



**UTILIZAÇÃO DE FUNGOS ENDÓFITOS DO  
CACAUEIRO COMO BIOCONTROLADORES  
DA VASSOURA-DE-BRUXA**

**JULIÁN MAURICIO AGREDO HOYOS**

**2008**

**JULIÁN MAURICIO AGREDO HOYOS**

**UTILIZAÇÃO DE FUNGOS ENDÓFITOS DO CACAUEIRO COMO  
BIOCONTROLADORES DA VASSOURA-DE-BRUXA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Ludwig Heinrich Pfenning

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Agredo Hoyos, Julián Mauricio.

Utilização de fungos endófitos do cacauzeiro como biocontroladores da  
vassoura-de-bruxa / Julián Mauricio Agredo Hoyos. – Lavras : UFLA,  
2008.

51 p.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.

Bibliografia.

1. Fungos endófitos. 2. *Theobroma cacao*. 3. Biocontrole. 4. *Crinipellis  
perniciosa*. 5. Vassoura-de-bruxa. 6. Plântulas. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

CDD – 633.74942

**JULIÁN MAURICIO AGREDO HOYOS**

**UTILIZAÇÃO DE FUNGOS ENDÓFITOS DO CACAUEIRO COMO  
BIOCONTROLADORES DA VASSOURA-DE-BRUXA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2008

Dr. Marco Antonio Galeas Aguilar      CEPLAC - ESFIP

Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende      UFLA/DFP

Prof. Ludwig Heinrich Pfenning  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

A meus familiares, em especial a Dilia, minha mãe,  
que com amor incondicional,  
me impulsiona nesta trajetória de vida.

A minha esposa e companheira Camila,  
aquela doçura que com amor, alegria e compreensão,  
também perfuma estas humanas trilhas.

### **Dedico**

A todos aqueles que amam a Vida em sua totalidade,  
e sempre aproveitam qualquer oportunidade  
para agradecer, cantar ou orar,  
ao fazer de seu trabalho, ou ocupação  
uma irradiação de luz, honestidade, paz...

### **Ofereço**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade de realização do curso.

Ao professor Dr. Ludwig Pfenning pela orientação e paciência na realização do presente trabalho.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos, muito importantes na minha formação profissional.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Marco Antonio Galeas Aguilar e ao professor Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende, por participar da banca examinadora e pelas valiosas sugestões.

Aos Drs. Cristiano Lima e Anderson Almeida pelas sugestões e boa vontade.

Aos colegas do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos: Loise, Vivian, Juliano, Sarah, Miriam, Janine, Mário, Júnior, Natália, pelas sugestões e colaboração.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo: João, Jadir, Pedro, pelo apoio e sugestões.

A Ariana por tomar as fotomicrografias.

A Moisés pela colaboração nas atividades na casa de vegetação.

Ao professor Dr. José da Cruz Machado, Angela e Ellen do Laboratório de Patologia de Sementes, pelas sugestões.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia: Renata, Edinho, Rute, Bruno.

Aos amigos Belisário, Joseph, Artur, Teresita, Antonio, Luz Dary, José, Ana, por compartilhar seus conhecimentos, experiências, integridade.

A Ceplac, Itabuna, BA, pelas sementes cedidas.

A todos aqueles que colaboraram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPITULO 1 Vassoura-de-bruxa, a doença mais importante na cultura do cacau.....	1
1 Introdução Geral.....	2
2 Referencial Teórico.....	4
3 Referências bibliográficas.....	8
CAPITULO 2 Fungos endófitos do cacauero e seu potencial como biocontroladores da vassoura-de-bruxa ( <i>Crinipellis perniciosa</i> ).....	13
1 Resumo .....	14
2 Abstract.....	15
3 Introdução .....	16
4 Material e métodos.....	19
4.1 Área Experimental.....	19
4.2 Isolados de fungos endófitos.....	19
4.3 Experimento da atividade antifúngica <i>in vivo</i> .....	20
4.3.1 Obtenção de mudas livres de fungos.....	21
4.3.2 Isolamento para verificar a presença de fungos nas mudas.....	21
4.3.3 Propagação, inoculação de endófitos e de <i>C. perniciosa</i> e pulverização de ASM.....	22
4.4 Avaliação da doença.....	23
4.5 Delineamento experimental e análises estatística .....	23
4.6 Testes da atividade fungistática <i>in vitro</i> .....	23
5 Resultados e discussão.....	24
5.1 Experimento 1: atividade antifúngica <i>in vivo</i> com fungos endófitos do cacau da Bahia.....	24
5.2 Experimento 2: atividade antifúngica <i>in vivo</i> com fungos endófitos do cacau do Pará.....	25
5.3 Endófitos em mudas de cacau.....	27
5.4 Experimento da atividade antifúngica <i>in vitro</i> .....	30
6 Conclusões.....	33
7 Referências bibliográficas.....	34
CAPITULO 3 Fungos endófitos associados as primeiras etapas de desenvolvimento de plântulas de cacau ( <i>Theobroma cacao</i> ) .....	37
1 Resumo.....	38
2 Abstract .....	39
3 Introdução .....	40
4 Material e métodos .....	41

4.1 Obtenção de sementes germinadas e plântulas de cacau .....	41
4.2 Isolamento de fungos.....	41
4.2.1 Isolamento de endófitos de plântulas, primeiro e segundo par de folhas e meristema apical de mudas de cacau .....	41
5 Resultados e discussão.....	43
5.1 Colonização e diversidade de fungos.....	43
6 Conclusões.....	48
7 Referências bibliográficas.....	49
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51



## RESUMO

AGREDO HOYOS, Julián Mauricio. **Utilização de fungos endófitos do cacauero como biocontroladores da vassoura-de-bruxa**. 2008. 51 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.\*

A doença mais importante do cacauero, a vassoura-de-bruxa, é causada pelo fungo *C. pernicioso*, que reduz consideravelmente a produção de cacau, vem sendo tema de estudo nos últimos anos, destacando-se as pesquisas sobre controle biológico, principalmente mediante uso de fungos endófitos. Os objetivos da realização deste trabalho foram: i) avaliar fungos endófitos de cacau de dois estados do Brasil: Bahia e Pará, em sua habilidade para controlar a doença e ii) conhecer a presença ou ausência de fungos endófitos nas primeiras etapas de crescimento de plântulas de cacau. Os experimentos foram realizados em laboratórios e em casa de vegetação da Universidade Federal de Lavras. Os fungos foram inoculados na concentração de  $6 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . O experimento com endófitos da Bahia teve nove tratamentos: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Clonostachys rosea*, *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp., *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium semitectum*, coquetel (mistura dos seis fungos), testemunha inoculada e testemunha sem inocular. O experimento com endófitos de cacau do Pará teve sete tratamentos: *Pestalotiopsis* sp., *Clonostachys rosea*, *Fusarium subglutinans*, *Trichoderma* sp., acibenzolar-S-metil ASM (dose  $0,2 \text{ g/L}^{-1}$  de i.a.), testemunha inoculada e testemunha sem inocular. Avaliações da doença foram feitas aos 30, 45 e 60 dias após a inoculação de *C. pernicioso*. Verificou-se a presença de fungos nas mudas antes e depois da inoculação dos fungos endófitos. Em ensaio *in vitro*, testou-se a ação antagonista de *Trichoderma* sp., e de *C. rosea* contra *C. pernicioso*. Isolamentos de plântulas de cacau foram feitos para conhecer sua diversidade e frequência de fungos associados. O endófito *C. rosea* (do Pará) e o tratamento com ASM controlaram parcialmente a doença. Encontraram-se fungos nas mudas antes da inoculação dos endófitos; após da inoculação, o único endófito não reisolado foi *F. semitectum*. No ensaio *in vitro*, os fungos testados inibiram o crescimento de *C. pernicioso*. Das plântulas de cacau, os gêneros isolados com maior frequência foram *Trichoderma*, *Colletotrichum*, um Ascomiceto da família *Bionectriaceae* e *Fusarium*. Concluiu-se que *C. rosea* e ASM têm potencial para controlar a vassoura-de-bruxa e que existem fungos endófitos associados às primeiras fases de crescimento das plântulas de cacau.

---

\*Comitê de orientação: Ludwig Heinrich Pfenning - UFLA (Orientador), Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Co-orientador).

## ABSTRACT

AGREDO HOYOS, Julián Mauricio. **Use of endophytic fungi of cacao as biocontrol agents the witches' broom.** 2008. 51 p. Dissertation (Master in Phytopathology) – Federal University of Lavras, Lavras.\*

Witches' broom, the most damaging disease of cacao caused by the fungus *C. perniciosa*, considerably reduces the production of cacao and has been subject of study in recent years, such as research on biological control, mainly through use of endophytic fungi. The objectives of this work were: i) assess endophytic fungi of cacao from two states in Brazil: Bahia and Pará, in its ability to control the disease and ii) ascertain the presence or absence of fungal endophytes in the early stages of growth of cacao seedlings. The experiments were made in laboratories and in a greenhouse of Federal University of Lavras. The fungi were inoculated in the concentration of  $6 \times 10^6$  propagules  $\text{mL}^{-1}$ . The experiment with Bahia endophytes had nine treatments: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Clonostachys rosea*, *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp., *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium semitectum*, cocktail (the six fungi mix), and inoculated and without inoculated witness. The experiment with Pará endophytes had seven treatments: *Pestalotiopsis* sp., *Clonostachys rosea*, *Fusarium subglutinans*, *Trichoderma* sp., Acibenzolar-S-methyl ASM (dose  $0.2 \text{ g/L}^{-1}$  a.i.), and inoculated and without inoculated witness. Assessments of the disease were made at 30, 45 and 60 days after inoculation of *C. perniciosa*. It was the presence of fungi in the seedlings before and after inoculation of the endophytes fungi. The antagonistic action of *Trichoderma* sp. and *C. rosea* against *C. perniciosa* was assessed in an *in vitro* assay. Isolation of cacao seedlings to know their diversity and frequency of associated fungi were also made. The endophyte *C. rosea* (from Pará) and ASM treatment partially controlled the disease. Fungi were encountered in seedling before the inoculation of endophytes; after inoculation, *F. semitectum* was the only endophyte not reisolated. In the *in vitro* assay, the fungi tested inhibited the growth of *C. perniciosa*. In seedlings of cacao, the more frequently genera isolated were *Trichoderma*, *Colletotrichum*, an Ascomycete of *Bionectriaceae* family and *Fusarium*. It was concluded that *C. rosea* and ASM have the potential to control the witches' broom and that some endophytic fungi can be associated with the first stages of growth of common cacao seedlings.

---

\* Advising Committee: Ludwig Heinrich Pfenning - UFLA (Adviser), Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Co-adviser).

## **CAPÍTULO 1**

### **VASSOURA-DE-BRUXA: A DOENÇA MAIS IMPORTANTE NA CULTURA DO CACAU**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Até o começo da década de 1990, o Brasil foi o segundo maior produtor mundial de cacau (*Theobroma cacao* L., Malvaceae). Atualmente, a produção nacional é de 165 mil toneladas por ano, e o país ocupa apenas a quinta colocação.

Desde a chegada, em 1989, da vassoura-de-bruxa, a situação da cacauicultura no Sul da Bahia mudou drasticamente (Pereira et al., 1996). O agente causal *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer (Purdy & Schmidt, 1996) provocou rapidamente epidemias, devido às condições ambientais favoráveis, provocando, assim, redução de, aproximadamente, 75% na produção, aumentando consideravelmente os problemas socioeconômicos na região (Trevizan & Marques, 2004).

