

NOTAS CIENTÍFICAS

Inibição da germinação de basidiósporos de *Crinipellis pernicioso* por compostos voláteis produzidos por cinco actinomicetos residentes de filoplano de cacauero

Dirceu Macagnan^{1*}; Reginaldo da Silva Romeiro^{2*} & Alan William Vilela Pomella³

¹Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Verde, Rodovia Sul Goiana Km 01 Caixa postal 66 CEP 75.901-970 Rio Verde-GO dirceu.macagnan@yahoo.com.br. ²Universidade Federal de Viçosa -Departamento de Fitopatologia, 36571-000 Viçosa-MG. ³Almirante Cacau, Cx.P. 55 CEP 45630-000 Barro Preto-BA. Parte da tese de doutorado do primeiro autor. Universidade Federal de Viçosa. (2005). *Bolsistas do CNPq

Autor para correspondência: Dirceu Macagnan

Data de chegada: 09/11/2005. Aceito para publicação em: 10/01/2007

1276

RESUMO

Macagnan, D.; Romeiro R.S. & Pomella, A.W.V.. Inibição da germinação de basidiósporos de *Crinipellis pernicioso* por compostos voláteis produzidos por cinco actinomicetos residentes de filoplano de cacauero. *Summa Phytopathologica*, v.35, n.2, p.140-142, 2009

Cinco actinomicetos pertencentes ao gênero *Streptomyces*, selecionados como antagonistas ao fungo causador da vassoura-de-bruxa do cacauero (*Crinipellis pernicioso*), foram submetidos a ensaios para a detecção da produção de ácido cianídrico (HCN) e amônia. Todos os isolados demonstraram-se produtores de HCN e apenas um

produziu amônia. A produção de HCN pelos isolados foi acompanhada por 96 horas juntamente com a inibição da germinação de basidiósporos por compostos voláteis. Verificou-se que a inibição da germinação de propágulos do patógeno acompanhou a produção de HCN pelos referidos antagonistas.

Palavras-chave adicionais: Vassoura-de-Bruxa; *Streptomyces*; *Theobroma cacao*; ácido cianídrico.

ABSTRACT

Macagnan, D.; Romeiro R.S. & Pomella, A.W.V.. Inhibition of *Crinipellis pernicioso* basidiospore germination by volatile compounds produced by five actinomycetes phylophaner residents of cocoa.. *Summa Phytopathologica*, v.35, n.2, p.140-142, 2009

Five actinomycetes belonging to the genus *Streptomyces* and selected as antagonists against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of cocoa witches' broom, were investigated for their ability to produce cyanide (HCN) and ammonium. All isolates proved to be HCN producers

but only one was able to synthesize NH₃. Production of HCN and basidiospore inhibition by volatiles compounds was monitored. Was verified that there relationship between the production of HCN and inhibition of germination, during the studied time.

Keywords: witches' broom; *Streptomyces*; *Theobroma cacao*; cyanide.

Por controle biológico entende-se a redução da quantidade de inóculo ou da atividade de produção de doença de um patógeno utilizando um ou mais organismos exceto o homem (3). A atividade antagonista exercida pelos microrganismos 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 de resistência contra patógenos (10). A ação direta ocorre quando antagonistas produzem substâncias que atuam diretamente sobre o patógeno (3).

A vassoura-de-bruxa, causada pelo basidiomiceto *Crinipellis pernicioso*, é a enfermidade que mais causa perdas à lavoura cacauera no Brasil sendo responsável por perdas de até 70 % (8). O uso de genótipos resistentes à doença tem apresentado bons resultados, porém mais de 90 % da área plantada na região, ainda é constituída por genótipos suscetíveis (7). O controle dessa doença por meio de fungicidas sintéticos nem sempre é eficiente e economicamente viável (8). 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 (7). Porém os basidiósporos de *C. pernicioso* podem ser trazidos de longas distâncias por meio de correntes de ar. Neste contexto é importante o desenvolvimento de estratégias que protejam os tecidos suscetíveis das plantas contra a infecção do patógeno.

