de “chocolatl” e ao seu consumo diário atribuíam diferentes benefícios (Becker, 1999). O primeiro contato dos europeus com a planta e seu mais conhecido produto ocorreu, possivelmente, na corte de Montezuma, supremo da civilização Asteca, através do espanhol Hernando Cortez, o qual também foi o responsável por introduzi-lo na Europa (Purdy & Schmidt, 1996). Uma vez no Velho Continente o “chocolatl” inicialmente continuou sendo consumido como bebida porém acrescido de açúcar tornando-o mais palatável. O primeiro chocolate em barra surgiu por volta de 1849 porém, somente por volta de 1897 surgiu uma segunda receita de chocolate em barra contendo amêndoas de cacau, leite condensado e sacarose a qual tornou-se conhecida, e consumida, no mundo inteiro. Esta receita embora tenha sofrido algumas modificações perdura até nossos dias. A atual demanda mundial de amêndoas secas de cacau consumidas em diferentes formas de chocolate ou em combinação com outras iguarias, é estimada em cerca de três milhões de toneladas por ano (Becker, 1999).

Em 1746, sete anos antes de Linneaus nomear a árvore de cacau de *Theobroma cacao* (Theo = Deus. Broma =alimento) sementes da planta provenientes do Estado do Pará foram plantadas no atual município de Canavieiras, sul do Estado bahiano. A cultura se desenvolveu, atingindo a área atual de aproximadamente 650.000 hectares de lavouras contínuas. A produção proveniente dessa área já representou 85 % do total produzido no Brasil e, foi a principal responsável por elevar o Brasil ao posto de segundo maior produtor mundial de amêndoas (Pereira et al., 1996). O cacau foi o responsável pela geração de extraordinária riqueza na região, imortalizada nas obras de Jorge Amado.

A interação entre o cacauieiro e o fungo *Crinipellis perniciosa* foi assinalada em 1785, por Ferreira, que ilustrou a doença e denominou as malformações por ele observadas de “Lagartão” por lembrarem o referido réptil (Silva, 1987). Decorreu um

século até que em 1895 esta doença foi estudada, no Suriname, tendo sua etiologia elucidada e atribuída ao fungo *Marasmius perniciosus* (Stahel, 1915). Esta denominação permaneceu válida até 1942 quando, revisando o gênero *Marasmius*, Singer (1942), propôs a presente denominação de *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer. Em condições brasileiras é a doença mais importante da cultura (Dalla Pria & Camargo, 1997) a qual em condições favoráveis pode causar perdas superiores a 90 % (Evans, 1981).

Sempre houve um grande temor que essa doença pudesse ser introduzida na região cacauzeira da Bahia (Evans, 1981). Com o objetivo de prevenir ou pelo menos retardar a introdução da doença na Bahia, em 1978 o Ministério da Agricultura criou a Campanha para o Controle da Disseminação da Vassoura-de-Bruca, administrada pela CEPLAC. Foi criada uma estação quarentenária em Salvador visando assegurar que o material vegetal a ser introduzido na região cacauzeira estivesse livre da doença. Adicionalmente foi estabelecido um cordão fitossanitário com postos de fiscalização nas principais vias de entrada da região cacauzeira com o objetivo de interceptar e destruir material vegetal com possibilidade de ter a ele associado o patógeno (Pereira et al., 1996). Porém mesmo com todos esses esforços, a doença foi constatada na Bahia em 1988 (Pereira et al., 1989).

Perde-se nas brumas da especulação como a doença foi introduzida na Bahia indo desde a não intencional até a criminosa, uma vez que é impossível propágulos infectivos do patógeno terem atingido as lavouras Bahianas por vias naturais posto que as mais próximas fontes de inóculo distam mais de 2.000 km (Pereira et al., 1989). Há também uma segunda possibilidade, aventada por alguns pesquisadores, de que o agente causal da doença era nativo na região porém em hospedeiros diferentes e, por pressão de seleção, uma população do patógeno passou a causar doença no cacauzeiro (Barreto & Evans, 1996; Evans & Barreto, 1996; Resende et al., 2000).

Porém é fato concreto que o surgimento da doença na Bahia resultou em um verdadeiro desastre sócio-econômico jamais visto na região, evidenciado pelo abandono de fazendas de cacau, queda vertiginosa do preço das terras e falência do comércio. O êxodo rural aumentou e alguns municípios da região produtora tiveram a sua produção reduzida (Trevisan & Silva Jr., 1995). A produção brasileira de cacau, que na safra 1984/85 foi de 457.000 toneladas, caiu para 125.000 toneladas na safra 1999/2000 (CEPLAC, 2002). Essa queda na produção deve-se em grande parte à incidência da doença na região cacauzeira bahiana. As conseqüências da introdução da vassoura-de-

bruxa no sul da Bahia passará para a história como um dos exemplos mais dramáticos do impacto econômico e social de uma fitomoléstia (Luz et al., 1997).

Os maiores avanços no controle da doença têm sido obtidos pela substituição das copas das lavouras plantadas por genótipos com elevada resistência a doença. A elevação dos preços pagos às amêndoas a partir do final de 2002 (Seagri, 2005) deu novo ânimo aos cacauicultores possibilitando a recuperação das lavouras e adoção da tecnologia disponível.

Porém a esmagadora maioria das lavouras ainda é constituída por genótipos suscetíveis à doença.

Adicionalmente, a resistência genética, embora sendo a medida de controle mais simples a ser adotada pelo agricultor, não pode ser utilizada isoladamente. A resistência observada em cacauero à vassoura-de-bruxa é do tipo vertical incompleta, portanto, a existência de uma população do patógeno incidindo sobre uma população de plantas e proporcionando a seleção de uma população mais agressiva. Sendo o cacauero uma cultura perene, não é possível a contínua substituição dos materiais plantados para suplantar a quebra da resistência. De fato, a constatação de diferentes populações do patógeno causador da enfermidade (Andebrhan & Furtek, 1994; Wheeler & Mepsted, 1988; Hardy, 1960; Niella et al., 2000; Gomes et al., 2000; Lopes et al., 2000; Viana Junior et al., 2000), tem sido motivo de preocupação para muitos pesquisadores, devido a possibilidade de quebra da resistência dos materiais selecionados.

Crinipellis perniciosa agente causal da vassoura-de-bruxa, é um fungo pertencente ao Phylum Basidiomycota, ordem Agaricales, família Tricholomataceae (Alexopoulos et al., 1996). Evans & Bastos (1979) concluíram que *C. perniciosa* possui duas fases fisiológicas, genéticas e morfológicamente diferentes. Na fase parasítica o fungo apresenta micélio entumescido, medindo entre 5 e 20 μm , monocariótico, sem grampos de conexão, que é encontrado somente nos tecidos vivos do hospedeiro. A fase saprofítica ocorre nos tecidos mortos e em meio de cultura, quando as hifas apresentam-se mais delgadas, 1 a 3 μm , dicarióticas e com grampos de conexão.

Basidiocarpos do fungo desenvolvem-se a partir de micélio dicariótico, originário de vassouras ou frutos mortos colonizados. Os basidiósporos são, mais comumente, liberados a noite e disseminados por vento e água da chuva e constituem-se no principal tipo de propágulo infectivo do patógeno. Basidiósporos germinam na superfície da planta e produzem um longo tubo germinativo, que penetra através dos estômatos e na base de tricomas injuriados (Frias et al., 1991).

Após a penetração do micélio biotrófico, este se ramifica no tecido do hospedeiro intercelularmente e decorridas 3 a 9 semanas da infecção, tem início a substituição do micélio biotrófico pelo saprofítico (Calle et al., 1982). Durante a transição de vassouras verdes para vassouras mortas, são encontrados ambos os tipos de micélio (Wheeler, 1985). As vassouras mortas ou os frutos secos, após 4 a 8 semanas, sob condições favoráveis, podem iniciar a produção de basidiocarpos (Purdy & Schmidt, 1996), produção essa que pode se estender por até três anos (Bastos, 1994).

Durante o ciclo de vida do patógeno, há dois momentos em que as medidas de controle são potencialmente mais efetivas. O primeiro deles ocorre por ocasião da formação dos basidiocarpos e o segundo por ocasião da germinação dos basidiósporos e penetração do tubo germinativo, posto que uma vez no interior do hospedeiro, pouco pode ser feito além da remoção de tecidos infectados.

Em relação a supressão de formação de basidiocarpos, possivelmente a melhor novidade nos últimos tempos é o controle biológico por meio do fungo *Trichoderma stromaticum* (Samuels et al., 2000) inicialmente observado por Bastos (1985) no Estado do Pará. Atualmente é produzido pela CEPLAC/CEPEC e faz parte do controle integrado da vassoura-de-bruxa no sul do Estado da Bahia (Bezerra et al., 2000). O mecanismo de ação desse antagonista é a colonização de órgãos infectados, frutos e ramos secos, onde exerce o parasitismo de hifas do patógeno (Costa, 2003) impedindo a produção de novos propágulos infectivos. Há também evidências de que isolados desse fungo podem associar-se endofiticamente a plantas de cacauero promovendo o seu crescimento e induzindo resistência contra o patógeno (Souza et al., 2003).

A proteção de órgãos suscetíveis, lançamentos vegetativos, almofadas florais e frutos, pode ser feita com o uso de fungicidas protetores. Porém nem sempre apresentam resultado satisfatório devido à remoção por chuvas e também diluição do produto devido ao crescimento do hospedeiro, especialmente no caso de frutos. Adicionalmente, a adoção depende dos preços pagos às amêndoas (Evans et al., 1977; Purdy & Schmidt, 1996).

O foco principal dos trabalhos de controle biológico tem sido a inibição da produção de inóculo do patógeno. Pouco tem sido feito no intuito de proteger órgãos suscetíveis sendo que, este assume conspícua importância para as lavouras cacaueiras do sul da Bahia. O patógeno apresenta um eficiente mecanismo de disseminação. Segundo Solorzano (1977) com a incidência de ventos entre 1,1 e 1,3 m.s⁻¹, ausência de barreiras e sem a incidência de chuvas, estes podem ser transportados por distâncias

entre 40 e 50 km. Dessa maneira, já foram observadas infecções em plantas localizadas à distância de 1,5 km da fonte de inóculo (Evans & Solorzano, 1981). Portanto, em função da grande área plantada, formando um complexo de plantações contíguas, mesmo lavouras que adotem medidas de controle da doença podem ser atingidas pelo patógeno da mesma forma que lavouras onde não são adotadas quaisquer medidas de controle (Pomella, 2001).

A prospecção de bactérias residentes de filoplano de cacaueteiro como agentes de controle biológico da vassoura-de-bruxa foi estudada inicialmente por Macagnan (2001). A partir de um universo de 377 isolados foram selecionados os mais eficientes com base em ensaios de laboratório e casa-de-vegetação. Em condições de laboratório, através de bioensaios, foram detectados compostos antifúngicos produzidos por estes mesmos microrganismos contra o micélio de *C. pernicioso*. Porém ensaios posteriores em casa-de-vegetação revelaram a ineficiência desses isolados em proteger mudas de cacaueteiro contra o patógeno. Adicionalmente, observou-se que a maior proporção de microrganismos com atividade antagonista ao patógeno eram aqueles isolados de amostras de frutos coletados ao sul da região cacaueteira bahiana.

Uma das causas da ausência de efeito dos antagonistas na proteção das mudas pode ser o conjunto de condições que torna o filoplano um ambiente extremamente adverso. Bactérias que eficientemente colonizam e têm esse ambiente como habitat, dispõem de duas estratégias: a tolerância ou resistência, e o escape. A primeira requer capacidade em tolerar condições inóspitas, tais como a incidência de radiação ultravioleta e baixa umidade, em função de estruturas morfológicas da célula. Já o escape, é visto como a habilidade da bactéria em buscar estabelecer-se em sítios que ofereçam um ambiente menos sujeito à adversidades ambientais (Beattie & Lindow, 1995; Beattie & Lindow, 1999). Assumindo que para haver controle biológico é necessário que o antagonista esteja presente em altas populações, aventa-se que aqueles que dispõem de estruturas de resistência sejam capazes de manter sua população elevada por mais tempo.

Nesse sentido, bactérias capazes de produzir estruturas de resistência tais como endósporos podem ter suas chances de sobrevivência aumentadas em comparação a bactérias não endosporogênicas, uma vez que endósporos são tidos como a estrutura biológica de maior resistência a fatores químicos e físicos (Madigan et al., 2000). Adicionalmente, bactérias endosporogênicas produzem substâncias antimicrobianas

(Demain & Lancini, 2001), assim como podem induzir resistência em plantas (Halfeld-Vieira, 2002; Silva et al., 2004).

Outro grupo de bactérias com grande resistência a condições adversas de ambiente são os actinomicetos. Estes são procariotos Gram positivos e constituem um grupo com ampla diversidade morfológica. A atividade desses organismos na natureza varia desde a liberação de nutrientes utilizados por outros microrganismos através da decomposição da matéria orgânica presente nos solos, fixadores de nitrogênio atmosférico até a causadores de doenças em plantas e animais, incluindo humanos (Goodfellow & Williams, 1983).

É também um grupo de microrganismos fisiologicamente diverso, evidenciado pela produção de centenas de compostos muitos dos quais, são antibióticos com habilidade de inibir o crescimento de outros microrganismos (Ensign, 1992).

Um dos fatores que tornam actinomicetos atrativos como agentes de controle biológico no filoplano é sua capacidade de sobrevivência em ambientes adversos por meio da degradação de moléculas complexas e utilizá-las como substrato (McCarthy, 1989). Uma segunda característica fisiológica importante que confere maior resistência a dessecação à estes microrganismos, é o acúmulo intracelular de altas concentrações de trealose (McBride & Ensign, 1987). A trealose, em tecidos dessecados, assume a função da água mantendo a integridade da membrana (Crowe et al., 1984).

A segunda doença do cacaueiro em importância econômica no Brasil é a podridão-parda, ainda que em termos mundiais seja a que mais cause perdas, por ocorrer em lavouras de todos os países produtores. No Brasil a podridão-parda é causada por quatro diferentes espécies do gênero *Phytophthora*; *P. capsici*, *P. palmivora*, *P. citrophthora* e *P. heveae*. As perdas causadas por essa doença giram em torno de 20 a 30 % porém dependendo das condições do ambiente podem ser muito maiores (Luz & Silva, 2001).

As espécies de *Phytophthora* podem atacar qualquer parte do cacaueiro desde as raízes passando pelos ramos chupões, tronco, almofadas florais e folhas. Porém os maiores danos causados ocorrem nos frutos. Estes são suscetíveis em qualquer idade porém observa-se que a suscetibilidade aumenta com a idade do fruto (Lawrence, 1978).

O controle genético da podridão-parda é dificultado por esta ser causada por diferentes espécies de *Phytophthora* e são poucos os materiais com resistência concomitantemente às quatro espécies. Na atualidade as plantações no sul da Bahia são de genótipos suscetíveis e a principal medida de controle da doença é a aplicação de

fungicidas cúpricos (Luz & Silva, 2001). O controle biológico tem sido pouco explorado e a quase totalidade dos trabalhos versam sobre o uso de antagonistas fúngicos (Krauss & Soberanis, 2001; Luz & Silva, 2001; ten Hoopen et al., 2003; Hanada et al., 2004).

O controle biológico deve se inserir no contexto das doenças do cacauero como uma ferramenta auxiliar para o controle efetivo das referida enfermidades e para manter a longevidade da resistência dos materiais selecionados, atuando na diminuição da produção de inóculo e na proteção de órgãos suscetíveis contra a infecção pelo patógeno.

Com este trabalho objetivou-se o isolamento de bactérias formadoras de endósporos e actinomicetos da superfície de frutos de cacauero e selecionar os isolados mais eficientes no biocontrole da vasoura-de-bruxa e da podridão-parda. Procurou-se também estudar os possíveis mecanismos envolvidos no biocontrole mediado por esses isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W. & Blackell, M. 1996. Introductory Mycology. New York, John Wiley & Sons Inc. 869p.
- Andebrhan, T. & Furtek, D.B. 1994. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis pernicioso* isolates from different hosts. Plant Pathology 43:1020-1027.
- Barreto, R.W. & Evans, H.C. 1996. Duas novas solanáceas selvagens hospedeiras de *Crinipellis pernicioso* em Minas Gerais: uma explicação alternativa para a chegada da vassoura de bruxa na Bahia? Fitopatologia Brasileira 21:348.
- Bastos, C.N. 1985. Efeito de *Trichoderma viride* na esporulação de *Crinipellis pernicioso*. CEPLAC/CORAM. Informe de pesquisas 1985 35 -36.
- Bastos, C.N. 1994. Capacidade de *Crinipellis pernicioso* produzir basidiósporos viáveis em vassouras com três anos de idade e de infectar tecidos do cacauero com gemas dormentes. Fitopatologia Brasileira 19:585-587.
- Beattie, G.A. & Lindow, S.E. 1995. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. Annual Review of Phytopathology 33:145-172.
- Beattie, G.A. & Lindow, S.E. 1999. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. Phytopathology 89:353-359.
- Becker, H. 1999. Cacao - Good for agriculture and the environment. Agricultural Research, November 1999 2.
- Bezerra, J.L.; Costa, J.C.B.; Pomella, A.W.V. & Almeida, O.C. 2000. Como produzir TRICOVAB para controlar a vassoura-de-bruxa do cacauero. Fitopatologia Brasileira 25:359.
- Calle, H.; Cook, A.A. & Fernando, S.Y. 1982. Histology of Witches' broom caused in cacao by *Crinipellis pernicioso*. Phytopathology 72:1479 - 1481.
- CEPLAC 2002. Panorama da economia mundial de cacau: Produção Mundial de Cacau em Grão por Continentes e Principais Países Produtores – AAI. www.ceplac.gov.br
- Costa, J.C.B. 2003. Situação atual no controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero com o uso de *Trichoderma* spp., na Bahia. Anais da VIII Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos, CEPLAC/CEPEC -Itabuna-Bahia 63-69.
- Crowe, J.H.; Crowe, L.M. & Chapman, D. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. Science 223:701-703.

- Dalla Pria, M. & Camargo, L.E.A. 1997. Doenças do cacau (Theobroma cacao L.). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. & Rezende, J.A.M. (Ed.) Manual de Fitopatologia Doenças das plantas cultivadas. São Paulo, CERES, 176 -183.
- Demain, A.L. & Lancini, G. 2001. Bacterial Pharmaceutical Products. In: M. Dworkin et al. (Ed.) The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. New York, Springer-Verlag, <http://link.springer.com/link/service/books/10125/> (Acessado em junho de 2005).
- Ensign, J.C. 1992. Introduction to the actinomycetes. In: Balows, A.; Trüper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W. & Schleifer, K.H. (Ed.) The Prokaryotes. New York, Springer-Verlag, 811-815.
- Evans, H.C. 1981. Witches' broom disease - a case of study. Cocoa Growers' Bulletin 32:5 - 19.
- Evans, H.C. & Barreto, R.W. 1996. *Crinipellis perniciosa*: A much investigated but little understood fungus. Mycologist 10:58 - 61.
- Evans, H.C. & Bastos, C.N. 1979. Uma reavaliação do ciclo de vida da vassoura-de-Bruca, *Crinipellis perniciosa*, do cacau. Fitopatologia Brasileira 4:104.
- Evans, H.C.; Edwards, D.F. & Rodriguez, M. 1977. Research on cocoa disease in Ecuador; past and present. PANS 23:68 - 80.
- Evans, H.C. & Solorzano, G.R. 1981. Witches' broom disease: wrong experiment right results. Proceedings 8th International Cocoa Research Conference, Cartagena Colômbia 415 - 418.
- Frias, G.A.; Purdy, L.H. & Schmidt, R.A. 1991. Infection biology of *Crinipellis perniciosa* on vegetative flushes of cacao. Plant Disease 75:787 - 791.
- Gomes, L.M.C.; Mello, G.R.P.; Faleiro, F.G.; Silva, S.D.M.; Araújo, I.S.; Bahia, R.C.; Moraes, M.G. & Ahnert, D. 2000. Diversidade genética de *Crinipellis perniciosa* na região sul da Bahia utilizando marcadores moleculares RAPD. Fitopatologia Brasileira 25:377.
- Goodfellow, M. & Williams, S.T. 1983. Ecology of the actinomycetes. Annual Review of Microbiology 37:189-216.
- Halfeld-Vieira, B.A. 2002. Procariotas residentes de filoplano como indutores de resistência à doenças em tomateiro. Anais da 1^a Reunião Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas Contra Fitopatógenos, São Pedro, SP 18-19.

- Hanada, R.E.; Pomella, A.W.V.; Salazar, H. & Pereira, J.O. 2004. Seleção de fungos endofíticos visando o controle biológico de *Phytophthora* sp. agente causal da podridão parda dos frutos de cacau. *Fitopatologia Brasileira* 29:S134.
- Hardy, F. 1960. *Cacao Manual*. Turrialba, Costa Rica, Inter-Am. Inst. Agric. Sci. 395p.
- Krauss, U. & Soberanis, W. 2001. Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. *Biological Control* 22:149–158.
- Lawrence, J.S. 1978. Evaluation of methods for assessing resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivars and hybrids to *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler. *Boletim Técnico CEPEC/CEPLAC Itabuna-Bahia* N°62:47.
- Lopes, J.R.M.; Bezerra, J.L. & Luz, E.D.M.N. 2000. *Theobroma bicolor* hospedeiro de *Crinipellis pernicioso* na região Sul da Bahia. *Fitopatologia brasileira* 25:388.
- Luz, E.D.M.N.; Bezerra, J.L.; Resende, M.L.V. & Oliveira, M.L. 1997. Cacau (*Theobroma cacao* L.) Controle de doenças. In: Vale, F.X.R. & Zambolim, L. (Ed.) *Controle de doenças de plantas*. Viçosa, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 611-656.
- Luz, E.D.M.N. & Silva, S.D.V.M. 2001. Podridão-Parda dos frutos, Cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacau. In: Luz, E.D.M.N.; Santos, A.F.d.; Matsuoka, K. & Bezerra, J.L. (Ed.) *Doenças causadas por Phytophthora no Brasil*. Campinas, Livraria Editora Rural, 175-265.
- Macagnan, D. 2001. Seleção de procariotas residentes de filoplano de cacau (*Theobroma cacao* L.) para o biocontrole da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer). Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. Tese de mestrado em Fitopatologia 57p.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M. & Parker, J. 2000. *Brock: Biology of Microorganisms*. Upper Saddle River, NJ, Prentice Hall. 991p.
- McBride, M.J. & Ensign, J.C. 1987. Effects of intracellular trehalose content on *Streptomyces griseus* spores. *Journal of Bacteriology* 169:4995-5001.
- McCarthy, A.J. 1989. Lignocellulose-degrading actinomycetes. *FEMS Microbiology Review* 46:145-163.
- Niella, G.R.; Resende, M.L.V.; Silva, S.D.V.M.; Castro, H.A.; Filho, J.S.S.B. & Araújo, A.G. 2000. Patogenicidade de isolados de *Crinipellis pernicioso* da amazônia brasileira em clones de cacau. *Fitopatologia Brasileira* 25:376.
- Pereira, J.L.; Almeida, L.C.C. & Santos, S.M. 1996. Witches' broom disease of cocoa in Bahia: attempts at eradication and containment. *Crop Protection* 15:743-752.

- Pereira, J.L.; Ram, A.; Figueiredo, J.M. & Almeida, L.C.C. 1989. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. *Agrotropica* 1:79-81.
- Pomella, A.W.V. 2001. O controle biológico da vassoura de bruxa: situação atual no Brasil e no mundo. *Fitopatologia Brasileira* 26:268.
- Purdy, L.H. & Schmidt, R.A. 1996. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. *Annual Review of Phytopathology* 34:573-594.
- Resende, M.L.V.; Nojosa, G.B.A.; Silva, L.H.C.P.; Niella, G.R.; Carvalho, G.A.; Santiago, D.V.R. & Bezerra, J.L. 2000. *Crinipellis perniciosus* proveniente de um novo hospedeiro, *Heteropterys acutifolia*, é patogênico ao cacauero. *Fitopatologia Brasileira* 25:88 - 91.
- Samuels, G.J.; Pardo-Schultheis, S.R.; Hebbar, K.P.; Lumsden, R.D.; Bastos, C.N.; Costa, J.C. & Bezerra, J.L. 2000. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycological Research* 104:760-764.
- Seagri- Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado da Bahia, 2005. Cotação dos produtos Agrícolas. www.seagri.ba.gov.br (Acessado em julho de 2005).
- Silva, H.S.A.; Romeiro, R.S.; Macagnan, D.; Halfeld-Vieira, B.A.; Baracat-Pereira, M.C. & Mounteer, A. 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control* 29:288–295.
- Silva, P. 1987. Cacau e Lagartão ou Vassoura-de-bruxa: Registros efetuados por Alexandre Rodrigues Ferreira nos anos de 1785-1787 na Amazônia. Brasília, Boletim Técnico CEPEC/CEPLAC. 21p.
- Singer, R. 1942. A monographic study of the genera *Crinipellis* and *Chaetocalathus*. *Lilloa* 8:441 - 513.
- Solorzano, G.R. 1977. Factores involucrados en la produccion de basidiocarpos y en la diseminación de basidiosporas de *Marasmius perniciosus* Stahel. Tech. Universidad de Manabi Ecuador. Ingenierio Agronomo
- Souza, J.T.; Pomella, A.W.V.; Bertles, A.; Bayley, B. & Hebbar, P. 2003. Avanços no controle da vassoura-de-bruxa com *Trichoderma stromaticum*. Anais da VIII Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos, CEPLAC/CEPEC - Itabuna-BA 133.
- Stahel, G. 1915. *Marasmius perniciosus* Nov. Spec., the cause of the krulloten disease of cacao in Suriname. *Dep. van den Landbouw, Suriname*. 25p.

- ten Hoopen, G.M.; Rees, R.; Aisa, P.; Stirrup, T. & Krauss, U. 2003. Population dynamics of epiphytic mycoparasites of the genera *Clonostachys* and *Fusarium* for the biocontrol of black pod (*Phytophthora palmivora*) and moniliasis (*Moniliophthora roreri*) on cocoa (*Theobroma cacao*). *Mycological Research* 107:587-596.
- Trevisan, S.D.P. & Silva Jr., M.F.d. 1995. Mudanças socio-econômicas e ambientais associadas à vassoura-de-bruxa nos cacauais da Bahia. *Fitopatologia Brasileira* 20:273.
- Viana Junior, C.A.; Resende, M.L.V.; Landa Neto, L. & Perz, J.O. 2000. Patogenicidade de *Crinipellis* sp. proveniente de *Solanum lycocarpum* (Lobeira) em *Theobroma grandiflorum* (Cupuaçuzeiro). *Fitopatologia Brasileira* 25:453.
- Wheeler, B.E.J. 1985. The growth of *Crinipellis pernicioso* in living and dead cocoa tissue. In: More, D.; Casselton, L.A.; Wood, D.A. & Frankland, J.C. (Ed.) *Developmental Biology of Higher Fungi*. Cambridge, Cambridge University Press, 103 - 116.
- Wheeler, B.E.J. & Mepsted, R. 1988. Pathogenic variability amongst isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa (*Theobroma cacao*). *Plant Pathology* 37:475-488.

PAPER I: Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their activity against the witches' broom and black pod pathogens

Dirceu Macagnan¹, Reginaldo da S. Romeiro¹, Jorge T. de Souza², Alan W. V. Pomella^{3*}

¹Universidade Federal de Viçosa, Departamento de fitopatologia, 36571-000 Viçosa, MG, Brazil. ²CEPLAC/CEPEC, Caixa Postal 7, Km 22 Rodovia Ilheus-Itabuna, 45600-970 Itabuna, BA, Brazil. ³Almirante cacau, Caixa Postal 55, 45630-000 Itajuípe, BA, Brazil.

* Corresponding author: alan.pomella@effem.com (Phone: +55-73-3214-7900)

SUMMARY

In this study, actinomycetes and endospore-forming bacteria were isolated from the surface of cacao pods. The activity of these microorganisms against *Crinipellis pernicioso* and *Phytophthora palmivora*, causal agents of witches' broom and black pod diseases of cacao respectively, was investigated. A total of 336 isolates of actinomycetes and endospore-forming bacteria were tested on a detached pod assay against *C. pernicioso*. The screening procedure used proved to be fast and inexpensive, allowing the selection of five actinomycetes as the most promising isolates for the biocontrol of *C. pernicioso*. Under laboratory conditions the actinomycetes were able to inhibit 100 % of *C. pernicioso* basidiospore germination. However, under field conditions the selected actinomycetes were unable to protect cacao pods against both pathogens. In these experiments, inhibition of *C. pernicioso* ranged from 6 to 21 % in relation to the control, whereas there was no inhibition of black pod caused by *P. palmivora*. Formulations need to be improved in order to enhance the activity of the actinomycetes against cacao pathogens in the field. Molecular identification of the selected isolates showed that they are species of the genus *Streptomyces*.

Keywords: *Theobroma cacao*, biological control, actinomycetes, endospore-forming bacteria, *Streptomyces* sp., *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora*.

INTRODUCTION

The seeds produced by cacao (*Theobroma cacao*) are the source of chocolate. The tree is cultivated in the tropics of South and Central America, Asia, and Africa. In Brasil, witches' broom disease caused by the basidiomycete *Crinipellis pernicioso* is the most limiting factor for cacao cultivation (39). The pathogen is able to infect all meristematic parts of cacao plants, including vegetative buds, flower cushions and pods (48). In the Southern region of Bahia State, Brazil, losses up to 70 % were inflicted by the disease in the last 14 years following its outbreak in 1989 (2). More resistant genotypes are being developed and this control strategy is expected to reduce the severity of the disease (45). The control of witches' broom disease with fungicides is not always efficient and economically viable (29). Biological control is being investigated in several countries with different microorganisms obtained from various parts of cacao trees (4,6). The most promising results obtained to date were with the use of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *C. pernicioso*, that causes a reduction in the production of the basidiocarps and consequently in the number of basidiospores, which are the infective structures of the pathogen (5). However, this mycoparasite does not protect the plant against new infections. In this context, it is important to develop strategies to protect the susceptible tissues of the plant against the pathogen.

Black pod, caused by *Phytophthora* spp., is an economically serious problem in all areas of the world where cacao is grown. In Brazil, losses due to black pod vary between 20 and 30 % (31). There are few sources of resistance and the situation is especially aggravated because there are four species of *Phytophthora* associated with this disease (31). Chemical control with copper-based fungicides presents good results, but is not always economically viable (13). The biological control of this disease has received little attention and most attempts have been made with antagonistic fungi (27,46).

The phylloplane, aerial plant surfaces, presents a numerous and diverse microbiota (26). In this complex microbiological habitat, the most diverse interactions among microorganisms occur. It is possible to find microorganisms adapted to these habitats and with notable antagonistic activity against pathogens (8). Besides being microbiologically rich, the phylloplane is extremely inhospitable because of its high variations in temperature, light, water, and nutrients (3). To survive in these environments bacteria have adopted two strategies: resistance and scape. The first

requires the capacity to tolerate extreme conditions due to the production of resistance structures and certain compounds. The second considers the ability of the bacteria to explore sites less prone to environmental stresses (7). When these epiphytes are considered for biological control, their population densities must be high enough to exert an antagonistic effect against the pathogen. They also need to maintain their population in time, what is achieved through resistance structures that allow their survival in adverse conditions. Bacteria belonging to the *Bacillus* group are able to produce structures called endospores, which are considered to be among the most resistant biological structures known (33). The mechanisms involved in the biological control by these bacteria include antibiosis (16), competition for space, water and nutrients, and the activation of plant's defense responses (43).

Actinomycetes constitute a morphologically diverse group, distinguished from other Gram-positive bacteria by their filamentous growth and GC-rich DNA (28). Although actinomycetes are present in both terrestrial and aquatic environments (21), the great majority of the research on biological control focus on the isolation and use of these organisms on the rhizosphere and rhizoplane (42,40). Several actinomycetes are producers of antimicrobial compounds able to inhibit the growth of other bacteria, fungi, and protozoa (14). For this reason they are being studied with the objective of obtaining new antibiotics (33). These organisms have a great capacity to survive in adverse environments. It was shown that the ability to accumulate high endogenous concentrations of trehalose is related to the capacity of these organisms to resist dry conditions due to the preservation of membrane integrity by this substance (12,34).