Hoje, na Bahia, principal região produtora de cacau, convive-se com a doença. Não obstante, são necessárias maiores pesquisas para o entendimento e o manejo da vassoura-de-bruxa. O controle químico da doença não pode ser recomendado em todas as situações, já que requer numerosas aplicações para ser efetivo (Purdy & Schmidt, 1996), tornando-se ambiental e economicamente insustentável. A Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), em seus vários anos de experiência, recomenda o manejo integrado mediante uso racional de fungicidas cúpricos e sistêmicos, a remoção de tecidos infectados, o controle biológico com *Hypocrea stromatica* (Bezerra, Costa & Bastos 2003) e o plantio de genótipos resistentes (Luz et al., 2006).

No que diz respeito aos custos de produção e aos custos ambientais, são imprescindíveis a pesquisa e o desenvolvimento de práticas de controle da doença eficientes e eficazes, que representem aumento da viabilidade econômica, conservação dos recursos naturais e produtos saudáveis.

Nos últimos anos, têm-se desenvolvido diversas pesquisas, direcionadas a descobrir ou a redescobrir métodos alternativos eficazes e viáveis para o manejo de *C. perniciosa*, além de serem econômica e ambientalmente desejáveis. Vários pesquisadores visam à busca de outros agentes biocontroladores das principais doenças do cacau, principalmente microrganismos endófitos, por estarem já incluídos nas plantas (Bailey et al., 2008; Krauss et al., 2006, Mejia et al., 2008; Rubini et al., 2005; Arnold, et al., 2003; Evans et al., 2003). Outro agente de controle é o acibenzolar-S-metil (ASM), indutor de resistência, que também tem apresentado bons resultados no controle de várias doenças em cacau.

Nesta perspectiva, se realizou este trabalho, em que fungos endófitos isolados de plantas de cacau em estado natural, no Pará e de plantas de agroecossistema no Sul da Bahia foram avaliados em casa de vegetação, como possíveis agentes de biocontrole da vassoura-de-bruxa. Observou-se também a necessidade de conhecer a presença ou a ausência de fungos endófitos nas primeiras etapas de crescimento de plântulas de cacau, visando aumentar a base de conhecimento para o desenvolvimento de produtos e processos alternativos para o controle da vassoura-de-bruxa.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### **Fungos endófitos**

Microrganismos endófitos são aqueles que colonizam e causam infecções assintomáticas nos tecidos das plantas sadias (Petrini et al., 1992; Wilson, 1995). Em árvores, acredita-se que os fungos endófitos as protegem por meio de um ou vários fenômenos, tais como antibiose, indução de resistência, micoparasitismo ou competição por espaço (Johnson & Whitney, 1992).

Os fungos endófitos consistem em três grupos ecológicos básicos: os fungos micorrízicos, os balansiaceos ou endófitos de gramíneas (Gramineae) e os não-balansiaceos. Em contrastes com os endófitos balansiaceos, os não-balansiaceos são diversos, tanto filogeneticamente quanto com respeito a sua estratégia de vida. A maioria destes fungos pertence ao Filo Ascomycota e tem sido isolada de todos os órgãos da maioria das plantas estudadas (Arnold et al., 2000; Petrini, 1991; Schulz & Boyle, 2005).

Os endófitos tropicais constituem, segundo Arnold & Herre (2003), um grupo diverso, mas pobremente conhecido. O estudo da ecologia dos endófitos nos sistemas naturais promete esclarecer as potenciais aplicações dos fungos endófitos nas atividades agrícolas e farmacêuticas e, além disso, papéis ecológicos, como interações fungo-planta em florestas tropicais e a importância dos simbiontes críticos na diversa comunidade de plantas.

Já nos agroecossistemas, os endófitos são importantes na proteção das plantas pela atuação direta sobre os patógenos e ou pelo aumento das respostas de defesa. Os simbiontes microbianos protetores das espécies vegetais determinam o seu sucesso ecológico, modificando as comunidades das plantas e as cadeias tróficas relacionadas (Selosse et al., 2004).

Adicionalmente, há trabalhos de pesquisa sobre a utilização de fungos não patogênicos controlando fungos patogênicos de grandes culturas (Bao &

Lazarovitz, 2001; Baayen et al., 2002). Isso se deve ao fato de alguns fungos expressarem diferentes modos de vida, dependendo da planta hospedeira e ou das condições ambientais.

De acordo com o modo de vida, os fungos podem aumentar (mutualismo), diminuir (parasitismo) ou não influenciar (comensalismo) o vigor e resistência das plantas. Como os fungos mutualistas colonizam o mesmo nicho ecológico dos fitopatógenos, esta característica os habilita para o uso em programas de controle alternativo ou biocontrole (Arnold et al., 2003; Baayen et al., 2002; Peixoto-Neto, et al. 2002; Azevedo et al., 2000; Redman et al., 2001; Rubini et al., 2005; Schulz & Boyle, 2005; Ganley et al., 2005; Chareprasert et al., 2006).

As três principais vertentes como objetos de estudo dos fungos endófitos são: (i) sua importância como segmento da diversidade biológica de fungos, considerando o ambiente altamente específico em que vivem (Cannon & Simmons 2002; Arnold et al., 2000; Suryanarayanan et al., 2002, 2003; Bayman & Gamboa, 2001; Rodrigues, 1994; Rodrigues & Petrini, 1996; Lodge et al., 1996); (ii) sua função na proteção das plantas e seu envolvimento em fenômenos de resistência a patógenos e pragas (Arnold et al., 2003; Redman et al., 2001; Rubini et al., 2005) e (iii) como produtores de metabólitos com atividade biológica com potencial para aproveitamento na agricultura e na medicina (Wiyakrutta et al., 2004; Schulz et al., 2002; Strobel, 2002; 2003).

### **Estudos de fungos endófitos em *Theobroma* spp**

Em estudos de endófitos e hiperparasitas de fungos associados com árvores nativas de *Theobroma gileri*, no Equador (Evans et al., 2003a, 2003b), foram feitos isolamentos de caules de mais de 80 espécies de hifomicetos (75% anamorfos de Hypocreales) e, da superfície de frutos, foram isoladas 28 espécies (entre Hypocreales e Basidiomycetes) em mais de 15 gêneros. Seis de sete

espécies selecionadas de caules e frutos mostraram-se endófitas e foram re-isoladas de mudas assintomáticas. Das 28 espécies de hiperparasitas, várias tiveram total colonização do pseudostroma de *Crinipellis roreri*, resultando em completa supressão do crescimento. Foi demonstrado que esses endófitos podem ser introduzidos em mudas de cacau sem disparar mecanismos de defesa e que alguns podem colonizar os meristemas e também poderiam atuar como mutualistas, estimulando a resistência a patógenos como *C. roreri*.

Em outro estudo, foi demonstrado o antagonismo de fungos endófitos do cacau sobre *Phytophthora* sp. (Arnold et al., 2003). Estes estudos receberam destaque na comunidade científica, pelo fato de terem postulado um importante papel que os fungos endófitos de plantas lenhosas exercem na sua proteção contra fitopatógenos, diminuindo consideravelmente os índices de incidência da doença em mudas previamente inoculadas com fungos endófitos (Clay, 2004).

Samuels et al., (2006) descobriram duas novas espécies endófitas de *Trichoderma* (*T. paucisporum* e *T. theobromicola*) em árvores nativas de *Theobroma cacao*, no Amazonas peruano e demonstraram, *in vitro* e em testes com frutos, que ambas têm um efeito antibiótico contra *Moniliophthora roreri*. Foi demonstrado que as espécies produzem ácido nonanóico (um inibidor da germinação de esporos de fitopatógenos), o que sugere que este metabólito poderia ser produzido na planta e contribuir para a indução de resistência à doença. Contudo, não puderam demonstrar o micoparasitismo *in vitro* dessas duas espécies. Foi sugerido também que hospedeiro e endófito co-evoluíram, tendo uma relação simbiótica. Em trabalho complementar, com novas espécies encontradas na bacia amazônica em árvores nativas de *Theobroma grandis*, foi demonstrado o potencial de espécies de *Trichoderma* como agentes de biocontrole de *C. perniciosus* em mudas de cacau (Holmes et al., 2004).

Crozier et al., (2006) obtiveram 854 isolados individuais de endófitos de tecido do caule e de frutos de *T. cacao*, em ecossistemas nativos e



agroecossistemas da América Latina e do oeste da África. Destes, 556 isolados (65%) não puderam ser identificados com as técnicas taxonômicas tradicionais e foram agrupados em 59 morfoespécies, sendo, em seguida, identificados por métodos moleculares mediante a extração de DNA e a análise da seqüência do rDNA.

A identificação preliminar compreendeu Ascomycetes e Basidiomycetes, este último com o maior grupo, com 42 isolados (morfoespécies) e 27 táxons diferentes. Os Basidiomycetes foram os mais promissores como fontes potenciais de agentes de biocontrole ao poder ocupar (competição) nichos ecológicos similares aos Basidiomycetes patógenos do cacau: *Moniliophthora roreri* e *C. Perniciosa*, além de produzir metabólitos bioativos que podem ser antagonistas a fungos ou a outros patógenos.

### **Resistência induzida**

É possível aumentar a resistência geral da planta quando os mecanismos de defesa, representados por barreiras bioquímicas e ou estruturais, são ativados mediante a resistência induzida (RI) (Oliveira et al., 1997). Essa resistência pode ser proporcionada por um agente indutor biótico ou abiótico que aciona mecanismos de defesa latentes na planta (Hammerschmidt & Kúc, 1982). O éster S-metil do ácido benzo-(1-2-3)-tiadiazole-7-carbotióico (acibenzolar-S-metil, ASM) foi o primeiro indutor de resistência sistêmica adquirida (SAR) liberado para uso comercial (Lyon & Newton, 1997).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOLD, A. E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G. S.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 267-274, July 2000.

ARNOLD, A. E.; MEJÍA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - PNAS**, Washington, v. 10, n. 26, p. 15649-15654, Dec. 2003.

ARNOLD A. E.; HERRE E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (malvaceae). **Mycologia**, New York, v. 95, n. 3, p. 388-398, May/June 2003.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAUJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, n. 3, p. 40-65, 2000.

BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G. C.; VAN DER A. A, H.A.; WERDT, M. DE.; BROUWESHAVEN, I. R. van; SCHUTTE, G. C.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; BLANCO, C. G. de; AZEVEDO, J. L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophytes of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 5, p. 464-477, May 2002.

BAO, J. R.; LAZAROVITS, G. Differential colonization of tomato roots by nonpathogenics and pathogenic *Fusarium oxysporum* strains may influence of fusarium wilt control. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, n. 5, p. 449-456, May 2001.

BAYMAN, P.; GAMBOA, M. A. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). **Biotropica**, St. Louis, v. 33, n. 2, p. 352-360, June 2001.

CANNON, P. F.; SIMMONS, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the iwokrama forest reserve, guyana. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 2, p. 210-220, Mar./Apr. 2002.

CLAY, K. Fungi and the food of the gods. **Nature**, London, v. 427, n. 6973, p. 401-402, Jan. 2004.

CROZIER, J.; THOMAS, S. E.; AIME, M. C.; EVANS, H. C.; HOLMES, K. A. Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies isolated from stems and pods of *Theobroma cacao*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, n. 6, p. 1449-1464, Nov. 2006.