Macagnan et al. (6) selecionaram cinco actinomicetos eficientes em inibir a germinação de basidiósporos do patógeno na superfície de frutos de cacauero. Relatam os autores que em ensaios visando estudar o modo de ação desses microrganismos, observaram 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.

Dentre as substâncias produzidas por antagonistas contra patógenos cita-se o ácido cianídrico (HCN) um potente inibidor de heme-proteínas tais como as citocromo oxidases e as cloreto dismutases. A inibição dessas enzimas resulta em acúmulo de cloreto no interior da

célula, a qual pode entrar em colapso (9). Blumer & Haas (1) sustentam que a produção de HCN por isolados de rizobactérias, em parte, foi o responsável pelo biocontrole exercido pelos antagonistas. A amônia (NH_3) é produzida e liberada por alguns microrganismos como metabólito secundário e é um composto tóxico a diferentes seres vivos com efeito direto contra fitopatógenos.

Neste trabalho procurou-se detectar a produção dos compostos voláteis, HCN e amônia, mencionados como mecanismos de antagonismo microbiano e putativamente produzidos pelos antagonistas selecionados para o biocontrole da vassoura-de-bruxa. Intencionou-se também verificar *in vitro* a possível contribuição dessas substâncias na inibição da germinação de basidiósporos de *C. perniciosa*.

Os antagonistas, actinomicetos pertencentes ao gênero *Streptomyces*, foram selecionados por Macagnan et al. (6). Os isolados, Ac26, Ac79, Ac68, Ac19 e Ac4 foram preservados em “ultrafreezer” ($-80\text{ }^\circ\text{C}$), e durante os ensaios foram mantidos em meio extrato de solo-água visando a produção de esporos os quais eram usados como propágulos para a realização dos ensaios. Para a detecção das substâncias mencionadas os antagonistas foram cultivados em meio TSA composto por tripton 15 g, peptona 5 g, e NaCl 5 g. O inóculo de *C. perniciosa* foi obtido usando a metodologia de Frias et al. (4) e preservada em ultrafreezer ($-80\text{ }^\circ\text{C}$).

Para a detecção da produção de amônia esporos dos antagonistas foram adicionados a tubos de ensaio contendo meio TSA líquido acrescido de glicina $0,05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $0,005\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e cultivados, sem agitação, por 72 h quando foi adicionado ao meio o reativo de Nessler. Foi considerado produtor de amônia o microrganismo em cujo tubo foi observado um precipitado de coloração amarelada.

Para a detecção de HCN, adotou-se a técnica de Castric & Castric (2). Ao meio de cultura TSA semi-sólido, em estado semi-fundente, foram adicionados esporos dos antagonistas a serem testados. Estes foram dispensados em cavidades de placas de diluição e estas depositadas em placas de Petri de 150 mm de diâmetro. Cada antagonista foi dispensado em três cavidades. Como controle, foi utilizado meio de cultura esterilizado. Para a detecção de cianeto, utilizou-se papel de filtro imerso no reativo de Castric & Castric (2). Após a montagem, as placas foram incubadas por 72 h em temperatura de $28\text{ }^\circ\text{C}$ quando foram avaliadas, sendo consideradas produtoras de HCN as colônias que produziram manchas de coloração marrom, no papel branco, impregnado com o indicador na região correspondente à posição da colônia.