Although it is assumed that a high population of microorganisms are associated with all parts of cacao plants, there is little or no information available on the microorganisms obtained from the pod surface with respect to biological control. In this research the objectives were to isolate and select endospore-forming bacteria, including the ones from the *Bacillus* group and actinomycetes from the surface of cacao pods. We focused on the ability of these bacteria to protect susceptible pods against *C. pernicioso*. A detached pod assay was employed in the selection of the microorganisms with potential to control witches' broom and the ones selected as the most promising were tested against black pod. The selected microorganisms were identified by partial sequencing of the 16s rDNA.

MATERIAL AND METHODS

Sampling, isolation, and cultivation of the biocontrol agents. Cacao pods in different developmental stages and from different genotypes were collected from farms in the South of Bahia State, Brazil. The method of Földes *et al.* (16) was adopted for the isolation of endospore-forming bacteria. In short, 3 cm²-fragments from the surface of the pods were transferred to 15 mL of Finley and Fields' liquid medium to induce the formation of endospores. This medium contained meat extract (3 g L⁻¹), peptone (1.9 g L⁻¹), MnSO₄ (0.03 g L⁻¹) adjusted to pH 7 (15). After three days of incubation at 25 °C with shaking, a 500 µl-aliquot of the medium was heated at 80 °C for 10 min to inactivate the vegetative cells. The sample was spread on solid (15 agar g l⁻¹) Finley and Fields' medium and incubated for 48 h at 25 °C. Individualized colonies with different morphological characteristics were selected, transferred and maintained on plates containing the same medium. For the isolation of actinomycetes, the technique of Hirsch and Christensen (24) was used. Pod samples were exposed to 70 °C for 72 h and extracted with saline solution (NaCl 0.85 %) amended with Tween 80 (0.05 mL l⁻¹) for 24 h. A 15-mL-aliquot of the extract was passed through 0.45 µm-filter and the membranes were transferred to soil extract medium containing ciclohexamide (10 mg mL⁻¹) and incubated at 25 °C for five days. Soil extract medium (38) is composed of 100 mL l⁻¹ of soil infusion supernatant (200 g soil L⁻¹, boiled for 5 min, and decanted for 15 min), glucose (1 g L⁻¹), K₂HPO₄ (0.5 g L⁻¹), KNO₃ (0.1 g L⁻¹), agar (15 g L⁻¹), pH 7.0. After the incubation, membranes were removed and the plates incubated for five additional days. Actinomycete-like colonies were purified and maintained on the same medium. All strains were stored at -80 °C in triptic soy broth amended with glycerol to a final concentration of 10 % (v/v).

Pathogen cultivation and inoculum production. Basidiospores of isolate FA 42 of *C. pernicioso* were used in all assays. Basidiospore production was based on a modified methodology proposed by Griffith and Hedger (22) and Niella *et al.* (36). The fungus was cultivated on PDA for 10 days under laboratory conditions. Mycellium plugs were then transferred to Petri plates containing a sterile substrate composed of a homogeneous mixture of finely ground dry brooms, which are hypertrophic and hyperplastic cacao branches resulted from the pathogen's colonization (37 %), oat flour

(10 %), CaSO₄ (1.5 %) and water (51.5 %). Petri plates were kept in an incubator at 25°C for 15 days. Fully colonized substrate was placed in a glass chamber (1.0 x 0.5 x 0.5 m) submitted to a watering regime of 1 l min⁻¹ day⁻¹ and photoperiod of 8 h light and 16 h dark. After 15 days of incubation, the water supply was interrupted for 4 days to induce basidiocarp formation. The basidiocarps produced were collected, surface-sterilized with streptomycin sulphate (150 µg mL⁻¹), washed with sterile distilled water, and had their caps fixed with vaseline to the upper part of Petri plates. The lower part of the cap remained free for the discharge of basidiospores, which were collected in a solution containing glycerol (16 %) and 2-(N-morpholine) ethane sulphonic (MES) acid (0.195 %) with shaking for a period of 18 h under laboratory conditions (18). Basidiospore suspensions were kept in liquid nitrogen until use. *Phytophthora palmivora* isolate ALF 625 was cultivated on a medium composed of the extract obtained by boiling 25 g of carrots, tomato extract (45 g l⁻¹), CaCO₃ (3 g l⁻¹) and agar (15 g l⁻¹). For zoospore production, *P. palmivora* was cultivated for 7 days in the dark and 3 days on fluorescent light (40 w). On each plate, 10 mL of cold water was added, incubated on a refrigerator for 15 min and 20 min at room temperature. Zoospores were collected and the concentration adjusted to 10⁵ zoospores mL⁻¹ (30).

Inoculum of the biocontrol agents.

For the laboratory experiments on the selection of the most promising biocontrol agents, inoculum of endospore-forming bacteria was produced by cultivating the isolates for 24 h on Finley and Fields' medium and the actinomycetes for five days on soil extract medium (38). The propagules used were vegetative cells for endospore-forming bacteria and spores for actinomycetes. The vegetative cells or spores were suspended in saline solution (NaCl 0.85 %) amended with Tween 80 (0.05 mL l⁻¹) and the concentration was adjusted with a spectrophotometer to A₅₄₀=0.8. In the experiments on the effect of the type of propagule on the germination of *C. perniciosus* basidiospores, spores of the actinomycetes were produced as described above for the laboratory experiments.

Vegetative cells and the supernatant were produced by cultivating the actinomycetes in a modified TSB medium, containing peptone (12.5 g l⁻¹) and NaCl (5 g l⁻¹). After the incubation at 25 °C for 48 h under shaking, vegetative cells were separated from the supernatant by centrifuging at 10.000 g for 15 min. The spores, produced on soil extract medium and vegetative cells were suspended in saline solution

and their concentration was adjusted as described above. For the experiments on the effect of the formulations on the germination of *C. pernicioso* basidiospores, the actinomycetes were cultivated as described above for the obtention of vegetative cells. The suspensions were added to each of the five following formulations: 1) yeast-saccharose, composed of 20 % of fresh yeast (Burns Philp, Pederneiras, SP, Brazil) autoclaved for 30 min at 120 °C, 0.01 % of xantan gum (Tec Pharma, São Paulo, Brazil), 0.1 % of saccarose, 10 % of Hoagland's solution and 0.1 % of Tween 80 (19); 2) colloidal chitin 0.03 % plus breakthru[®] 0.03 % (Goldchmidt Chemical Corp., Hopewell, VA, USA); 3) peptone 1 % plus OPPA[®] 2 % (Petrobras, Macae, RJ, Brazil); 4) saccarose 2 % plus breakthru[®] 0.05 %, and 5) meat extract 2 % (Knorr, Pouso Alegre, MG, Brazil) plus breakthru[®] 0.05 %. The final concentration of all formulations was adjusted to $A_{540} = 0,8$. For the field experiments on the activity of the actinomycetes against *P. palmivora*, the five isolates were cultivated and the inoculum prepared as described for the experiments on the effect of the formulations. The isolates were applied with the following formulations: saline solution; yeast-saccharose, and meat extract. Controls were treated with the formulations without the microorganisms.

Selection of the biocontrol agents under laboratory conditions. For the selection of the most efficient isolates, 20 to 30-day-old pods of cacao genotype TSH 516 were collected, washed with tap water and distilled water. The suspensions of each isolate were applied by atomization on the surface of one pod until the suspension was close to run off. The pods were kept in a humid chamber for 24 h for endospore-forming bacteria and 48 h for actinomycetes. After the incubation, the pods were brushed with a suspension of *C. pernicioso* containing 10^6 basidiospores mL^{-1} and again incubated in a humid chamber for 3 h. Pods were air-dried and a transparent nail polish was applied on portions of their surface. From the covered portions, three sections (3 x 15mm) were removed from each pod and transferred to glass slides, stained with cotton blue and 50 basidiospores were counted, registering the percentage of germinated basidiospores in relation to the control. Isolates that inhibited more than 50 % of the basidiospore germination were re-applied on three detached pods. Application of the biocontrol agents, *C. pernicioso* and evaluation were done as described above. The screening experiment was done once.

Effect of the type of propagule on the activity of the actinomycetes. Because the production of spores was slow and cumbersome, the effect of other types of propagules on the germination of *C. pernicios*a basidiospores was studied. Spores, vegetative cells and the supernatant of the five most promising isolates of actinomycetes (Ac4, Ac19, Ac 26, Ac 68, and Ac 79) selected in the initial bioassays were atomized on three detached pods obtained from the genotype TSH 516. After the application of the actinomycetes, the pods were incubated at 25 °C for 48 h. The application of *C. pernicios*a inoculum and evaluation were done as described for the screening experiments. The treatments were the different inoculum types of each of the five selected isolates of actinomycetes suspended in saline solution. The experiment was repeated twice.

Effect of the formulations. The effect of five formulations (see inoculum of the biocontrol agents) was tested for the five most promising isolates of actinomycetes. The assays were done on 20 to 30-day old pods from genotype TSH 516 and ICS 1. The treatments were five formulations and the five selected actinomycetes. Each treatment was applied on three pods in the field. Pods were maintained in humid chambers constituted of plastic bags for 24 h after the application of the actinomycetes. The controls were each isolate of actinomycete without the formulations and the formulations without the actinomycetes. After 72 h of the application pods were detached from the trees, brought to the laboratory, basidiospores of *C. pernicios*a were applied and the germination was evaluated as described for the screening experiments. The experiment was repeated twice.

Activity against *Phytophthora palmivora*. The five most promising isolates were tested against the development of black pod caused by *P. palmivora* in field experiments. Each treatment (see inoculum of the biocontrol agents section) were applied to seven pods. After the application of the treatments, the pods were kept in humid chambers for 24 h and 72 h later were sprayed with a zoospore suspension until close to run off. After the inoculation of the pathogen pods were again kept in a humid chamber for 24 h and the disease development was evaluated after 7 days according to the following disease index: 1= no symptoms, 2= lesions smaller than 2 mm, 3= lesions with the diameter

between 2 mm and 2 cm, 4=pods with 25 % of lesioned surface, 5=pods with more than 25 % of the surface lesioned (23). The experiment was done twice.

Statistical analyses. Data from the laboratory experiments were analyzed on a randomized design. The experiments on the effect of different types of propagules on the germination of *C. pernicioso* basidiospores were analyzed in a factorial scheme, with five isolates and three types of propagules. The experiments on the effect of the formulations were analyzed in a factorial scheme, with five isolates and five formulations.

Molecular identification of the actinomycetes. The five most promising isolates were identified by sequencing a fragment of the 16S rDNA gene. Genomic DNA was extracted from 3 to 4-day old cultures according to Hopwood *et al.* (25). The amplification was done with primers p27f and p1401r, that are homologous to the conserved regions of bacterial 16S rDNA (1). The PCR products were purified by using a purification column (GFX PCR DNA and Gel Band purification kit, Amersham Biosciences). Sequencing was done directly by using the amplification primers on a MegaBACE 1,000 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) and the DyeDeoxy terminator cycle sequencing kit (Amersham Biosciences) according to the manufacture's instructions. Sequences were aligned with Clustal W1.8 (47) and compared to the ones available in public databases.

RESULTS

Collection of microorganisms. A total of 63 pods were collected from farms located in five municipalities in the South of Bahia State, Brazil. From these samples, 203 isolates of endospore-forming bacteria and 94 isolates of actinomycetes were obtained. To this collection, 17 isolates of endospore-forming bacteria selected by Macagnan (32) and 22 actinomycete isolates obtained from soil samples collected in South Bahia by Dr. Prakash Hebbar (Masterfoods USA), were added. A total of 336 isolates, 220 of endospore-forming bacteria and 116 of actinomycetes were tested.

Selection of the most promising isolates. The data from the bioassay on detached pods showed that 7 % of the endospore-forming bacteria were able to inhibit the germination of *C. pernicios*a basidiospores at levels ≥ 60 to 80 %, whereas 21 % of the actinomycetes were inhibitory at these levels. When the inhibition classes ≥ 80 % are considered, 0.50 % of the endospore-forming bacteria and 11 % of the actinomycetes were effective (Figure 1). Eighteen isolates were selected based on their capacity to inhibit ≥ 50 % of the germination of *C. pernicios*a basidiospores on the pod surface (data not shown). From these isolates 13 were actinomycetes and 5 were endospore-forming bacteria. The 18 pre-selected isolates were re-evaluated on the pod surface and isolates Ac 4, Ac 19, Ac 26, Ac 68, and Ac 79 were selected as being the most promising ones based on their inhibitory effects on basidiospore germination, fast growth and abundant sporulation in the soil extract medium.

Molecular Identification. The identification of the five most promising isolates was done by sequencing a portion of the 16S rDNA gene and comparing them with sequences of the same gene from public databases. Nucleotide sequences have been deposited with GenBank under the following accession numbers DQ066885 to DQ066889. All isolates were classified as species belonging to the genus *Streptomyces*.

Effect of the type of inoculum on the inhibition of *C. pernicios*a germination. In these experiments, different kinds of inoculum, including supernatant, vegetative cells and spores were used on detached pods. Results from these experiments did not show any difference in the ability of the 5 most promising isolates to inhibit *C. pernicios*a. All isolates tested inhibited approximately 100 % of the basidiospore germination. However, the inoculum types differed in their activity against basidiospore germination. Vegetative cells and the supernatant had similar inhibitory activity, whereas spores were significantly less active (Fig. 2). On the basis of these results, all other experiments were done with vegetive cells produced in modified TSB medium.

Inhibition of *C. pernicios*a germination. Several experiments with cacao genotype TSH 516 were done to test the effect of the 5 most promising isolates and the formulations on the germination of *C. pernicios*a basidiospores. The first experiments

showed that meat extract and yeast-saccharose were the formulations that provided the highest levels of inhibition of basidiospore germination (data not shown). In further experiments, only these formulations were used. Saline solution was used for comparison purposes. In general, the formulation based on meat extract showed the highest inhibition of basidiospore germination (Fig. 3). The isolates tested inhibited from 70 to 85 % of the germination of basidiospores, whereas the control inhibited an average of 60 % (Fig. 3). Combination of isolates Ac 79 and Ac 26 did not result in increased inhibition of basidiospore germination (data not shown). Experiments done on cacao pods from genotypes TSH 516 and ICS 1 did not show differences in the inhibition of basidiospore germination (data not shown), indicating that the cacao genotype did not influence the activity of the actinomycetes.

Assays against *P. palmivora*. In field experiments against *P. palmivora*, none of the isolates or formulations were able to inhibit back pod at acceptable levels (Fig. 4). The average of the disease indexes obtained for all isolates tested was higher than 4.

DISCUSSION

Cacao is an economically, socially and environmentally important crop for South Bahia State, Brazil. Diseases, especially witches' broom and black pod are responsible for losses up to 70 % in this area. Biological control is an attractive method to manage these diseases. In this work we isolated actinomycetes and endospore-forming bacteria from the surface of cacao pods and studied their activity against two pathogens. The most common application of actinomycetes and endospore-forming bacteria in biological control is in the rizoplane and plant rhizosphere (20,41,42) and some reports of actinomyces as endophytes (9,10,11). In this work we attempted to find potential biocontrol agents on the cacao pod surface because direct damage is caused by pathogens in this part of the plant.

The selection procedure used in this work allowed a simple and fast identification of the five most promising isolates among the 336 tested ones for the biocontrol of witches' broom disease of cacao. All isolates selected as promising for biocontrol were obtained from the pod surface. This procedure revealed to be very

efficient for the studied system, once *C. pernicioso* only shows external symptoms on pods after a minimum of two months after the inoculation (Pomella, A.W.V., unpublished results) while with this methodology results were obtained within 48 h. This assay also eliminated the environmental conditions that can affect *C. pernicioso* basidiospore germination and penetration. The screening procedure is less expensive and less time consuming than the ones done under field conditions.

The results showed a clear superiority of the actinomycetes in the inhibition of the germination of *C. pernicioso* basidiospores in comparison to the endospore-forming bacteria (Fig. 1). Partial sequencing of the 16S rDNA allowed the identification of all the selected actinomycetes as *Streptomyces* spp. However, identification of the isolates at the species level was not possible because of the low resolving power of the 16S rDNA gene to distinguish closely related species (17). Sequencing of other genes will be necessary to identify these bacteria at the species level.

Actinomycetes are known as producers of antimicrobial compounds that can be used in agriculture, medicine and research (33). Particularly the genus *Streptomyces* has a great importance in the production of these compounds. About 50 % of the isolates from this genus are producers of some kind of antibiotic and up to now, more than 500 different antibiotics were shown to be produced by actinomycetes. For example, streptomycin and ciclohexamide are both produced by *Streptomyces griseus*, kanamycin by *S. kanamyceticus*, tetracycline by *S. aureofaciens*, nystatin by *S. noursei*, and chloramphenicol by *S. venezuelae* (33). It is possible that the isolates selected in this work were antibiotic producers, once the supernatant and the vegetative cells were equally efficient in inhibiting the germination of the basidiospores (Fig. 2), discarding the action by parasitism, where it is necessary the presence of living cells. The higher activity of vegetative cells in comparison with spores can be explained by the fact that spores constitute survival structures and the production of antimicrobial compounds is done by vegetative cells (35). Furthermore, when spores are used as inoculum, they need to germinate to start the production of antimicrobial compounds, whereas vegetative cells are already active. Vegetative cells were more inhibitory and easier to obtain when compared to spores. While vegetative cells were obtained in 48 h, spores were only obtained in 7 days.

This work showed that cacao pods harbor actinomycetes that have the potential to be explored for biocontrol. One of the remaining limitations of biocontrol is the reproduction of laboratory experiments in the field. Although the five selected

actinomycete isolates were able to inhibit 100 % of the germination of *C. pernicioso* in the laboratory (Figs 1 and 2), under field conditions the inhibition ranged from 6 to 21 % (data not shown). Experiments on black pod showed no effect of the actinomycetes on the control of this disease. Other results from our laboratory showed that disease indexes lower than 2.5 indicate that the treatment under study is efficient against black pod (Pomella, A.W.V., unpublished results). The formulations may have been responsible for the poor activity of the actinomycetes. It is still difficult to provide the ideal formulation for the activity of the microorganisms in the field. In fact, according to Paa *et al.* (37), the use of incorrect formulations is one of the main causes of inconsistency of biocontrol in the field. It is also possible that the poor effects of the actinomycetes against the cacao pathogens under field conditions are due to competition with the indigenous microflora of the pod surface. Further studies on the population dynamics of these antagonists on the pod surface are necessary to elucidate their fate under field conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Aginaldo Guimarães, Aílton Santos, Renilton Bispo, Iara Santos, and Alicio Costa for technical assistance. We thank Dr. Prakash Hebbar for providing some of the actinomycete isolates. This project was financed by FINEP (proc. n. 1488/02) and Almirante Cacao. Financial support to D.M. was provided by CNPq-Brazil (proc. n. 142076/2001-5).

REFERENCES

1. Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.
2. Andebrhan, T., Figueira, A., Yamada, M. M., Cascardo, J. and Furtek, D. B. (1999) Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:167-175.
3. Andrews, J.H. and Hirano, S.S.E. (1991) *Microbial Ecology of Leaves*. Springer-Verlag, New York, NJ, USA.
4. Arnold, A. E., Mejía, L.C., Kyllö, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N. and Herre, E.A. (2003) Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:15649-15654.
5. Bastos, C.N. (1996) Mycoparasitic nature of the antagonism between *Trichoderma viride* and *Crinipellis pernicioso*. *Fitopatol. Bras.* 21:50-54.
6. Bastos, C. N., Evans, H. C. and Samson, R. A. (1981). A new hyperparasitic fungus, *Cladobotryum amazonense*, with potential for the control of fungal pathogens of cocoa. *Trans. British Mycol. Soc.* 77:273-278.
7. Beattie, G.A. and Lindow, S.E. (1995) The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:145-172.
8. Blakeman, J.P. and Fokkema, N.J. (1982) Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annu. Rev. Phytopathol.* 20:167-192.
9. Cao, L., Qiu, Z., Dai, X., Tan, H., Lin, Y. and Zhou, S. (2004a) Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of banana (*Musa acuminata*) plants and their activities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20:501-504.
10. Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H. and Zhou, S. (2004b) Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Lett. Appl. Microbiol.* 39:425-430.
11. Coombs, J.T. and Franco, C.M.M. (2003) Visualization of an Endophytic *Streptomyces* Species in Wheat Seed. *Appl. Environm. Microbiol.* 69:4260-4262.

12. Crowe, J.H., Crowe, L.M. and Chapman, D. (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 223:701-703.
13. Dalla Pria, M. and Camargo, L.E.A. (1997) Doenças do cacau (Theobroma cacao L.). pp. 176-183. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. and Rezende, J.A.M. [Eds.] Manual de Fitopatologia Doenças das plantas cultivadas. CERES, São Paulo, SP, Brazil.
14. Ensign, J.C. (1992) Introduction to the actinomycetes. pp. 811-815. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. [Eds.] The Prokaryotes. Springer-Verlag, New York, NJ, USA.
15. Finley, N. and Fields, M.L. (1962) Heat activation and heat-induced dormancy of *Bacillus stearothermophilus* spores. *J. Appl. Microbiol.* 10:231-236.
16. Földes, T., Bánhegyi, I., Herpai, Z., Varga, L. and Szigeti, J. (2000) Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and *in vitro* screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage microorganisms. *J. Appl. Microbiol.* 89:840-846.
17. Fox, G.E., Wisotzkey, J.D. and Jurtshuk, P.Jr. (1992) How close is close: 16S rDNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:166-170.
18. Frias, G.A., Purdy, L.H. and Schmidt, R.A. (1995) An inoculation method for evaluating resistance of cacao to *Crinipellis pernicioso*. *Plant Dis.* 79:787-791.
19. Garcia, F.A.O. (2004) Efetividade de Formulações de procariotas residentes de filoplano no controle biológico de doenças do tomateiro (Msci. thesis). Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Viçosa, MG, Brazil.
20. Gava, C.A.T., Pereira, J.C., Fernandes, M.C. and Neves, M.C.P. (2002) Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. *Pesq. Agropec. Bras.* 37:1373-1380.
21. Goodfellow, M. and Williams, S.T. (1983) Ecology of the actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 37:189-216.
22. Griffith, G.W. and Hedger, J.N. (1993) A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis pernicioso* using a bran-vermiculite medium. *Netherl. J. Plant Pathol.* 99:227-230.

23. Hanada, R.E., Pomella, A.W.V., Salazar, H., and Pereira, J.O. (2004) Seleção de fungos endofíticos visando o controle biológico de *Phytophthora* sp. agente causal da podridão-parda dos frutos de cacau. *Fitopatol. Bras.* 29:134.
24. Hirsch, C.F. and Christensen, D.L. (1983) Novel method for selective isolation of actinomycetes. *Appl. Environm. Microbiol.* 46:925-929.
25. Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M. and Schrempf, H. (1985) Genetic manipulation of *Streptomyces* - a laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, UK.
26. Jacques, M.-A. and Morris, C.E. (1995) A review of issues related to the quantification of bacteria from the phyllosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 18: 1-14.
27. Krauss, U. and Soberanis, W. (2001) Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. *Biol. Contr.* 22:149-158.
28. Lacey, J. 1997. Actinomycetes in composts. *Ann. Agric. Environ. Med.* 4:113-121.
29. Laker, H. and Rudgard, S.A. (1989) A review of the research on chemical control of witches' broom disease of cocoa. *Cocoa Growers' Bul.* 42:12-24.
30. Lawrence, J.S. (1978) Evaluation of methods for assessing resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivars and hybrids to *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler. Boletim Técnico N°62, CEPEC/CEPLAC, Itabuna, BA, Brazil.
31. Luz, E.D.M.N. and Silva, S.D.V.M. (2001) Podridão-Parda dos frutos, cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacaueiro. pp. 175-265. In: Luz, E.D.M.N., dos Santos, A.F., Matsuoka, K. and Bezerra, J.L. [Eds.] Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Livraria Editora Rural, Campinas, SP, Brazil.
32. Macagnan, D. (2001) Seleção de procariotas residentes de filoplano visando o biocontrole da vassoura-de-bruxa do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) incitada por *Crinipellis pernicioso* (Msci. thesis). Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Viçosa, MG, Brazil.
33. Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (2000) Brock: Biology of Microorganisms. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA.
34. McBride, M.J. and Ensign, J.C. (1987) Effects of intracellular trehalose content on *Streptomyces griseus* spores. *J. Bacteriol.* 169:4995-5001.

35. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L. and Schaechter, M. (1990) Physiology of the bacterial cell: A molecular approach. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
36. Niella, G.R., Resende, M.L.V., Carvalho, G.A. and Silva, L.H.C.P. (1999) Aperfeiçoamento da metodologia de produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso*. *Fitopatol. Bras.* 24:523-527.
37. Paau, A.S., Graham, L.L. and Bennett, M. (1991) Progress in formulation research for PGPR and biocontrol inoculants. pp. 399-403. *In*: Keel, C., Koller, B. and Défago, G. [Eds.] Plant growth-promoting rhizobacteria progress and prospects. IOBC/WPRS Bulletin, Zürich, Switzerland.
38. Pramer, D. and Schmidt, E.L. (1964) Experimental soil microbiology. Burgess Publishing Company, MN, USA.
39. Purdy, L.H. and Schmidt, R.A. (1996) Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:573-594.
40. Sabaratnam, S. and Traquair, J.A. (2002) Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biol. Contr.* 23:245-253.
41. Silva, H.S.A. and Romeiro, R.S. (2004) Isolamento e seleção massal de rizobactérias como indutoras de resistência sistêmica à mancha bacteriana pequena do tomateiro. *Ceres* 51:345-354.
42. Silva, H.S.A., Romeiro, R.S. and Barbosa, J.G. (2000) Actinomycetes as biocontrol agents for rose crown gall caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Summa Phytopathol.* 26:459-463.
43. Silva, H.S.A., Romeiro, R.S., Macagnan, D., Halfeld-Vieira, B.A., Baracat-Pereira, M.C. and Munteer, A. (2004) Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biol. Contr.* 29:288-295.
44. Sneath, P.H.A. 1986. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. pp. 1104-1139. *In*: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. [Eds.] Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA.

45. Surujdeo-Maharaj, S., Umaharan, P., Butler, D.R. and Sreenivasan, T.N. (2003) An optimized screening method for identifying levels of resistance to *Crinipellis pernicioso* in cocoa (*Theobroma cacao*). *Plant Pathol.* 52:464-475.
46. Ten Hoopen, G.M.; Rees, R.; Aisa, P.; Stirrup, T. and Krauss, U. (2003) Population dynamics of epiphytic mycoparasites of the genera *Clonostachys* and *Fusarium* for the biocontrol of black pod (*Phytophthora palmivora*) and moniliasis (*Moniliophthora roreri*) on cocoa (*Theobroma cacao*). *Mycol. Res.* 107:587-596.
47. Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Acids Res.* 22:4673-4680.
48. Wheeler, B. E. J. (1985) The growth of *Crinipellis pernicioso* in living and dead cocoa tissue. pp. 103-116. *In: Developmental biology of higher fungi.* Cambridge University Press, London, UK.

FIGURES

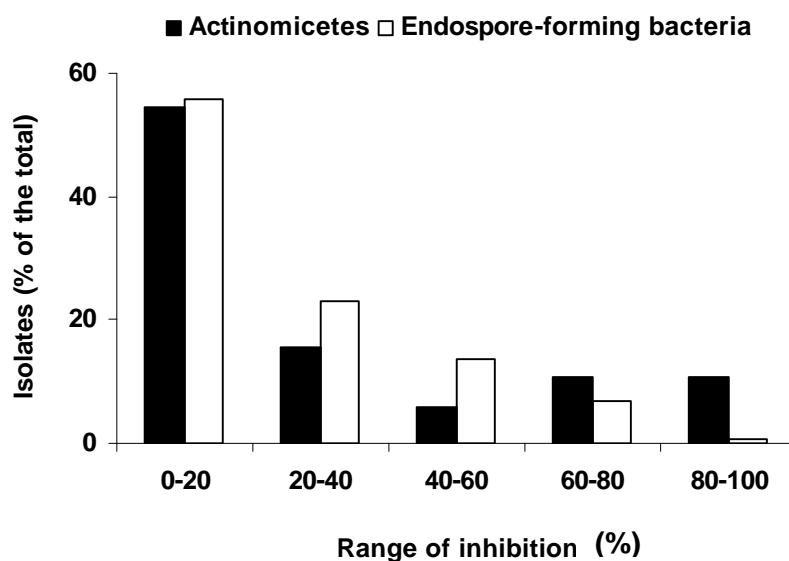


Figure 1. Activity of endospore-forming bacteria and actinomycetes on the inhibition of the germination of *Crinipellis pernicioso* basidiospores. Inoculum of each of the 336 isolates was sprayed on the surface of detached pods. Basidiospores of *C. pernicioso* were applied and germination was evaluated under the microscope and compared to the control. From the 336 isolates evaluated, 220 were endospore-forming bacteria and 116 actinomycetes. The percentage of isolates in each range of inhibition is shown.

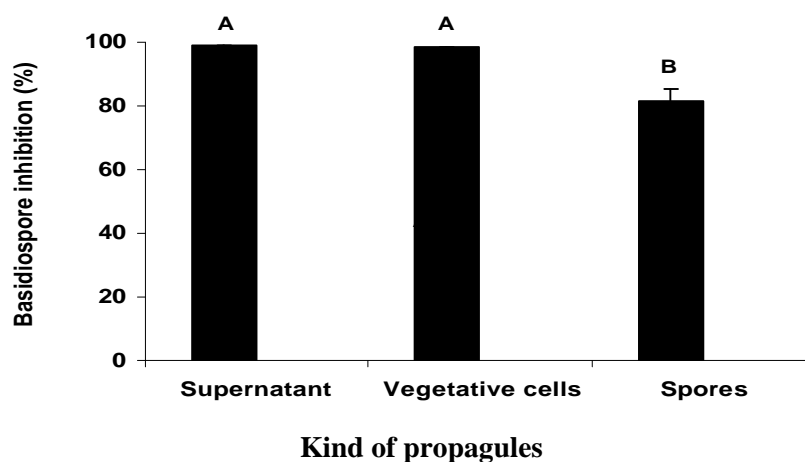


Figure 2. Inhibition of *Crinipellis pernicioso* basidiospore germination on the surface of detached cacao pods. Vegetative cells, spores or supernatant from growth of isolates Ac4, Ac 19, Ac 26, Ac 68, and Ac 79 were diluted in saline solution and sprayed on detached cacao pods. Basidiospores of *C. pernicioso* were applied and the germination was evaluated under the microscope. Means of the different types of inoculum of five actinomycetes are shown. Treatments followed by the same letter are not significantly different according to Tukey's studentized range test ($P=0.05$).

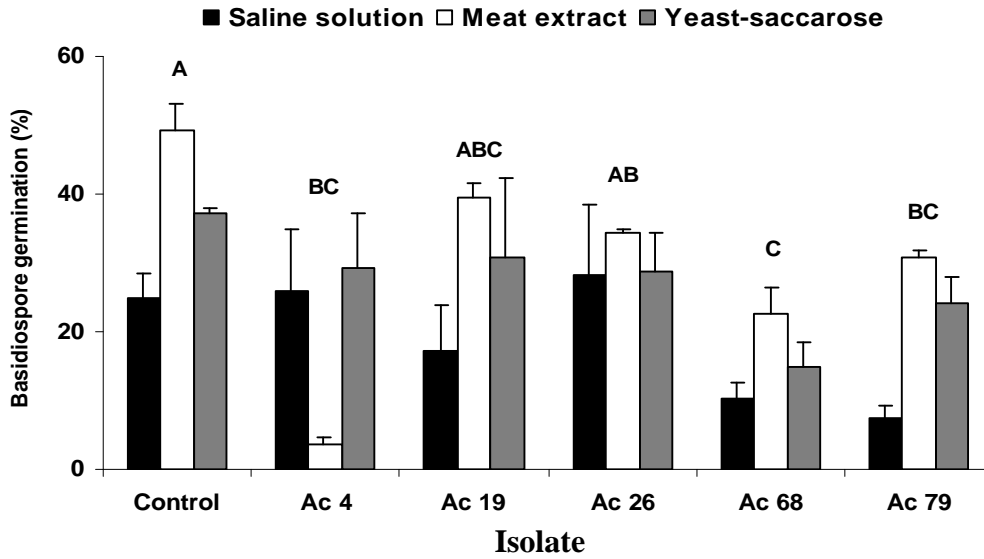


Figure 3. Germination of basidiospores of *Crinipellis perniciosia* on cacao pod surface. Pods were treated in the field with five actinomycetes suspended on saline solution, meat extract, and yeast-saccharose. Pods were detached 72 h after the application of the actinomycetes and the germination of basidiospores was evaluated under the microscope. Each treatment was applied on three pods. The average of three columns represents the isolate effect's. Means with different letters differ significantly with Tukey's studentized range test ($P=0.05$). Error bars represent the standard error of the means.