CHAREPRASERT, S.; PIAPUKIEW, J.; THIENHIRUN, S.; WHALLEY, A. J. S.; SIHANONTH, P. Endophytic fungi of teak leaves *tectona grandis* L. and rain tree leaves *samanea saman* merr. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Catalunya, v. 22, n. 5, p. 481-486, 2006.

EVANS, H. C.; HOLMES, K. A.; THOMAS, S. E. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *theobroma gileri*, in ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. **Mycological Progress**, Tubingen, v. 2, n. 2, p. 149-160, May 2003a.

EVANS, H. C.; HOLMES, K. A.; REID, A. P. Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, n. 4, p. 476-485, Aug. 2003b.

GANLEY, R. J.; BRUNSFELD, S. J.; NEWCOMBE, G. A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, Washington, v. 101, n. 27, p. 10107-10112, Dec. 2005.

HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 20, n. 1, p. 61-71, 1982.

HOLMES, K. A.; SCHROERS, H. J.; THOMAS, S. E.; EVANS, H. C.; SAMUELS, G. J. Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *trichoderma* from the amazon basin of south america. **Mycological Progress**, Tubingen, v. 3, n. 2, p. 199-210, Aug. 2004.

JOHNSON, J. A.; WHITNEY, N. J. Isolation of fungal endophytes from black spruce (*picea mariana*) dormant buds and needles from new brunswick, canada. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v. 70, n. 9, p. 1754–1757, Sept. 1992.

LODGE, D. J.; FISHER P. J.; SUTTON B. C. Endophytic fungi of *manilkara bidentata* leaves in puerto rico. **Mycologia**, New York, v. 88, n. 5, p. 733-738, Sept./Oct. 1996.

LUZ, E. D. M. N.; SOUZA, J. T.; OLIVEIRA, M. L.; BEZERRA, J. L.; ALBUQUERQUE, P. S. B. **Vassoura-de-bruxa do cacauero: novos enfoques sobre uma velha doença. em: revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: Wilmar C. Luz, 2006. v. 14, p. 59-111.

LYON, G. D.; NEWTON, A. C. Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 636-641, Oct. 1997.

OLIVEIRA, R. F.; PASCHLATI, S. F.; LEITE, B. Papilla formation and peroxidase activity in mimosa scrabella hypocotyls inoculated with the non-pathogen colletotrichum graminicola. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 195-197, mar./abr. 1997.

PEIXOTO-NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 5, n. 29, p. 62-77, 2002.

PEREIRA, J. L. A.; ALMEIDA, L. C. C.; SANTOS, S. M. Witche's broom disease of cocoa in bahia: attempts at eradication and containment. **Crop Protection**, Oxford, v. 15, n. 8, p. 743-752, Dec. 1996.

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

REDMAN, R. S.; DUNIGAN, D. D.; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? **New Phytologist**, Cambridge, v. 151, n. 3, p. 705-716, Sept. 2001.

RODRIGUES, K. F. The foliar fungal endophytes of the amazonian palm *euterpe oleracea*. **Mycologia**, New York, v. 86, n. 3, p. 376-385, May/June 1994.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches broom disease. **International Journal Biological Science**, New Walles, v. 1, p. 24-33, 2005.

SAMUELS, G. J.; SUAREZ, C.; KARINA, S.; HOLMES, K. A.; THOMAS, E.; ISMAIEL, A.; EVANS, H.C. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America. **Mycological Research**, Cambridge, v. 110, n. 4, p. 381-392, Apr. 2006.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.; KROHN, K. ENDOPHYTIC FUNGI: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, n. 9, p. 996–1004, Sept. 2002.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. Review the endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, n. 6, p. 661–686, June 2005.

SELOSSE, M. A.; BAUDOIN, E.; VANDENKOORNHUYSE. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 327, n. 7, p. 639-648, July 2004.

STROBEL, G. A.; DIRKSE, E.; SEARS, J.; MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *muscodor albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, Reading, v. 147, n. 11, p. 2943–2950, Nov. 2001.

STROBEL, G. A. Endophytes As Sources Of Bioactive Products. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 535–544, 2003.

SURYANARAYANAN, T. S.; MURALI, T. S.; VENKATESAN, G. Ocurrent and distribution of fungal endophytes in tropical forest cross a rainfall gradient. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v. 80, n. 8, p. 818-826, Aug. 2002.

SURYANARAYANAN, T. S.; VENKATESAN, G.; MURALI, T. S.  
Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns. **Current Science**, Bangalore, v. 85, n. 4, p. 25, Aug. 2003.

TREVIZAN, S. D. P.; MARQUES, M. Impactos socioeconômicos da crise do cacau: um estudo de comunidade-caso. **Agrotropica**, Ilhéus, v. 14, n. 3, p. 127-136, set./dez. 2004.

WILSON, D. Endophyte—the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, Copenhagen, v. 73, n. 2, p. 274–276, June 1995.

WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; PANPHUT, W.; THONGON, N.; DANWISSETKANJANA, K.; RUANGRUNGSI, N.; MEEVOOTISOM, V.  
Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Catalunya, v. 20, p. 265–272, 2004.

## CAPÍTULO 2

### **FUNGOS ENDÓFITOS DO CACAUEIRO E SEU POTENCIAL COMO BIOCONTROLADORES DA VASSOURA-DE-BRUXA (*Crinipellis perniciosa*)**

## 1 RESUMO

AGREDO HOYOS, Julián Mauricio. **Fungos endófitos do cacau e seu potencial como biocontroladores da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*)**. 2008. 51 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.\*

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar fungos endófitos de cacau de dois estados do Brasil, Bahia e Pará, em sua habilidade para controlar a vassoura-de-bruxa em mudas de cacau cultivar Catongo. Os fungos foram inoculados na concentração de  $6 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>. O experimento com endófitos da Bahia teve nove tratamentos: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Clonostachys rosea*, *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp., *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium semitectum*, coquetel (dos seis fungos), testemunha inoculada e testemunha sem inocular. O experimento com endófitos de cacau do Pará teve sete tratamentos: *Pestalotiopsis* sp., *Clonostachys rosea*, *Fusarium subglutinans*, *Trichoderma* sp., acibenzolar-S-metil ASM (dose 0,2 g/L<sup>-1</sup> de i.a.), testemunha inoculada e testemunha sem inocular. Avaliações da doença foram feitas aos 30, 45 e 60 dias após da inoculação de *C. perniciosa*. Verificou-se a presença de fungos na mudas antes e depois da inoculação dos fungos endófitos. Em ensaio *in vitro*, testou-se a ação antagônica de *Trichoderma* sp. e *C. rosea* contra *C. perniciosa*. No experimento com endófitos de cacau da Bahia, o tratamento com *Fusarium semitectum* apresentou a menor incidência da doença (49,7%). No experimento com endófitos de cacau do Pará, os tratamentos *Clonostachys rosea* e ASM proporcionaram menores incidências 45,83% e 29,7% respectivamente e foram significativos a 5%. Os fungos encontrados nas mudas antes da inoculação dos endófitos foram: *Acremonium* sp., *Clonostachys rosea*, *Cylindrocladium* sp., *Fusarium decemcellulare*, *F. solani*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Trichoderma* sp. Após a inoculação dos endófitos, o único endófito não reisolado foi *F. semitectum*. No ensaio *in vitro*, os fungos testados inibiram o crescimento de *C. perniciosa*. Concluiu-se que os tratamentos *Clonostachys rosea* e ASM controlaram parcialmente a vassoura-de-bruxa, em mudas de cacau em casa de vegetação.

---

\*Comitê de orientação: Ludwig Heinrich Pfenning - UFLA (Orientador), Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Co-orientador).



## ABSTRACT

AGREDO HOYOS, Julián Mauricio. **Endophytic fungi of cacao and its potential as biocontrol agents of witches' broom (*Crinipellis pernicios*a).** 2008. 51 p. Dissertation (Master in Phytopathology) – Federal University of Lavras, Lavras.\*

This study was taken for the purpose of evaluating, and determining the ability to control witches' broom with endophytic fungi in cacao originating from two states of Brazil, Bahia and Pará. The fungi were inoculated in the concentration of  $6 \times 10^6$  propagules  $\text{mL}^{-1}$ . The experiment with Bahia endophytes had nine treatments: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Clonostachys rosea*, *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp., *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium semitectum*, cocktail (the six fungi mix), and inoculated and without inoculated witness. The experiment with Pará endophytes had seven treatments: *Pestalotiopsis* sp., *Clonostachys rosea*, *Fusarium subglutinans*, *Trichoderma* sp., Acibenzolar-S-methyl ASM (dose  $0.2 \text{ g/L}^{-1}$  a.i.), and inoculated and without inoculated witness. Assessments of the disease were made at 30, 45 and 60 days after inoculation of *C. pernicios*a. It was the presence of fungi in the seedlings before and after inoculation of the endophytes fungi. In assay *in vitro*, tried to antagonistic action of *Trichoderma* sp. and *C. rosea* against *C. pernicios*a. In the experiment with Bahia endophytes, neither treatment showed to control the disease. In the experiment with Pará endophytes, treatments *Clonostachys rosea* and ASM provided minor incidence of witches' broom 45.83% and 29.7% respectively and were significant at 5%. The fungus found in seedlings before inoculation of endophytes were: *Acremonium* sp., *Clonostachys rosea*, *Cylindrocladium* sp., *Fusarium decemcellulare*, *F. solani*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Trichoderma* sp. After inoculation of endophytes, *F. semitectum* the only endophyte was not reisolated. In the *in vitro* assay, the fungi tested inhibited the growth of *C. pernicios*a. It was concluded that the treatments *Clonostachys rosea* and ASM controlled partly of a witches' broom in cacao seedlings in greenhouse.

---

\* Advising Committee: Ludwig Heinrich Pfenning - UFLA (Adviser), Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Co-adviser).

### 3 INTRODUÇÃO

Devido à crescente demanda de seus subprodutos, o cultivo do cacau está se expandindo. No presente século, essa cultura ainda apresenta escassez de modernização em muitos aspectos de seu manejo, afetando negativamente o modo de vida dos produtores de cacau e o ambiente (Cooke, 2001).

Com relação às doenças que incidem na produção de cacau, destaca-se a vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, que teve uma explosiva disseminação nas lavouras do sul da Bahia, a partir de 1989 (Ferreira, 1997). As perdas de divisas em função da queda na produção continuam sendo extremamente prejudiciais para o Sul da Bahia, principal zona cacauera do país. Por este motivo, a contínua pesquisa visando à obtenção de novas tecnologias de combate à doença é imprescindível para a sustentação econômica e ambiental da produção de cacau. Atualmente, as medidas recomendadas para o controle da vassoura-de-bruxa preconizam a necessidade de um manejo integrado da doença envolvendo métodos de controle cultural, químico, biológico e genético. Nesse contexto, pesquisas vêm sendo realizadas para encontrar métodos alternativos eficientes e eficazes que representem aumento da viabilidade econômica e preservação do ambiente.

Fungos endófitos são uma alternativa econômica e natural para o biocontrole de doenças em plantas. São biologicamente diversos, mas todos compartilham da característica de colonizar internamente o tecido da planta sem causar dano ao seu hospedeiro (Wilson, 1995). Acredita-se que, em árvores, os fungos endófitos as protegem por meio de um ou vários fenômenos, tais como: antibiose, indução de resistência, micoparasitismo ou competição por espaço (Johnson & Whitney, 1992). Em agroecossistemas, os fungos endófitos também

são importantes na proteção das plantas pela atuação direta sobre os patógenos e ou pelo aumento das respostas de defesa (Selosse et al., 2004).