A inibição da germinação de propágulos do patógeno por compostos voláteis foi avaliada e, paralelamente, acompanhou-se a produção de HCN pelos microrganismos. Foram preparadas placas de diluição contendo os antagonistas a 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. A produção de HCN e a inibição de germinação por compostos voláteis pelos antagonistas foram avaliadas a cada 24 h até 96 h após início do ensaio. A produção de HCN foi avaliada substituindo-se, a cada 24 h, o papel indicador. Neste momento era também avaliada a inibição de germinação de basidiósporos pela deposição de uma camada de ágar-água na tampa das placas de Petri. Depois de resfriado o ágar-água, as tampas eram recolocadas nas placas expondo o gel aos compostos voláteis produzidos pelos microrganismos. As placas foram seladas com filme de PVC e incubadas em temperatura de $28\text{ }^\circ\text{C}$ por 6 h quando $10\text{ }\mu\text{L}$ de suspensão de basidiósporos (10^6 mL^{-1}) foram depositados sobre o

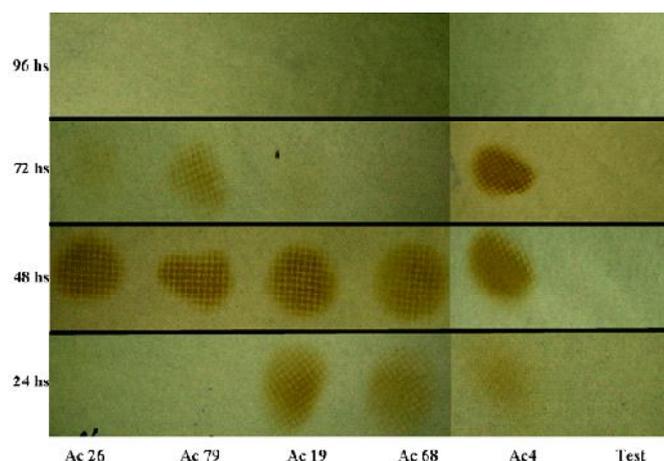


Figura 1. Detecção *in vitro* da produção de ácido cianídrico (manchas de coloração escurecida) por cinco actinomicetos selecionados para o biocontrole da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h após o semeio.

ágar-água na região correspondente a posição da colônia dos diferentes antagonistas. As placas foram re-incubadas por três horas quando foi realizada a avaliação da germinação dos basidiósporos assim como avaliada a produção de HCN. Foi considerado germinado o basidiósporo cujo tubo germinativo era maior ou igual ao seu comprimento e considerado produtor de HCN o microrganismo que produziu manchas de coloração marrom no papel indicador. Procedeu-se a representação cartesiana dos dados de germinação dos basidiósporos nos diferentes tempos, e a Área Abaixo da Curva de Germinação (AACG) foi calculada a exemplo do cálculo da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) (5). O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado e os valores da AACG foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey 5 %.

Usando as técnicas descritas observou-se que todos os cinco isolados produziram ácido cianídrico e foram capazes de inibir a germinação de basidiósporos por compostos voláteis. A maior produção de HCN pelos isolados, foi observada após 48 h de cultivo, produção esta evidenciada pela maior intensidade de manchas de coloração marrom no papel indicador (Fig. 1). Houve inibição da germinação de basidiósporos por compostos voláteis durante todo o desenvolvimento do ensaio, mostrando-se mais acentuada 48 h após o semeio e permanecendo assim até 72 h para a maioria dos isolados (Fig. 2). Calculando-se a área abaixo da curva de germinação (AACG) e submetendo os valores à análise de variância, observou-se que todos os isolados diferiram da testemunha. Porém, não se observou diferença estatística na inibição entre antagonistas.