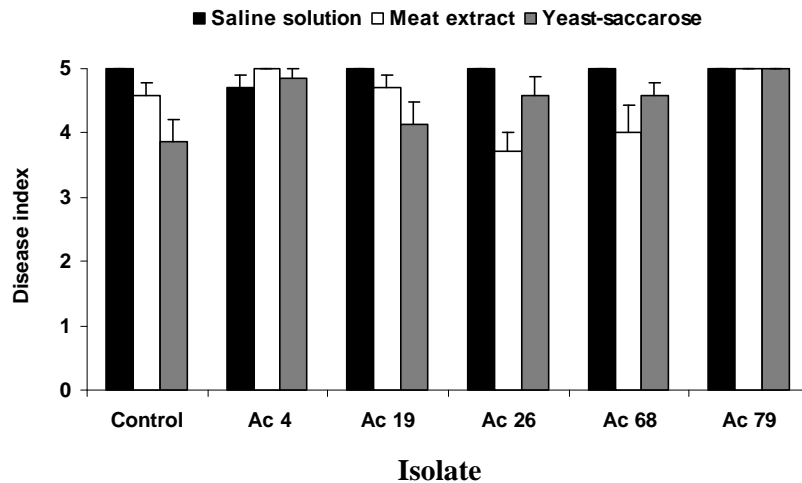


Figure 4. Effect of actinomycetes on the severity of black pod caused by *Phytophthora palmivora* under field conditions. Seven cacao pods were sprayed with vegetative cells from each of the five actinomycete isolates applied with three different formulations. The disease was evaluated seven days after pod inoculation with a zoospore suspension of the pathogen. Disease severity was determined with a disease index, where 0 represents no disease and 5 represents >25 % of the pod surface with black pod symptoms. Error bars represent the standard error of the means.

ARTIGO II: Detecção de compostos com possível atividade antimicrobiana produzidos por actinomicetos selecionados para o controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacau e o envolvimento dessas substâncias na inibição da germinação de basidiósporos do patógeno.

Dirceu Macagnan¹; Reginaldo da Silva Romeiro¹; Gisele Sales Batista¹; Roberto Lanna Filho¹ & Alan Willian Vilela Pomella²

¹Universidade Federal de Viçosa -Departamento de Fitopatologia, 36571-000 Viçosa-MG. ²Almirante Cacau, Cx.P. 55 CEP 45630-000 Barro Preto-BA

RESUMO

Cinco actinomicetos pertencentes ao gênero *Streptomyces* selecionados como antagonistas ao fungo causador da vassoura-de-bruxa do cacau (*Crinipellis pernicioso*) foram submetidos a ensaios para a detecção da produção de ácido cianídrico (HCN), sideróforos e as enzimas líticas quitinases, β -1,3-glucanases e celulases. Todos os isolados demonstraram-se produtores de HCN, sideróforos e quitinases. Nenhum dos isolados produziu β -1,3-glucanases e celulases. A produção de HCN foi acompanhada por 96 horas juntamente com a inibição da germinação de basidiósporos. Os antagonistas foram cultivados em meios líquidos permissivos e repressivos à produção de sideróforos e o sobrenadante usado em bioensaios de inibição da germinação de basidiósporos. Não foi observada diferença na inibição de germinação de propágulos do patógeno entre os sobrenadantes contendo ou não sideróforos. A importância da quitinase no antagonismo ao patógeno foi estudada cultivando os isolados em meio líquido contendo como fonte de carbono glicose, quitina coloidal ou parede celular do patógeno. O sobrenadante foi usado em ensaios de inibição de germinação de basidiósporos assim como foi quantificada a atividade de quitinase presente nos diferentes sobrenadantes. Não foi observada diferença significativa na atividade de quitinases produzida pelos diferentes isolados cultivados nos diferentes meios. Porém foi observada diferença significativa na inibição da germinação pelos diferentes isolados cultivados nos diferentes meios. As substâncias estudadas produzidas pelos isolados aparentemente têm apenas efeito aditivo no antagonismo exercido pelos mesmos contra o patógeno.

INTRODUÇÃO

Por controle biológico entende-se a redução da quantidade de inóculo ou da atividade de produção de doença de um patógeno utilizando de um ou mais organismos exceto o homem (Cook & Baker, 1983). Essa atividade de microrganismos antagônicos a patógenos de plantas deve-se a ação direta ou indireta. Como ação indireta pode-se citar a capacidade que alguns microrganismos têm de induzir plantas a ativarem mecanismos latentes de resistência contra patógenos (van Loon et al., 1998). A ação direta ocorre quando antagonistas produzem substâncias que atuam diretamente sobre o ciclo de vida do patógeno (Cook & Baker, 1983).

A vassoura-de-bruxa, causada pelo basidiomiceto *Crinipellis perniciosa*, é a enfermidade que mais causa perdas à lavoura cacaeira no Brasil (Purdy & Schmidt, 1996). Esta doença ataca todos os tecidos meristemáticos presentes na planta e é responsável por perdas de até 70% na região cacaeira da Bahia (Andebrhan et al., 1999). O uso de genótipos resistentes à doença tem apresentado bons resultados, porém mais de 90% da área plantada na região, ainda é constituída de material genético suscetível. O controle dessa doença por meio de fungicidas sintéticos nem sempre é eficiente e economicamente viável (Laker & Rudgard, 1989). Segundo Pomella (2001) o controle biológico dessa doença está sendo pesquisado em diferentes países e microrganismos obtidos de diferentes órgãos do cacaeiro já foram testados. Porém os resultados mais promissores de biocontrole, até o momento, têm sido obtidos com o uso de isolados de *Trichoderma stromaticum*, sendo seu principal mecanismo de ação o parasitismo das hifas do patógeno impedindo a produção de inóculo (Bastos, 1996). Porém os basidiósporos de *C. perniciosa*, podem ser trazidos de longas distâncias através de correntes de ar (Evans & Solorzano, 1981) e infectar lavouras tratadas com o micoparasita. Neste contexto é importante o desenvolvimento de estratégias que protejam os tecidos suscetíveis das plantas contra a infecção pelo patógeno. Macagnan et al. (2005) isolaram da superfície de frutos de cacaeiro bactérias endosporogênicas e actinomicetos e selecionaram os mais eficientes em inibir a germinação do patógeno na superfície de frutos de cacaeiro em idade suscetível. Em ensaios visando estudar o possível modo de ação desses antagonistas selecionados verificaram que o sobrenadante proveniente do cultivo desses antagonistas em meio líquido era tão eficiente em inibir a germinação dos propágulos do patógeno quanto o uso de células vivas dos microrganismos.

Dentre as substâncias produzidas contra patógenos cita-se o ácido cianídrico (HCN) um potente inibidor de heme-proteínas tais como a citocromo oxidase e a cloreto dismutase (Rikken et al., 1996). Segundo Song & Logan (2004) o cianeto pode levar a inibição da cloreto dismutase assim como outras heme-enzimas envolvidas na redução do perclorato. A inibição dessas enzimas resulta em acúmulo de cloreto no interior da célula a qual pode entrar em colapso. Blumer & Haas (2000) sustentam que a produção de HCN por isolados de rizobactérias, em parte, foi o responsável pelo biocontrole exercido pelos mesmos.

A parede celular de fungos superiores é composta por camadas de polímeros de quitina e β -1,3-glucano. Já fungos do reino Cromista como os oomicetos apresentam parede celular constituída por celulose (Alexopoulos et al., 1996). Microrganismos capazes de produzirem enzimas que causem a lise da parede celular desses organismos, podem causar o extravasamento de seu conteúdo celular. Neste sentido, Castoria et al. (1997) concluíram que a produção de β -1,3-glucanases por seus antagonistas está envolvida com o biocontrole exercido pelos mesmos. Já El-Tarabilya et al. (2000) selecionaram com sucesso antagonistas contra *Sclerotinia minor* baseados em sua atividade quitinolítica.

O ferro é um metal de grande importância biológica por ser constituinte do citocromo e outras heme e não heme-proteínas bem como co-fator de diferentes enzimas. Quando microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos crescem em ambientes deficientes em ferro, estes sintetizam agentes quelantes específicos para o íon Fe^{3+} denominados sideróforos (Goto, 1990). Sideróforos são compostos de baixo peso molecular (500-1000 Daltons) produzidos por fungos e bactérias, os quais exercem a função de ligarem-se especificamente ao íon Fe^{3+} sendo posteriormente transportados para o interior da célula (Neilands, 1989). De acordo com a estrutura, os sideróforos conhecidos podem ser divididos em catecolatos, produzidos somente por bactérias e hidroxamatos, produzidos tanto por fungos quanto por bactérias. Há ainda um terceiro grupo chamado de misto por apresentarem em uma mesma molécula ligantes hidroxamatos e fenolatos (Neilands, 1984). Quando produzidos em grande quantidade por antagonistas, putativamente, indisponibilizam o Fe^{3+} ao patógeno alvo (Glick & Bashan, 1997). Sideróforos podem também atuar na indução de resistência de plantas contra patógenos (Press et al., 2001; Meziane et al., 2005).

Com este trabalho objetivou-se detectar a produção de alguns compostos possivelmente envolvidos no controle biológico de doenças de plantas, e também

verificar a real contribuição dessas substâncias na inibição da germinação de basidiósporos de *Crinipellis perniciosa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos seu cultivo e manutenção:

Os antagonistas foram selecionados por Macagnan et al. (2005) e identificados por sequenciamento do rDNA 16S como pertencentes ao gênero *Streptomyces* não sendo possível sua identificação em nível de espécie. Os isolados, Ac26, Ac79, Ac68, Ac19 e Ac4 foram preservados em ultrafreezer (-80 °C) emulsificados em glicerina 15 % (Gherna, 1994) e durante os ensaios foram mantidos em meio extrato de solo ágar (Pramer & Schmidt, 1964) visando a produção de esporos os quais eram usados como propágulos para a realização dos ensaios.

O inóculo de *Crinipellis perniciosa* foi obtido usando a metodologia de Frias et al. (1995). Para tanto vassouras secas foram submetidas à câmaras de indução de formação de basidiocarpos em temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h de claro e 12 h de escuro com umidade relativa saturada. Os basidiocarpos produzidos foram coletados e tratados com sulfato de estreptomicina 150 µg.mL⁻¹ e, em seguida, lavados em água destilada e esterilizada. Posteriormente eles foram fixados pela sua face dorsal no centro de uma placa de Petri com graxa de silicone, permanecendo a face inferior livre para a ejeção de basidiósporos, os quais foram coletados em uma solução contendo 16 % de glicerol e 0,195 % de ácido 2-(N-morfolino) etano sulfônico (MES) pH 7,0, sob constante agitação, por um período de 18 h a 25 °C. A suspensão de basidiósporos obtida teve sua concentração e germinação avaliadas e foi mantida em ultrafreezer (-80 °C) até o momento de sua utilização.

Detecção de HCN: Adotou-se a técnica de Castric & Castric (1983). Em que ao meio de cultura TSA semi-sólido (triptona 15 g, peptona 5 g e NaCl 5 g ágar 7,5 g.l⁻¹ acrescido de glicina 0,05 g e FeCl₃ 6H₂O 0,005 g.L⁻¹) em estado semi-fundente foram adicionados esporos dos actinomicetos a serem testados. Estes foram dispensados em cavidades de placas de diluição e estas depositadas em placas de Petri de 150 mm. Cada antagonista foi dispensado em três cavidades. Sobre as placas de diluição foram depositadas duas telas de nylon para evitar o contato do papel contendo o reativo indicador de HCN e o meio de cultivo. Para a detecção de cianeto, utilizou-se papel de

filtro imerso no reativo de Feigl & Anger (1966). Este reativo é composto por acetoacetato de etila cobre derivativo, e 4,4'-dimetileno (-N,N-dimetilanilina) na quantidade de 5 mg de cada dissolvidos em 2 mL de clorofórmio. Sobre o papel impregnado com o indicador foram depositadas duas telas de aço visando comprimir o papel em uniforme proximidade com as colônias em crescimento. Após a montagem as placas foram incubadas por 72 h em temperatura de 28 °C quando foram avaliadas. Foram consideradas produtoras de HCN as colônias que deram origem a manchas de coloração marrom no papel impregnado com o indicador, na região correspondente à posição da colônia.

Papel da produção de HCN na germinação de basidiósporos do patógeno: Visando examinar o envolvimento do HCN produzido pelos antagonistas na inibição da germinação de propágulos do patógeno, acompanhou-se a produção do composto pelos microrganismos e, paralelamente, acompanhou-se, também, a inibição da germinação de basidiósporos por compostos voláteis produzidos pelos mesmos. Foram preparadas placas de diluição contendo os antagonistas à exemplo das utilizadas para a detecção da produção de HCN em quatro repetições. Uma das repetições foi usada para a detecção da produção de HCN, enquanto as demais foram usadas em bioensaios de inibição da germinação de basidiósporos do patógeno. Foram realizadas leituras a cada 24 h até 96 h após início do ensaio. As placas destinadas à indicação da produção de HCN recebiam, a cada 24 h novo papel indicador. Paralelamente as placas de Petri que continham as placas de diluição destinadas a examinar a inibição de germinação tinham ágar-água vertido em sua tampa. Após resfriado o ágar as tampas, eram recolocadas nas placas, seladas com filme de PVC e assim como as placas destinadas à detecção de HCN, eram incubadas a 28 °C por 6 h. O ensaio de inibição da germinação de esporos era então realizado aplicando-se uma alíquota de 10 µL de suspensão de basidiósporos ($10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$) na região do ágar-água correspondente a posição da colônia do antagonista. As placas foram re-incubadas por mais três horas quando foi realizada a avaliação da germinação dos basidiósporos, assim como avaliada a produção de HCN. Considerou-se germinado o basidiósporo cujo tubo germinativo era maior que o comprimento do basidiósporo. Como controle, a suspensão de basidiósporos foi depositada na superfície de ágar-água não exposto a compostos voláteis produzidos por microrganismos.

Detecção de sideróforos:

Toda a vidraria utilizada para o desenvolvimento dos ensaios foi imersa em mistura sulfocrômica por 48 h e enxaguada seguidas vezes em água destilada.

Inicialmente empregou-se a técnica universal para a detecção de sideróforos desenvolvida por Schwyn & Neilands (1987). Os microrganismos a serem testados foram cultivados, por 48 h sob agitação, em meio King B (KB) (King et al., 1954). Como controle o mesmo microrganismo foi cultivado no mesmo meio acrescido com 2 μM de Fe^{3+} preparado a partir de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, esterilizado por filtração. As células foram precipitadas por centrifugação e 1 mL do sobrenadante foi misturado a 1 mL da solução indicadora de cromo azurol S (CAS). A solução de CAS foi preparada misturando-se 6 mL de solução de HDTMA 10 mM e 30 mL de água. Foram acrescentados sob agitação, 1,5 mL de solução férrica ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM preparada em HCl 0,01N) e 7,5 mL de solução de cromo azurol S 2 mM. Separadamente foram dissolvidos 4,307 g de piperazina anidra em 20 mL de água que depois de dissolvida foi acrescida de 6,25 mL de HCl. Esta solução foi adicionada ao restante dos componentes já preparados, e o volume completado para 100 mL. A mudança de cor da mistura de sobrenadante-indicador de azulada para amarelo-avermelhado num prazo de 15 min indicou a produção de sideróforos pela bactéria.

Observada a produção de sideróforos, o microrganismo produtor foi submetido à técnica de Calvente et al. (2001), visando verificar se o sideróforo produzido era do tipo hidroxamato e a técnica de Arnow (1937) para determinar se o sideróforo produzido era do tipo catecolato. A metodologia de (Calvente et al. (2001) consistiu em adicionar ao meio KB semi-sólido propágulos do organismo e dispensá-los em cavidades de placas de diluição em temperatura de 28 °C por 48 h. Após a incubação no centro de cada cavidade, onde o microrganismo foi cultivado, foi confeccionado um orifício com aproximadamente 2 mm de diâmetro ao qual foi adicionado o reativo de Atkin et al. (1970) composto por $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ 5 mM em HClO_4 0,1 M. Havendo a formação de um halo escurecido em torno da cavidade contendo o reativo num tempo de 10 a 15 min assumiu-se como indicativo da presença de sideróforos do tipo hidroxamato. A técnica de Arnow (1937) consistiu em adicionar a 1 mL de sobrenadante 1 mL de ácido clorídrico 0,5 N, 1 mL da mistura nitrato-molibdato (10 g de nitrato de sódio + 10 g de molibdato de sódio em 100 mL de água), 1 mL de hidróxido de sódio 1 N e o volume completado para 5 mL com água destilada. O desenvolvimento de uma coloração avermelhada indicou a produção de sideróforos do tipo catecolato.

Sideróforos e germinação de basidiósporos de *C. pernicioso*:

Os isolados foram cultivados em meio KB líquido suplementado ou não com Fe^{3+} 2 μM , sob agitação por 48 h, submetidos à centrifugação (3.600 g por 10 min). Uma alíquota do sobrenadante foi submetida a diluições em série, na proporção 1:1 em tampão PBS (0,1 M) pH 7,0. De cada diluição, foi retirada uma alíquota de 20 μL que foi depositada em placas de Petri contendo ágar-água, e a cada alíquota foi misturada uma alíquota de 10 μL de suspensão de basidiósporos de *C. pernicioso* na concentração de $10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$. As placas contendo a mistura sobrenadante-basidiósporos foram incubadas em temperatura de 25 °C por 3 h, quando a germinação dos basidiósporos foi avaliada. Considerou-se germinado o basidiósporo que apresentou tubo germinativo maior ou igual ao comprimento do respectivo basidiósporo. Como controle, 20 μL de meio de cultura, acrescidos ou não com Fe^{3+} , foram misturados a 10 μL de suspensão de basidiósporos. Calculou-se a percentagem de inibição da germinação pelos sobrenadantes em relação à germinação observada no tratamento controle aplicando-se a fórmula: percentagem de inibição de germinação = $[100 - (\text{GD} \cdot 100) / \text{GC}]$ onde: GD = percentagem de basidiósporos germinados na diluição e GC = percentagem de basidiósporos germinados no tratamento controle. Foi calculada a concentração mínima inibitória para o sobrenadante de cada uma das três repetições, para cada tratamento, por meio de ajuste linear da inibição da germinação de basidiósporos em função da concentração original do sobrenadante. Como concentração inibitória mínima define-se a percentagem mínima necessária do sobrenadante original para promover 100% de inibição da germinação dos basidiósporos (Devkatte et al., 2005; Moreira et al., 2005). Nos tratamentos em que não se observou a inibição de 100% da germinação quando o sobrenadante sem diluição foi avaliado, considerou-se como concentração inibitória mínima valores >100%, uma vez que não foi possível o seu cálculo. Haveria a necessidade de concentração do mesmo sobrenadantes para a determinação da concentração inibitória mínima.

Detecção de enzimas líticas:

Os antagonistas foram semeados, por ponto, em meio mineral (CaCO_3 0,02 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g; KCl 1,71 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4,11 g ágar 15 g e água destilada q.s.p. 1 L) contendo como única fonte de carbono 0,5 % de Laminarina para detecção de β -1,3-glucanases, 0,5 % de Carboximetilcelulose para a detecção de celulases ou quitina coloidal 0,08 % para detecção de quitinases (Renwick

et al., 1991). A quitina coloidal foi obtida a partir de quitina não coloidal conforme metodologia de Reid & Ogrydziak (1981). Para tanto, 25 g de quitina foram trituradas usando-se o Moinho Universal M20 Ika[®] e peneirada. Utilizou-se a fração retida entre as peneiras 0,15 mm e 0,075 mm a qual foi suspensa em H₃PO₄ 85 % e mantida em refrigerador por 24 horas. A suspensão foi diluída com 2L de água destilada e homogeneizada com liquidificador. A quitina foi precipitada por centrifugação, resuspensa e homogeneizada em liquidificador por várias vezes até o pH atingir valor 5,5 quando foi adicionado NaOH 1 N até elevar o pH para 7,0. A mistura foi novamente centrifugada e o precipitado liofilizado e usado como fonte de carbono.

As placas contendo os antagonistas semeados nas diferentes fontes de carbono foram incubadas a 28 °C por 10 dias para quitinases e 4 dias para glucanases e celulases. Os isolados produtores de quitinases apresentaram, após incubação, um halo claro ao redor da colônia contrastando com o restante do meio com aspecto turvo. Para as demais, a superfície do meio foi coberta por uma solução de 0,5 % de vermelho Congo por 90 min. Após drenado o excesso, a observação de uma zona amarelo-alaranjada ao redor das colônias indicou a produção de β-1,3-glucanases ou celulases, dependendo da fonte de carbono.

Produção de quitinases e inibição da germinação de basidiósporos:

Os cinco antagonistas foram cultivados em meios contendo três diferentes fontes de carbono. O meio de Simmons (1926) foi utilizado como meio básico no qual o citrato foi substituído por 1 % de glicose, quitina coloidal ou parede celular de *C. pernicioso*. Para obtenção de parede celular do patógeno adotou-se a técnica de Wisniewski et al. (1991). O fungo foi cultivado em meio BD (Decocção de 200 g de batata +20 g dextrose e água destilada q.s.p 1 L) por 7 dias. O micélio resultante foi lavado seguidas vezes em água destilada e triturado usando um triturador-homogeneizador de tecidos (Ultra-turrax Ika[®]) por 2 min e congelado por uma noite. O micélio foi então novamente homogeneizado e centrifugado a 5000 g 15 min⁻¹. O precipitado foi resuspensa em água destilada e homogeneizado por 6 vezes quando o precipitado foi liofilizado e usado como fonte de carbono. Cada microrganismo foi cultivado em triplicata por 48 h quando as células foram precipitadas por centrifugação e o sobrenadante usado para os ensaios posteriores. A atividade de quitinases presente no sobrenadante foi quantificada através do método de Hackman & Goldberg (1964) onde foi quantificado colorimétrica o Remazol Violeta Brilhante liberado de Chitin Azure (SIGMA). A mistura de reação

consistiu de 900 µl da solução do substrato (1 % (p/v) de Chitin Azure em tampão fosfato 50 mM pH 6,0) e 100 µl do sobrenadante. Na mistura de reação controle o sobrenadante foi substituído por meio de cultura, no mesmo volume. A reação transcorreu por 48 h em temperatura de 25 °C sob agitação e ao fim deste período a mistura foi centrifugada e os sobrenadantes tiveram a absorvância determinada, a 575 nm.

Calculou-se a diferença entre o valor de absorvância a 575 nm de cada amostra e valor de absorvância do controle. Os resultados finais foram expressos em unidades de quitinases. Uma unidade de quitinase correspondeu à variação de 0,001 no valor de absorvância por dia de reação por µg de proteína total. A concentração de proteína presente nas amostras foi quantificada pelo método de Bradford (1976). A atividade de quitinases foi submetida à análise de variância em esquema fatorial sendo os fatores 3 meios e 5 isolados e como variável dependente a atividade de quitinases.

Quitinases e inibição da germinação de basidiósporos: Os sobrenadantes provenientes do cultivo dos diferentes antagonistas nos diferentes meios foram submetidos a bioensaios de inibição de germinação de basidiósporos. A metodologia para execução do ensaio e avaliação dos resultados foi à mesma descrita para sideróforos. Como controle, uma alíquota dos diferentes meios de cultura foram misturadas a alíquotas de suspensão de basidiósporos.

RESULTADOS

Produção de HCN e inibição da germinação de basidiósporos: Os cinco isolados testados demonstraram ser produtores de HCN e, capazes de inibir a germinação de basidiósporos pela produção de compostos voláteis. A maior produção de HCN foi observada após 48 h de cultivo evidenciada pela maior intensidade das manchas no papel indicador. A produção de HCN foi mais persistente no isolado Ac4 onde a sua produção foi detectada durante 72 h (Fig. 1). Houve inibição da germinação de basidiósporos por compostos voláteis durante todo o desenvolvimento do ensaio e mostrando-se em maior intensidade 48 h após o semeio e permanecendo acentuada, para a maioria dos isolados, até 72 h (Fig. 2).

Deteção de sideróforos e inibição da germinação de basidiósporos: Os ensaios revelaram que os cinco isolados são produtores de sideróforos e estes demonstraram serem todos do tipo hidroxamato. Não foi detectada a presença de sideróforos no meio suplementado com $2\mu\text{M}$ de Fe^{3+} . Observa-se diferença na inibição de germinação em função do isolado. Porém a inibição de germinação não foi influenciada pelo meio onde o antagonista foi cultivado. As maiores inibições de germinação de basidiósporos foram observadas com os sobrenadantes dos isolados Ac19 e Ac26 (Tab.1).

Produção de enzimas líticas e inibição da germinação: Os ensaios qualitativos revelaram que os isolados não foram produtores de celulases ou de β -1,3-glucanases. Porém todos demonstraram capazes de produzir quitinases (dados não apresentados). Ensaio visando determinar a produção quantitativa de quitinases demonstraram que não houve diferença significativa na atividade de quitinases pelos diferentes isolados. A fonte de carbono utilizada nos três diferentes meios de cultura também não afetou a atividade de quitinases produzida. Porém a inibição da germinação de basidiósporos, para todos os isolados, foi mais acentuada quando foi usado o sobrenadante do cultivo dos isolados em meio contendo glicose como fonte de carbono seguido de quitina coloidal e parede celular (Tab.2).

DISCUSSÃO

Os diferentes isolados de actinomicetos produziram substâncias capazes de inibir a germinação de basidiósporos de *C. pernicioso*. Estas substâncias são produzidas a partir de diferentes fontes de carbono e também foram detectadas tanto no sobrenadante proveniente do cultivo em meio líquido quanto a partir de compostos voláteis (Fig. 2, Tab.1 e 2).

Compostos voláteis demonstraram inibir fortemente a germinação de basidiósporos. A inibição de germinação assim como a produção de HCN atingiram seu máximo 48 h após o semeio (Fig. 2). As duas variáveis mensuradas parecem acompanhar a curva de crescimento dos microrganismos. Dessa forma a produção de HCN pelos isolados demonstrou estar envolvida na inibição da germinação dos propágulos do patógeno. Porém, é importante salientar que a eficiência desses isolados em condições de laboratório e em condições de campo é bastante diferente. Enquanto em condições de laboratório todos os isolados são eficientes em inibir a germinação de

basidiósporos (Fig. 2), alguns desses isolados são completamente ineficazes em condições de campo (Macagnan et al., 2005). Portanto, não se pode atribuir exclusivamente à capacidade de produzir HCN pelos isolados Ac26 e Ac79 a sua eficiência em condições de campo. É possível que a produção de HCN tenha um efeito complementar no antagonismo contra *C. pernicioso* à exemplo do observado por Voisard et al. (1989) no patossistema fumo-*Thielaviopsis basicola*.

Após 96 h de cultivo não foi detectada a produção de HCN por nenhum dos antagonistas (Fig. 1). Porém observou-se ainda uma forte inibição da germinação de basidiósporos (Fig. 2). Nas primeiras 24 h, os isolados Ac26 e Ac79 inibiram a germinação de basidiósporos porém não tiveram produção detectável do composto. Essas observações supõem uma sensibilidade do indicador da presença de HCN menor a sensibilidade dos basidiósporos à presença do composto, ou ainda, a produção pelos antagonistas de diferentes compostos tóxicos com características voláteis.

Conforme Neilands (1995) sideróforos somente são produzidos sob condições de baixa disponibilidade do íon Fe^{3+} . Em nossos ensaios foi detectada a presença de sideróforos somente quando se cultivou os microrganismos em meio KB, sem a adição de ferro. Quando este mesmo meio foi suplementado com apenas $2\mu M.l^{-1}$ de Fe^{3+} não foi observada a produção do referido composto, concordando assim com Neilands (1995).

A presença de sideróforos no sobrenadante de meio de cultivo não suplementado com Fe^{3+} não favoreceu a inibição de germinação de propágulos do patógeno (Tab.1). Estes dados estão em desacordo daqueles observados por Calvente et al. (1999). Estes autores observaram uma forte inibição na germinação de conídios e também no crescimento micelial de *Penicillium expansum* por sideróforos produzidos por leveduras. Porém deve-se observar que se trata de fungos de diferentes filos e de diferentes tipos de propágulos. Conídios de *P. expansum* apresentam dormência e a absorção de ferro é importante para o início da germinação (Charlang et al., 1981). Ao contrário, basidiósporos de *C. pernicioso* apresentam parede celular delgada e a presença de água livre é suficiente para iniciar o processo germinativo visto que a completa germinação de basidiósporos viáveis é observada para diferentes substratos sem a adição de nutrientes. Dessa forma, a competição por nutrientes demonstra-se inócua como modo de ação na inibição da germinação de basidiósporos do patógeno. Há ainda a possibilidade do patógeno requerer baixas quantidades de Fe^{3+} para início do processo germinativo e/ou crescimento micelial a exemplo do observado em

Lactobacillus plantarum, onde há a possibilidade de uma necessidade zero desse elemento para o início de seu crescimento (Neilands, 1984).

A produção de quitinases por actinomicetos é observada na maior parte dos espécimes pertencentes a este grupo de microrganismos (Araujo, 1998). Nesse sentido, Hsu & Lockwood (1975) desenvolveram um meio semi-seletivo para isolamento de actinomicetos baseados na sua constitutiva produção de quitinases. Os dados apresentados reiteram esta afirmativa uma vez que não houve influência da fonte de carbono na produção de quitinases e, mesmo da ausência de fonte de quitina, houve a produção de quitinases. Já o sobrenadante que mais eficientemente inibiu a germinação de basidiósporos foi o proveniente do cultivo dos antagonistas em meio com glicose como fonte de carbono (Tab. 2). de Boer et al. (1998) sustentam que microrganismos quitinolíticos são mais eficientes no antagonismo contra fungos seja pela ação da quitinases em si ou pela combinação com outros compostos com ação antifúngica produzidos pelo microrganismo. Os dados aqui apresentados concordam em parte com essas afirmações. Os isolados testados neste trabalho foram selecionados a partir de uma população de 332 microrganismos. E, de fato os cinco isolados são quitinolíticos. Porém os isolados não demonstraram-se diferentes na capacidade de produzirem quitinases mas mostraram-se diferentes na capacidade de inibirem a germinação de basidiósporos. A glicose foi a fonte de carbono mais eficiente em induzir a produção do composto inibidor da germinação o que coloca as quitinases, produzidas por esses microrganismos, em secundária importância no antagonismo ao patógeno. Roberts & Selitrennikoff (1988) compararam a atividade de quitinases purificadas de origem bacteriana e vegetal contra dois fungos e verificaram que embora as quitinases de ambas as fontes fossem capazes de degradar a quitina coloidal, somente as quitinases de origem vegetal eram capazes de inibir o crescimento de hifas fúngicas. Segundo esses autores quitinases de origem bacteriana são do tipo exoquitinase as quais necessitam de terminações não redutoras para a sua atividade. A ação dessas enzimas é dificultada ou mesmo inviabilizada pois paredes celulares intactas de fungos não contêm quitinases com regiões não redutoras. Já quitinases de origem vegetal são endoquitinases as quais podem clivar qualquer porção do polímero de quitina. Portanto, sob a ótica de Roberts & Selitrennikoff (1988), trabalhos onde a importância da atividade quitinolítica de agentes de biocontrole foi estudada usando unicamente parede celular fúngica purificada a exemplo do trabalho de Mahadevan & Crawford (1997), representam trabalhos inconsistentes. De fato segundo Selitrennikoff (2001), realmente existem

diferentes quitinases, pelo menos cinco. No entanto diferentemente das afirmações de Roberts & Selitrennikoff (1988) uma endoquitinase foi purificada e sua atividade contra hifas intactas de fungos fitopatogênicos foi comprovada por Gomes et al. (2001). Trabalho semelhante foi conduzido por Taechowisan et al. (2003) também observando que quitinases produzidas por bactérias apresentavam atividade endoquitinolítica. Portanto bactérias, especialmente actinomicetos, podem produzir quitinases capazes de causar a lise de fungos. Porém os isolados estudados neste trabalho não demonstraram essa característica. As causas do aparente não envolvimento da quitinase no antagonismo ao patógeno, pode ser atribuída a uma concentração insuficiente da mesma nos sobrenadantes para causar a lise das hifas do patógeno tendo assim papel secundário na antibiose sendo sua atividade sobreposta por outras substâncias. Ou ainda sendo as quitinases produzidas pelos antagonistas do tipo exoquitinase. Porém essas especulações precisam de confirmação experimental.