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidas diversas pesquisas com agentes biocontroladores das principais doenças do cacau, principalmente com fungos endófitos por estarem já incluídos nas plantas. Em estudos de endófitos associados com árvores nativas de *Theobroma gileri*, no Equador, foram feitos isolamentos de caules de mais de 80 espécies de hifomicetos e, da superfície de frutos, foram isoladas 28 espécies em mais de 15 gêneros. Seis de sete espécies selecionadas de caules e frutos mostraram-se endófitas e foram re-isoladas de mudas assintomáticas. Das 28 espécies de hiperparasitas, várias tiveram total colonização do pseudostroma de *Crinipellis roreri* (*Moniliophthora roreri*), resultando em completa supressão do crescimento. Foi demonstrado que esses endófitos podem ser introduzidos em mudas de cacau (*Theobroma cacao*) sem disparar mecanismos de defesa e que alguns podem colonizar os meristemas, e também poderiam atuar como mutualistas estimulando a resistência a patógenos como *C. roreri* (Evans et al., 2003a, 2003b).

Em outra pesquisa, foi demonstrado o antagonismo de fungos endófitos do cacau sobre *Phytophthora* sp. (Arnold et al., 2003). Este estudo recebeu destaque internacional pelo fato de ter postulado um importante papel que os fungos endófitos de plantas lenhosas exercem na sua proteção contra fitopatógenos, diminuindo consideravelmente a incidência da doença em mudas previamente inoculadas com fungos endófitos (Clay, 2004).

Foram descobertas duas novas espécies endófitas de *Trichoderma* (*T. paucisporum* e *T. theobromicola*), em árvores nativas de *Theobroma cacao* no Amazonas peruano e demonstraram, *in vitro* e em testes com frutos, que ambas têm um efeito antibiótico contra *Moniliophthora roreri*. Foi comprovado que as espécies produzem ácido nonanóico (um inibidor da germinação de esporos de fitopatógenos), o que sugere que este metabólito poderia ser produzido na planta

e contribuir para a indução de resistência à doença. Contudo, não pôde ser demonstrado o micoparasitismo *in vitro* dessas duas espécies. Foi sugerido também que hospedeiro e endófito co-evoluíram, tendo uma relação simbiótica (Samuels et al., 2006). Em trabalho complementar, com novas espécies encontradas na bacia amazônica em árvores nativas de *Theobroma grandis*, foi demonstrado o potencial de espécies de *Trichoderma* como agentes de biocontrole de *C. pernicioso* em mudas de cacau (Holmes et al., 2004).

Crozier et al. (2006) obtiveram 854 isolados individuais de endófitos de tecido do caule e de frutos de *T. cacao*, em ecossistemas nativos e agroecossistemas da América Latina e do oeste da África. Destes, 556 isolados (65%) não puderam ser identificados com as técnicas taxonômicas tradicionais e foram agrupados em 59 morfoespécies, sendo, em seguida, identificados por métodos moleculares mediante extração de DNA e análise da sequência do rDNA. A identificação preliminar compreendeu Ascomycetes e Basidiomycetes. Estes últimos foram os mais promissores como fontes potenciais de agentes de biocontrole ao ocuparem (competição) nichos ecológicos similares aos Basidiomycetes patógenos do cacau, *Moniliophthora roreri* e *C. Pernicioso*, além de produzir metabólitos bioativos que podem ser antagônicos a fungos ou outros patógenos.

Neste contexto, foi realizado este estudo com os seguintes objetivos (i) identificar fungos endófitos, obtidos de cacauzeiros da Bahia e do Pará, capazes de atuar como biocontroladores da vassoura-de-bruxa (*C. pernicioso*) em mudas de (*T. cacao*); (ii) isolar e identificar espécies de fungos endófitos em mudas de cacau, antes e depois da inoculação de endófitos e (iii) testar a atividade antifúngica *in vitro* contra *C. pernicioso*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Área experimental

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Sistemática e Ecologia de Fungos e de Fisiologia do Parasitismo e em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

### 4.2 Isolados de fungos endófitos

Fungos endófitos recuperados de material de cacau da Bahia e do Pará, mais freqüentemente isolados em trabalho preliminar e depositados na Coleção Micológica de Lavras (CML), foram selecionados como potenciais biocontroladores de *Crinipellis pernicioso*.

As coletas de material de cacau foram realizadas em áreas experimentais da Ceplac-Cepec, em Itabuna, Bahia e em Belém, Pará. As coletas foram realizadas em maio e agosto de 2007, respectivamente. Tomaram-se amostras aleatórias de seis árvores sadias, distanciadas uma da outra, no mínimo, de 40 m. Retiraram-se, de cada árvore, dois galhos plagiotrópicos (ramos laterais produtivos) de, aproximadamente, 1 m de comprimento e foram armazenados em embalagens de papel e devidamente identificados. Nas amostras do Pará (dos galhos cortaram-se suas folhas e o ápice, os extremos foram cobertos com parafina para diminuir o secamento), cada árvore pertence a uma variedade diferente de cacau: SCA6, MA15, CAB0017, MO1, RB40 e CAB 0270.

Nos isolamentos do material da Bahia, realizou-se prévia desinfestação superficial mediante lavagens sucessivas em água de torneira, etanol 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2% por 1 minuto e enxágüe em água destilada estéril. Foram retirados discos de folha de 5 mm de diâmetro e fragmentos de

haste de, aproximadamente, 3 mm<sup>3</sup> e colocados em placas de Petri de 90mm de diâmetro contendo meio MA2%, acrescido de 50 mg/L de cloranfenicol (Sigma), sulfato de estreptomicina (50 mg/L), e 10 mg/L de ciclosporina A (Sigma). No material de Pará, os galhos foram desinfestados com algodão embebido em etanol 70%. Depois, com a ajuda de bisturi, levantou-se a casca e raspou-se tanto na parte interna da casca como na parte superficial do caule. As serragens foram transferidas para placas de Petri, nas mesmas condições das placas com material vegetal da Bahia.

#### 4.3 Experimento da atividade antifúngica *in vivo*

Os fungos endófitos escolhidos foram testados em sua habilidade e eficácia para controlar *C. pernicioso* em mudas, em casa de vegetação. As inoculações foram realizadas por pulverização de cada endófito e em coquetel<sup>1</sup>, de acordo a metodologia utilizada por Arnold et al., (2003). Duas testemunhas foram utilizadas: uma inoculada somente com *C. pernicioso* e outra sem inoculação. Dois experimentos foram realizados. No primeiro, foram utilizados fungos endófitos da Bahia e, no segundo, fungos endófitos do Pará (Tabela 1).

**TABELA 1.** Tratamentos dos experimentos 1 e 2

Experimento 1		Experimento 2
1. <i>C. gloeosporioides</i> *	8. Testemunha inoculada *	1. <i>Clonostachys rosea</i> *
2. <i>C. acutatum</i> *	9. Testemunha absoluta	2. <i>Trichoderma sp.</i> *
3. <i>Trichoderma sp</i> *		3. <i>Pestalotiopsis sp.</i> *
4. <i>Fusarium semitectum</i> *		4. <i>Fusarium subglutinans</i> *
5. <i>Clonostachys rosea</i> *		5. ASM *
6. <i>Cladosporium sp.</i> *		6. Testemunha inoculada *
7. Coquetel dos 6 fungos *		7. Testemunha absoluta

\* Inoculadas com *Crinipellis pernicioso*

<sup>1</sup>Coquetel: realizou-se mistura uniforme da suspensão de esporos de cada um dos seis fungos inoculados e pulverizou-se como um tratamento a mais.

#### **4.3.1 Obtenção de mudas livres de fungos**

Utilizaram-se sementes de cacau (*T. cacao*), cultivar Catongo, provenientes de autofecundação, cedidas pelo Centro de Pesquisas do Cacau, CEPEC-CEPLAC, Itabuna, BA. As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto. As mudas foram cultivadas em casa de vegetação, em bandejas de isopor contendo o substrato Plantmax<sup>®</sup> e fertilizadas semanalmente com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950), aplicada no substrato.

Durante os experimentos, as mudas foram mantidas em câmara de crescimento vegetal com temperatura de  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa em torno de 80%, controladas por meio de sistema automatizado de nebulização.

#### **4.3.2 Isolamento para verificar a presença de fungos nas mudas**

Após 28 dias, folhas de 10% das mudas foram amostradas para confirmar se estavam livres de fungos endófitos. A metodologia para a obtenção da maior diversidade possível de fungos endófitos e para o mais fiel registro da frequência de colonização dos tecidos incluiu procedimentos descritos por Arnold et., al. (2003) e Rubini et., al. (2005).

Para a desinfestação do material vegetal, este foi lavado seqüencialmente em água de torneira, etanol 70%, por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2%, durante 1 minuto e enxágüe em água destilada estéril. Uma vez realizada a desinfestação superficial, discos de 5 mm de diâmetro foram retirados das folhas com um furador de papel esterilizado. Um bisturi esterilizado foi utilizado para a obtenção de fragmentos de  $3\text{ mm}^3$ . Cinco fragmentos (folha ou de haste) foram transferidos por placa de Petri de poliestireno de 90 mm de diâmetro, contendo meio MA2% acrescido de  $50\text{ mg.L}^{-1}$  de cloranfenicol (Sigma), sulfato de estreptomicina ( $50\text{ mg.L}^{-1}$ ), para

suprimir crescimento de bactérias e 10 mg.L<sup>-1</sup> de ciclosporina A (Sigma), para impedir que fungos de crescimento rápido crescessem sobre os de crescimento lento. No total, foram utilizados 80 fragmentos em 16 placas.

#### **4.3.3 Propagação, inoculação de endófitos e de *C. pernicioso* e pulverização de ASM**

Fungos endófitos: os fungos escolhidos foram cultivados em meio MA2%, a 25°C, por 15 dias e fotoperíodo de 12 horas de luz, 12 horas de escuro. Em seguida, 10 mL de água destilada estéril foram aplicados sobre as placas com os fungos esporulados e raspou-se com uma alça de Drigalsky. As suspensões foram filtradas, a concentração ajustada a 6 x 10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup> e pulverizadas sobre as folhas das mudas de cacau. Durante 24 horas após a inoculação, a umidade relativa foi mantida próximo a 100%, para favorecer a germinação e a penetração dos esporos. A confirmação da colonização das folhas pelos endófitos foi realizada 13 dias após a inoculação. Para isso, coletaram-se folhas de 10% das mudas inoculadas e o isolamento foi feito conforme descrito anteriormente.

*Crinipellis pernicioso*: o inóculo (isolado MA25) foi obtido a partir de vassouras infectadas (ramos secos) provenientes de Ilhéus, BA. As vassouras se mantiveram no “vassoureiro” (câmara indutora da produção de basidiomas), sob regime de nebulização periódica para induzir a formação de basidiomas. Os basidiósporos foram coletados e misturados em solução de glicerol a 16%, de acordo com Frias et al., (1995) e armazenados em nitrogênio líquido para posterior uso. Na inoculação, foi depositada, no meristema apical de cada muda, uma gota da suspensão na concentração de 1 x 10<sup>5</sup> basidiósporos viáveis mL<sup>-1</sup> 15 dias após a inoculação dos fungos endófitos. A viabilidade dos basidiósporos foi quantificada antes e depois da inoculação.



ASM: o tratamento com o produto comercial à base de acibenzolar-S-metil (Bion ®) foi aplicado aos 8 dias antes da inoculação do patógeno, via pulverização foliar. Utilizou-se a dosagem de 0,2 g.L<sup>-1</sup> de i.a.