A curva de produção de HCN evidenciada pela intensidade das manchas no papel indicador e a germinação de basidiósporos do patógeno apresentam comportamento inversamente proporcional. Esse comportamento sugere o envolvimento do HCN produzido pelos isolados na inibição da germinação dos propágulos do patógeno. A curva de produção de HCN, assemelha-se com típicas curvas de crescimento bacteriano em batelada. Dessa forma especula-se que a produção do referido composto pelos isolados seja constitutiva, atingindo seu máximo no início da fase estacionária. A eficiência de alguns dos isolados estudados 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

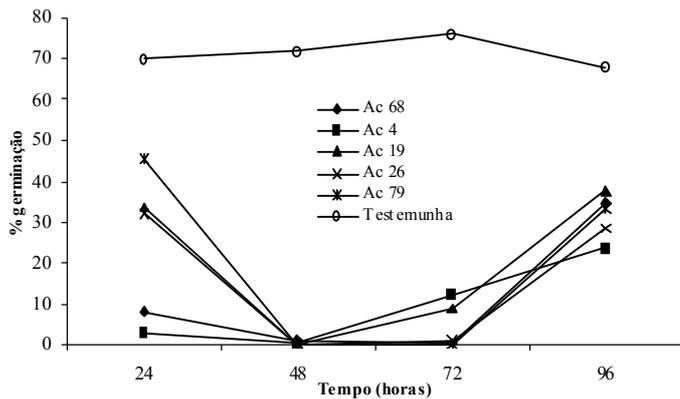


Figura 2. Inibição *in vitro* da germinação de basidiósporos de *Crinipellis perniciososa* por compostos voláteis produzidos por cinco actinomicetos selecionados para o biocontrole da vassoura-de-bruxa do cacauero nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h após o semeio.

basidiósporos (Fig. 2), alguns desses isolados apresentam pouca eficiência em condições de campo (6). Após 96 h de cultivo não foi detectada a produção de HCN por nenhum dos antagonistas (Fig. 1). Porém observou-se ainda inibição da germinação de basidiósporos (Fig. 2). Essas observações supõem uma sensibilidade da técnica da presença de HCN menor que a sensibilidade dos basidiósporos à presença do composto, ou ainda, a produção pelos antagonistas de diferentes compostos tóxicos com características voláteis diferentes dos detectados neste trabalho.

A produção de amônia pelos isolados foi pouco expressiva. Somente o isolado Ac19 demonstrou ser produtor desse composto. Acredita-se que este composto tenha pouco efeito tóxico ao patógeno visto que este isolado apresenta baixo desempenho *in vivo*. Devido à característica volátil é difícil haver, na superfície da planta, o acúmulo dos compostos estudados em concentrações suficientes para ocorrer a

inibição da germinação de propágulos do patógeno.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao auxílio financeiro da FINEP (proc. n. 1488/02) e ao CNPq pela bolsa concedida ao primeiro autor (proc. n. 142076/2001-5).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blumer, C., Haas, D. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archives of Microbiology*, v.173, n.3, p.170-177, 2000.
- Castric, K.F., Castric, P.A. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.45, n.2, p.701-702, 1983.
- Cook, R.J., Baker, K.F. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. St. Paul, Minnesota: APS Press, American Phytopathological Society, 1983. 539p.
- Frias, G.A., Purdy, L.H., Schmidt, R.A. An inoculation method for evaluating resistance of cacao to *Crinipellis perniciososa*. *Plant Disease*, v.79, n.8, p.787-791, 1995.
- Horsfall, J.G., Barrat, R.W. A improved grading system for measuring plant diseases. *Phytopathology*, v.35, p.365, 1945.
- Macagnan, D., Romeiro, R.S., Souza, J.T., Pomella, A.W.V. Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their activity against the witches' broom and black pod pathogens. *Phytoparasitica*, v.34, n.2, p.122-132, 2006.
- Pomella, A.W.V. O controle biológico da vassoura de bruxa: situação atual no Brasil e no mundo. *Fitopatologia Brasileira*, v.26, n.Suplemento, p.268, 2001.
- Purdy, L.H., Schmidt, R.A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. *Annual Review of Phytopathology*, v.34, p.573-594, 1996.
- Song, Y., Logan, B.E. Inhibition of aerobic respiration and dissimilatory perchlorate reduction using cyanide. *FEMS Microbiology Letters*, v.239, p.229-234, 2004.
- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, v.36, p.453-483, 1998.