Nenhum dos isolados produziu β -1,3-glucanases assim como celulasas. A produção dessas enzimas líticas por microrganismos é pouco freqüente conforme trabalho de de Boer et al. (1998).

É muito provável que a substância responsável por grande parte da inibição da germinação de basidiósporos em condições de campo não sejam aquelas aqui estudadas. Porém deve-se ter em mente que todas essas substâncias podem estar direta ou indiretamente envolvidas no conjunto de interações microbianas que resultam no controle biológico. Estas substâncias podem estar envolvidas no antagonismo direto ao patógeno como a produção de HCN ou na competição por nutrientes e espaço com outros organismos também habitantes da superfície de frutos de cacauete através da produção de sideróforos ou ainda degradando e obtendo nutrientes a partir de polímeros de difícil degradação a exemplo da quitina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W. & Blackell, M. 1996. *Introductory Mycology*. New York, John Wiley & Sons Inc. 869p.
- Adebrhan, T.; Figueira, A.; Yamada, M.M.; Cascardo, J. & Furtek, D.B. 1999. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 105:167-175.
- Araujo, J.M. 1998. Estratégias para o isolamento seletivo de actinomicetos. In: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (Ed.) *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna, EMBRAPA, 351-367.
- Arnou, L.E. 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. *Journal of Biological Chemistry* 118:531-537.
- Atkin, C.L.; Neilands, J.B. & Phaff, H.J. 1970. Rhodotorulic acid from species of *Leucosporidium*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, and *Sporobolomyces*, and a new alanine-containing ferrichrome from *Cryptococcus melibiosum*. *Journal of Bacteriology* 103:722-733.
- Bastos, C.N. 1996. Mycoparasitic nature of the antagonism between *Trichoderma viride* and *Crinipellis pernicioso*. *Fitopatologia Brasileira* 21:50-54.
- Blumer, C. & Haas, D. 2000. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archives of Microbiology* 173:170-177.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Calvente, V.; Benuzzi, D. & Tosetti, M.I.S. 1999. Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 43:167-172.
- Calvente, V.; Orellano, M.E.; Sansone, G.; Benuzzi, D. & Tosetti, M.I.S. 2001. A simple agar assay for screening siderophore producer yeasts. *Journal of Microbiological Methods* 47:273-279.
- Castoria, R.; De Curtis, F.; Lima, G. & De Cicco, V. 1997. Beta-1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology* 12:293-300.

- Castric, K.F. & Castric, P.A. 1983. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 45:701-702.
- Charlang, G.; Bradford, N.; Horowitz, N. & Horowitz, R. 1981. Cellular and extracellular siderophores of *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum*. *Molecular and Cellular Biology* 1:94-100.
- Cook, R.J. & Baker, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, Minnesota, APS Press, American Phytopathological Society. 539p.
- de Boer, W.; Gunnewiek, P.J.A.K.; Lafeber, P.; Jans, J.D.; Spit, B.E. & Woldendorp, J.W. 1998. Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. *Soil Biology Biochemistry* 30:193-203.
- Devkatte, A.N.; Zore, G.B. & Karuppayil, S.M. 2005. Potential of plant oils as inhibitors of *Candida albicans* growth. *FEMS Yeast Research* 5:867-873.
- El-Tarabilya, K.A.; Solimana, M.H.; Nassara, A.H.; Al-Hassania, H.A.; Sivasithamparame, K.; McKennad, F. & Hardy, G.E.S.J. 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathology* 49:573-583.
- Evans, H.C. & Solorzano, G.R. 1981. Witches' broom disease: wrong experiment right results. Proceedings 8th International Cocoa Research Conference, Cartagena Colômbia 415 - 418.
- Feigl, F. & Anger, V. 1966. Replacement of benzidine by cooper ethylacetoacetato and tetrabase as spot-test reagent for hydrogen cyanide and cyanogen. *Analyst* 91:282-284.
- Frias, G.A.; Purdy, L.H. & Schmidt, R.A. 1995. An inoculation method for evaluating resistance of cacao to *Crinipellis pernicioso*. *Plant Disease* 79:787-791.
- Gherna, R.L. 1994. Culture preservation. In: Gerhardt, P.; Murray, R.G.E.; Wood, W.A. & Krieg, N.R. (Ed.) *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington, American Society for Microbiology, 278-292.
- Glick, B.R. & Bashan, Y. 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology Advances* 15:353-378.
- Gomes, R.C.; Sêmedo, L.T.A.S.; Soares, R.M.A.; Linhares, L.F.; Ulhoa, C.J.; Alviano, C.S. & Coelho, R.R.R. 2001. Purification of a thermostable endochitinase from

- Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology* 90:653-661.
- Goto, M. 1990. *Fundamentals of bacterial plant pathology*. San Diego, Academic Press. 342p.
- Hackman, R.H. & Goldberg, M. 1964. New substrates for use with chitinases. *Analytical Biochemistry* 8:397-401.
- Hsu, S.C. & Lockwood, J.L. 1975. Powdered chitin as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Applied Microbiology* 29:422-426.
- King, E.O.; Ward, M.K. & Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal Laboratory Clinical Medical* 44:301 - 307.
- Laker, H. & Rudgard, S.A. 1989. A review of the research on chemical control of witches' broom disease of cocoa. *Cocoa Growers' Bulletin* 42:12 - 24.
- Macagnan, D.; Romeiro, R.S.; Souza, J.T. & Pomella, A.W.V. 2005. Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their activity against the witches' broom and black pod pathogens. *Phytoparasitica* Submetido para publicação:
- Mahadevan, B.M. & Crawford, D.L. 1997. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enzyme and Microbial Technology* 20:489-193.
- Meziane, H.; Van Der Sluis, I.; Van Loon, L.C.; Höfte, M. & Bakker, P.A.H.M. 2005. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Molecular Plant Pathology* 6:177-185.
- Moreira, M.R.; Ponceb, A.G.; del Vallea, C.E. & Roura, S.I. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT* 38:565-570.
- Neilands, J.B. 1984. Methodology of siderophores. *Structure and Bonding* 58:1-24.
- Neilands, J.B. 1989. Siderophore systems of bacteria and fungi. In: Beveridge, T.J. & Doyle, R.J. (Ed.) *Metal ions and Bacteria*. New York, John Wiley & Sons, 141-163.
- Neilands, J.B. 1995. Siderophores: Structure and functions of microbial iron transport compounds. *The Journal of Biological chemistry* 270:26723-26726.
- Pomella, A.W.V. 2001. O controle biológico da vassoura de bruxa: situação atual no Brasil e no mundo. *Fitopatologia Brasileira* 26:268.

- Pramer, D. & Schmidt, E.L. 1964. Experimental soil microbiology. Minnesota, Burgess Publishing Company. 107p.
- Press, C.M.; Loper, J.E. & Kloepper, J.W. 2001. Role of iron in rhizobacteria-mediated induced systemic resistance of cucumber. *Phytopathology* 91:593-598.
- Purdy, L.H. & Schmidt, R.A. 1996. Status of cocoa witches' broom: biology, epidemiology, and management. *Annual Review of Phytopathology* 34:573-594.
- Reid, J.D. & Ogrydziak, D.M. 1981. Chitinase-overproducing mutant of *Serratia marcescens*. *Journal of Applied Microbiology* 41:664-669.
- Renwick, A.; Campbell, R. & Coe, S. 1991. Assessment of in vitro screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology* 40:524-532.
- Rikken, G.B.; Kroon, A.G.M. & van Ginkel, C.G. 1996. Transformation of (per)chlorate into chloride by a newly isolated bacterium: reduction and dismutation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45:420-426.
- Roberts, W.K. & Selitrennikoff, C.P. 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Journal of General Microbiology* 134:169-176.
- Schwyn, B. & Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160:47-56.
- Selitrennikoff, C.P. 2001. Antifungal Proteins. *Applied And Environmental Microbiology* 67:2883-2894.
- Simmons, J.S. 1926. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. *Journal of Infect Disease* 209-214.
- Song, Y. & Logan, B.E. 2004. Inhibition of aerobic respiration and dissimilatory perchlorate reduction using cyanide. *FEMS Microbiology Letters* 239:229-234.
- Taechowisan, T.; Peberdy, J.F. & Lumyong, S. 2003. Chitinase production by endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Annals of Microbiology* 53:447-461.
- van Loon, L.C.; Bakker, P.A.H.M. & Pieterse, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36:453-483.
- Voisard, C.; Keel, C.; Haas, D. & Défago, G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *The EMBO Journal* 8:351-358.

Wisniewski, M.; Biles, C.; Droby, S.; McLaughlin, R.; Wilson, C. & Chalutz, E. 1991.
Mode of action of the postharvest biocontrol yeast *Pichia guillermondii*. I.
Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. Physiological and Molecular
Plant Pathology 39:245–258.

FIGURAS

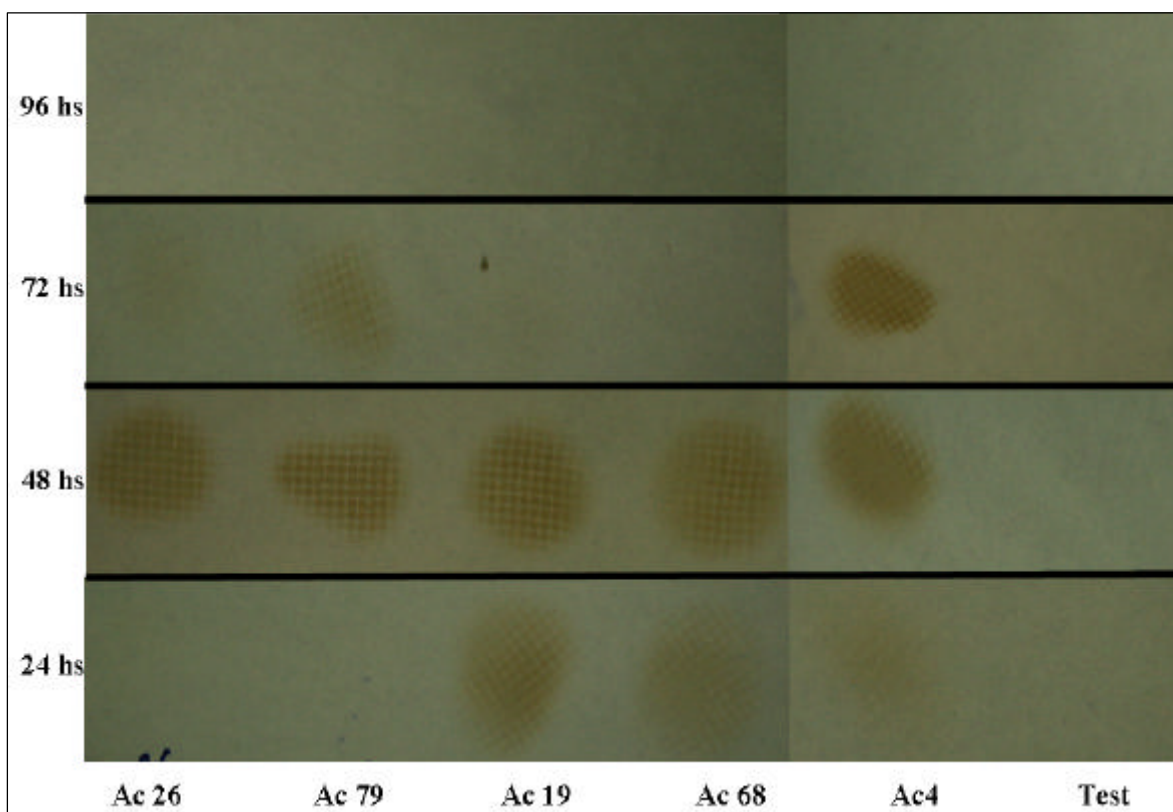


Figura 1: Detecção da produção *in vitro* de ácido cianídrico por cinco actinomicetos selecionados para o biocontrole da vassoura-de-bruxa do cacauero nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h após o semeio em meio TSA suplementado com glicina e $\text{FeCl}_3+6\text{H}_2\text{O}$ e detectado com papel filtro impregnado com o reativo de (Feigl & Anger, 1966).

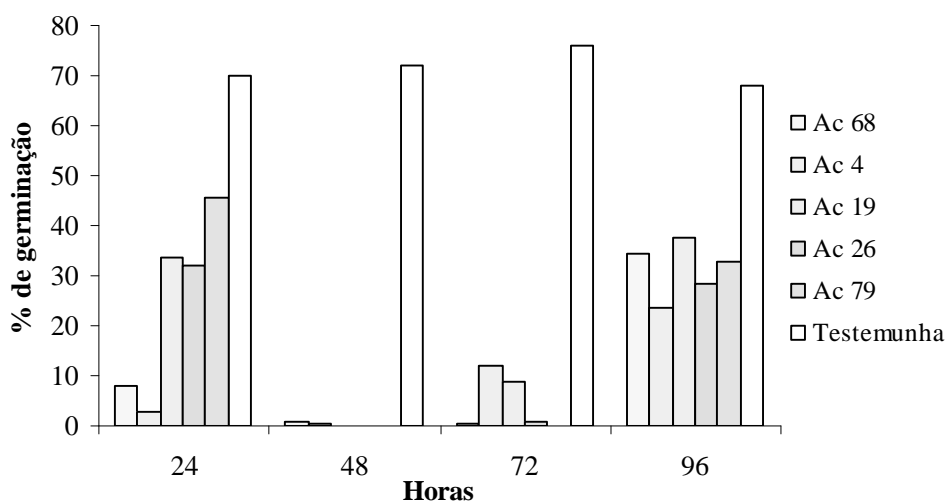


Figura 2: Germinação *in vitro* de basidiósporos de *Crinipellis pernicioso* expostos à compostos voláteis produzidos por cinco actinomicetos selecionados para o biocontrole da vassoura-de-bruxa do cacauero nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h após o semeio em meio TSA suplementado com glicina e $\text{FeCl}_3+6\text{H}_2\text{O}$.

Tabela 1: Inibição da germinação de basidiósporos de *Crinipellis pernicioso* por sobrenadantes provenientes do cultivo de cinco antagonistas selecionados para o biocontrole da vassoura-de-bruxa do cacauero em meio B de King suplementado ou não com Fe^{3+} 2 μM obtido a partir de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Isolado	Concentração inibitória mínima (% do meio original)	
	Meio com adição de Fe^{3+}	Meio s/ adição de Fe^{3+}
Ac19	44,62	41,03
Ac26	54,17	48,01
Ac4	>100	80,04
Ac79	>100	98,29
Ac68	>100	>100

Tabela 2: Inibição da germinação de basidiósporos de *Crinipellis pernicioso* por sobrenadantes de cinco actinomicetos cultivados em meios contendo glicose, quitina coloidal ou parede celular de *C. pernicioso* como fonte de carbono

Isolado	Concentração inibitória mínima (% do meio original)		
	Meio com glicose	Meio com quitina	Meio com parede celular
Ac19	93,43	98,24	>100
Ac26	89,85	>100	>100
Ac4	93,32	>100	>100
Ac79	63,18	90,83	>100
Ac68	>100	>100	>100

ARTIGO III: Aumento da atividade de enzimas associadas ao estado de indução e proteção de mudas de cacauero mediadas por dois actinomicetos residentes de filoplano aplicados isoladamente e em associação

Dirceu Macagnan¹; Reginaldo S. Romeiro¹; Maria C. Baracat-Pereira²; Roberto Lanna-Filho¹; Gisele S. Batista¹ & Alan W.V. Pomella³.

¹*Universidade Federal de Viçosa – UFV - Departamento de Fitopatologia* ²*UFV - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 36571-000 Viçosa-MG.* ³*Almirante Cacau, Cx.P. 55 CEP 45630-000 Itajuípe-BA.*

RESUMO

Dois antagonistas selecionados para o controle da vassoura-de-bruxa do cacauero foram avaliados quanto à capacidade em ativar mecanismos de defesa de plantas contra patógenos. Para tanto, mudas seminais de cacauero foram cultivadas em casa-de-vegetação por 30 dias. Os antagonistas foram cultivados em meio líquido e aplicados à mudas de cacauero por atomização, individualmente e em associação. Mudas tratadas ou não com os antagonistas foram inoculadas com o patógeno *C. pernicioso* e as folhas basais foram coletadas após 2, 4, 12 e 24 dias após a aplicação dos antagonistas. As atividades de peroxidases, polifenol oxidases, quitinases e β -1,3-glucanases foram avaliadas no material coletado. Observou-se um aumento na atividade de peroxidases e polifenol oxidases nos primeiros dias após a exposição das mudas, especialmente ao isolado Ac26. Observou-se efeito negativo quando os dois isolados foram aplicados em conjunto. Não foi obtida infecção nas mudas pelo patógeno e sendo assim não foi possível obter conclusões a respeito da real contribuição do aumento da atividade dessas enzimas na proteção de mudas contra a infecção pelo patógeno.

INTRODUÇÃO

A resistência induzida é um fenômeno caracterizado pelo aumento da resistência de plantas contra doenças quando estas são apropriadamente estimuladas. Plantas induzido-resistentes quando inoculadas com um patógeno desafiador exibem menor severidade dos sintomas (van Loon, 1997).

A ativação de mecanismos latentes de resistência de plantas por microrganismos contra fitopatógenos pode ocorrer por meio do tratamento de plantas com componentes ou produtos microbianos. A atividade do agente indutor não se deve à sua atividade antimicrobiana *per se* ou à sua transformação em agentes antimicrobianos mas sim na sua capacidade em sensibilizar a planta, e esta por sua vez ativa mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos latentes em resposta à presença de um patógeno em potencial (Kuc', 2001)

O uso de microrganismos como agentes indutores de resistência sistêmica em plantas tem sido intensamente investigada nos últimos anos, principalmente rizobactérias e, em menor escala, residentes de filoplano. A título de exemplo trabalhando com residentes de filoplano Halfeld-Vieira (2002) verificou que um isolado de *Bacillus cereus* não apresentava atividade antagônica direta sobre patógenos, mas era capaz de exercer controle de doenças da parte aérea de tomateiro. Análises bioquímicas de plantas tratadas com esse isolado revelaram aumentos nas atividades de enzimas envolvidas na indução de resistência.

Plantas induzido-resistentes apresentam restrições à invasão e multiplicação de patógenos em seus tecidos (van Loon, 1997). Estas restrições podem ser devido à maior resistência dos tecidos em função de reforço da parede celular ou à produção de substâncias com atividade antimicrobiana (Hammerschmidt, 1999). Em última análise, plantas expostas a um agente indutor de resistência apresentam um aumento nas atividades de enzimas envolvidas na percepção da presença de patógenos em potencial, rotas de sinalização bioquímica a pontos distantes do sítio onde o sinal foi originado e, por conseqüência, aumentos nas atividades de enzimas envolvidas na síntese de compostos antimicrobianos, tais como PR proteínas e fitoalexinas, e reforço da parede celular. Portanto, se a resistência induzida aumenta a atividade de determinadas rotas metabólicas específicas, o estado de indução de plantas expostas a agentes indutores pode ser confirmado por meio da análise da atividade de algumas enzimas-chave envolvidas na resistência de plantas contra patógenos.

Neste sentido algumas enzimas têm sido consideradas indicadoras do estado de indução em plantas. Dentre estas citam-se as enzimas líticas quitinases (EC 3.2.1.14) e β -1,3-glucanases que fazem parte das proteínas de plantas induzidas sob patogênese ou correlatas e, de forma genérica, chamadas de PR proteínas (van Loon et al., 1994).

Quitinases e glucanases podem apresentar função dupla na resistência. Por serem enzimas líticas, podem agir diretamente sobre o patógeno degradando a parede e causando a lise celular. A degradação da parede celular de agentes invasores, por algumas de suas isoenzimas, gera alicidores da reação de hipersensibilidade que por sua vez gera sinais bioquímicos que são translocados sistemicamente pela planta (Tuzun, 2001).

As quitinases catalisam a hidrólise da quitina, um polímero de β -1,4-N-acetilglicosamina, que é um dos principais componentes da parede celular de fungos, ovos de nematóides e de porções do intestino de insetos (Tuzun, 2001). Há evidências, também, de que algumas quitinases de plantas exibem atividade lizozimática (Dodson et al., 1993). Alguns grupos de fungos, aditivamente à quitina, apresentam um segundo polímero, o β -1,3-glucano como constituinte da parede celular. Especialmente para os fungos pertencentes ao filo oomicota, este polímero apresenta-se como o principal constituinte da parede celular (Alexopoulos et al., 1996). Estas duas enzimas podem agir sinergisticamente contra agentes patogênicos (Benhamou et al., 1990; Jach et al., 1995).

Peroxidases (PO; EC 1.11.1.7) representam um conjunto de mais de 20 isoenzimas capazes de catalisar a oxidação, de vários substratos como substâncias aromáticas, ácido ascórbico e compostos fenólicos, na presença de peróxido de hidrogênio, formando quinonas e água. Os produtos gerados pela ação das peroxidases estão envolvidos na formação da parede celular vegetal, suberização e lignificação (Kolattukudy et al., 1992). As atividades das peroxidases, em plantas infectadas por patógenos, ou em plantas induzidas, estão também ligadas à oxidação de compostos fenólicos, que são tóxicos a patógenos (Sutic´ & Sinclair, 1991). O acúmulo de lignina, assim como de compostos fenólicos, tem sido correlacionado com a resistência da plantas a patógenos (Mohammadi & Kazemi, 2002). Estas enzimas estão também envolvidas na geração de H_2O_2 , que por sua vez pode gerar outros radicais ativos de oxigênio, além de apresentar, atividade antimicrobiana (Peng & Kuc, 1992).

Outra enzima importante para a defesa de plantas, também envolvida em reações de oxidação é a polifenol oxidases (PPO; EC 1.14.18.1). Assim como a peroxidase, a PPO oxida compostos como o ácido ascórbico e fenóis, porém usando oxigênio (Sutic´

& Sinclair, 1991). A importância da PPO e da peroxidase em plantas resistentes ou induzidas é atribuída principalmente à sua capacidade de oxidar fenóis que são mais tóxicos a patógenos na forma oxidada (Vidhyasekaran, 1997).

Este trabalho teve como objetivo detectar bioquimicamente a possível indução de resistência em mudas de cacaueteiro expostas a dois actinomicetos, isoladamente ou em associação, selecionados como agentes de controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacaueteiro. Adicionalmente, visou avaliar a possibilidade de plantas resistente-induzidas apresentarem menor frequência de infecção quando desafiadas com o patógeno *Crinipellis pernicioso*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e microrganismos: manutenção, multiplicação e aplicação.

Os isolados Ac26 e Ac79 pertencentes ao gênero *Streptomyces*, selecionados por Macagnan et al. (2005), mantidos em ultrafreezer (-80 °C) e emulsificados em glicerol 15 % (Gherna, 1994), foram cultivados em meio extrato de solo ágar (Pramer & Schmidt, 1964) por 7 dias. Os esporos foram removidos por raspagem e transferidos para meio líquido BD (Tuite, 1969) onde foram cultivados por 72 h, sob agitação.

Como material vegetal foram utilizadas mudas seminais de cacaueteiro do tipo amelonado comumente cultivado e designado “comum” com 30 dias de idade, cultivadas em vasos contendo 500 mL de solo não esterilizado.

A suspensão de cada antagonista foi padronizada para uma $DO_{540} = 0,8$ e aplicados nas plantas individualmente e em associação. A combinação dos isolados foi obtida misturando-se as suspensões de cada um dos dois antagonistas na proporção 1:1. As suspensões foram aplicadas com o auxílio de um atomizador de Vilbs, acoplado a uma fonte de pressão, até antes do início do ponto de escorrimento, sobre toda a parte aérea das mudas. Como controle, mudas foram tratadas com meio de cultura BD. Cada tratamento, Ac26, Ac79, Ac26+Ac79 e testemunha foi aplicado a 96 mudas.

Após o tratamento as mudas foram transferidas para câmara de nevoeiro com temperatura ajustada para 25 °C, em compartimentos separados para cada tratamento. Transcorridas 48 horas da aplicação dos antagonistas, 60 mudas de cada tratamento foram inoculadas com o patógeno *C. pernicioso*. Cada muda recebeu, em sua gema

apical, 30 µl de uma suspensão contendo $6,6 \cdot 10^5$ basidiósporos viáveis por mililitro de suspensão acrescidos de ágar 0,003 % (p/v) previamente fundido.

O inóculo de *Crinipellis perniciosa* foi obtido mantendo-se vassouras secas de cacauero, provenientes de infecção natural, em temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h de claro e 12 h de escuro, com umidade relativa saturada. Os basidiocarpos produzidos foram coletados e tratados com sulfato de estreptomicina $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e, em seguida, lavados em água destilada esterilizada. Posteriormente eles foram fixados pela sua face dorsal no centro de placas de Petri com graxa de silicone, permanecendo a face inferior livre para a ejeção de basidiósporos, os quais foram coletados em uma solução contendo 16 % de glicerol (v/v) e 0,195 % (p/v) de ácido 2-(N-morfolino) etano sulfônico (MES) pH 7,0 sob lenta e contínua agitação, por um período de 18 h a 25 °C (Frias et al., 1995). A suspensão de basidiósporos obtida foi avaliada quanto à sua concentração e germinação e mantida em ultrafreezer (-80 °C) até o momento de sua utilização. A concentração desejada da suspensão de basidiósporos foi obtida adicionando-se o tampão MES + glicerol conforme citado.

Após a inoculação, as plantas foram mantidas na câmara de nevoeiro por mais 48 h, quando foram transferidas para a casa-de-vegetação permanecendo no local até o final do ensaio. Cada tratamento foi mantido isolado dos demais, e as mudas foram numeradas e dispostas em três grupos, contendo 20 plantas inoculadas e nove plantas não inoculadas com o patógeno por grupo. Essas plantas foram destinados a coleta de material destinado as análises enzimáticas. O ensaio de inoculação com o patógeno foi repetido. Os tratamentos e os procedimentos pré e pós-inoculação foram os mesmos supra citados. Cada tratamento foi aplicado a 54 mudas distribuídas em três repetições. Neste ensaio, cada muda recebeu 20 µL de uma suspensão contendo $6,5 \cdot 10^5$ basidiósporos viáveis por mililitro de suspensão, contidos em de tampão MES+Glicerol, acrescido de ágar na concentração de 0,003 % (p/v).

As folhas basais das plantas foram coletadas dois dias depois da aplicação dos antagonistas (e antes da aplicação do patógeno) quatro, 12 e 24 dias depois da aplicação dos antagonistas. As mudas das quais as folhas basais foram coletadas dois dias depois da aplicação dos antagonistas foram descartadas após a coleta das folhas.

As folhas coletadas foram armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) até o momento da execução das análises.

A avaliação da incidência da doença foi feita 60 dias após a inoculação. Considerou-se infectada a muda apresentando a região próxima à gema apical com

diâmetro maior e entrenós mais curtos, em comparação com mudas sadias de acordo com as descrições de Rudgard (1989).

Delineamento para as análises enzimáticas:

Por ocasião da execução das análises enzimáticas, nove mudas dentro de cada tempo de amostragem foram unidas três a três, constituindo-se uma repetição. De cada repetição retirou-se um grama de tecido vegetal (peso fresco) o qual foi submetido a extração de proteína total. A partir do extrato obtido foram realizadas todas as análises enzimáticas sendo que para cada enzima foram realizadas três reações. Portanto cada enzima em cada um dos quatro tempos amostrados foi ensaiada 9 vezes.

Obtenção dos extratos:

As amostras vegetais foram maceradas em nitrogênio líquido, utilizando almofariz e pistilo. Ao macerado foram acrescentados 3 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5, acrescido de polivinilpirrolidona 1 % (p/v) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1 mM (tampão de extração), com posterior centrifugação (30.000 g, 25 min, 4 °C) e recuperação do sobrenadante que foi mantido em banho de gelo durante a execução das análises (Baracat-Pereira et al., 2001).

Os sobrenadantes recuperados foram utilizados para determinar as atividades de peroxidases, polifenol oxidases, β -1,3-glucanases, quitinases e para a dosagem de proteína total.

O conteúdo total de proteína presente em cada extrato foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando a albumina bovina sérica como padrão.

Determinação da atividade de peroxidases:

Para a quantificação da atividade de peroxidases (PO), adotou-se o método espectrofotométrico de Hammerschmidt et al. (1982). O substrato enzimático constituiu-se de guaiacol 125 μ L, peróxido de hidrogênio 153 μ L e 50 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0. A mistura de reação ficou constituída por 1.019 μ L de substrato e 10 μ L do extrato vegetal diluído 1:20.

A reação desenvolveu-se a 30 °C e as leituras de absorbância (470 nm) foram determinadas aos 30 e 120 s após o início da reação, intervalos esses ajustados em ensaios preliminares. Os resultados foram expressos em unidades de peroxidase. Cada

unidade de peroxidase correspondeu à variação de 0,001 no valor da absorbância a 470 nm por min de reação por μg proteína total.

Determinação da atividade de polifenol oxidases: A atividade de polifenol oxidases (PPO) foi determinada em ensaio espectrofotométrico pelo aumento da absorbância à 420 nm, resultante da oxidação do catecol para quinona. A mistura de reação consistiu em 1 mL de pirocatequina 20 mM em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,8, e 10 μL do extrato vegetal diluído 1:10. A reação ocorreu a 30 °C e as leituras foram realizadas nos tempos de 30 e 150 s após o início da reação. Os resultados foram expressos unidades de polifenol oxidase. Cada unidade de polifenol oxidase correspondeu a variação de 0,001 no valor da absorbância a 420 nm por min de reação por μg de proteína total (Duangmal & Apenten, 1999).

Determinação da atividade de quitinases: A atividade de quitinases foi quantificada pelo método de Hackman & Goldberg (1964), pela quantificação espectrofotométrica do Remazol Violeta Brilhante liberado de Chitin Azure (SIGMA). A mistura de reação consistiu de 900 μL da solução do substrato (1 % (p/v) de Chitin Azure em tampão fosfato 50 mM pH 6,0) e 100 μL do extrato. Na mistura de reação controle o extrato foi substituído por tampão de extração, no mesmo volume. A reação desenvolveu-se por 48 h a 25 °C sob agitação seguindo-se a centrifugação 3.600 g e determinada a absorbância a 575 nm. Calculou-se a diferença entre o valor de absorbância de cada amostra e valor de absorbância do controle. Os resultados finais foram expressos em unidades de quitinase. Uma unidade de quitinase correspondeu à variação de 0,001 no valor de absorbância por dia de reação por μg de proteína total.

Determinação da atividade de β -1,3- glucanases: A atividade de β -1,3-glucanases foi quantificada espectrofotometricamente pela leitura do Remazol Azul Brilhante R liberado da laminarina azure de acordo com o ensaio enzimático sugerido pelo fabricante (Sigma, 2004). Uma alíquota de 1,43 μL do extrato foi adicionada a 128 μL do substrato constituído de laminarina azure na concentração de 3 % em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0. A reação desenvolveu-se a 37 °C por 15 min, quando foi interrompida pela adição de 857 μL de álcool etílico 95%. As amostras foram

centrifugadas por 20 min à 3.600 g e o sobrenadante submetido a leituras de absorvância a 595 nm. As unidades das enzimas foram calculadas pelas diferenças de absorvância entre a reação da amostra e reação controle em que o extrato vegetal foi substituído por tampão de extração. Uma unidade de β -1,3-glucanases correspondeu a variação de 0,001 unidade de absorvância por min por μ g de proteína.

RESULTADOS

Incidência da vassoura-de-bruxa: Em nenhum dos dois ensaios realizados foi obtida infecção das mudas inoculadas (dados não mostrados). Em função disso, as análises enzimáticas foram realizadas apenas com o material coletado nas mudas tratadas ou não com os antagonistas e não inoculadas com o patógeno.