#### **4.4 Avaliação da doença**

Após as inoculações de *C. Perniciosa*, avaliou-se a incidência da doença nas mudas, aos 30, 45 e 60 dias.

#### **4.5 Delineamento experimental e análises estatísticas**

Os experimentos em casa de vegetação foram instalados no delineamento de blocos completamente casualizados, com 4 repetições, utilizando parcelas de 12 plantas cada. Aos dados obtidos se aplicou a análise de variância e o teste de médias Scott-Knott (1974).

#### **4.6 Testes da atividade fungistática *in vitro***

Com este experimento, foi verificado se os melhores tratamentos do experimento anterior possuem efeito tóxico direto sobre o crescimento de *C. perniciosa*. Para isso, discos de micélio de *C. Perniciosa*, de 5 mm de diâmetro, foram inoculados em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo MA2% e incubadas a 25°C±1, com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Após cinco dias, os fungos endófitos foram inoculados a uma distancia de 50 mm da colônia de *C. perniciosa*. O efeito tóxico direto foi detectado pela formação de um halo de inibição. Também foi estudada a interação do(s) fungo(s) antagonista(s) *versus C. perniciosa*, mediante microscopia eletrônica de varredura (microscópio LEO Evo-40), realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UFLA.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Experimento 1: atividade antifúngica *in vivo* com fungos endófitos do cacau da Bahia

Na avaliação aos 60 dias, nenhum dos tratamentos controlou a doença, e não apresentaram diferença significativa entre eles, a 5% (Tabela 2).

**TABELA 2:** Incidência da doença aos 60 dias

Tratamentos	Incidência da vassoura-de-bruxa aos 60 dias (%)*
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	72,91 b
<i>C. acutatum</i>	68,33 b
<i>Cladosporium</i> sp.	78,33 b
<i>Clonostachys rosea</i>	80,41 b
<i>Trichoderma</i> sp.	71,55 b
<i>Fusarium semitectum</i>	47,91 b
Coquetel	70,83 b
Testemunha inoculada	81,06 b

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 50% de significância. Dados transformados para  $\sqrt{x + 0,5}$

Os seis fungos endófitos de cacau da Bahia selecionados por sua alta frequência de isolamento ou por sua capacidade antagonica contra *C. pernicioso*, não apresentaram controle da doença. Já que ao serem removidos dos habitats originais os hospedeiros perdem fungos endófitos que coevoluiram com eles (Taylor et al., 1999), e / ou pelas complexas interações entre endófito-hospedeiro-patógeno-ambiente (Rodrigues & Redman, 1997; Cannon & Simmons, 2002; Bailey et al., 2006; Schulz, et al. 1999), as plantas ficam sem seus protetores ou estes perdem ou diminuem sua habilidade antagonista contra os patógenos.

## 5.2 Experimento 2: atividade antifúngica *in vivo* com fungos endófitos do cacau do Pará

Aos 60 dias, verificou-se que os tratamentos *Clonostachys rosea* e ASM apresentaram as menores incidências, com valores de 45% e 29,7%, respectivamente e foram significativos, a 5% (Tabela 3).

**TABELA 3:** Incidência da doença, aos 60 dias.

Tratamentos	Incidência vassoura-de-bruxa aos 60 dias (%)
<i>Fusarium subglutinans</i>	70,83 b
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	70,84 b
<i>Trichoderma</i> sp.	64,58 b
<i>Clonostachys rosea</i>	45,83 a
ASM	29,73 a
Testemunha inoculada	64,17 b

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância. Dados transformados para  $\sqrt{x + 0,5}$

Neste experimento, os tratamentos com ASM e *C. rosea* reduziram a incidência da vassoura-de-bruxa em 70,27% e 54,17%, respectivamente, em relação aos outros tratamentos. A ação do ASM como indutor de resistência em plântulas de cacauero suscetíveis à murcha-de-verticillium, foi comprovada por Resende & Cavalcanti (2004). Em outro estudo, Resende et al., (2002) encontraram que as repostas de defesa devido a ASM foram dependentes ao genótipo do hospedeiro. E, em tomateiro, o tratamento com ASM induziu resistência de plântulas contra *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. O aumento da resistência foi associado ao incremento das atividades da peroxidase e da quitinase (Baysal et al., 2003).

Quanto a *Clonostachys rosea*, vários pesquisadores também obtiveram resultados importantes. Por exemplo, Rubini et al., (2005) relataram que o fungo *Gliocladium catenulatum*, sinônimo de *C. rosea*, em condições de casa de

vegetação, conseguiu reduzir a incidência da vassoura-de-bruxa em 70%. Krauss e Soberanis (2001) também tiveram sucesso parcial no controle de doenças do cacau utilizando isolados de *C. rosea*. Em estudo com endófitos isolados de *Theobroma gileri*, no Equador, os isolados de *Clonostachys* que co-evoluíram com o hospedeiro foram muito eficientes na inibição da infecção e da colonização de *Crinipellis roreri* nos frutos em comparação aos isolados do Peru (Evans, et al., 2003). Isto comprova o postulado central do controle biológico clássico, segundo o qual os melhores agentes de biocontrole são aqueles que co-evoluíram com os “inimigos” naturais do hospedeiro (Mitchell & Power, 2003). Portanto, existe perda progressiva de endófitos específicos ou que co-evoluíram com seus hospedeiros, ao serem removidos estes dos seus habitats (Taylor et al., 1999).

Considerando que o cacau (*T. cacao*) é originário da bacia amazônica (Cuatrecasas, 1964; Motomayor et al., 2002), para se obter melhores resultados com o uso de fungos endófitos no biocontrole da vassoura-de-bruxa, seria necessário obter isolados de plantas de cacau nativo, na selva amazônica e, então, realizar seleção e avaliação dos fungos.

É importante também, ter em conta que a interação das espécies de endófitos com o hospedeiro vai depender das condições ambientais (Cannon & Simmons, 2002; Arnold et al., 2003; Rodrigues & Redman, 1997), da interação bioquímica endófito-hospedeiro (Schulz, et al., 1999), da interação genética endófito-hospedeiro (Bailey et al., 2006). Por isso, dos tratamentos com maior sucesso no controle da doença, estudar qual o mecanismo de inibição de infecção do patógeno, se é direto (competição, antibiose ou hiperparasitismo) ou indireto, mediante indução de resistência e, neste caso, caracterizar os mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa.

Porém, para construir efetivas estratégias de biocontrole, é necessário compreender corretamente os padrões ecológicos da interação endófito-

hospedeiro e identificar os mecanismos responsáveis das interações entre endófitos, fitopatógenos e hospedeiros (Herre et al., 2007; Rodriguez & Redman, 1997). Tudo este trabalho, representa a parte inicial da pesquisa. Sugere-se combinar estudos ecológicos e estudos *in vitro* que ajudem a identificar isolados de fungos endófitos com potencial como agentes de biocontrole e testá-los, primeiro em condições de casa de vegetação e depois em campo (Mejía et al., 2008).

### 5.3 Endófitos em mudas de cacau

Em isolamentos realizados em fragmentos de folhas e hastes de mudas de 28 dias de idade, infectadas naturalmente, se recuperaram os fungos *Acremonium* sp., *Clonostachys rosea*, *Cylindrocladium* sp., *Fusarium solani*, *Fusarium decemcellulare* e *Lasiodiplodia theobromae*, e um micélio estéril (Tabela 4). Dos seis gêneros, cinco representam anamorfos de Hypocreales nos gêneros *Acremonium*, *Clonostachys*, *Cylindrocladium*, *Fusarium* e *Trichoderma*; o outro gênero pertence aos Dothideales, representado por *L. theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl., estado assexual de *Botryosphaeria rhodina* (Berk. & M.A. Curtis) Arx.

**TABELA 4:** Fungos endófitos isolados de mudas de cacau sem inocular

Fungos	Tecido	
	Folha	Haste
<i>Acremonium</i> sp.	+	-
<i>Clonostachys rosea</i>	-	+
<i>Cylindrocladium</i> sp.	-	+
<i>Fusarium solani</i>	+	+
<i>Fusarium decemcellulare</i>	-	+
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	-	+
Micélio estéril	+	-
<i>Trichoderma</i> sp.	-	+

Arnold et al., (2003) constataram a presença de fungos endófitos em mais de 82% das amostras de folhas de mudas de cacau infectadas naturalmente. Em contraste, as amostras de folhas de mudas crescidas sob condições protegidas apresentaram fungos endófitos em menos de 1%. Os autores afirmam que estes dados, mais a enorme quantidade de inóculo (propágulos) no ar, são forte evidência de que os endófitos associados com *T. cacao* são transmitidos horizontalmente (Arnold & Herre, 2003).

Em relação a *Lasiodiplodia theobromae*, afirma-se que este fungo cosmopolita, de ampla distribuição mundial, sem especialização por hospedeiro e com natureza endófito mas que pode produzir sintomas só em pós-colheita, requer estratégias para seu manejo (Mohali et al., 2005). Este fungo coloniza plantas saudáveis sem mostrar sintomas.

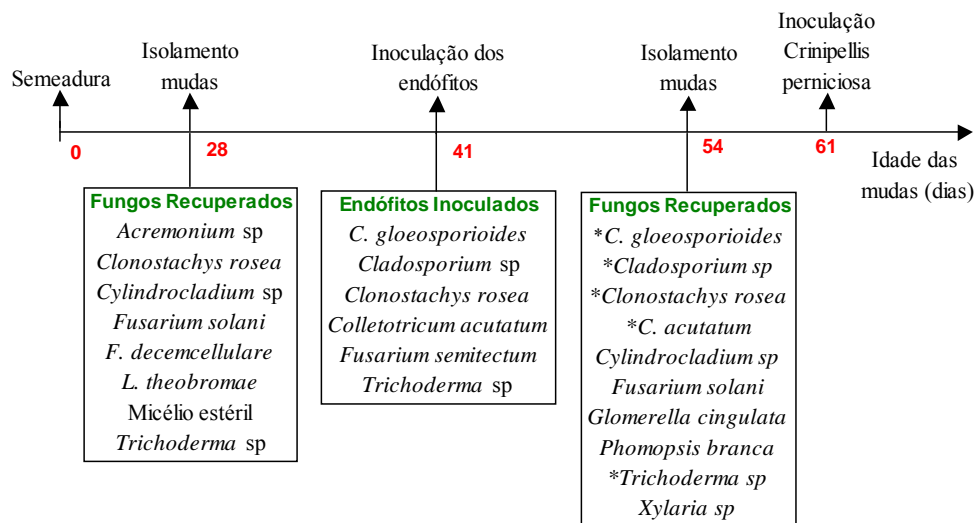
Na árvore *Cornus florida*, encontrou-se que *L. theobromae* pode ser isolado de todas as plantas inoculadas, mas sintomas, como cancras, só são manifestados em condições de estresse (Mullen et al., 1991). No caso de *Cylindrocladium* sp., este fungo habitante do solo pode ter vindo com o substrato no qual cresceram as mudas de cacau.

Treze dias depois da inoculação nas mudas dos seis fungos endófitos selecionados (e sete dias antes da inoculação de *C. pernicioso*), foram re-isolados das mudas *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cladosporium* sp., *Clonostachys rosea*, *Colletotrichum acutatum* e *Trichoderma* sp. O único fungo não re-isolado foi *Fusarium semitectum*. Foram recuperados outros fungos, como *Cylindrocladium* sp., *Fusarium solani*, *Glomerella cingulata*, *Phomopsis* sp., e *Xylaria* sp. Dentre os gêneros com taxa de isolamento maior que 1%, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Xylaria* e *Clonostachys* foram os mais frequentes (Tabela 5).