Concentração de proteína solúvel total: As análises revelaram haver variação da concentração de proteína total nas folhas analisadas com o decorrer do tempo para os diferentes tratamentos (Fig.1 e 2). As plantas expostas ao isolado Ac26, aplicado isoladamente, apresentaram um padrão de expressão protéica semelhante ao apresentado pelo tratamento controle. Um padrão diferente foi apresentado pelas plantas tratadas com o isolado Ac79 e as plantas tratadas com ambos os isolados. Observou-se maior concentração de proteínas presentes nas folhas dos diferentes tratamentos aos 24 dias após a aplicação dos antagonistas em comparação aos demais tempos amostrados. Especialmente naquelas plantas expostas ao isolado Ac79 isoladamente. O padrão de expressão protéico observado nas plantas expostas aos dois antagonistas sugere uma possível combinação de efeitos observados em cada um individualmente (Fig. 1).

Atividade de peroxidases: Em linhas gerais a atividade relativa de peroxidases apresentou decréscimo no decorrer do tempo para todos os tratamentos. Porém, mudas tratadas com os antagonistas aplicados individualmente mantiveram a atividade em patamares mais elevados especialmente nos dois, quatro e 12 dias após o tratamento, especialmente aquelas tratadas com o isolado Ac26 (Fig. 3 e 4). Já as mudas tratadas com isolado Ac79 mostrou esse mesmo padrão porém aos 12 dias após o tratamento (Fig.4).

Atividade de polifenol oxidases: As análises não revelaram diferença estatisticamente significativa. Porém, em termos absolutos pode-se dizer que a atividade da PPO apresentou comportamento semelhante ao apresentado pela PO (Figuras 5 e 6).

Quitinases: Não foi observada diferença significativa entre os diferentes tratamentos nos diferentes tempos amostrados. Porém, pode-se observar que há um decréscimo na atividade relativa da quitinase no decorrer do tempo e que nos tratamentos onde os antagonistas foram aplicados individualmente, há em termos absolutos um aumento na atividade da enzima aos 4 dias (Ac 26) e aos 12 dias (Ac79) (Fig. 8).

β -1,3-glucanases: Não foi observada atividade dessa enzima em nenhum dos tratamentos e em nenhum dos 4 tempos amostrados (dados não mostrados).

DISCUSSÃO

O aumento na concentração de proteínas nos tecidos foliares, para tempos maiores de exposição das mudas aos antagonistas (Fig. 1, 2), são resultados esperados visto que foram coletadas em todos os tratamentos, nos diferentes tempos as folhas basais das mudas. Inicialmente, as folhas apresentavam-se tenras e maleáveis enquanto que em estágios posteriores de desenvolvimento, especialmente aos 24 dias estas apresentavam-se rígidas e coriáceas, evidenciando assim uma maior concentração de solutos em detrimento à quantidade de água presente nas folhas (Salisbury & Ross, 1991).

O decréscimo da atividade relativa da PO no decorrer do tempo pode ser também explicado em função do amadurecimento das folhas (Fig. 3 e 4). A PO está envolvida na formação da parede celular vegetal, especialmente a síntese de lignina.

A lignina é um polímero aromático composto por unidades de fenilpropano, gerados pela ação de diferentes enzimas. Após a polimerização, formam uma complexa rede interligada entre monolignóis, proteínas e polissacarídeos e a peroxidase está envolvida na reação final de polimerização (Pascholati & Leite, 1995; Smit & Dubery, 1997). Logo, durante a fase inicial de desenvolvimento das folhas, há uma contínua deposição de componentes da parede celular. Com a completa expansão foliar, a atividade da PO com funções plásticas diminui.

Peroxidases são também componentes da resposta inicial da defesa de plantas contra o ataque de patógenos (Tuzun, 2001). A localização extracelular de isoenzimas da peroxidase estimuladas durante o ataque de patógenos (Birecka et al., 1975), assim como a capacidade de algumas de suas isoenzimas de formar peróxido de hidrogênio (Ride, 1975; Peng & Kuc, 1992), sugerem que estas enzimas estão também envolvidas na formação de substâncias de barreira que limitam o progresso e o desenvolvimento do patógeno (Tuzun, 2001). Este envolvimento da peroxidase em respostas de defesa de plantas contra patógenos explica o aumento na atividade dessa enzima nas plantas expostas aos antagonistas (Fig. 3 e 4). E, a maior atividade observada para os menores períodos de tempo após a exposição das plantas aos antagonistas está de acordo com a afirmação de Tuzun (2001) de que peroxidases estão envolvidas nas respostas iniciais de defesa de plantas. Resende et al. (2000) já haviam demonstrado que a peroxidase estava envolvida na indução de resistência em cacauzeiros, porém mediada pela aplicação de um indutor abiótico. As enzimas peroxidase apresentam caráter polifuncional (Siegel 1993). Este autor sugere a participação das mesmas em vários mecanismos fisiológicos de defesa. O aumento observado na atividade dessas enzimas indica que elas podem estar atuando em processos de lignificação e reforço da parede celular, na produção de H_2O_2 a partir de NADH ou NADPH, o que pode gerar outras espécies ativas de oxigênio também com capacidade antimicrobiana (Peng & Kuc, 1992; Lamb & Dixon, 1997), ou ainda oxidando fenóis e formando compostos mais tóxicos (quinonas) ou mesmo inibindo diretamente o desenvolvimento de patógenos (Peng & Kuc, 1992). O real envolvimento dessas enzimas em cada um desses possíveis nichos de atuação é difícil de precisar. Porém, a exemplo do observado por Resende et al. (2000), pode-se afirmar que, de alguma forma as peroxidases estão envolvidas na indução de resistência em cacauzeiro.

As polifenol oxidases apresentaram um comportamento semelhante à PO, porém com as maiores atividades dessas enzimas nas primeiras horas ou dias após a exposição das plantas aos antagonistas e um decréscimo na atividade aos 24 dias após a exposição (Fig 5 e 6). As plantas tratadas com o isolado Ac26, em números absolutos, foram as que apresentaram os maiores níveis de atividade dessa enzima.

Polifenol oxidases também apresentam atividade na lignificação da parede celular assim como na oxidação de fenóis, gerando compostos de defesa durante invasões microbianas (Mayer, 1987; Sommer et al., 1994). De fato, Mohammadi & Kazemi (2002) demonstraram que variedades de trigo resistentes a *Fusarium*

graminearum, quando inoculadas com o patógeno, apresentam uma maior atividade dessa enzima em comparação à variedades suscetíveis.

A não observação de atividade de quitinases e β -1,3- glucanases era em parte esperada uma vez que essas enzimas sendo PR proteínas são ativadas pela rota da SAR (*systemic acquired resistance*) (van Loon & van Strien, 1999; Dixon et al., 1994), sendo esta rota induzida por patógenos ou indutores químicos (Sticher et al., 1997). Embora se observe em números absolutos uma alta na atividade de quitinases nas plantas tratadas com o isolado Ac26 aos quatro dias depois de expostas ao agente indutor e com o isolado Ac79 aos 12 dias após a exposição (Fig. 7 e 8), houve grande variação nos resultados obtidos não permitindo conclusões sobre o efeito dos antagonistas na expressão dessa enzima.

Não foi observado efeito sinérgico nos tratamentos onde os dois antagonistas foram aplicados em mistura. Adicionalmente observou-se, de maneira geral, uma diminuição na atividade das enzimas avaliadas (Fig 1 a 8). A ausência de aditividade podem estar relacionados com a incompatibilidade entre os isolados que pode ter levado a uma diminuição da persistência dos mesmos no filoplano das mudas. A baixa população individual de cada antagonista pode também ser uma explicação para o fato. A suspensão de cada antagonista tinha a densidade ótica ajustada para $A_{540} = 0,8$. Quando estes eram aplicados em associação, a concentração individual era reduzida pela metade uma vez que estes eram misturados na proporção 1:1. Uma das características da resistência induzida é a ausência do efeito de dose porém, há a necessidade de uma dosagem mínima do agente indutor para desencadear o início da reação (van Loon et al., 1998; Romeiro, 1999). Portanto, ao combinar os dois antagonistas estes podem ter sido aplicados em dosagem inferior à necessária para desencadear as respostas de defesa.

A não infecção das mudas de cacauero pelo patógeno (*Crinipellis perniciososa*) impossibilitou conclusões a respeito da real contribuição do aumento da atividade das enzimas oxidativas PO e PPO na proteção das mudas tratadas contra a doença. Os resultados inconsistentes na obtenção de infecção artificial por *C. perniciososa* de fato, é uma das dificuldades inerentes a esse patossistema (Purdy & Schmidt, 1996).

Serão necessários outros estudos visando determinar qual a real contribuição do aumento da atividade das enzimas oxidativas aqui estudadas na proteção contra a infecção por *C. perniciososa*, assim como à espécie de *Phytophthora*. Há ainda de se estudar se a resistência induzida observada apresenta caráter sistêmico ou local.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W. & Blackell, M. 1996. Introductory Mycology. New York, John Wiley & Sons Inc. 869p.
- Baracat-Pereira, M.C.; Oliveira, M.G.A.; Barros, E.G.; Moreira, M.A. & Santoro, M.M. 2001. Biochemical properties of soybean leaf lipoxygenases: Presence of soluble and membrane-bound forms. *Plant Physiology and Biochemistry* 39:91-98.
- Benhamou, N.; Joosten, M.H.A.J. & de Wit, P.J.G.M. 1990. Subcelular localization of chitinase and of its potential substrate in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Physiology* 92:1108-1120.
- Birecka, H.; Catalfamo, J.L. & Urban, P. 1975. Cell wall and protoplast isoperoxidases in tobacco plants in relation to mechanical injury and infection with tobacco mosaic virus. *Plant Physiology* 55:611-619.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Dixon, R.A.; Harrison, M.J. & Lamb, C., J. 1994. Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology* 32:479-501.
- Dodson, K.M.; Shaw, J.J. & Tuzun, S. 1993. Purification of a chitinase/lysozyme isozyme (CHL2) that is constitutively expressed in cabbage varieties resistant to black rot. *Phytopathology* 83:1335.
- Duangmal, K. & Apenten, R.K.O. 1999. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). *Food Chemistry* 64:351-359.
- Frias, G.A.; Purdy, L.H. & Schmidt, R.A. 1995. An inoculation method for evaluating resistance of cacao to *Crinipellis pernicioso*. *Plant Disease* 79:787-791.
- Gherna, R.L. 1994. Culture preservation. In: Gerhardt, P.; Murray, R.G.E.; Wood, W.A. & Krieg, N.R. (Ed.) *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington, American Society for Microbiology, 278-292.
- Hackman, R.H. & Goldberg, M. 1964. New substrates for use with chitinases. *Analytical Biochemistry* 8:397-401.
- Halfeld-Vieira, B.A. 2002. Procariotas residentes de filoplano como indutores de resistência à doenças em tomateiro. 1ª Reunião Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas Contra Fitopatógenos, São Pedro, SP 18-19.

- Hammerschmidt, R. 1999. Induced disease resistance: How do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:77-84.
- Hammerschmidt, R.; Nuckles, E.M. & Kuc', J. 1982. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiology Plant Pathology* 20:73-82.
- Jach, G.; Gornhardt, B.; Mundy, J.; Logemann, J.; Pinsdorf, E.; Leah, R.; Schell, J. & Maas, C. 1995. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant Journal* 8:97-109.
- Kolattukudy, P.E.; Mohan, R.; Bajar, M.A. & Sherf, B.A. 1992. Plant peroxidase gene expression and function. *Biochemical Society Transactions* 20:333-337.
- Kuc', J. 2001. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants its application. *European Journal of Plant Pathology* 107:7-12.
- Lamb, C. & Dixon, R.A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:251-275.
- Macagnan, D.; Romeiro, R.S.; Souza, J.T. & Pomella, A.W.V. 2005. Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their activity against the witches' broom and black pod pathogens. *Phytoparasitica* Submetido para publicação:
- Mayer, A.M. 1987. Polyphenol oxidase in plants—recent progress. *Phytochemistry* 26:11-20.
- Mohammadi, M. & Kazemi, H. 2002. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science* 162:491-498.
- Pascholati, S.F. & Leite, B. 1995. Hospedeiro: Mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H. & Amorim, L. (Ed.) *Manual de Fitopatologia: Vol.1. Principios e conceitos*. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 417-453.
- Peng, M. & Kuc, J. 1992. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82:696-698.
- Pramer, D. & Schmidt, E.L. 1964. *Experimental soil microbiology*. Minnesota, Burgess Publishing Company. 107p.
- Purdy, L.H. & Schmidt, R.A. 1996. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. *Annual Review of Phytopathology* 34:573-594.

- 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. 2000. Perspectivas na indução de resistência em cacauero contra *Crinipellis pernicioso* através do benzotiadiazole (BTH). *Fitopatologia Brasileira* 25:149 -156.
- Ride, J.P. 1975. Lignification in wounded wheat leaves in response to fungi and its possible role in resistance. *Physiological Plant Pathology* 5:125-134.
- Romeiro, R.S. 1999. Indução de resistência em plantas a patógenos. Viçosa, Imprensa Universitária. 45p.
- Rudgard, S.A. 1989. Detailed description of symptoms of witches' broom disease of cocoa caused by *Crinipellis pernicioso*. *Cocoa Growers Bulletin* 41:32pp.
- Salisbury, F. & Ross, C. 1991. *Plant Physiology*. Belmont, CA, Brooks Cole. 682p.
- Siegel, B.Z. 1993. Plant peroxidases-an organismic perspective. *Plant Growth Regulation* 12:303-312.
- Sigma. Suitability Assay for Laminarin Azure as a Substrate for Laminarinase. www.sigma.com (acessado em: 03/12/2004)
- Smit, F. & Dubery, I.A. 1997. Cell wall reinforcement in cotton hypocotyls in response to a *Verticillium dahliae* elicitor. *Phytochemistry* 44:811-815.
- Sommer, A.; Neéman, E.; Steffens, J.C.; Mayer, A.M. & Harel, E. 1994. Import, targeting and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant Physiology* 105:1301-1311.
- Sticher, L.; Mauch Mani, B. & Metraux, J.P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35:235-270.
- Sutic, D.D. & Sinclair, J.B. 1991. *Anatomy and Physiology of Diseased Plants*. Boston, CRC Press. 232p.
- Tuite, J. 1969. *Plant Pathological Methods*. Minneapolis, Burgess Pub. Company. 239p.
- Tuzun, S. 2001. The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology* 107:85-93.
- van Loon, L.C. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103:753-765.
- van Loon, L.C.; Bakker, P.A.H.M. & Pieterse, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36:453-483.

- van Loon, L.C.; Pierpoint, W.S.; Boller, T. & Conejero, V. 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* 12:245-264.
- van Loon, L.C. & van Strien, E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analyses of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:85-97.
- Vidhyasekaran, P. 1997. *Fungal pathogenesis in plant and crops*. New York, Marcel Decker. 553p.

FIGURAS

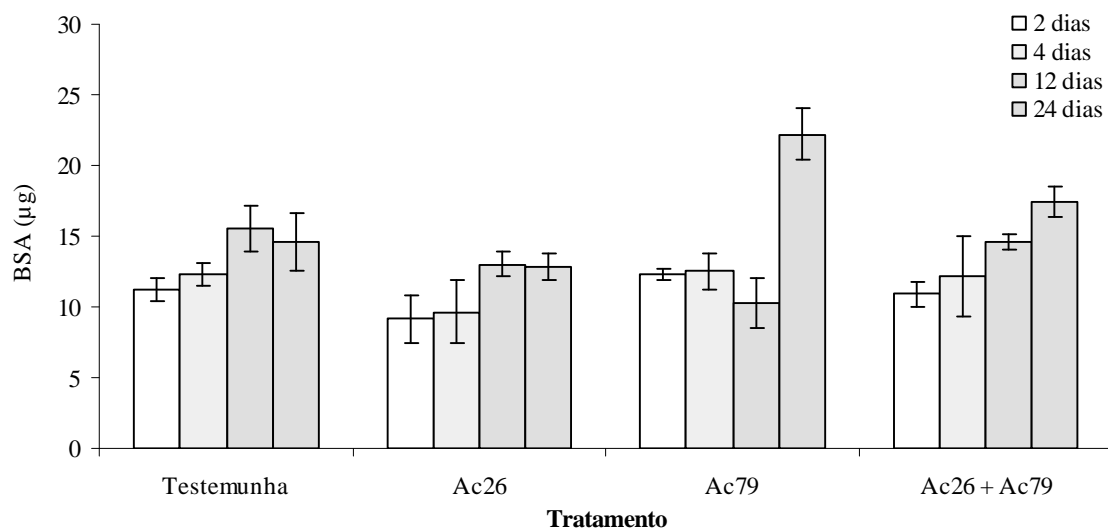


Figura 1: Proteína total presente em folhas de mudas de cacauero expostas ou não a dois actinomicetos aplicados isoladamente (Ac26 e Ac79) e em associação (Ac26+Ac79) nos tempos de 2, 4, 12 e 24 dias após a aplicação dos mesmos. As barras representam o erro padrão da média

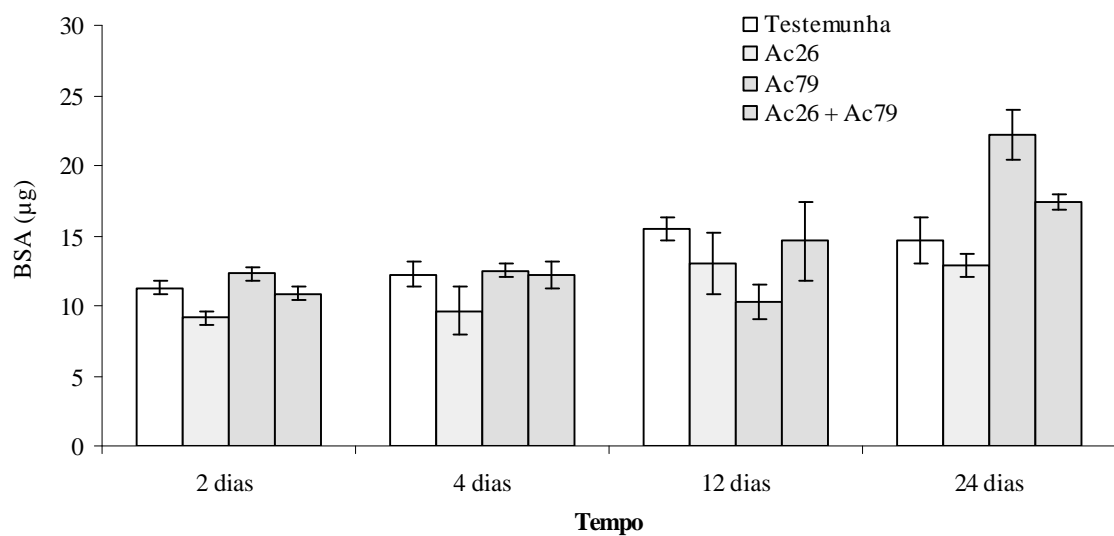


Figura 2: Proteína total presente em folhas de mudas de cacauero expostas ou não a dois actinomicetos aplicados isoladamente (Ac26 e Ac79) e em associação (Ac26+Ac79) nos tempos de 2, 4, 12 e 24 dias após a aplicação dos mesmos. As barras representam o erro padrão da média.

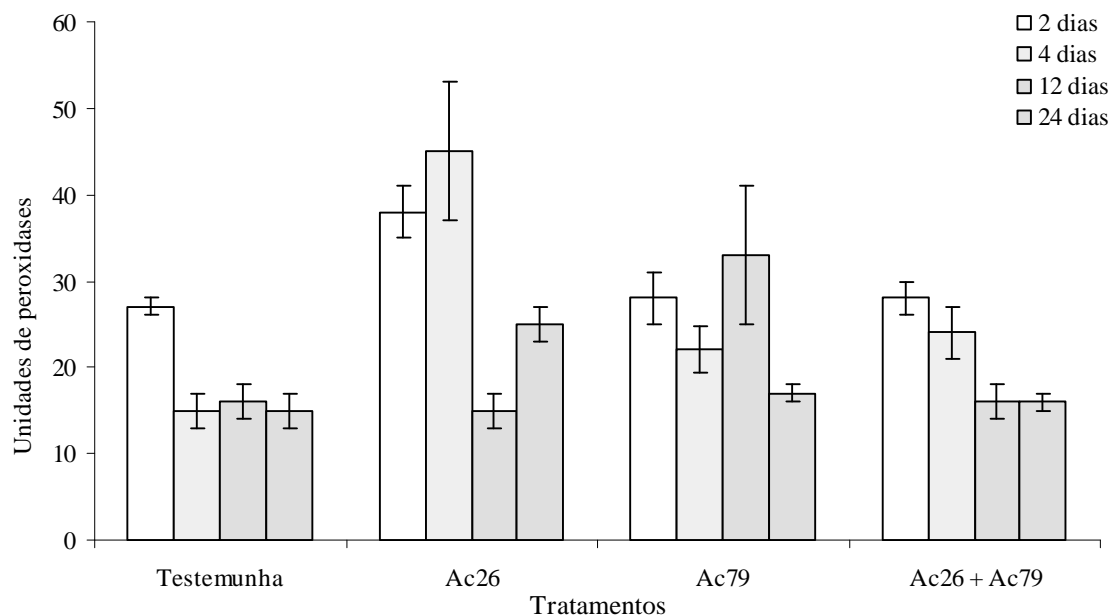


Figura 3: Atividade de peroxidases em folhas de mudas de cacauero expostas ou não a dois actinomicetos aplicados isoladamente e em associação nos tempos de 2, 4, 12 e 24 dias após a aplicação dos mesmos. As barras representam o erro padrão da média.

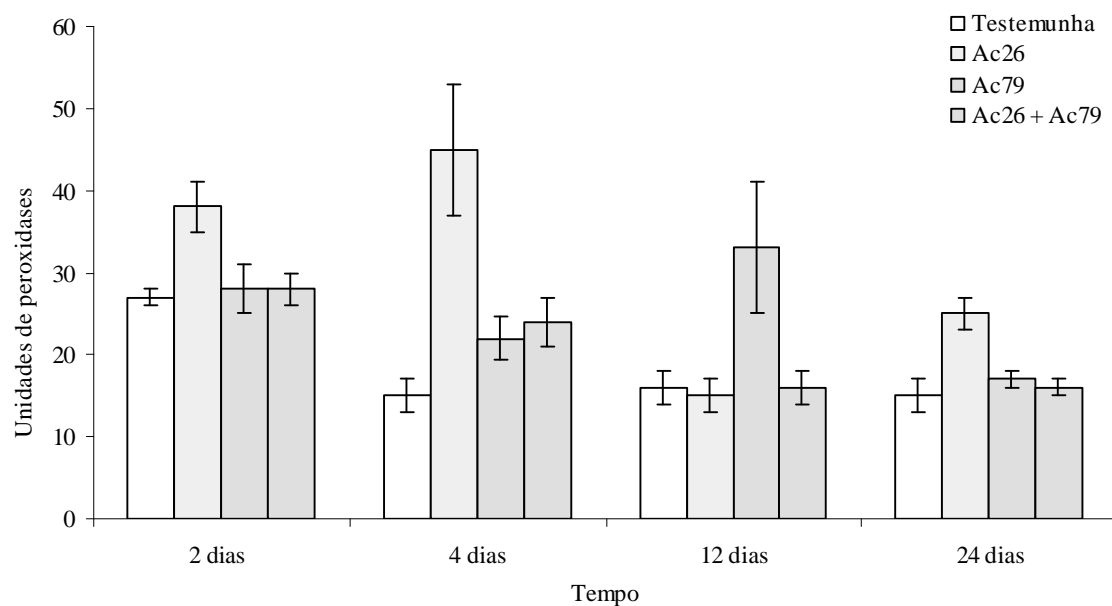


Figura 4: Atividade de peroxidases em folhas de mudas de cacauero expostas ou não a dois actinomicetos aplicados isoladamente (Ac26 e Ac79) e em associação (Ac26+Ac79) nos tempos de 2, 4, 12 e 24 dias após a aplicação dos mesmos. As barras representam o erro padrão da média.

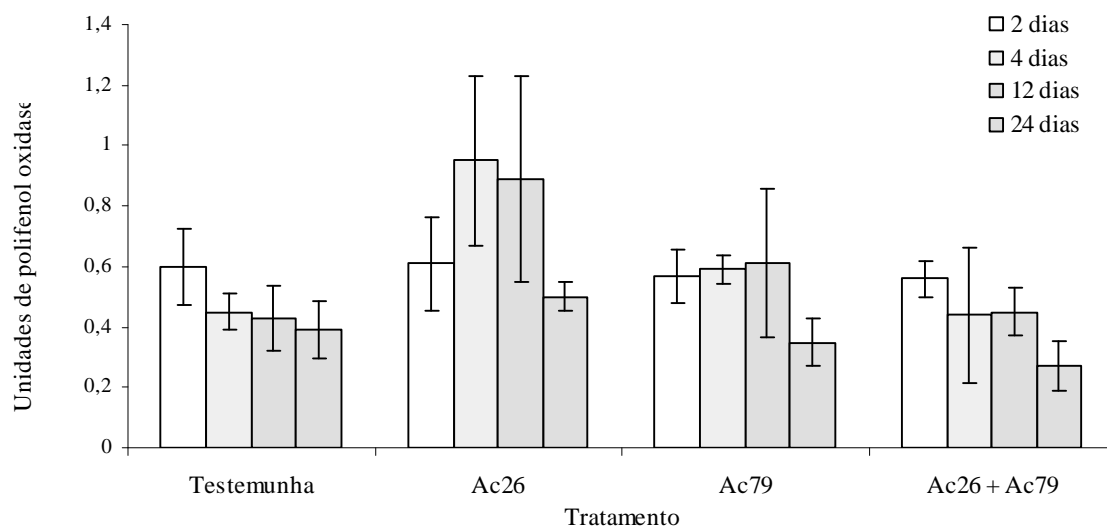


Figura 5: Atividade de polifenol oxidases em folhas de mudas de cacauero expostas ou não a dois actinomicetos aplicados isoladamente (Ac26 e Ac79) e em associação (Ac26+Ac79) nos tempos de 2, 4, 12 e 24 dias após a aplicação dos mesmos. As barras representam o erro padrão da média

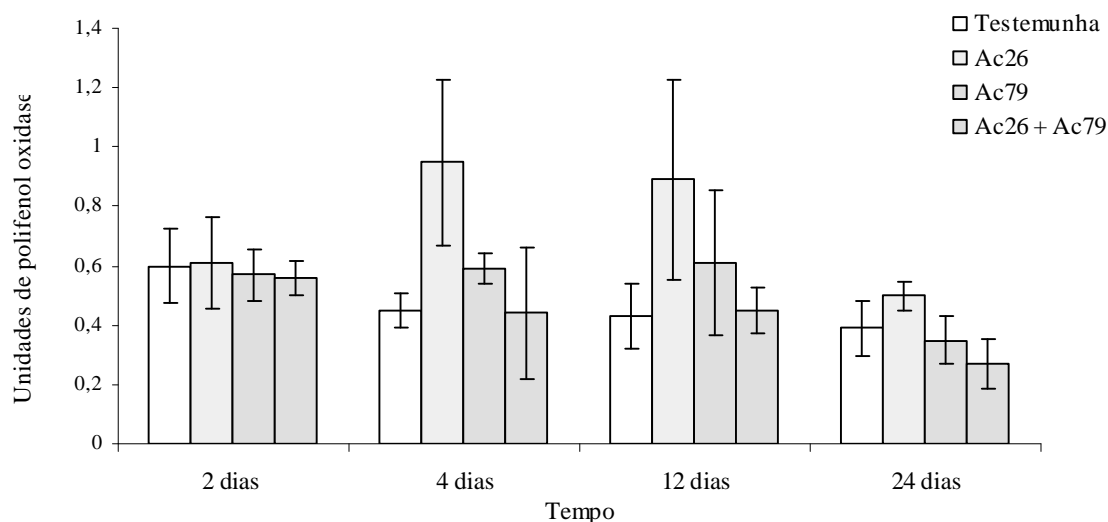


Figura 6: Atividade de polifenol oxidases em folhas de mudas de cacauero expostas ou não a dois actinomicetos aplicados isoladamente (Ac26 e Ac79) e em associação (Ac26+Ac79) nos tempos de 2, 4, 12 e 24 dias após a aplicação dos mesmos. As barras representam o erro padrão da média.

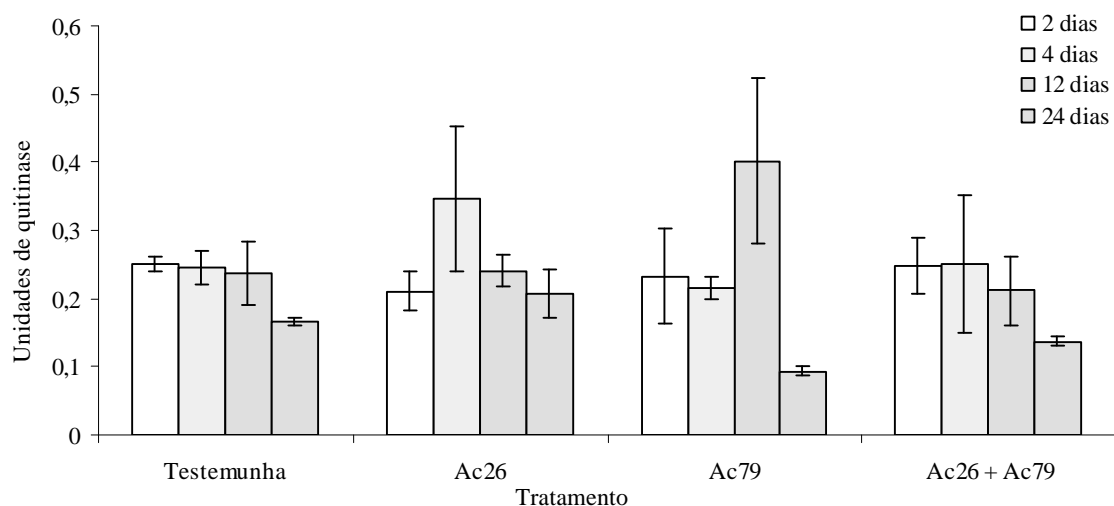


Figura 7: Atividade de quitinases em folhas de mudas de cacauero expostas ou não a dois actinomicetos aplicados isoladamente (Ac26 e Ac79) e em associação (Ac26+Ac79) nos tempos de 2, 4, 12 e 24 dias após a aplicação dos mesmos. As barras representam o erro padrão da média.

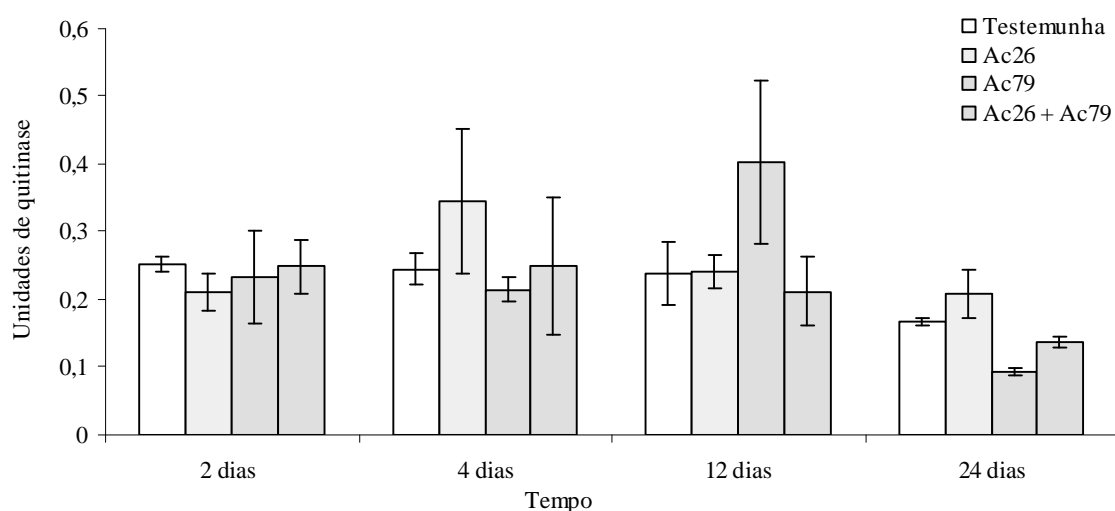


Figura 8: Atividade de quitinases em folhas de mudas de cacauero expostas ou não a dois actinomicetos aplicados isoladamente (Ac26 e Ac79) e em associação (Ac26+Ac79) nos tempos de 2, 4, 12 e 24 dias após a aplicação dos mesmos. As barras representam o erro padrão da média.

ARTIGO IV: Proteção de frutos de cacauero contra a podridão-parda por combinações de células vivas e sobrenadantes provenientes do cultivo de dois actinomicetos em dois diferentes meios de cultura.

Dirceu Macagnan¹; Reginaldo da Silva Romeiro¹; Alan Willian Vilela Pomella²

¹Universidade Federal de Viçosa - Departamento de Fitopatologia, 36571-000 Viçosa-MG. ²Almirante Cacau, Cx.P. 55 CEP 45630-000 Barro Preto-BA

RESUMO

Dois antagonistas selecionados para o biocontrole da vassoura-de-bruxa e da podridão-parda do cacauero foram multiplicados em dois diferentes meios de cultura líquidos. Células vegetativas dos dois antagonistas foram recolhidas e aplicadas em frutos de cacauero apenas suspensas em solução salina e, ou veiculadas em caldo de carne e óleo mineral emulsionável. Os antagonistas foram aplicados individualmente e, ou combinando-se as suspensões de ambos na proporção 1:1. Os sobrenadantes provenientes do cultivo dos dois antagonistas nos dois diferentes meios também foram aplicados da mesma forma. Onze dias depois da aplicação dos tratamentos, os frutos foram inoculados com um isolado de *Phytophthora palmivora*. Os resultados foram avaliados, por uma escala de notas, seis dias após a inoculação do patógeno em cada um dos quinze frutos tratados. Células do isolado Ac26 veiculadas em caldo de carne + óleo mineral apresentaram os melhores resultados. A combinação de isolados não apresentou resultados promissores porém, frutos expostos à mistura dos sobrenadantes dos dois isolados provenientes do cultivo em meio TSA_m exibiram diminuição da severidade da doença.

INTRODUÇÃO

As tentativas de biocontrole de doenças de plantas tem sido, principalmente, realizadas através do uso de apenas um agente de controle biológico contra um único patógeno que incide sobre uma determinada cultura (Raupach & Kloepper, 1998). Um agente de biocontrole dificilmente permanece ativo sob todas as variações do ambiente em que é aplicado e também não é efetivo no controle de todos os patógenos que incidem sobre a cultura que se pretende proteger (Weller, 1988). Em função da inexistência de um agente de controle biológico capaz de agir eficientemente sobre todos os patógenos de uma cultura, sob diferentes condições de ambiente, a eficiência desses agentes, em muitos casos, pode mostrar-se inconsistente. Visando a solução, ao menos em parte, deste problema Janisiewicz (1988) propõe que uma das possibilidades é o desenvolvimento de associações de microrganismos.

Diferentes estratégias de combinação de antagonistas podem ser imaginadas. A mistura de microrganismos que colonizarão diferentes partes da planta, microrganismos que controlarão diferentes patógenos ou controlando o mesmo patógeno por diferentes mecanismos de supressão, microrganismos com diferentes faixas ótimas de temperatura, pH, ou condições de umidade, são algumas das possibilidades (Raupach & Kloepper, 1998). O uso de uma gama de antagonistas em associação assemelha-se à ocorrência natural de biocontrole, onde ele acontece em função da pluralidade de organismos autóctones, e não em função da alta população de um único antagonista. Como exemplo da associação natural de antagonistas cita-se a supressividade que alguns solos apresentam contra doenças (Lemanceau & Alabouvette, 1991; Schippers, 1992; Lemanceau et al., 2000).

Há relatos de que a mistura de antagonistas resultou num aumento no biocontrole da doença alvo como exemplo citam-se os trabalhos de Guetsky et al. (2001) e Guetsky et al. (2002) no patossistema *Botrytis cinerea* – morango. Há também relatos que misturas de agentes de biocontrole não resultaram no aumento da supressão à doença comparados com o uso de cada antagonista separadamente (Hubbard et al., 1983; Sneh et al., 1984; Miller & May, 1991; Dandurand & Knudsen, 1993).

A compatibilidade entre os agentes co-combinados é um importante pré requisito para o sucesso no desenvolvimento de associações de agentes de biocontrole (Baker, 1990; de Boer et al., 1999). A incompatibilidade entre os organismos combinados pode

acontecer em função de diferentes fatores como a competição por nichos e habitats e a antibiose direta entre os isolados (Leeman et al., 1996).

Há dificuldades de desenvolvimento de metodologias que, visem determinar a possível compatibilidade entre agentes de controle biológico na superfície da planta hospedeira. Esta dificuldade é resultante da impossibilidade de reproduzir em condições controladas os fatores que interferem no crescimento e nas interações entre microrganismos, tais como a quantidade e qualidade de nutrientes, temperatura, pH, radiação, concentração de gases e umidade presentes na superfície vegetal.

No entanto, Fukui et al. (1999) desenvolveram um bioensaio com o qual foi possível determinar, com alguma precisão, a compatibilidade entre agentes de biocontrole e a atividade contra o patógeno a ser controlado. de Boer et al. (1999) obtiveram, também, boa correlação de ensaios de biocontrole com testes *in vitro* onde rizobactérias selecionadas para o biocontrole do patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani* tiveram sua compatibilidade tentativamente testada.

Com este ensaio intencionou-se estudar, em condições de campo, a possibilidade de associação entre dois agentes de controle biológico, visando o biocontrole da podridão-parda do cacauzeiro. O isolado Ac79 selecionado como promissor no biocontrole da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*), e o isolado Ac26, que apresentou resultados promissores em ensaios de biocontrole da podridão-parda quando ocasionada por *Phytophthora palmivora*.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos e seu cultivo: Foram usados dois antagonistas, Ac26 e Ac79, previamente selecionados como agentes de controle biológico contra doenças do cacauzeiro por Macagnan et al. (2005). Ambos os antagonistas foram identificados como pertencentes ao gênero *Streptomyces* através do sequenciamento do rDNA 16 S. Os isolados foram mantidos em meio extrato de solo ágar (Pramer & Schmidt, 1964). Para a multiplicação, esporos foram coletados e adicionados ao meio BD (decoção de 200 g de batata e 20 g de glicose e água destilada q.s.p. 1 L) (Tuite, 1969) ou TSA modificado (TSA_m) (peptona 12,5 g, NaCl 5 g e água destilada q.s.p. 1 L). Os isolados foram cultivados sob agitação a 25 °C por 48 h. Para aplicação, as células foram recolhidas por centrifugação (10.000 g por 15 min) e resuspendidas em solução salina 0,85 % e

acrescidas ou não com óleo mineral Oppa[®] 2 % (Petrobrás, Macaé, RJ) e caldo de carne Knorr[®] 2 % (Knorr, Pouso Alegre, MG). As suspensões de antagonistas veiculados ou não com óleo mineral e caldo carne tiveram uma DO₅₄₀ final =0,8. O sobrenadante proveniente do cultivo dos isolados não foi submetido a diluição ao ajuste de concentração. Para a obtenção das combinações, suspensões ou sobrenadantes, depois de preparados, foram misturados na proporção 1:1. Cada isolado, portanto, foi aplicado, isoladamente, de 6 maneiras diferentes: células formuladas ou não produzidas em dois meios diferentes e o sobrenadante proveniente do cultivo nos dois diferentes meios. Foram também aplicadas em 6 diferentes combinações os dois isolados provenientes dos dois meios diferentes acrescidos da formulação ou não e os sobrenadantes provenientes dos dois diferentes meios. Como controle utilizaram-se solução salina e solução salina acrescida de Oppa 2 % e caldo de carne 2 %. Ao total foram, portanto, aplicados 20 tratamentos. Neste ensaio não foram aplicados como controle os dois diferentes meios de cultura pois em ensaios prévios não foi observado efeito desses tratamento sobre a doença.

Para a produção de inóculo de *Phytophthora palmivora* o isolado ALF 625, pertencente a coleção da Almirante Cacau, foi cultivado em meio composto pela decocção de 25 g de cenoura, acrescido de extrato de tomate 45 g, CaCO₃ 3 g, ágar 15 g e água destilada q.s.p. 1 L. Para a produção de zoósporos, o patógeno foi cultivado por 7 dias no escuro e por 3 dias sob luz fluorescente (40 W). A cada placa foram adicionados 10 mL de água gelada seguindo-se transferência para temperatura de 4 °C por 15 min, retiradas do refrigerador permaneceram por mais 20 min em temperatura ambiente. Os zoósporos foram coletados e a concentração ajustada para 10⁵ zoósporo.mL⁻¹ (Lawrence, 1978).

Ensaio de compatibilidade entre isolados: A possível compatibilidade entre os dois isolados foi estudada usando a técnica de de Boer et al. (1999). Para tanto os dois antagonistas foram semeados, por ponto em oito placas de Petri de 90 mm contendo meio BDA (Tuite, 1969), TSA modificado ou ainda extrato de solo ágar (Pramer & Schmidt, 1964) e incubadas por 4 dias. Esporos dos dois antagonistas foram suspensos em solução salina acrescida de Tween 80 (0,05 mL.l⁻¹) até uma DO₅₄₀= 0,4. As suspensões de propágulos de cada antagonista foram aplicados por pulverização, com o uso de atomizador de Vilbs acoplado a uma fonte de pressão, na superfície de

quatro placas contendo cada tipo de meio. Estas foram novamente incubadas por mais 4 dias quando foram avaliadas quanto à presença e tamanho de halos de inibição de crescimento formados, caso existissem.

Material vegetal e aplicação dos tratamentos: Cada tratamento foi aplicado a quinze frutos completamente expandidos do genótipo ICS 1. A aplicação foi feita por atomização com o auxílio de pulverizador manual até antes do início do ponto de escorrimento, com os diferentes tratamentos. Após a pulverização, os frutos foram submetidos à câmara úmida por 24 h. O patógeno foi inoculado 11 dias depois da aplicação dos antagonistas, também com o auxílio de atomizador manual até antes do ponto de escorrimento e os frutos mantidos em câmara úmida por 24 h.

Quantificação de efetividade: Transcorridos 6 dias da inoculação do patógeno os frutos foram avaliados quanto à severidade da doença usando-se para tanto uma escala de notas proposta por Hanada et al. (2004) onde nota 1= sem sintomas, 2= lesões até 2 mm, 3= lesões até 2 cm, 4=frutos com 25 % da superfície lesionada, 5=frutos com mais de 25 % de superfície lesionada. Considerou-se como eficientes os tratamentos que, na média geral, apresentassem notas igual ou inferior a 2,5. uma vez que essa situação ainda possibilita o amadurecimento dos frutos e não interfere na qualidade das amêndoas (Alan W.V. Pomella, dados não publicados).

RESULTADOS

No teste de compatibilidade realizado, o isolado Ac79 revelou-se produtor de substâncias capazes de inibir o crescimento do isolado Ac26 (Fig. 1). Porém o isolado Ac26 não inibiu o crescimento do isolado Ac79. Os diferentes meios de cultura usados para realizar o teste de compatibilidade interferiram quantitativamente na inibição do isolado Ac26 pelo isolado Ac79 (Fig. 2).

De maneira geral, a severidade da podridão-parda dos frutos no campo foi baixa (Fig. 3). Porém, observa-se que nos frutos tratados com células do isolado Ac26 veiculadas em caldo de carne + óleo mineral emulsionável, as médias das notas bem como as barras de erro sempre mantiveram-se abaixo de 2,5. A combinação de

propágulos dos antagonistas não resultou em efeito aditivo na proteção de frutos de cacauero. Porém quando o sobrenadante proveniente do cultivo em meio TSA_m dos dois isolados foram combinados, foi obtido o melhor resultado do ensaio em termos absolutos.

DISCUSSÃO

O teste de compatibilidade entre os isolados realizado *in vitro* indicou a impossibilidade biológica de combinar os dois isolados em uma putativa formulação. Halos de inibição de maior diâmetro em placas contendo meio TSA_m seguida de BDA e por último extrato de solo (Fig. 2), possivelmente está ligada ao menor tempo de geração permitida pelos dois primeiros meios em relação ao último (dados não mostrados). Assim acredita-se que as culturas com crescimento mais ativo, em um mesmo período de tempo, produziram e acumularam substâncias antimicrobianas em maior quantidade.

A incompatibilidade observada *in vitro* também foi observada *in vivo*, uma vez que a proteção dos frutos diminuiu quando propágulos dos dois antagonistas eram combinados, em comparação a aplicação do isolado Ac26 veiculado com caldo de carne e óleo mineral (Fig. 3). Possivelmente a causa da incompatibilidade entre os dois antagonistas na superfície de frutos de cacauero seja a produção de substâncias antimicrobianas pelo isolado Ac79 e a susceptibilidade do isolado Ac26 a essa substância conforme observado *in vitro* (Fig. 1 e 2). De fato, Baker (1990) e de Boer et al. (1999) ressaltam que a compatibilidade entre os agentes co-inoculados é pré requisito para o sucesso de associações, entre agentes de biocontrole. A incompatibilidade entre antagonistas combinados provavelmente ocorre devido à inibição entre os antagonistas ao invés de fazê-lo ao patógeno alvo (Leeman et al., 1996).

Os ensaios de campo revelaram uma maior efetividade do isolado Ac26 especialmente quando os propágulos do antagonista foram veiculados em caldo de carne + óleo mineral emulsionável. Esta informação reforça observações anteriores a respeito desse isolado e dessa formulação (Capítulo 1). Embora admita-se que esta formulação não é suficiente para suportar a atividade antagônica do isolado em níveis satisfatórios em condições de campo, deve-se lembrar que a inoculação do patógeno foi feita 11 dias após a aplicação dos antagonistas e, mesmo assim observou-se uma boa proteção dos frutos. É importante lembrar que os antagonistas após o seu cultivo foram centrifugados

e seus propágulos aplicados separadamente de seu sobrenadante. Assim o efeito na proteção dos frutos observado naqueles tratamentos em que aplicaram-se propágulos do antagonista deve-se à capacidade do microrganismo em estabelecer-se na superfície dos frutos e acionar os possíveis mecanismos de biocontrole.

É antevista a impossibilidade de usar os propágulos dos dois antagonistas em mistura mas, há a possibilidade de se combinarem os sobrenadantes provenientes do cultivo dos dois antagonistas. A aplicação do sobrenadante proveniente do cultivo dos dois antagonistas no meio TSAm reduziu em quase 50 % a severidade da podridão-parda observada nos tratamentos controle. A não redução da severidade da doença nos mesmos níveis pelos sobrenadantes provenientes de meio BD é atribuída ao menor crescimento microbiano suportado por esse meio, sendo dessa forma, menor a síntese e o acúmulo de substâncias antimicrobianas produzidas pelos isolados. É importante salientar que o intervalo entre a aplicação dos sobrenadantes e a inoculação do patógeno foi de 11 dias. Os sobrenadantes foram aplicados sem a adição de adjuvantes visando permitir maior adesão ou diminuir a degradação do produto por diferentes fatores e mesmo assim observou-se controle.

O efeito protetor do sobrenadante proveniente do cultivo dos isolados em meio líquido ratifica as observações feitas por Macagnan et al. (2005) (Capítulo 1) com relação ao efeito do sobrenadante desses isolados contra *C. perniciosa*. Estão presentes no sobrenadante diferentes substâncias produzidas e exportadas pelos microrganismos em função de seu metabolismo. Algumas dessas substâncias podem apresentar atividade antimicrobiana (Caldwell, 2000). Actinomicetos são reconhecidamente importantes produtores de substâncias antimicrobianas. Esse grupo de microrganismos é a fonte primária de inúmeras substâncias usadas na medicina humana e animal (Madigan et al., 2000). Actinomicetos são também produtores de antibióticos para o controle de fitomoléstias incitadas principalmente por bactérias à exemplo do Sulfato de streptomina obtido a partir de *Streptomyces griseus* a casugamicina obtida a partir de *Streptomyces kasugaensis* e a oxitetraciclina obtida de *Streptomyces rimosus* (Malavolta-Júnior & Beriam, 2005).

Não foi observada proteção de frutos pelo isolado Ac79 exceção feita ao tratamento onde o seu sobrenadante proveniente do meio TSAm foi combinado com o sobrenadante do isolado Ac26 (Fig.3). Este resultado já era esperado uma vez que em ensaios anteriores este isolado não apresentou atividade contra *Phytophthora* e sim somente contra *Crinipellis perniciosa* (Macagnan et al., 2005).

Observado efeito positivo na proteção de frutos pelo isolado Ac26 é importante como próximo passo a definição da melhor estratégia do uso desses antagonistas. Pode-se envidar esforços no desenvolvimento de uma formulação adequada a esse microrganismo de modo a aumentar a sua persistência assim como manter ativos seus mecanismos de biocontrole na superfície da planta. Há, também, de ser melhor investigada a possibilidade do uso das substâncias antimicrobianas produzidas por esses dois microrganismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baker, R. 1990. An overview of current and future strategies and models for biological control . In: Hornby, D. (Ed.) Biological Control of Soilborne Plant Pathogens. Wallingford, United Kingdom, CAB International, 375-388.
- Caldwell, D.R. 2000. Microbial physiology and metabolism. Belmont, CA, Star publishing company. 403p.
- Dandurand, L.M. & Knudsen, G.R. 1993. Influence of *Pseudomonas fluorescens* on hiphal growth and bicontrol activity of *Trichoderma harzianum* in the espermosphere and rhizosphere of pea. Phytopathology 83:265-270.
- de Boer, M.; van der Sluis, I.; van Loon, L.C. & Bakker, P.A.H.M. 1999. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of fusarium wilt of radish. Europeam Journal of Plant Pathology 105:201-210.
- Fukui, R.; Fukui, H. & Alvarez, A.M. 1999. Comparisons of single versus multiple bacterial species on biological control of anthurium blight. Phytopathology 89:366-373.
- Guetsky, R.; Shtienberg, D.; Elad, Y. & Dinoor, A. 2001. Combining Biocontrol agentes to reduce the variability of biological control. Phytopathology 91:621-627.
- Guetsky, R.; Shtienberg, D.; Elad, Y.; Fischer, E. & Dinoor, A. 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. Phytopathology 92:976-985.
- Hanada, R.E.; Pomella, A.W.V.; Salazar, H. & Pereira, J.O. 2004. Seleção de fungos endofíticos visando o controle biológico de *Phytophthora* sp. agente causal da podridão-parda dos frutos de cacau. Fitopatologia Brasileira 29:S134.
- Hubbard, J.P.; Harman, G.E. & Hadar, Y. 1983. Effect of soilborne *Pseudomonas* spp. on the biological control agent. Phytopathology 73:655-659.
- Janisiewicz, W.J. 1988. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. Phytopathology 78:194-198.
- Lawrence, J.S. 1978. Evaluation of methods for assessing resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivars and hybrids to *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler. Boletim Técnico CEPEC/CEPLAC Itabuna-Bahia N°62:47.
- Leeman, M.; den Ouden, F.M.; van Pelt, J.A.; Cornellissen, C.; Matamala-Garros, A.; Bakker, P.A.H.M. & Schippers, B. 1996. Supression of fusarium wilt of radish by

- co-inoculation of fluorescent *Pseudomonas* spp. and rot-colonizing fungi. European Journal of Plant Pathology 102:21-31.
- Lemanceau, P. & Alabouvette, C. 1991. Biological control of fusarium diseases by fluorescent *Pseudomonas* and nonpathogenic *Fusarium*. Crop Protection 10:279-286.
- Lemanceau, P.; Steiberg, C.; Thomas, D.J.I.; Edel, V.; Raaijmakers, J.M. & Alabouvette, C. 2000. Natural soil suppressiveness to soilborne diseases. 5th International Workshop on PGPR, Córdoba, Argentina <http://www.ag.auburn.edu/argentina>.
- Macagnan, D.; Romeiro, R.S.; Souza, J.T. & Pomella, A.W.V. 2005. Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their activity against the witches' broom and black pod pathogens. Phytoparasitica (Submetido para publicação)
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M. & Parker, J. 2000. Brock: Biology of Microorganisms. Upper Saddle River, NJ, Prentice Hall. 991p.
- Malavolta-Júnior, V.A. & Beriam, L.O.S. 2005. Histórico da utilização de antibióticos no controle de fitopatógenos. Summa Phytopathologica 31:125-128.
- Miller, R.H. & May, S. 1991. Legume inoculation: Successes and failures. In: Keister, D.L. & Cregan, P.B. (Ed.) The rhizosphere and plant growth. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 123-134.
- Pramer, D. & Schmidt, E.L. 1964. Experimental soil microbiology. Minnesota, Burgess Publishing Company. 107p.
- Raupach, G.S. & Kloepper, J.W. 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. Phytopathology 88:1158-1164.
- Schippers, B. 1992. Prospects for management of natural suppressiveness to control soilborne pathogens. In: Tjamos, E.C.; Papavizas, G.C. & Cook, J. (Ed.) Biological control of plant diseases, progress and challenges for the future. New York, Plenum Press, 21-34.
- Sneh, B.; Dupler, M.; Elad, Y. & Baker, R. 1984. Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from a Fusarium-suppressive soil. Phytopathology 74:1115-1124.
- Tuite, J. 1969. Plant Pathological Methods. Minneapolis, Burgess Pub. Company. 239p.

Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review Phytopathology* 26:379-407.

FIGURAS

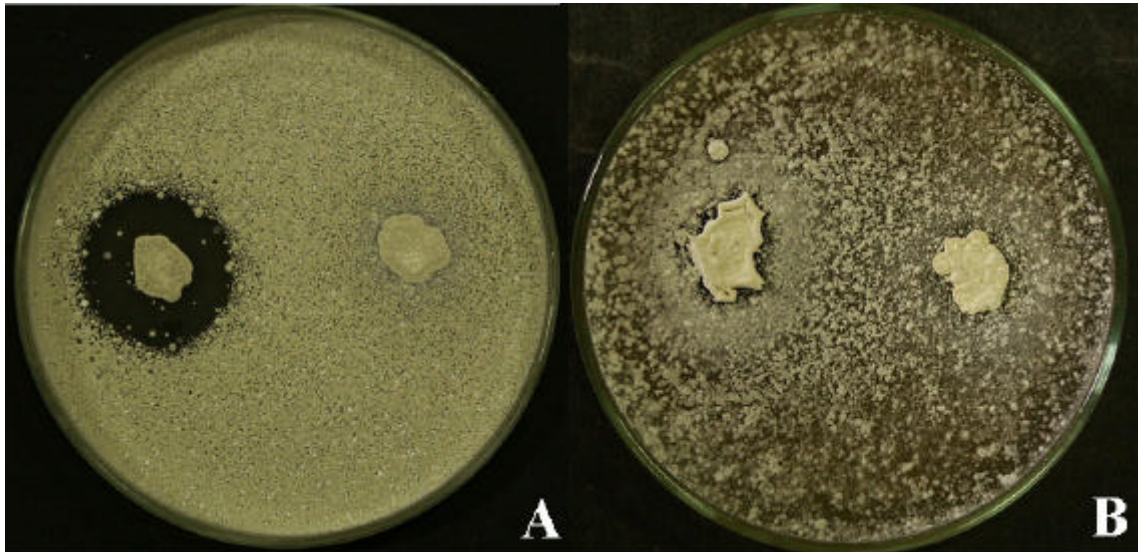


Figura 1: Teste de compatibilidade entre dois antagonistas pertencentes ao gênero *Streptomyces* selecionados como agentes de biocontrole de doenças do cacauero. Os dois antagonistas foram semeados, por ponto, em placas contendo meio BDA que foram incubadas por 4 dias quando as placas foram atomizadas com suspensões de propágulos ou outro antagonista: Ac 26 em A e Ac79 em B. Em A observa-se um nítido halo de inibição ao crescimento do Isolado Ac26 por substâncias produzidas pelo isolado Ac79.

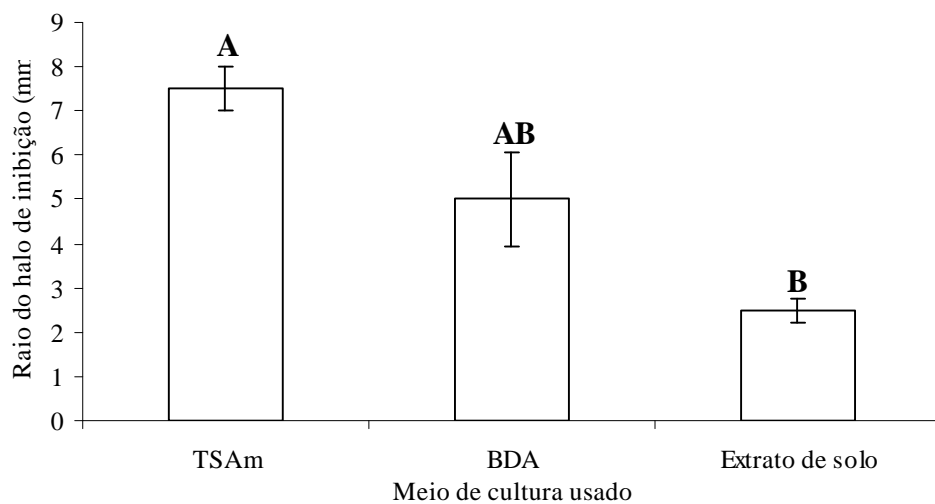


Figura 2: Resultado de teste de compatibilidade entre dois antagonistas selecionados como agentes de biocontrole a doenças do cacauero. As barras representam o tamanho do halo de inibição ao crescimento do isolado Ac26 pelo isolado Ac79 observado em teste in vitro usando a técnica de de Boer et al (1999). Colunas encimadas pelas mesmas letras não deferiram entre si pelo teste de Tukey 1 %. As barras representam o erro padrão da média.

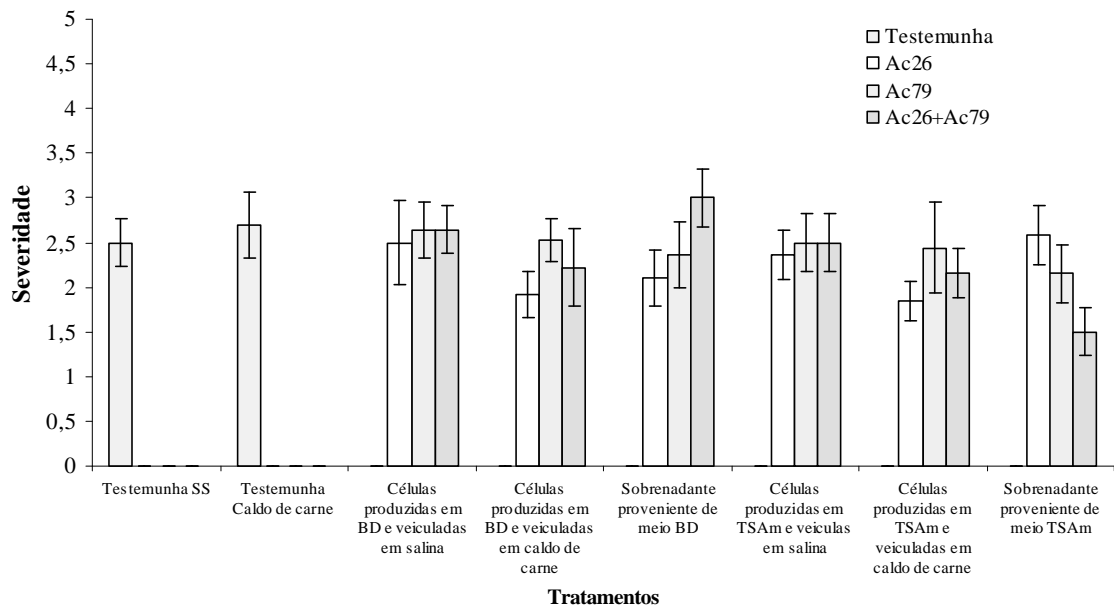


Figura 3: Severidade da podridão-parda (*Phytophthora palmivora*) em frutos de cacauero, genótipo ICS1, tratados com propágulos de dois antagonistas cultivados em dois diferentes meios de cultura e cujas células foram resuspendidas em solução salina e aplicadas em solução salina ou acrescidas com caldo de carne e óleo mineral emulsionável. Os propágulos dos antagonistas assim como os sobrenadantes provenientes do cultivo dos mesmos foram também combinados na proporção 1:1 e aplicados a frutos de cacauero. As barras representam o erro padrão da média calculado a partir das notas atribuídas a cada fruto dentro de cada tratamento.

ARTIGO V: Dispensa de dois antagonistas em condições de campo visando o controle biológico da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) e da podridão-parda (*Phytophthora* ssp.)

Dirceu Macagnan¹, Reginaldo da Silva Romeiro¹ & Alan Willian Vilela Pomella²

¹*Universidade Federal de Viçosa - Departamento de Fitopatologia, 36571-000 Viçosa-MG.* ²*Almirante Cacau, Cx.P. 55 CEP 45630-000 Barro Preto-BA*

RESUMO

Visando comprovar a real efetividade de dois actinomicetos selecionados para o controle biológico de doenças do cacau em proteger frutos sob condições naturais de incidência de enfermidades, foi conduzido um experimento em condições de campo. Os antagonistas foram multiplicados em meio líquido e veiculados em caldo de carne e acrescidos com óleo mineral emulsionável, ambos na concentração final de 2 %. Os antagonistas foram aplicados quinzenalmente, tanto individualmente quanto em mistura na proporção 1:1. Como controles, plantas foram tratadas bimestralmente com óxido cuproso e também avaliaram-se plantas que não receberam tratamento algum. Cada tratamento foi aplicado em 150 plantas de cacau “comum” através de atomizador costal motorizado num volume de calda de aproximadamente 300 mL por planta, sendo as pulverizações direcionadas aos frutos. Foram realizadas duas colheitas quando avaliaram-se a porcentagem dos frutos sadios, aqueles apresentando sintomas de podridão-parda ou vassoura-de-bruxa. Não foi observado efeito dos tratamentos para as três variáveis mensuradas nas duas colheitas realizadas. A ausência de efeito dos tratamentos é atribuída ao tardio início das aplicações.

INTRODUÇÃO

As medidas indicadas para o controle da vassoura-de-bruxa do cacau são difíceis de serem uniformizadas para todas as situações, variando regionalmente e até mesmo em nível de plantação (Rudgard et al., 1993a; Rudgard et al., 1993b; Purdy & Schmidt, 1996). O clima da região cacaueira baiana é extremamente favorável à ocorrência da doença tendo na maior parte do ano disponibilidade de tecido suscetível e esporulação do patógeno. A extensão dos cultivos e o manejo adotado em plantações vizinhas uma vez que nessa região as lavouras formam um grande contínuo de cultivo, são dificuldades adicionais ao efetivo controle da doença.

O controle químico nem sempre é eficiente e a sua adoção depende dos preços pagos por arroba de cacau (Baker & Holliday, 1957; Laker & Rudgard, 1989). De fato, Almeida et al. (1998) encontraram resultados promissores na proteção de frutos com aplicações de óxido cuproso, porém o retorno econômico variou em função da localização da lavoura e do início da aplicação do produto.

O controle biológico dessa doença está sendo pesquisado em diferentes países e microrganismos obtidos de diferentes órgãos do cacau já foram testados (Pomella, 2001). O foco principal dos trabalhos tem sido a inibição da produção de inóculo do patógeno, especialmente com fungos do gênero *Trichoderma*, à exemplo dos trabalhos de Hebbbar et al. (1999); Pomella et al. (2004) e Costa (2003). Pouco tem sido feito no intuito de proteger órgãos susceptíveis e este foco nos trabalhos assume primordial importância no contexto das lavouras cacaueiras do sul da Bahia. A grande área plantada forma um maciço de lavouras contíguas que, aliado ao eficiente mecanismo de distribuição do patógeno (Evans & Solorzano, 1981), faz com que lavouras que adotem medidas de controle da doença sejam atingidas pelo patógeno da mesma forma que lavouras onde não são adotadas medidas de controle (Pomella, 2001).

A podridão-parda do cacau, causada no Brasil por quatro diferentes espécies de *Phytophthora*, causa perdas que variam de 20 a 30 % dependendo das condições climáticas (Luz & Silva, 2001).

O controle por meio de pulverizações com produtos cúpricos, apesar de apresentar bons resultados, nem sempre é viável economicamente (Dalla Pria & Camargo, 1997). O controle biológico dessa doença é pouco explorado e a totalidade dos trabalhos tratam do uso de fungos antagônicos, a exemplo dos trabalhos de Krauss & Soberanis (2001), ten Hoopen et al. (2003) e Hanada et al. (2004).