**TABELA 5:** Taxa de isolamento de mudas de cacau inoculadas com endófitos, com frequência de isolamento total >1%.

<b>Fungos nas mudas inoculadas</b>	<b>Freqüência</b>	<b>TI (%)</b>
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	78	27.8
<i>Cladosporium</i> sp.	9	3.2
<i>Clonostachys rosea</i>	16	5.7
<i>Colletotricum acutatum</i>	33	11.8
<i>Cylindrocladium</i> sp.	7	2.5
<i>Fusarium solani</i>	9	3.2
<i>Glomerella cingulata</i>	13	4.6
<i>Phomopsis</i> sp.	36	12.8
<i>Trichoderma</i> sp.	4	1.4
<i>Xylaria</i> sp.	34	12.1

Pode-se observar que *Clonostachys rosea* foi isolado das mudas antes e depois da inoculação dos fungos endófitos (Figura 1), o qual pode sugerir que este fungo precisa de uma maior concentração de inóculo para exercer ação antagonica contra *C. pernicioso*, já que foi o único fungo que controlou parcialmente a doença em condições de casa de vegetação. Krauss e Soberanis (2001), encontraram que ao serem inoculados vários isolados de *C. rosea*, se obteve maior controle das três principais doenças do cacau: *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora*, *Moniliophthora roreri*. No caso de *Trichoderma* sp., que também foi isolado antes da inoculação dos endófitos, no apresentou antagonismo com o patógeno.

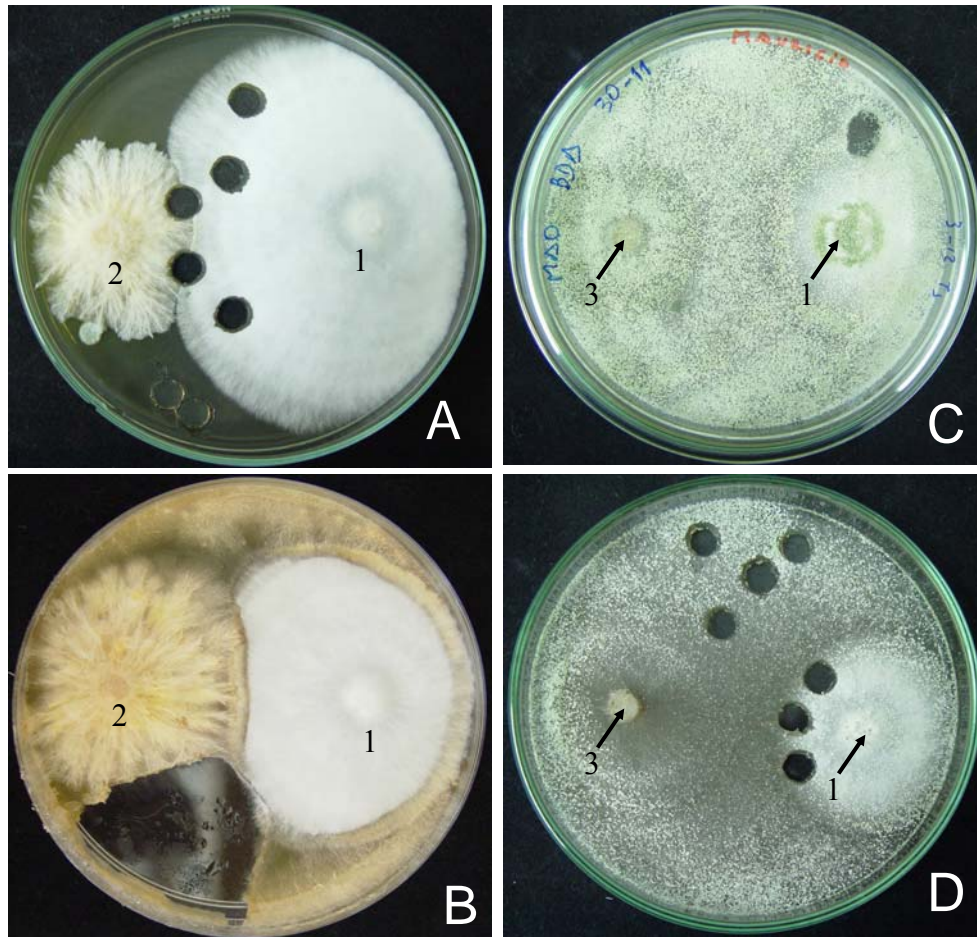


**FIGURA 1:** Fungos isolados de mudas de cacau, antes e depois da inoculação de fungos endófitos de cacau da Bahia.  
 \*Fungos endófitos inoculados que foram reisolados

#### 5.4 Experimento da atividade antifúngica *in vitro*

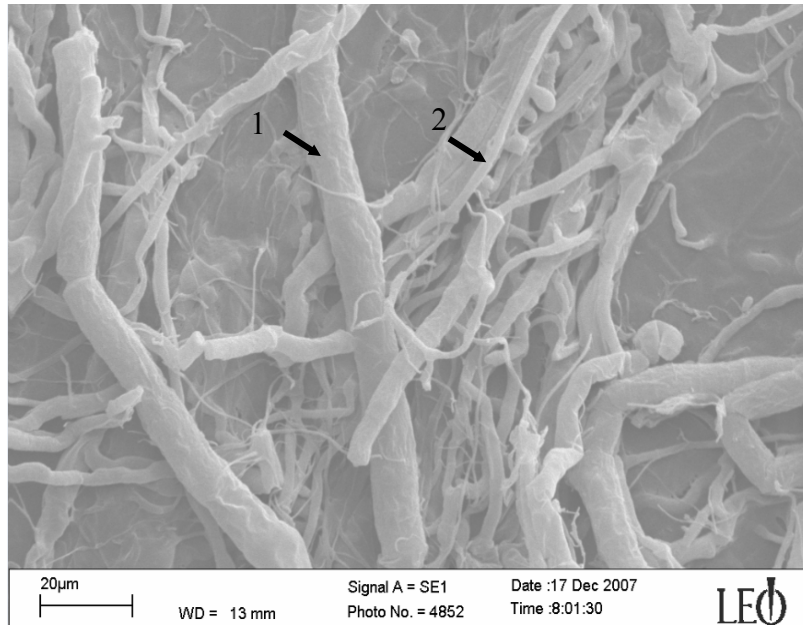
Nas placas não se observou a presença de halo inibindo o crescimento de *C. Perniciosus*. O que se verificou foi a competição por substrato, tendo *Trichoderma* sp. e *Clonostachys rosea*, colocados cinco dias após que o patógeno, se desenvolveram-se mais. No caso de *Trichoderma* sp., este cobriu toda a colônia de *Crinipellis*, impedindo seu crescimento e, no caso de *C. rosea*, este cercou o patógeno e influenciou o seu desenvolvimento (Figura 2).





**FIGURA 2:** Antagonismo de fungos endófitos contra *C. perniciosa*. A e B, interação entre *C. perniciosa* (1) e *C. rosea* (2). C e D, interação entre *C. perniciosa* (1) e *Trichoderma* sp (1).

Constatou-se, em microscopia eletrônica de varredura, que existe interação entre os fungos *Trichoderma* sp. e *C. Perniciosa*. Foi observado que há maior presença de hifas do fungo antagonista parecendo parasitar o basidiomiceto, uma vez que competem pelo substrato. Também um menor número de hifas de *C. perniciosa* foi observado no tratamento com *Trichoderma* sp. (Figura 3).



**FIGURA 3:** Fotomicrografia mostrando a interação entre os fungos *Trichoderma* sp. (1) e *C. perniciosus* (2).

É importante aprofundar o estudo com *Trichoderma* sp. para conhecer o processo mediante o qual exerce ação antagonista sobre o patógeno. Em estudos de biocontrole realizados por vários pesquisadores com espécies de *Trichoderma*, obtiveram-se resultados promissores. Isolados de *Trichoderma ovalisporum*, inibiram completamente o crescimento de *Crinipellis roreri* *in vitro* (Holmes et al., 2004). De maneira similar, *Trichoderma harzianum* e *Clonostachys rósea*, isolados de frutos de *Theobroma gileri*, em ensaio *in vitro*, suprimiram completamente o crescimento de *Crinipellis roreri* (Evans et al., 2003). Diversas espécies de *Trichoderma* sp. foram agressivas ao hiperparasitar completamente as colônias de *Moniliophthora roreri*, até o ponto de não poder recuperar o patógeno (Bailey et al., 2008).

## 6 CONCLUSÕES

- Os tratamentos com *Clonostachys rosea* e ASM, controlaram a doença parcialmente.
- Os fungos *Clonostachys rosea* e *Trichoderma* sp. inibiram o crescimento de *Crinipellis perniciososa in vitro*, por competição com o substrato.
- Foram encontrados fungos nas mudas antes de ser inoculadas com os fungos endófitos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOLD, A. E.; MEJIA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, Washington, v. 10, n. 26, p. 15649-15654, Dec. 2003.

ARNOLD, A. E., HERRE, E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, New York, v. 95, n. 3, p. 14388-14398, May/June 2007.

BAILEY, B.A.; BAE, H.; STREM, M. D.; ROBERTS, D. P.; THOMAS, S. E.; CROZIER, J.; SAMUELS, G. J.; CHOI, I. Y.; HOLMES, K. A. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. **Planta**, Berlin, v. 224, n. 6, p. 1149-1164, Nov. 2006.

BAYSAL, O.; SOYLU, E. M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *Michiganensis*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, n. 6, p. 747-753, Dec. 2003.

CAVALCANTI, L. S.; RESENDE, M. L. V. Efeito da Época de Aplicação e Dosagem do Acibenzolar- S-Metil na Indução de Resistência à Murcha-de-Verticillium em Cacaueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 67-71, jan./fev. 2004.

COOKE, L. Conference and Travel Reports. **The Newsletter of the British Society for Plant Pathology**, n. 38, Spring, 2001.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contributions from the United States National Herbarium**, Washington, v. 35, n. 6, p. 379-614, 1964.

EVANS, H. C.; HOLMES, K. A.; THOMAS, S. E. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. **Mycological Progress**, Tubingen, n. 2, p. 149-16 160, May 2003.

FERREIRA, L.T. Cacau. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 3, p 20-24, nov./dez. 1997.

FRIAS, G. A.; PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. An inoculation method for evaluate resistance of cocoa to *Crinipellis pernicioso*. **Plant Disease**, St Paul, v. 79: 787-791, 1995.

FROLICH, J.; HYDE, K.; PETRINI, O. Endophytic fungi asociated with palms. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 10, p. 1202-1212, Oct. 2000.

HERRE, E. A.; MEJIA, L. C.; KYLLO, D. A.; ROJAS, E.; MAYNARD, Z.; BUTLER, A.; VAN BAEL, S. A. Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. **Ecology**, Washington, v. 88, n. 3, 550-558, Mar. 2007.

HOLMES, K. A.; SCHROERS, H. J.; THOMAS, S. E.; EVANS, H. C.; SAMUELS, G. J. Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin in South America. **Mycological Progress**, Tubingen, n. 3, p. 199-210, 2004.

KRAUSS, U.; SOBERANIS, W. Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. **Biological Control**, San Diego, v. 22, n. 2, p. 149–158, Oct. 2001.

MEJÍA, L. C.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; BAEL, S. V.; ARNOLD, A. E.; HEBBAR, P.; SAMUELS, G. J.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens, **Biological Control**, San Diego, 2008. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.012.

MITCHELL, C. E.; POWER, A. G. Release of invasive plants from fungal and viral pathogens. **Nature**, London, n. 6923, p. 625-627, Feb. 2003.

MOTOMAYOR, J. C.; RISTERUCCI, A. M.; LOPEZ, P. A.; ORTIZ, C. F.; MORENO, A.; LANAUD, C. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. **Heredity**, London, v. 89, n. 5, p. 380-386, Nov. 2002.

MOHALI, S.; BURGESS, T. I.; WINGFIELD, M. J. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. **Forest Pathology**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 385–396, Dec. 2005.

MULLEN, J. M.; GILLIAM, C. H.; HAGEN, A. K.; MORGAN JONES, G. 1991: *Lasiodiplodia theobromae* canker of dogwood, a disease influenced by drought stress or cultivar selection. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, n. 9, p. 886–889, Sept. 1991.

RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; CAVALCANTI, L. S.; AGUIAR, M. A. G.; SILVA, L. H. C. P.; PEREZ, J. O.; ANDRADE, G. C. G.; CARVALHO, G. A.; CASTRO, R. M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by Acibenzolar S-Methyl (ASM). **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 621 – 628, Oct. 2002.

RODRIGUEZ, R. J.; REDMAN, R. S. Fungal life-styles and ecosystem dynamics: biological aspects of plant pathogens, plant endophytes and saprophytes. **Advances in Botanical Research**, New York, v. 24, p. 169-193, 1997.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Moniliophthora pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal Biological Science**, New York, v. 1, n. 3, p. 24-33, 2005. Disponível em: <<http://www.biolsci.org/v01p0024.htm>>

SCHULZ, B.; ROMMERT, A. K.; DAMMANN, U.; AUST, H. J.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism?. **Mycological Research**, New York, v. 103, n. 10, p. 1275-1283, Oct. 1999.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. Review the endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, n. 6, p. 661–686, Dec. 2005.

TAYLOR, J. K.; HYDE, K. D.; JONES, E. B. G. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. **New Phytologist**, Cambridge, v. 142, n. 2, p. 335-346, 1999.

## **CAPITULO 3**

### **FUNGOS ENDÓFITOS ASSOCIADOS ÀS PRIMEIRAS ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE CACAU (*Theobroma cacao*)**

## 1 RESUMO

AGREDO HOYOS, Julián Mauricio. **Fungos endófitos associados às primeiras etapas de desenvolvimento de plântulas de cacau (*Theobroma cacao*)**. 2008. 51 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.\*

A existência de fungos endófitos nas fases iniciais do crescimento das plântulas é um campo de estudo para a determinação de condições de manutenção destes endófitos até a fase adulta da planta inibindo a manifestação de fungos patógenos. Coletaram-se frutos maduros de cacau comum e selecionaram-se 150 sementes. Para o isolamento de plântulas de nove dias de idade, foram selecionadas 8 plântulas; para o isolamento de fungos do primeiro e do segundo par de folhas e meristema apical, selecionaram-se 10 plântulas de 21, 34 e 38 dias de idade, respectivamente. Determinaram-se a taxa de colonização total (TC) e a taxa de isolamento (TI). A taxa de colonização total nas plântulas de nove dias de idade foi de 42,8% e a taxa de colonização das folhas e meristemas foi de 41,2%. A diversidade de fungos compreende 8 gêneros e 12 espécies. Os gêneros isolados com maior frequência foram *Colletotrichum*, *Fusarium*, um Ascomiceto da família *Bionectriaceae* e *Trichoderma* sp. Do material de cacau dos germinados, recuperaram-se 4 espécies e das folhas e meristemas, 12. Apesar da baixa diversidade de fungos endófitos recuperados, alguns deles são apontados como potenciais agentes de biocontrole, tais como *Trichoderma* sp. e *Colletotrichum*.

---

\*Comitê de orientação: Ludwig Heinrich Pfenning - UFLA (Orientador),  
Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Co-orientador).



## 2 ABSTRACT

AGREDO HOYOS, Julián Mauricio. **Endophytic fungi associated with the first stages of development of cacao's seedlings (*Theobroma cacao*)**. 2008. 51 p. Dissertation (Master in Phytopathology) Federal University of Lavras, Lavras.\*

The existence of endophytic fungi in the early stages of growth of seedlings is a field of study for the determination of conditions of maintenance of these endophytes to the adult phase of the plant inhibiting the expression of fungal pathogens. Collected ripe fruits of cacao common and selected 150 seeds. Seedlings of 9, 21, 34 and 38 days of age were selected for the fungal isolation. The total colonization rate, and the isolation rate, was. The total colonization rate in seedlings of nine days of age was 42.8% and in the leaves and meristems was 41.2%. The fungi diversity comprises eight genera and twelve species. The more frequently isolated genera were *Colletotrichum*, *Fusarium*, an Ascomycete of *Bionectriaceae* family and *Trichoderma*. Of cacao seedlings, it is recovered four species and of leaves and meristems, twelve. Despite the low diversity of endophytic fungi recovered, some of them are mentioned as potential biocontrol agents, such as *Trichoderma* sp., and *Colletotrichum*.

---

\* Advising Committee: Ludwig Heinrich Pfenning - UFLA (Adviser),  
Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Co-adviser).

### 3 INTRODUÇÃO

Alguns fungos endófitos podem atuar como biocontroladores de patógenos em diversas plantas, ao conferir resistência a inimigos naturais (Clay, 1990). A existência de fungos endófitos nas fases iniciais do desenvolvimento das sementes é um campo de estudo para a determinação de condições de manutenção destes endófitos até a fase adulta da planta, podendo inibir a manifestação de fungos patógenos.

A infecção de sementes por endófitos, saprófitos e patógenos pode ocorrer nos estados de pré- e pós-dispersão; infecções pré-dispersão de endófitos podem ter importantes conseqüências para a persistência das sementes no solo, ao conferir aumento da resistência a patógenos. Em cacau, folhas e frutos, acumulam-se diversos esporos de endófitos que se encontram no ambiente; os tecidos são rapidamente colonizados em um período entre 2–3 semanas (Arnold & Engelbrecht, 2007; Arnold et al., 2003a; Arnold et al. 2003b).

O interior dos tecidos de plantas abriga uma grande diversidade de fungos capazes de colonizar órgãos aéreos e subterrâneos, vivendo em uma relação de simbiose, a depender da planta hospedeira e ou das condições climáticas, os fungos podem aumentar (mutualismo), diminuir (parasitismo) ou não influenciar (comensalismo) na estrutura da planta. Estes fungos endófitos podem atuar como controladores de fungos patógenos. Desse modo, objetivou-se, com este estudo, determinar a existência de fungos endófitos nas primeiras etapas de desenvolvimento de plântulas de cacau.

Neste estudo, foram testadas as hipóteses de (i) que os fungos endófitos associados a plântulas de cacau (*T. cacao*) são transmitidos horizontalmente e (ii) que a diversidade e freqüência dos fungos endófitos variam em função do tipo de órgão (sementes, folhas ou meristemas).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção de sementes germinadas e plântulas de cacau**

Foram coletados oito frutos maduros de cacau comum, em outubro de 2007, na Universidade Federal de Lavras (UFLA), extraíram-se as sementes e a mucilagem foi retirada manualmente. Foram selecionadas 150 sementes, as quais foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1%, por 1 minuto. As sementes foram semeadas em bandeja de isopor contendo substrato Plantmax<sup>®</sup>, mantidas à temperatura de 25±3°C e umidade relativa em torno de 80%, controladas por um sistema automatizado de nebulização, em casa de vegetação da UFLA.

### **4.2 Isolamento de fungos**

A metodologia para a obtenção da maior diversidade possível de fungos endófitos e para o mais fiel registro da frequência de colonização dos tecidos incluiu procedimentos descritos por Arnold et al. (2003) e Rubini et al. (2005).

#### **4.2.1 Isolamento de endófitos de plântulas, primeiro e segundo par de folhas e meristema apical de mudas**

Para a desinfestação do material vegetal, este foi lavado seqüencialmente em água de torneira, etanol 70%, por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2%, durante 1 minuto e enxagüe em água destilada estéril. Para o isolamento, foram selecionadas 8 plântulas com 9 dias de idade. Após a desinfestação superficial, em condições assépticas, foram removidos com bisturi os cotilédones, as radículas e as raízes das plântulas. Fragmentos de cada uma das partes de 1-2 mm<sup>3</sup> foram cortados. Em seguida, transferiram-se sete fragmentos por placa Petri de poliestireno de 90 mm de diâmetro. De cada plântula, montou-se uma placa com fragmentos de cotilédones, uma placa com

fragmentos de radículas e uma placa com fragmentos de raízes. No total, foram 24 placas com 168 fragmentos.

Para o isolamento de fungos do primeiro e do segundo par de folhas e meristema apical, foram selecionadas 10 plântulas de 21, 34 e 38 dias de idade, respectivamente. Uma vez desinfestadas, foram cortados fragmentos de, aproximadamente, 2 mm, sendo colocados sete fragmentos por placa. Foram utilizadas 12 placas e 84 fragmentos para cada um dos 3 isolamentos, perfazendo um total de 36 placas com 252 fragmentos.

Todas as placas continham meio MA2% acrescido de 50 mg.L<sup>-1</sup> de cloranfenicol (Sigma), sulfato de estreptomicina (50 mg.L<sup>-1</sup>), para suprimir crescimento de bactérias e 10 mg.L<sup>-1</sup> de ciclosporina A (Sigma), para impedir que fungos de rápido crescimento se sobrepusessem aos de crescimento lento.

As placas de Petri foram mantidas à temperatura ambiente (~25°C). No total, foram analisados 420 fragmentos. As colônias de fungos recuperadas foram transferidas para placas com MA2% sem antibióticos, para identificação. Foram realizadas avaliações, periodicamente, durante 30 dias. Determinou-se a taxa de colonização total (TC) de acordo com Petrini et al. (1982), segundo a fórmula:

$$TC = \frac{\text{Número total de discos de folha ou fragmentos de haste na amostra com mais de 1 isolado}}{\text{Número total de discos de folha ou fragmentos de haste na amostra}}$$

A taxa de isolamento (TI) também foi calculada. Esta é utilizada, principalmente, como medida da riqueza de fungos em um dado local/planta/tecido, calculada com base na fórmula de Frolich et al. (2000), apresentada a seguir:

$$TI = \frac{\text{Número total de isolados obtidos em uma dada amostra}}{\text{Número total de discos de folha ou fragmentos de haste na amostra}}$$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Colonização e diversidade de fungos

De um total de 420 fragmentos, foram recuperadas 178 unidades formadoras de colônias (UFCs), sendo 168 fragmentos das plântulas e 252 fragmentos dos 1º e 2º par de folhas e meristemas. Nas plântulas, a taxa de colonização total foi de 42,8%. Mais de 10% dos fragmentos apresentaram colonização por pelo menos um fungo e apenas dois fragmentos (1,2%) foram colonizados por dois fungos. Nenhum fragmento foi colonizado por mais de dois fungos (Tabela 1).

**TABELA 1:** Taxa de colonização e número de fragmentos de cotilédones, radículas e raízes colonizadas por fungos endófitos.