No decorrer deste trabalho, foram obtidos isolados de bactérias endosporogênicas e actinomicetos residentes da superfície de frutos de cacau num total de 336 culturas. Foram selecionados os isolados mais eficientes em inibir a germinação de basidiósporos de *C. pernicioso* na superfície de frutos de cacau. Os isolados mais promissores foram também testados quanto à sua capacidade em proteger frutos contra a infecção por *P. palmivora* (Capítulo 1). Foi observada a capacidade dos cinco isolados mais promissores em produzir substâncias envolvidas no controle biológico (Capítulo 2) Os dois isolados mais promissores, Ac26 para o controle da podridão-parda e o Ac79 para o biocontrole da vassoura-de-bruxa, ambos pertencentes ao gênero *Streptomyces*, foram avaliados quanto à sua capacidade em induzir resistência em plantas, e demonstram-se capazes de fazê-lo (Capítulo 3). Quando os sobrenadantes dos dois antagonistas cultivados em meio TSAm foram combinados, e aplicados em frutos em condições de campo, observou-se efeito aditivo contra a podridão-parda (Capítulo 4). Neste trabalho procurou-se avaliar a real capacidade dos dois isolados em proteger frutos de cacau contra a vassoura-de-bruxa e a podridão-parda em lavoura comercial sob natural pressão de inóculo.

MATERIAL E MÉTODOS

Antagonistas e sua multiplicação: Os dois antagonistas Ac26 e Ac79 foram multiplicados inicialmente em meio extrato de solo ágar (Pramer & Schmidt, 1964) por 7 dias. Os esporos, de duas placas de cada isolado, foram removidos por raspagem e transferidos para frascos de vidro com capacidade para 12 L contendo 8 L de meio BD (decoção de 200 g de batata + 20 g de dextrose e água destilada q.s.p. 1 L) (Tuite, 1969). As culturas foram incubadas por cinco dias em temperatura de 25 °C sob agitação.

Material vegetal e tratamentos: O ensaio foi conduzido na fazenda “Luz de Maria” município de Uruçuca-BA. Das plantas de cacau do tipo amelonado comumente chamado na região de cacau “comum” destinadas a realização do ensaio foram retirados os frutos apresentando sintomas de vassoura-de-bruxa e podridão-parda. Cada tratamento foi aplicado a 150 plantas. No interior da área ocupada por essas plantas foram marcados cinco grupos de 10 plantas destinadas a servirem como repetições.

Os antagonistas foram veiculados em 2 % de óleo mineral emulsionável OPPA® (Petrobrás, Macaé, RJ) e caldo de carne Knorr® 2 % (Knorr, Pouso Alegre, MG) (Macagnan et al., 2005). Para cada volume de meio de cultura contendo os antagonistas foram adicionados 2 volumes de água contendo os adjuvantes. A combinação dos antagonistas, foi obtida misturando-se as suspensões de cada um individualmente na proporção 1:1. Foram ao total cinco tratamentos: o isolado Ac26 e o isolado Ac79 aplicados individualmente e em associação; óxido cuproso na quantidade de 6 g de ingrediente ativo por planta e o tratamento controle que não recebeu nenhuma aplicação. A primeira aplicação foi feita no dia 22 de julho de 2004 e os tratamentos com os antagonistas foram reaplicados quinzenalmente e o fungicida a cada 60 dias. Cada planta recebeu aproximadamente 300 mL de calda direcionada aos frutos com o auxílio de atomizador costal motorizado.

Foram realizadas 2 colheitas sendo uma aos 12 dias e outra 41 dias após o início das pulverizações. Para a avaliação dos resultados a partir do total de frutos colhidos, em cada repetição, foi deduzida a porcentagem de frutos sadios, apresentando sintomas de podridão-parda e sintomas de vassoura-de-bruxa. Os dados de cada uma das variáveis analisadas foram submetidos a análise de variância em modelo inteiramente casualizado.

RESULTADOS

O ensaio estendeu-se de 22 de julho com o início das pulverizações até o dia 30 de setembro de 2004 com o término das aplicações. Nesse intervalo de tempo foram realizadas 6 aplicações dos antagonistas e duas aplicações do fungicida. A análise dos dados revelou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os cinco diferentes tratamentos para as variáveis estudadas.

DISCUSSÃO

Nas duas colheitas, especialmente na segunda, observou-se alta severidade da podridão-parda e da vassoura-de-bruxa. Enquanto na primeira colheita, cerca de 40 % dos frutos apresentavam sintomas da podridão-parda e, ou, vassoura-de-bruxa e 60 %

dos frutos estavam sadios, na segunda colheita em torno de 60 % dos frutos apresentavam sintomas somente decorrentes da infecção por *C. pernicioso*.

A ausência de efeito dos tratamentos na primeira colheita era esperada, uma vez que as aplicações haviam sido iniciadas a apenas 12 dias. Dessa forma, não haveria tido tempo suficiente para haver a supressividade das doenças uma vez que apenas uma aplicação havia sido feita. Porém a segunda colheita também revelou ausência de efeito de todos os tratamentos. Não foi observado nem mesmo efeito do fungicida recomendando para o controle de ambas as doenças. Possivelmente a ausência de efeito do próprio fungicida, assim como dos microrganismos, pode ser atribuída ao tardio início das aplicações, segunda quinzena do mês de julho. O período indicado para o início das aplicações de óxido cuproso para o controle da vassoura-de-bruxa é o final do mês de fevereiro (Almeida et al., 1998) e para a podridão-parda, as aplicações devem iniciar no mês de abril (Luz & Silva, 2001). A aplicação de produtos para o controle da vassoura-de-bruxa deve iniciar logo após o final do pico de floração uma vez que frutos são susceptíveis desde a fecundação até, aproximadamente, 90 dias após (Soberanis et al., 1999). O fungo uma vez presente no interior dos tecidos do hospedeiro torna as tentativas de controle da doença de nulo efeito. Normalmente quando os sintomas são exteriorizados a qualidade das amêndoas já encontra-se comprometida. Portanto o controle dessa doença deve ser essencialmente preventivo. Em nosso ensaio as aplicações iniciaram-se quando a maior parte dos frutos já não mais encontrava-se em idade suscetível e possivelmente já infectados pelo patógeno.

O uso de fungicidas protetores, incluindo-se os cúpricos, para o controle da podridão-parda somente é eficiente se a sua aplicação for realizada no momento em que é possível prevenir a infecção, principalmente quando o órgão a ser protegido forem os frutos (Luz & Silva, 2001). Ainda, segundo esses autores, em condições de alta conducividade à doença nem mesmo 10 a 12 pulverizações anuais são suficientes para o seu controle.

Neste ensaio não esperava-se que o controle das doenças através do controle biológico superasse aquele provido pelo uso do fungicida em função de vários fatores. O principal motivo foi a ausência de uma formulação realmente eficiente em favorecer a atividade antagônica dos microrganismos, e esse é realmente um dos maiores desafios do controle biológico na atualidade principalmente tratando-se de antagonistas dispensados no filoplano (Bettiol, 1997). Porém o motivo principal da ausência de efeito dos tratamentos foi provavelmente a época de início da aplicação dos tratamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, L.C.C.; Niella, G.R. & Bezerra, J.L. 1998. Efeito de remoções de partes doentes do cacauzeiro associadas a intervalos de aplicação de óxido cuproso no controle da vassoura-de-bruxa na Bahia. *Agrotrópica* 10:95-102.
- Baker, R.E.D. & Holliday, P. 1957. Witches' broom disease of cacao (*Marasmius perniciosus* Stahel). Kew, Surrey, England., Commonwealth Mycological Institute. 42p.
- Bettiol, W. 1997. Biocontrole na fitosfera: problemas e perspectivas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 5:59-97.
- Costa, J.C.B. 2003. Situação atual no controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro com o uso de *Trichoderma* spp., na Bahia. *Anais da VIII Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos, CEPLAC/CEPEC -Itabuna-Bahia* 63-69.
- Dalla Pria, M. & Camargo, L.E.A. 1997. Doenças do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.). In: Rezende, J.A.M. (Ed.) *Manual de Fitopatologia Doenças das plantas cultivadas*. São Paulo, CERES, 176-183.
- Evans, H.C. & Solorzano, G.R. 1981. Witches' broom disease: wrong experiment right results. *Proceedings 8th International Cocoa Research Conference, Cartagena Colômbia* 415-418.
- Hanada, R.E.; Pomella, A.W.V.; Salazar, H. & Pereira, J.O. 2004. Seleção de fungos endofíticos visando o controle biológico de *Phytophthora* sp. agente causal da podridão parda dos frutos de cacau. *Fitopatologia Brasileira* 29:S134.
- Hebbar, K.P.; Lumsden, R.D.; Krauss, U.; Soberanis, W.; Lambert, S.; Machado, R.; Dessimoni, C. & Aitken, M. 1999. Biocontrol of cocoa diseases in Latin America - status of field trials. In: Krauss, U. & Hebbar, K.P. (Ed.) *Research methodology in biocontrol of plant diseases with special reference to fungal diseases of cocoa*. Costa Rica, CATIE, 19-28.
- Krauss, U. & Soberanis, W. 2001. Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. *Biological Control* 22:149-158.
- Laker, H. & Rudgard, S.A. 1989. A review of the research on chemical control of witches' broom disease of cocoa. *Cocoa Growers' Bulletin* 42:12 - 24.
- Luz, E.D.M.N. & Silva, S.D.V.M. 2001. Podridão-Parda dos frutos, Cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacauzeiro. In: Bezerra, J.L. (Ed.) *Doenças causadas por Phytophthora no Brasil*. Campinas, Livraria Editora Rural, 175-265.

- Macagnan, D.; Romeiro, R.S.; Souza, J.T. & Pomella, A.W.V. 2005. Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their activity against the witches' broom and black pod pathogens. *Phytoparasitica* (Submetido para publicação)
- Pomella, A.W.V. 2001. O controle biológico da vassoura de bruxa: situação atual no Brasil e no mundo. *Fitopatologia Brasileira* 26:268.
- Pomella, A.W.V.; Carvalho, A.C. & Luguércio, L.L. 2004. Análise comparativa da atividade de biocontrole de isolados de *Trichoderma stromaticum* sobre o agente causal da vassoura-de-bruxa do cacauero em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira* 29:S204.
- Pramer, D. & Schmidt, E.L. 1964. *Experimental soil microbiology*. Minnesota, Burgess Publishing Company. 107p.
- Purdy, L.H. & Schmidt, R.A. 1996. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. *Annual Review of Phytopathology* 34:573-594.
- Rudgard, S.A.; Andebrhan, T.; Maddison, A.C. & Schidt, R.A. 1993a. Disease management: recomendations. In: Rudgard, S.A.; Maddison, A.C. & Andebrhan, T. (Ed.) *Disease management in cocoa : Comparative epidemiology of witches' broom*. London, Chapman & Hall,
- Rudgard, S.A.; Andebrhan, T.; Maddison, A.C. & Schmidt, R.A. 1993b. Future prospects for improvements in disease management. In: Rudgard, S.A.; Maddison, A.C. & Andebrhan, T. (Ed.) *Disease management in cocoa : Comparative epidemiology of witches'broom*. London, Chapman & Hall,
- Soberanis, W.; Rios, R.; Arévalo, E.; Zúñiga, L.; Cabezas, O. & Krauss, U. 1999. Increased frequency of phytosanitary pod removal in cacao (*Theobroma cacao*) increases yield in eastern Peru. *Crop Protection* 18:677 - 685.
- ten Hoopen, G.M.; Rees, R.; Aisa, P.; Stirrup, T. & Krauss, U. 2003. Population dynamics of epiphytic mycoparasites of the genera *Clonostachys* and *Fusarium* for the biocontrol of black pod (*Phytophthora palmivora*) and moniliasis (*Moniliophthora roreri*) on cocoa (*Theobroma cacao*). *Mycological Research* 107:587-596.
- Tuite, J. 1969. *Plant Pathological Methods*. Minneapolis, Burgess Pub. Company. 239p.

FIGURAS

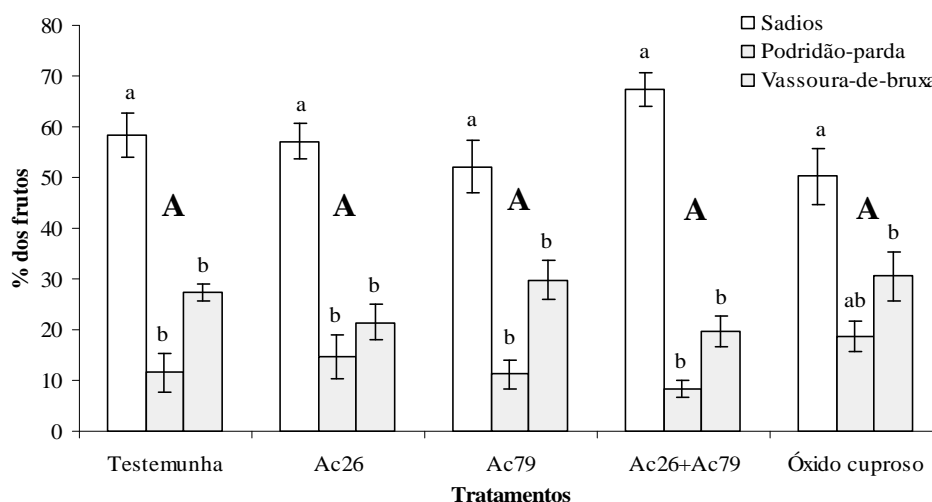


Figura 1: Porcentagem de frutos sadios, com sintomas podridão-parda e vassoura-de-bruxa observados na primeira colheita de um ensaio de campo onde, plantas foram tratadas com dois actinomicetos aplicados isoladamente e em associação, óxido cuproso e não tratadas. As letras maiúsculas representam a comparação das médias entre os tratamentos e as minúsculas as três variáveis quantificadas dentro de cada tratamento. Colunas encimadas pelas mesmas letras não diferiram entre si pelo teste de Tukey 1%. As barras representam o erro padrão da média.

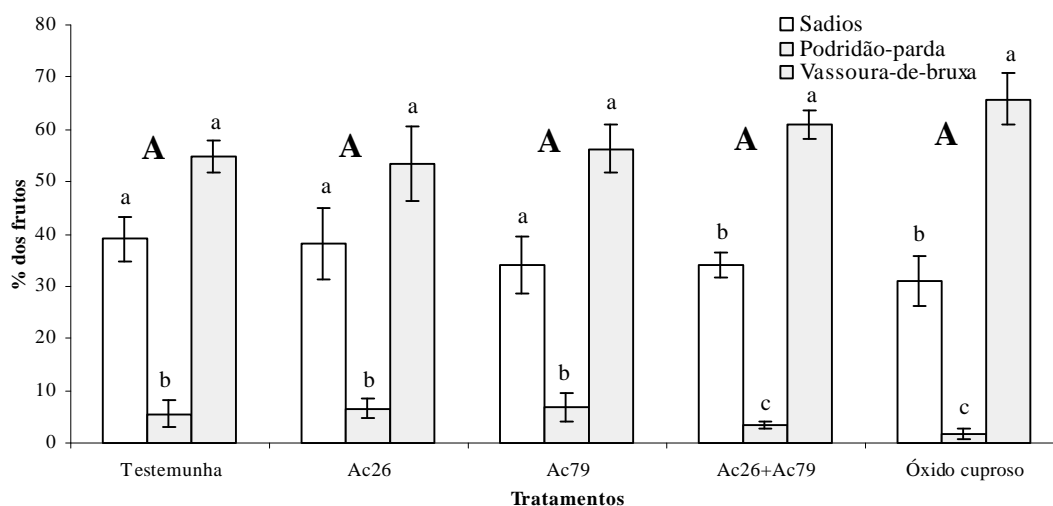


Figura 2: Porcentagem de frutos sadios, com sintomas podridão-parda e vassoura-de-bruxa observados na segunda colheita de um ensaio de campo onde, plantas foram tratadas com dois actinomicetos aplicados isoladamente e em associação, óxido cuproso e não tratadas. As letras maiúsculas representam a comparação das médias entre os tratamentos e as minúsculas as três variáveis quantificadas dentro de cada tratamento. Colunas encimadas pelas mesmas letras não diferiram entre si pelo teste de Tukey 1%. As barras representam o erro padrão da média.

ARTIGO VI: Caracterização parcial de substâncias inibidoras da germinação de basidiósporos de *Crinipellis perniciosa* produzidas por dois actinomicetos selecionados para o biocontrole de doenças do cacauero

Dirceu Macagnan¹, Reginaldo da Silva Romeiro¹, Maria Cristina Baracat Pereira², Hebréia Oliveira Almeida² & Alan Willian Vilella Pomella³

¹Universidade Federal de Viçosa – UFV - Departamento de Fitopatologia ²UFV - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 36571-000 Viçosa-MG. ³Almirante Cacau, Cx.P. 55 CEP 45630-000 Barro Preto-BA

RESUMO

Os isolados de actinomicetos Ac26 e Ac79, pertencentes ao gênero *Streptomyces*, foram submetidos a ensaios visando a caracterização de substâncias antimicrobianas presentes no sobrenadante, provenientes do cultivo desses micorganismos em três diferentes meios. Esses sobrenadantes demonstraram a capacidade de inibir a germinação de basidiósporos do fungo *Crinipellis perniciosa*. O estudo da cinética de produção das substâncias inibidoras revelou que as maiores atividades de inibição ocorreram 72 h após o início do cultivo. A diálise em membranas revelou que as substâncias inibidoras produzidas por ambos os isolados apresentam massas moleculares menores que 12 kDa. Nova diálise em membranas com ponto de corte de 1 kDa revelou que as substâncias inibidoras produzidas pelo isolado Ac79 apresentam massa molecular menor que 1 kDa e o isolado Ac26 produz substâncias com essa mesma propriedade porém com massa molecular entre 1 e 12 kDa. Cromatografias do sobrenadante do isolado Ac26 em colunas de troca aniônica e catiônica sugerem a presença de pelo menos, duas substâncias diferentes, uma aniônica e uma catiônica.

INTRODUÇÃO

Durante os trabalhos de seleção e teste de microrganismos com vistas ao controle biológico da vassoura-de-bruxa e da podridão-parda do cacauero causadas por *Crinipellis perniciosa* e *Phytophthora* ssp., respectivamente, verificou-se que o sobrenadante proveniente do cultivo em meio líquido de dois actinomicetos selecionados era tão eficiente em inibir a germinação de basidiósporos de *C. perniciosa* quanto o uso de células vivas dos antagonistas (Capítulo 1). Verificou-se, também, que frutos de cacauero expostos à combinação dos sobrenadantes dos dois antagonistas e posteriormente inoculados com zoósporos de *Phytophthora palmivora* apresentavam menor severidade da doença quando comparados ao uso de cada sobrenadante isoladamente ou de células vivas dos mesmos (Capítulo IV). A purificação e a caracterização quanto às propriedades e estruturas de substâncias com atividade antimicrobiana geram diferentes possibilidades de uso do microrganismo produtor. Uma delas é a síntese artificial da substância e posterior uso como defensivo agrícola a exemplo do que ocorre com a estreptomicina, casugamicina e oxitetraciclina. Pode-se proceder a clonagem dos genes responsáveis pela produção e, transferência a outro microrganismo com vistas a otimizar a produção *in vitro* ou *in situ*, a exemplo do aventado por Janisiewicz (1988). Há ainda a possibilidade de monitorar a presença e a quantidade do composto sendo produzido pelo microrganismo *in situ*, a exemplo do trabalho de Grote et al. (2004). Com a purificação do composto pode-se estudar a possível absorção e translocação da substância pela planta, a exemplo do trabalho de Romeiro & Muchovej (1990).

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos e seu cultivo:

Foram utilizados os isolados Ac26 e Ac79, selecionados como agentes de biocontrole de doenças do cacauero. Estes antagonistas foram identificados por meio do seqüenciamento do rDNA 16S, que permitiu posicioná-los taxonomicamente como pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Para a produção de esporos, os antagonistas foram cultivados em meio extrato de solo ágar (Pramer & Schmidt, 1964), por sete dias a 28 °C. Para a produção de sobrenadante, exceto quando indicado, esporos dos antagonistas

foram adicionados ao meio de Simmons (1926), substituindo-se o citrato por glicose e ficando constituído por glicose 1 g, MgSO₄ 7H₂O 0,2 g, NH₄H₂PO₄ 1 g, K₂HPO₄ 1 g, NaCl 5 g e água destilada 1000 mL onde foram cultivados sob agitação por 72 h. O sobrenadante concentrado foi obtido precipitando as células vegetativas, por centrifugação (20.000 g x 15 min 4 °C), e o sobrenadante concentrado por liofilização, reduzindo o seu volume em 10 vezes. Após a concentração, o sobrenadante foi mantido sob refrigeração a -20 °C até o momento da utilização.

O inóculo de *Crinipellis pernicioso* foi obtido submetendo vassouras secas de cacauzeiros, formadas a partir de infecção natural, a câmaras de indução de formação de basidiocarpos a 25 °C e fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro, com umidade relativa saturada. Os basidiocarpos produzidos foram coletados e tratados com sulfato de estreptomicina 150 µg.mL⁻¹ e, em seguida, lavados em água destilada e esterilizada. Posteriormente eles foram fixados pela sua face dorsal no centro de uma placa de Petri com graxa de silicone, permanecendo a face inferior livre para a ejeção de basidiósporos, os quais foram coletados em uma solução contendo 16 % de glicerol em tampão de ácido 2-(N-morfolino) etano sulfônico (MES) 0,195 %, pH 7,0, sob constante agitação, por 18 h a 25 °C (Frias et al., 1995). A suspensão de basidiósporos obtida foi avaliada quanto à sua concentração e índice de germinação e mantida em ultrafreezer (-80 °C) até o momento da utilização.

Inibição da germinação de basidiósporos por sobrenadantes provenientes do cultivo dos antagonistas em diferentes meios de cultura: Durante os ensaios de seleção e comprovação da eficiência dos isolados em condições de campo os dois antagonistas foram multiplicados em meio TSA modificado (TSA_m) contendo 12,5 g de peptona e 5 g de NaCl. Porém este meio apresenta composição complexa em função da adição da peptona, podendo dificultar as etapas de purificação posteriores (Mellouli et al., 2003). Sendo assim testou-se a produção das substâncias em outros dois meios o de Simmons (1926) e em meio de Ayers et al. (1919), sendo o último composto por NH₄H₂PO₄ 1 g, KCl 0,2 g, MgSO₄ 7H₂O 0,2g e água destilada 1:l. Esporos dos dois antagonistas foram removidos do meio sólido por raspagem e adicionados a 100 mL de cada um dos três meios, em triplicata, contido em frascos de Erlenmayer com capacidade para 250 mL. Os frascos permaneceram sob agitação em temperatura ambiente por 48 h quando foram submetidos à centrifugação por 10 min 3.600 g. Uma alíquota do

sobrenadante recuperado foi usada para o teste de inibição de germinação de basidiósporos.

Bioensaio de inibição da germinação de basidiósporos de *C. perniciosus*: Em todos os ensaios a inibição da germinação dos basidiósporos foi feita misturando-se, na superfície de gel de ágar-água, depositado em placas de Petri, 20 µL da substância putativamente inibidora e 10 µL de suspensão de basidiósporos do fungo contendo aproximadamente 10^6 basidiósporos.mL⁻¹. As placas contendo o bioensaio foram incubadas a 25 °C por 3 h quando à mistura foi adicionado o corante azul de algodão preparado em lactofenol (Tuite, 1969). A germinação foi avaliada ao microscópio e considerado germinado o basidiósporo que apresentasse o tubo germinativo maior que o comprimento do basidiósporo. Como controle, dependendo do ensaio, basidiósporos eram misturados ao meio de cultura ou o tampão usado.

Cinética da atividade da substância inibidora da germinação de basidiósporos de *C. perniciosus* por acompanhamento do cultivo dos antagonistas em batelada: Com o objetivo de coletar o sobrenadante com alta atividade inibitória, determinou-se a curva de atividade da putativa substância inibidora da germinação dos basidiósporos. Esporos dos antagonistas foram adicionados a frascos Erlenmeyers com capacidade para 250 mL contendo 100 mL de meio líquido de Simmons (1926), em triplicada. A incubação foi em temperatura ambiente, sob agitação, por 120 h. A cada 24 h era retirada uma alíquota de 1 mL, submetida a centrifugação por 10 minutos 3.600 g e seu sobrenadante obtido diluído na proporção 1:1 em tampão PBS 0,1 M obtendo-se 10 diluições diferentes. Alíquotas de cada diluição foram submetidas ao ensaio de inibição da germinação de basidiósporos. O índice de inibição da germinação de basidiósporos foi obtida em relação à germinação observada no tratamento controle, em que a suspensão de basidiósporos foi misturada ao tampão PBS, aplicando-se a fórmula: Índice de Inibição = $[100-(GD.100)/GC]$ onde: GD= percentagem de basidiósporos germinados na diluição, GC= percentagem de basidiósporos germinados no tratamento controle. O cálculo do índice de inibição de germinação foi aplicado naquelas diluições onde a germinação observada foi superior a 2 %. Nas menores diluições onde a germinação observada foi 0 % acrescentou-se ao valor final de inibição de germinação o valor 100 de inibição de germinação para cada diluição onde não foi observada germinação.

Estimativa do tamanho das moléculas por diálise em membranas: Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante concentrado de cada antagonista foi submetido à diálise em membrana de celulose com ponto de corte de 12 kDa e em membranas de celulose benzoilatada com ponto de corte de 1 kDa. A diálise foi feita à baixa temperatura (5 °C) por 12 h contra um volume de 1000 vezes de água destilada substituída pelo menos 4 vezes. As moléculas que permaneceram no interior da membrana foram submetidas a teste quantitativo de inibição da germinação de basidiósporos.

Avaliação da capacidade de absorção de radiação das moléculas: Os sobrenadantes dos dois antagonistas, submetidos ou não a diálises em membrana com ponto de corte de 1 kDa, assim como o meio de cultura concentrado, foram submetidos a leituras de absorvância no intervalo de 190 a 700 nm. Como branco, foi usada água destilada e as leituras realizadas automaticamente pelo programa UV solutions 1.4 (Hitachi company) ao espectrofotômetro Hitachi U-3000.

Filtração em gel: um volume de 3 mL de sobrenadante concentrado, de cada antagonista, foi fracionado em uma coluna medindo 26 x 2 cm contendo Sephadex G25 Coarse equilibrada em tampão PBS 0,1 M pH 7,0. As moléculas foram eluídas no mesmo tampão e 40 frações, de aproximadamente 3,5 mL foram coletadas e alíquotas de cada fração usadas em ensaio de inibição da germinação de basidiósporos.

Cromatografias de troca aniônica e catiônica: Volumes de 7 mL do sobrenadante concentrado de cada antagonista foram fracionados em coluna de troca catiônica contendo resina CM-Sephrose FF equilibrada em tampão MES 25 mM, pH 6,0. As moléculas foram eluídas no mesmo tampão, e na ausência e presença de NaCl 1 M. O sobrenadante do isolado Ac26 foi fracionado também em coluna de troca aniônica contendo resina DEAE-Sephrose CL6B, equilibrada em tampão Tris - HCl 25 mM, pH 7,0. As moléculas foram eluídas no mesmo tampão na ausência e na presença de NaCl 1 M. De cada tipo de coluna, foram coletadas frações de 1,5 mL, das quais foram retiradas alíquotas destinadas ao teste de inibição de germinação de basidiósporos.

RESULTADOS

Os sobrenadantes provenientes dos três diferentes meios de cultura testados foram capazes de inibir a germinação de basidiósporos do patógeno (Figura 1). Os ensaios posteriores foram feitos usando o meio de Simmons (1926), por este ter proporcionado melhor crescimento dos antagonistas evidenciado pela maior turbidez do meio (dados não mostrados).

A cinética da atividade das substâncias inibidoras da germinação de basidiósporos revelou que a presença das substâncias ocorreu após 24 h de cultivo. A maior atividade inibitória foi detectada com 72 h de incubação, iniciando uma fase de decréscimo (Fig. 2).

As moléculas produzidas pelos dois isolados e retidas pela membrana de diálise com ponto de corte de 12 kDa não inibiram a germinação dos basidiósporos (dados não mostrados). As moléculas do isolado Ac26 retidas pela membrana de 1 kDa foram capazes de inibir a germinação dos propágulos do patógeno enquanto as moléculas do isolado Ac79 não inibiram (Fig. 3).

As leituras de absorvância no espectro de 190 a 700 nm revelaram que em função da diálise houve a remoção de substâncias responsáveis pela absorvância na faixa aproximada de 220 a 560 nm. Entretanto para o sobrenadante proveniente do isolado Ac26, que apresentou atividade inibitória depois da diálise em membrana de 1 kDa, observou-se maior absorção na região de comprimento de onda entre 220 a 300 nm, em comparação ao sobrenadante do isolado Ac79 (Fig. 4 e 5).

Não foi possível a recuperação das moléculas inibidoras da germinação quando o sobrenadante foi tentativamente, fracionado em coluna de Sephadex G-25 Coarse.

O perfil de eluição da separação do sobrenadante dos dois antagonistas em coluna de troca catiônica revelou que as frações coletadas antes da adição de NaCl 1M apresentaram um pico de alta absorvância, especialmente entre as frações 35 e 45 para o isolado Ac26 (Fig. 6) e 35 a 47 para o isolado Ac79 (Fig.8). O isolado Ac26 apresentou menores valores de absorvância no pico principal e apresentou também um segundo pico de absorvância entre as frações 55 a 73 (Fig.6). Os maiores valores de inibição de germinação foram observados entre as frações 35 e 41 e entre 44-47 para aquelas coletadas quando fracionou-se o isolado Ac26 (Fig. 7). As frações coletadas do isolado Ac79 apresentaram inibição somente entre as frações 47 e 50 (Fig. 9). Após a adição de NaCl observaram-se frações com inibição da germinação porém, não foi possível

diferenciar a inibição por moléculas presentes no sobrenadante daquela provocada pela adição de NaCl uma vez que foi constatado que este sal dependendo da dosagem inibe a germinação dos basidiósporos (Fig. 10). No fracionamento do sobrenadante do isolado Ac26 em coluna de troca aniônica foram observados resultados semelhantes em relação a inibição da germinação (Fig. 11).

Indiretamente, foi observado que as moléculas responsáveis pela inibição da germinação facilmente permaneciam retidas em filtros de éster de celulose e papel pois, após a passagem do sobrenadante por filtros constituídos por esses materiais estes não mais apresentavam a capacidade inibidora (dados não mostrados).

DISCUSSÃO

A produção das substâncias responsáveis pela inibição da germinação de basidiósporos do patógeno é produzida em diferentes meios e cultura isso leva a supor que a sua produção seja constitutiva (Fig. 1).

A cinética de atividade das substâncias responsáveis pela inibição parece correlacionar-se com a curva de crescimento dos antagonistas por esta assemelhar-se a curvas de crescimento típicas de bactérias (Breznak & Costilow, 1994) (Fig.2). A diminuição da atividade das substâncias após 72 h, evidenciado pela menor inibição da germinação, pode estar relacionada a reabsorção das substâncias pelos microrganismos com o intuito de servirem como fonte de carbono. Esse tipo de comportamento acontece em ensaios de uso de açúcares para fins de identificação de bactérias. Dependendo do microrganismo, inicialmente se observa a produção, e liberação de ácido ao meio e, posteriormente o pH retorna ao neutro em função da reabsorção da substância ácida (Loures & Guimarães, 1974). Outra indicação da possível reabsorção pelo microrganismo das substâncias inibidoras é que o sobrenadante livres de células continuou apresentando atividade inibitória mesmo depois do armazenamento por longos períodos. O tempo de incubação, de 72 h tem sido usado em diversos trabalhos para a produção de substâncias antimicrobianas por actinomicetos como descritos nos trabalhos de Castillo et al. (2003) e Mellouli et al. (2003).

Ambas as substâncias inibidoras produzidas pelos antagonistas apresentam massa molecular menor que 12 kDa evidenciado pela não inibição da germinação pelas moléculas retidas pela membrana de diálise com ponto de corte de 12 kDa. Porém ao

realizar testes de inibição com as moléculas retidas pela membrana de 1 kDa observou-se que o sobrenadante do isolado Ac26 ainda inibiu a germinação enquanto o sobrenadante do isolado Ac79 perdeu a capacidade de inibição. Portanto o isolado Ac79 produz substâncias inibidoras da germinação de basidiósporos de *C. pernicioso* com massa molecular inferior a 1 kDa enquanto o isolado Ac26 produz moléculas com essa mesma propriedade porém com massa molecular entre 1 kDa e 12 kDa (Fig.3).

Segundo Clark Jr & Switzer (1977) muitos compostos de interesse bioquímico apresentam um espectro de absorção próprio em determinadas condições. Substâncias aromáticas normalmente apresentam maior absorção no espectro próximo ao comprimento de onda de 275 - 280 nm (Clark Jr & Switzer, 1977). Especula-se que algumas das substâncias inibidoras da germinação possivelmente sejam substâncias aromáticas. Suporta essa especulação a observação de que no caso do sobrenadante do isolado Ac26, que não perdeu a atividade inibidora em função da diálise, houve pouca remoção de substâncias responsáveis pela absorbância na faixa de espectro 250-280 nm. Já para o sobrenadante do isolado Ac79, que perdeu atividade inibidora quando submetido à diálise, se observa que, houve maior remoção de substâncias responsáveis pela absorção na faixa de 220-280 (Fig. 4 e 5).

A retenção das moléculas responsáveis pela inibição da germinação em filtros de papel e éster de celulose permitem explicar a não recuperação das mesmas quando submetidas à gel filtração em coluna contendo Sephadex. A celulose (Lehninger et al., 1995) assim como Sephadex (Pharmacia, 1993) apresentam em suas moléculas grupos hidroxila (OH). Esses resíduos podem formar pontes de hidrogênio com diferentes solutos (Lehninger et al., 1995). Dessa forma sugere-se que as substâncias responsáveis pela inibição da germinação tenham permanecido retidas na resina.

As cromatografias em colunas de troca catiônica e aniônica sugerem que compostos com diferentes características de carga estão presentes nas amostras. A observação de que tanto na coluna de troca catiônica quanto na coluna de troca aniônica as frações coletadas antes da adição de NaCl inibiram a germinação de basidiósporos levam a concluir que o antagonista Ac26 produz, pelo menos, duas substâncias diferentes com atividade inibidora, uma aniônica e uma catiônica.

As propriedades apresentadas pelos sobrenadantes levam a crer que as moléculas responsáveis pela inibição da germinação dos basidiósporos de *C. pernicioso* são do tipo antibióticos pois algumas de suas propriedades encaixam-se nas definições de antibióticos de Demain & Lancini (2001), como serem produzidas por microrganismos,

apresentarem atividade contra outros microrganismos e suas moléculas apresentarem baixo peso molecular além de em baixas concentrações, apresentarem atividade inibitória. Segundo esses mesmos autores, os antibióticos são considerados os mais importantes metabólitos secundários obtidos de microrganismos. Dos mais de 8.100 antibióticos relatados até o final de 1999, 45,6 % eram produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces*, 16 % por outros gêneros de actinomicetos, 16,9 % por outras bactérias e apenas 21,5 % por fungos (Lazzarini et al., 2000).

Trabalhos adicionais são necessários visando purificar e elucidar a estrutura das diferentes substâncias presentes no sobrenadante dos isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayers, S.H.; Rupp, P. & Johnson, W.T. 1919. A study of the alkali-forming bacteria in milk. United States Department of Agriculture Bulletin 782:
- Breznak, J.A. & Costilow, R.N. 1994. Physicochemical factors in growth. In: Gerhardt, P.; Murray, R.G.E.; Wood, W.A. & Krieg, N.R. (Ed.) Methods for general and molecular bacteriology. Washington, American Society for Microbiology, 137-154.
- Castillo, U.; Harper, J.K.; Strobel, G.A.; Sears, J.; Alesi, K.; Ford, E.; Lin, J.; Hunter, M.; Maranta, M.; Ge, H.; Yaver, D.; Jensen, J.B.; Porter, H.; Robison, R.; Millar, D.; Hess, W.M.; Condrón, M. & Teplow, D. 2003. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. FEMS Microbiology Letters 224:183-190.
- Clark Jr, J.M. & Switzer, R.L. 1977. Experimental Biochemistry. San Francisco, W.H. Freeman and Company. 335p.
- Demain, A.L. & Lancini, G. 2001. Bacterial Pharmaceutical Products. In: M. Dworkin et al. (Ed.) The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. New York, Springer-Verlag, <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/> (Acessado em junho de 2005).
- Frias, G.A.; Purdy, L.H. & Schmidt, R.A. 1995. An inoculation method for evaluating resistance of cacao to *Crinipellis pernicioso*. Plant Disease 79:787-791.
- Grote, M.; Vockel, A.; Schwarze, D.; Mehlich, A. & Freitag, M. 2004. Fate of antibiotics in food chain and environment originating from pigfattening (part 1). Fresenius Environmental Bulletin 13:1216-1224.
- Janisiewicz, W.J. 1988. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. Phytopathology 78:194 - 198.
- Lazzarini, A.; Cavaletti, L.; Toppo, G. & Marinelli, F. 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. Antonie van Leeuwenhoek 78:399-405.
- Lehninger, A.L.; Nelson, D.L. & Cox, M.M. 1995. Princípios de Bioquímica. São Paulo, Sarvier Editora de Livros médicos. 839p.
- Loures, E.G. & Guimarães, W.V. 1974. Microbiologia: Principais provas empregadas para identificação de bactérias. Viçosa, Imprensa Universitária. 43p.
- Mellouli, L.; Ameer-Mehdi, R.B.; Sioud, S.; Salem, M. & Bejar, S. 2003. Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a

- newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Research in Microbiology* 154:345–352.
- Pharmacia 1993. *Gel filtration: Principles and methods*. Suécia, Rahms i Lund. 103p.
- Pramer, D. & Schmidt, E.L. 1964. *Experimental soil microbiology*. Minnesota, Burgess Publishing Company. 107p.
- Romeiro, R.S. & Muchovej, J.J. 1990. Persistence and lack of absorption and translocation of streptomycin sulfate in passion fruit leaves. *Turrialba* 40:487-490.
- Simmons, J.S. 1926. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. *Journal of Infect Disease* 209-214.
- Tuite, J. 1969. *Plant Pathological Methods*. Minneapolis, Burgess Pub. Company. 239p.

FIGURAS

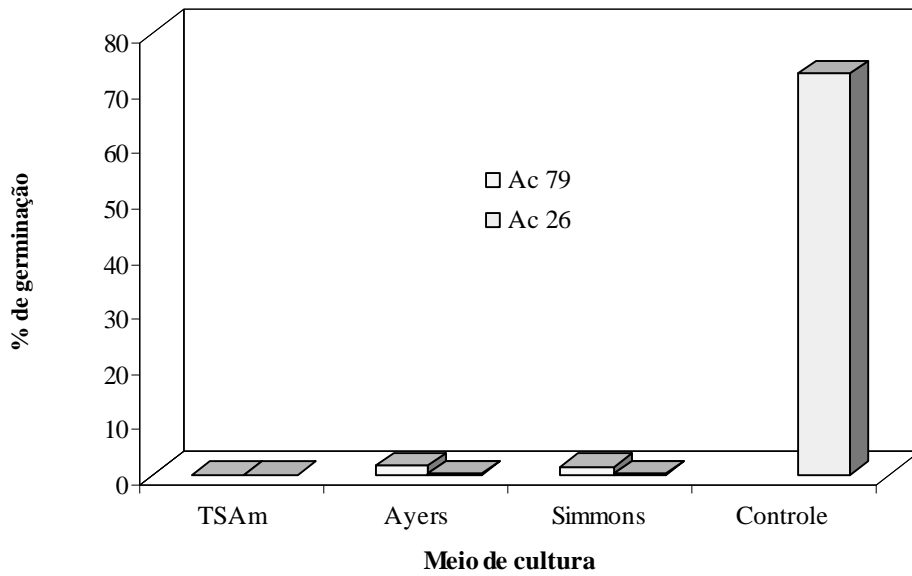


Figura 1: Inibição da germinação de basidiósporos de *Crinipellis pernicioso* por sobrenadantes dos antagonistas Ac26 e Ac79 cultivados em três diferentes meios de cultura por 48 h.

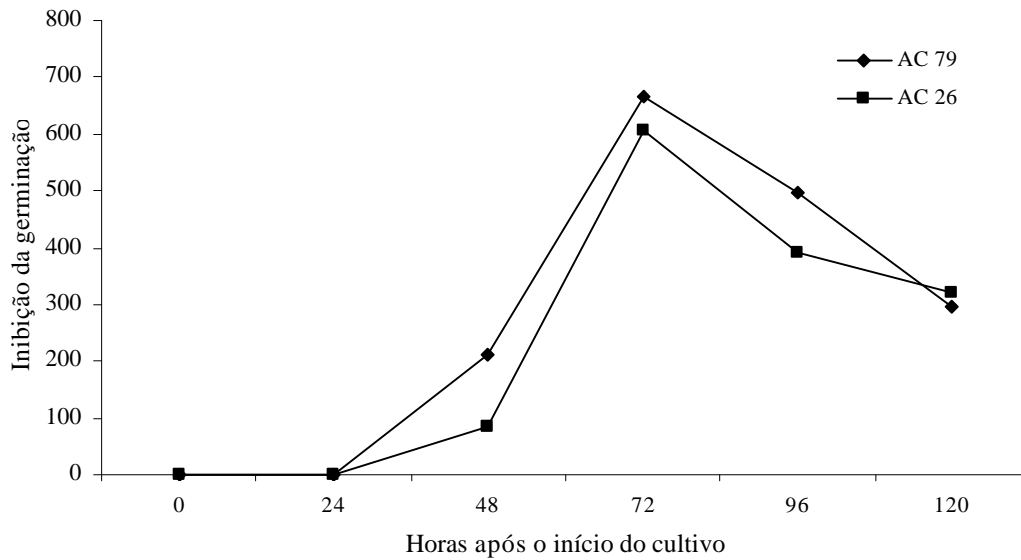


Figura 2: Inibição da germinação de basidiósporos de *Crinipellis pernicioso* por amostras de sobrenadantes retiradas a cada 24 h de cultivo em batelada em meio de Simmons (1926) dos antagonistas Ac26 e Ac79.

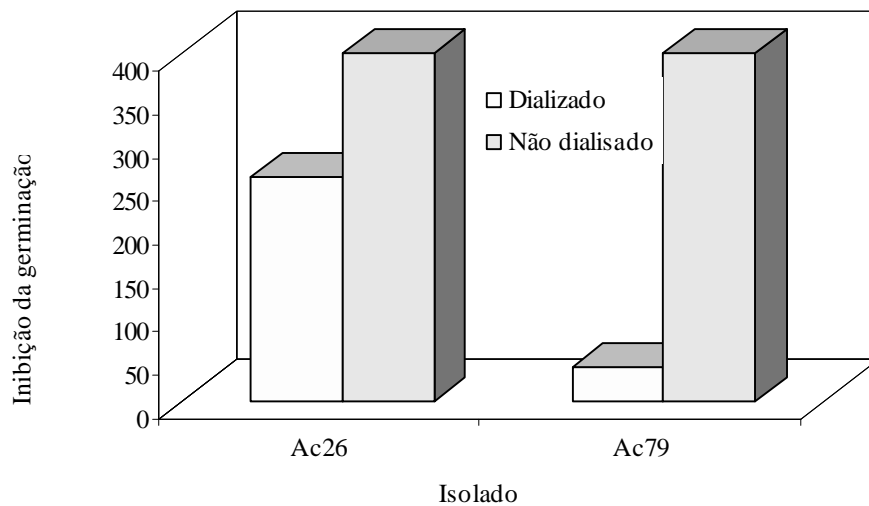


Figura 3: Inibição da germinação de basidiósporos de *Crinipellis pernicioso* pelo sobrenadante concentrado de dois antagonistas selecionados para o biocontrole de doenças do cacauero submetidos a diálises em membranas de celulose benzoilada com ponto de corte de 1 KDa.

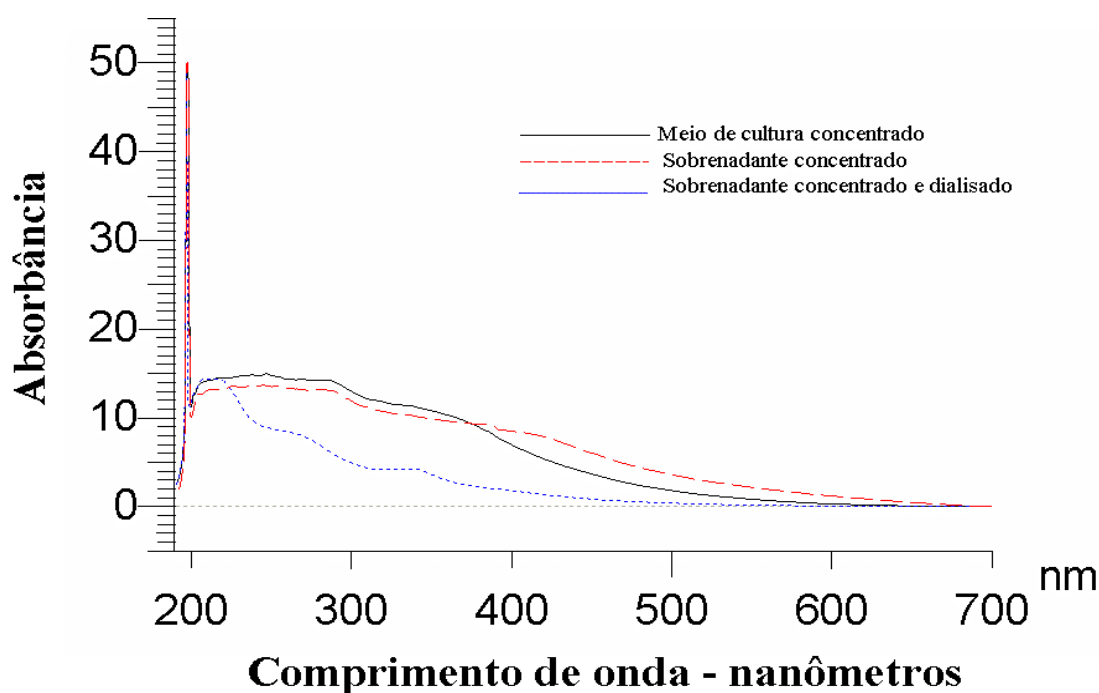


Figura 4: Valores de absorvância observados quando o sobrenadante proveniente do cultivo do isolado Ac26 submetido ou não à diálise em membrana com ponto de corte de 1 kDa, e o meio de cultura concentrado, foram submetidos ao espectro de 190 a 700 nm.

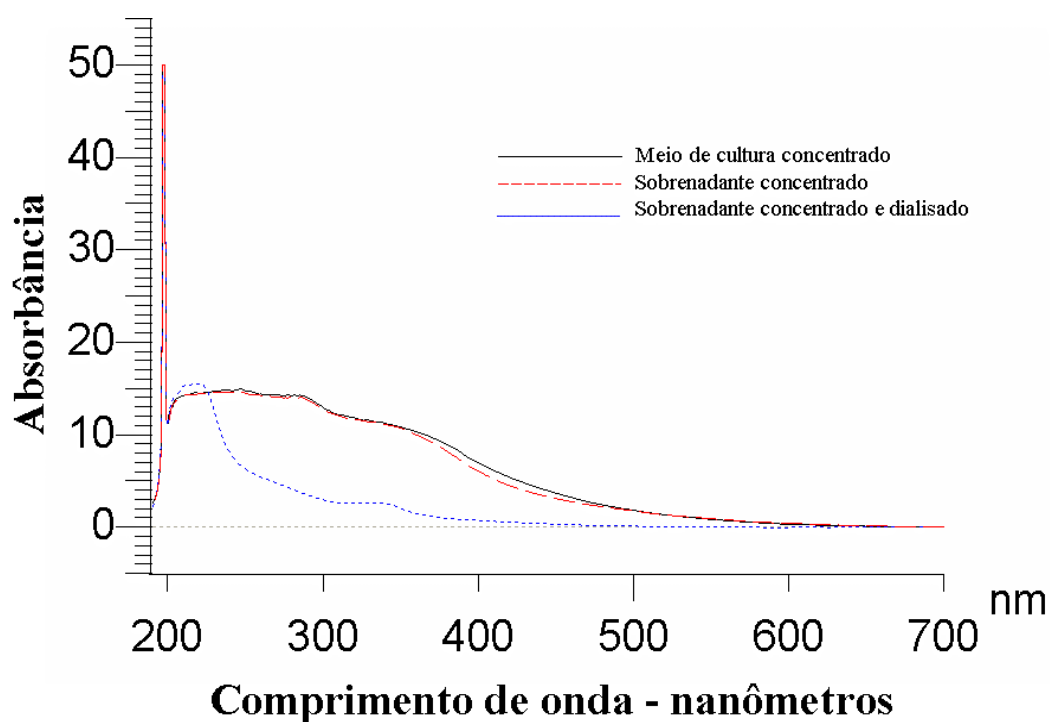


Figura 5: Valores de absorvância observados quando o sobrenadante proveniente do cultivo do isolado Ac79 submetido ou não à diálise em membrana com ponto de corte de 1 kDa, e o meio de cultura concentrado, foram submetidos ao espectro de 190 a 700 nm.

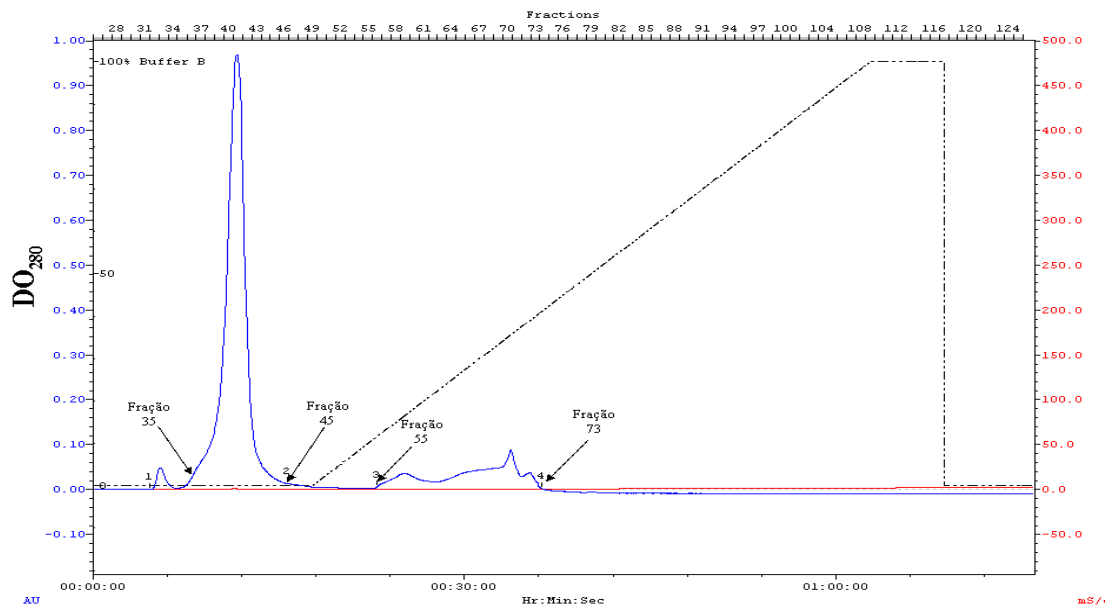


Figura 6: Perfil de eluição resultante do fracionamento do sobrenadante concentrado do isolado Ac 26 em coluna de troca catiônica contendo a resina CM-sepharose FF equilibrada em tampão MES 25 mM pH 6,0. As moléculas foram eluídas no mesmo tampão e na ausência e presença de NaCl 1 M. Os picos representam leituras de absorvância das frações em comprimento de onda de 280 nm.

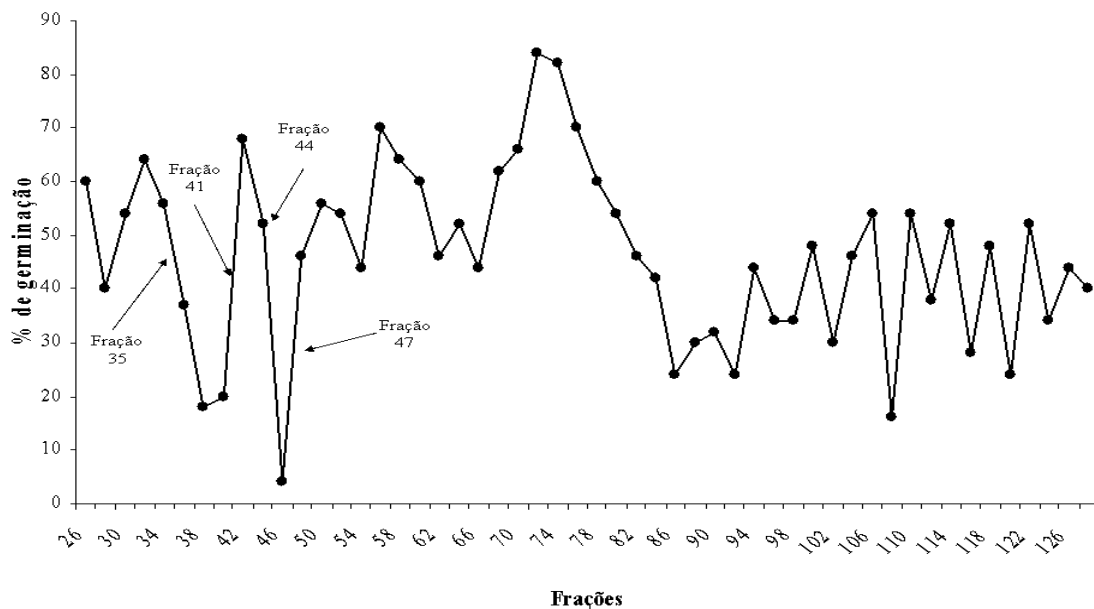


Figura 7: Inibição da germinação de basidiósporos de *Crinipellis pernicioso* por frações do sobrenadante do isolado Ac26 fracionado em coluna de troca catiônica contendo a resina CM-sepharose FF equilibrada em tampão MES 25 mM pH 6,0. As moléculas foram eluídas no mesmo tampão e na ausência e presença de NaCl 1 M.

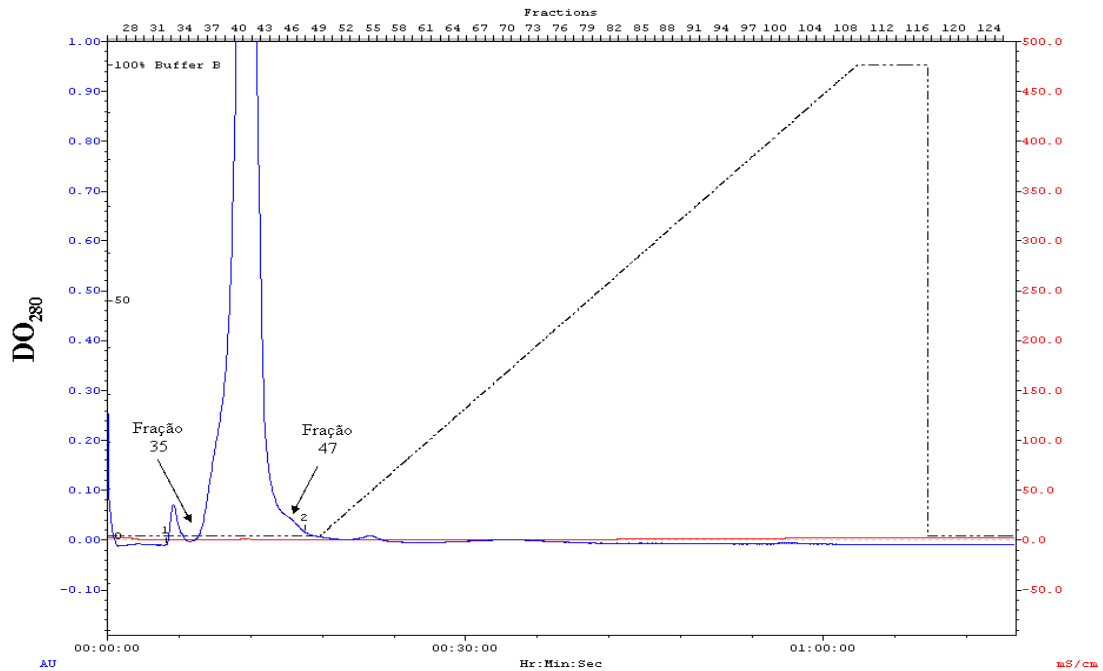


Figura 8: Perfil de eluição resultante do fracionamento do sobrenadante concentrado do isolado Ac 79 em coluna de troca catiônica contendo a resina CM-sepharose FF equilibrada em tampão MES 25 mM pH 6,0. As moléculas foram eluídas no mesmo tampão e na ausência e presença de NaCl 1M. Os picos representam leituras de absorvância das frações em comprimento de onda de 280 nm.

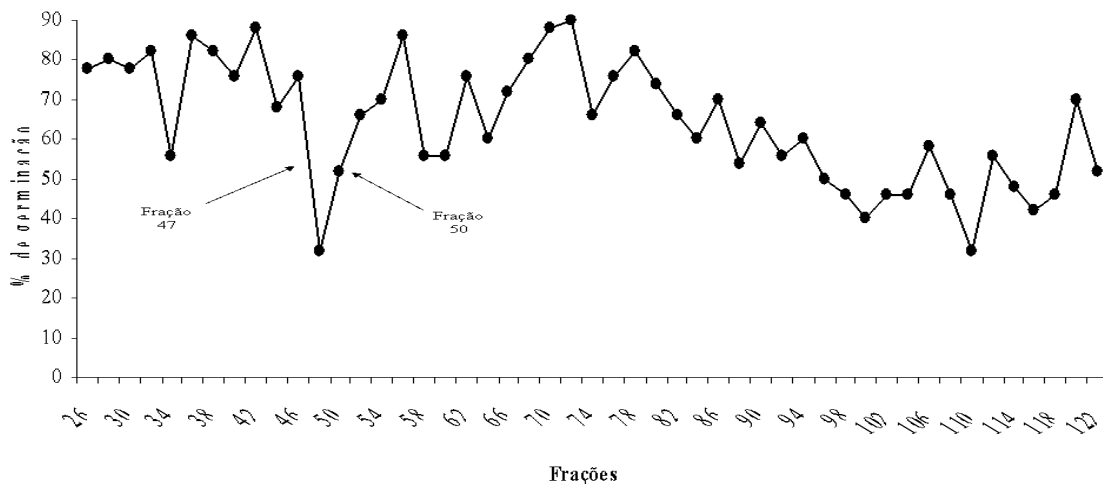


Figura 9: Inibição da germinação de basidiósporos de *Crinipellis pernicioso* por frações do sobrenadante do isolado Ac79 fracionado em coluna de troca catiônica contendo a resina CM-sepharose FF equilibrada em tampão MES 25 mM pH 6,0. As moléculas foram eluídas no mesmo tampão e na ausência e presença de NaCl 1 M.

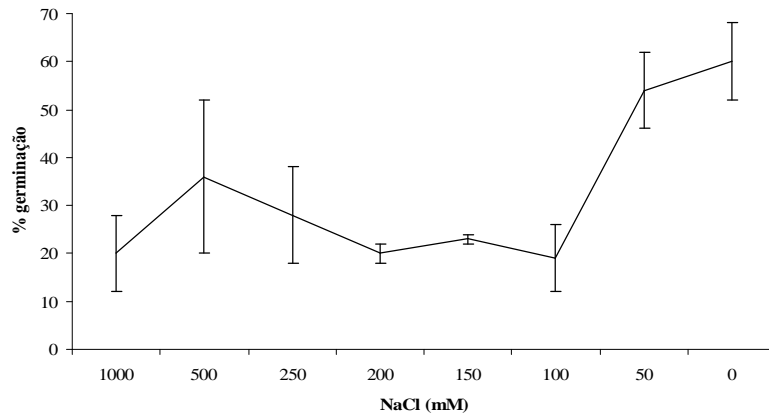


Figura 10: Germinação de basidiósporos de *Crinipellis pernicioso* na presença de cloreto de sódio em concentrações de zero até 1 M. As barras representam o erro padrão da média.

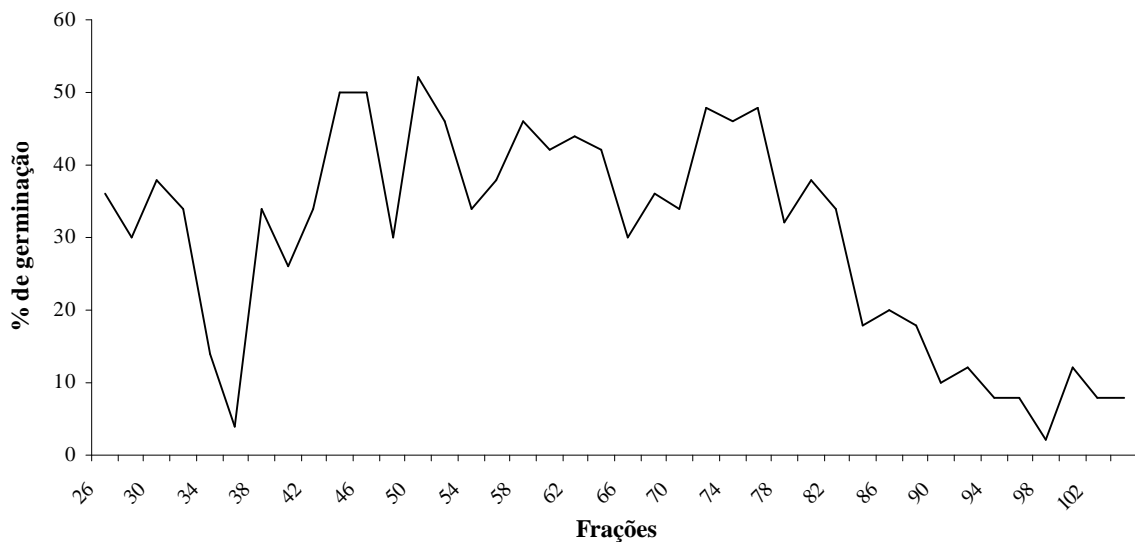


Figura 11: Inibição da germinação de basidiósporos de *Crinipellis pernicioso* por frações do sobrenadante do isolado Ac26 fracionado em coluna de troca aniônica contendo a resina DEAE-Sepharose CL6B equilibrada em tampão Tris -HCl 25 mM pH 7,0. As moléculas foram eluídas no mesmo tampão e na ausência e presença de NaCl 1 M.

CONCLUSÕES GERAIS

- No filoplano de cacauzeiros há a presença de microrganismos que podem ser usados como antagonistas visando o biocontrole de doenças como a vassoura-de-bruxa e a podridão-parda;
- Bactérias do tipo actinomicetos foram muito superiores na inibição da germinação de propágulos infectivos do agente causal da vassoura-de-bruxa em comparação às bactérias endosporogênicas;
- A atividade antagônica exercida por actinomicetos independe do tipo de propágulo usado;
- O isolado Ac79 e o Isolado Ac26 ambos posicionados taxonomicamente no gênero *Streptomyces* foram os isolados que apresentaram os melhores isolados contra a vassoura-de-bruxa e podridão-parda, respectivamente;
- A aplicação dos dois isolados em mistura para o biocontrole da podridão-parda é incompatível, porém a aplicação dos sobrenadantes para o controle dessa doença apresenta resultados mais expressivos;
- Os melhores isolados selecionados produzem diferentes compostos envolvidos no biocontrole de doenças de plantas como sideróforos, ácido cianídrico e quitinases. Porém nenhuma dessas substâncias apresentou importante papel na inibição de basidiósporos de *C. perniciosa*.
- Os antagonistas, especialmente o isolado Ac26, são capazes de induzir resistência em mudas de cacauzeiro evidenciado pelo aumento da atividade de enzimas oxidativas. Porém a aplicação dos dois isolados em mistura essa mesma atividade não foi observada;
- Em ensaio de campo, sob condições de infecção natural, os dois isolados não foram capazes de proteger frutos de cacauzeiro contra a vassoura-de-bruxa e a podridão-parda;
- Os dois antagonistas Ac26 e Ac79 produzem substâncias antagônicas de baixo peso molecular. O isolado Ac26 produz substâncias com capacidade de inibir a germinação de basidiósporos com massa molecular entre 1 e 12 kDa enquanto o isolado Ac79 produz substâncias com essa mesma propriedade porém com massa molecular inferior a 1 kDa.