Item	Plântulas			Total
	Cotilédones	Radículas	Raízes	
Nº. total de fragmentos	56	56	56	168
Nº. fragmentos $\geq$ 1 UFC	46	20	6	72
Taxa de colonização (%)	82,1	35,8	10,7	42,8
Nº. fragmentos 1 UFC	46	20	6	72
Nº. fragmentos 2 UFC	0	2	0	2
Nº. fragmentos $>$ 2 UFC	0	0	0	0
Nº. total de UFC	46	22	6	74

Do tecido de cotilédone, se obteve a maior taxa de colonização (82%). Como é sabido, este tecido funciona como reserva de nutrientes da semente, o que o torna atrativo para a infecção por fungos que possam instalar-se aí.

A taxa de colonização das folhas e meristemas foi de 41,2%. Mais de 33% dos fragmentos estavam colonizados por, pelo menos, um fungo e quatro fragmentos (1,6%), por dois fungos. Nenhum fragmento foi colonizado por mais de dois fungos (Tabela 2).

**TABELA 2:** Taxa de colonização e número de fragmentos de 1° e 2° par de folhas e meristemas de plântulas de cacau, colonizados por fungos endófitos.

Item	1 par de folhas	2 par de folhas	Meristemas	Total
No. total de fragmentos	84	84	84	252
No. fragmentos $\geq$ 1 UFC	38	28	38	104
Taxa de colonização (%)	45,2	33,3	45,2	41,2
No. fragmentos 1 UFC	37	26	37	100
No. fragmentos 2 UFC	1	2	1	4
No. fragmentos $>$ 2 UFC	0	0	0	0
No. total de UFC	38	28	38	104

Ao contrário das plântulas, a taxa de colonização não teve grande variação, o que pode indicar certa uniformidade na química e na física do substrato, pois fatores como a composição química e a topografia, entre outros, podem influenciar as vias de transmissão e infecção, bem como a especificidade da interação (Cannon & Simmons, 2002; Rodrigues e Petrini, 1996).

Do total de UFCs obtidas, 168 (94,3%) formaram estruturas reprodutivas e 10 (5,7%) se desenvolveram como micélios estéreis. A diversidade de fungos compreendeu oito gêneros e doze espécies, sem contar os morfotipos estéreis. Os gêneros isolados com maior frequência foram *Colletotrichum*, *Fusarium*, um Ascomyceto da família *Bionectriaceae* e

*Trichoderma* sp. Das plântulas de cacau comum, foram recuperadas quatro espécies e das folhas e meristemas, doze espécies (Tabelas 3 e 4).

**TABELA 3:** Taxa de isolamento de fungos endófitos de cotilédones, radículas e raízes com frequência de isolamento total >1%

Fungos	Cotilédones		Radículas		Raízes		Total Geral
	Frequência	TI (%)	Frequência	TI (%)	Frequência	TI (%)	
<i>Trichoderma</i> sp. 1	33	58,9	14	25	1	1,8	28,6
<i>Trichoderma</i> sp. 2	6	10,7	3	5,3	2	3,6	6,5
Micélio estéril branco	3	5,3	2	3,6	3	16,1	4,7
<i>Fusarium</i> sp.1	2	3,6	1	1,8	0	0	1,8
<i>Fusarium</i> sp. 2	2	3,6	2	3,6	0	0	2,4

**TABELA 4:** Taxa de isolamento de fungos endófitos 1° e 2° par de folhas e meristemas de plântulas com frequência isolamento total >1%

Fungos	1 par de folhas		2 par de folhas		Meristemas		Total Geral
	Frequência	TI (%)	Frequência	TI (%)	Frequência	TI (%)	
<i>C. gloeosporioides</i>	23	27,4	19	22,6	9	10,7	20,2
<i>Trichoderma</i> sp. 1	4	4,7	1	1,2	0	0	2,0
<i>Clonostachys rosea</i>	2	2,3	2	2,3	0	0	1,5
<i>Fusarium solani</i>	3	3,6	1	1,2	0	0	1,6
<i>Fusarium</i> sp. 2	3	3,6	1	1,2	10	11,9	5,6
Micélio estéril branco	1	1,2	1	1,2	0	0	0,8
<i>Cladosporium</i> sp.	1	1,2	0	0	0	0	0,4
<i>Periconia bysoides</i>	1	1,2	0	0	0	0	0,4
<i>Fusarium</i> sp. 3	0	0	2	2,3	0	0	0,8
<i>Fusarium</i> sp. 4	0	0	1	1,2	0	0	0,4
<i>C. acutatum</i>	0	0	0	0	4	4,7	1,6
Ascomyceto familia							
<i>Bionectriaceae</i>	0	0	0	0	14	16,6	5,5
<i>Glomerella cingulata</i>	0	0	0	0	1	1,2	0,4

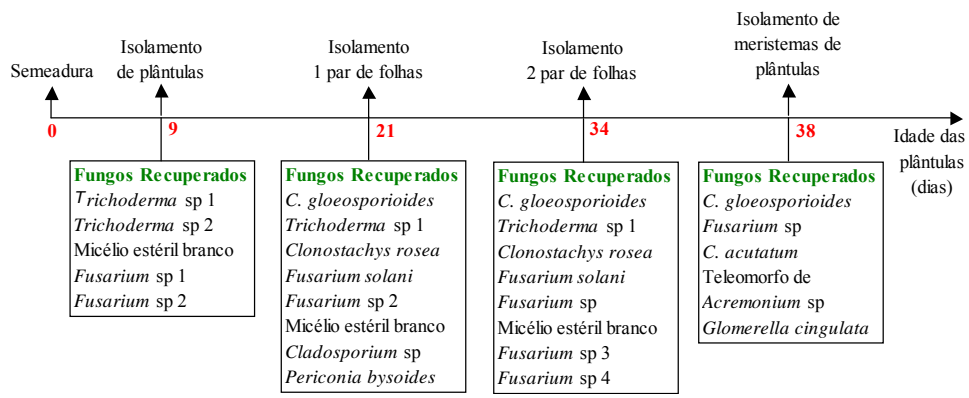
Da mesma maneira que se observou anteriormente, a química e a topografia do substrato e também a idade dos tecidos (Cannon & Simmons, 2002; Rodrigues e Petrini, 1996) afetam a diversidade e a frequência de fungos. Nas folhas e meristemas, encontrou-se maior biodiversidade de fungos que nas plântulas.

Encontraram-se também os dois grupos diferentes de endófitos observados em *Theobroma cacao* e *Theobroma gileri*, o primeiro em folhas (Herre et al., 2005) e o segundo em troncos de árvores (Evans et al., 2003; Crozier et al., 2006). Os endófitos encontrados em folhas geralmente são reconhecidos como fungos habitantes de folhas e ramos, como, por exemplo, *Colletotrichum*, *Botryosphaeria*, *Xylaria* e *Phomopsis*, enquanto os endófitos dominantes nos troncos de árvores, geralmente, se reconhecem como fungos de solo, como *Clonostachys* e *Trichoderma*. O ascomiceto da família *Bionectriaceae*, isolado frequentemente (16,6%) nos meristemas, seria incluído no segundo grupo (habitantes do solo).

Alguns dos fungos encontrados nas plântulas de cacau são reportados como potenciais agentes de controle biológico *C. gloeosporioides*, *Trichoderma* sp. e *C. rosea* (Arnold et al., 2003; Rubini et al., 2005; Evans et al., 2003; Mejia et al., 2008). Portanto, é necessário aprofundar os estudos sobre as interações endófito-hospedeiro-patógeno, levando-se em conta os estágios de desenvolvimento desde semente a muda.

O resumo dos fungos recuperados nas diversas etapas de crescimento das plântulas de cacau registra-se na Figura 1. Os gêneros isolados mais frequentemente nas diversas idades das plântulas de cacau foram *Fusarium*, *Trichoderma* e *Colletotrichum*.





**FIGURA 1:** Fungos endófitos isolados de plântulas de cacau comum em vários estágios de crescimento.

## 6 CONCLUSÕES

- ✓ Existem fungos endófitos no interior dos tecidos de plântulas de cacau comum.
- ✓ Os gêneros *Trichoderma*, *Colletotrichum* e *Fusarium* apresentaram a maior taxa de isolamento.
- ✓ A maior taxa de colonização se obteve nos cotilédones (>80%) e a menor, nas raízes (10%).
- ✓ Alguns fungos encontrados nas primeiras etapas de desenvolvimento das plântulas poderiam ser agentes de biocontrole.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOLD, A. E., HERRE, E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, New York, v. 95, n. 3, p. 14388-14398, May/June 2007.

ARNOLD, A.E.; MEJIA, L.C.; KYLLO, D.; ROJAS, E.I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N. & HERRE, E.A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. 2003. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, Washington, 26: 15649-15654.

ARNOLD, E.; ENGELBRECHT, B. M. J. Fungal endophytes nearly double minimum leaf conductance in seedlings of a neotropical tree species. Short communication. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 23, n. 3, p. 369–372, May 2007.

CANNON, P. F.; SIMMONS, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 2, p. 210-220, Mar./Apr. 2002.

CLAY, K. Fungal endophytes of grasses. **Annual Review of Ecology and Systematics**. Palo Alto, v. 21, p. 275-297. 1990.

EVANS, H. C.; HOLMES, K. A.; THOMAS, S. E. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. **Mycological Progress**, Tubingen, n. 2, p. 149-160, May 2003.

FROLICH, J.; HYDE, K.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with palms. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 10, p. 1202-1212, Oct. 2000.

HERRE, E. A.; BAEL, S. A. van, MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; BISCHOFF, J.; ARNOLD, A. E.; ROJAS, E.; MEJÍA, L. C.; CORDERO, R. A.; WOODWARD, C.; KYLLO, D. A. Tropical plants as chimera: some implications of foliar endophytic fungi for the study of host plant defense, physiology, and genetics. In: BURSLEM, D. F. R. P.; PINARD, M. A.; HARTLEY, S. E. (Eds.). **Biotic Interactions in the Tropics: Their Role in the Maintenance of Species Diversity**. Cambridge: University Press, 2005. p. 226-237.

MEJÍA, L. C.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; BAEL, S. V.; ARNOLD, A. E.; HEBBAR, P.; SAMUELS, G. J.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens, **Biological Control**, San Diego, 2008. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.012.

PETRINI, O.; STONE, J.; CARROLL, F. E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: A preliminary study. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 60, n. 6, p. 789-796, June 1982.

RODRIGUES, K. F.; PETRINI, O. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. In: HYDE K. D. (Ed.). **Biodiversity of tropical microfungi**. Hong Kong: Hong Kong University, 1996. p. 57-69.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Moniliophthora perniciosa*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal Biology Science**, New York, n. 1, p. 24-33, 2005.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Qual a estratégia efetiva de biocontrole?

Primeiro, obter isolados de fungos endófitos de cacau nativo, na selva, após realizar avaliação e seleção dos fungos potenciais. Dos fungos com maior sucesso, estudar qual(is) o(s) mecanismo(s) de inibição, se é direto pode ser por competição, antibiose ou hiperparasitismo, se é indireto, por resistência induzida, neste caso, deve-se caracterizar os mecanismos bioquímicos envolvidos. É fundamental, também, compreender os padrões ecológicos da interação endófito-hospedeiro, identificar os mecanismos das interações endófito-patógeno-hospedeiro. Isto representa o começo do trabalho. Sugere-se combinar estudos ecológicos e estudos *in vitro* que ajudem a identificar agentes potenciais para biocontrole e testá-los (Herre et al., 2007; Rodriguez e Redman, 1997; Mejía et al., 2008).