

ISSN 0100-8102

Boletim de Pesquisa

Novembro, 1996

Número, 167

***Produção Artificial
de Basidiocarpos de
Crinipellis perniciosa do
Cupuaçuzeiro em meio de
Farelo-Vermiculita***

Embrapa

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental
Ministério da Agricultura e do Abastecimento

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente da República

Fernando Henrique Cardoso

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO

Ministro

Arlindo Porto Neto

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores

Dante Daniel Giacomelli Scolari
Elza Angela Battaglia Brito da Cunha
José Roberto Rodrigues Peres

Chefia do CPATU

Emanuel Adilson Souza Serrão – Chefe Geral
Jorge Alberto Gazel Yared – Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
Antonio Carlos Paula Neves da Rocha – Chefe Adjunto de Apoio Técnico
Antonio Ronaldo Teixeira Jatene – Chefe Adjunto Administrativo

***Produção Artificial
de Basidiocarpos de
Crinipellis perniciosa do
Cupuaçuzeiro em meio de
Farelo-Vermiculita***

Ruth Linda Benchimol Stein

Tsutaé Ito

Fernando Carneiro de Albuquerque

Risaldo Muniz do Nascimento

Belém, PA

1996

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa-CPATU

Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n

Telefones: (091) 246-6653, 246-6333

Telex: (91) 1210

Fax: (091) 226-9845

Caixa Postal, 48

66095-100 – Belém, PA

Tiragem: 300 exemplares

Comitê de Publicações

Antonio Ronaldo Camacho Baena – Presidente

Ari Pinheiro Camarão

Célia Maria Lopes Pereira

Ismael de Jesus Matos Viégas

Jorge Alberto Gazel Yared

Maria de Lourdes Reis Duarte

Maria de Nazaré Magalhães dos Santos – Secretária Executiva

Moacyr Bernardino Dias Filho

Noemi Vianna Martins Leão – Vice-Presidente

Raimundo Nonato Brabo Alves

Sérgio de Mello Alves

Revisores Técnicos

Maria de Lourdes Reis Duarte – Embrapa-CPATU

Sérgio Eduardo Abud Fonseca – CEPLAC

Expediente

Coordenação Editorial: Antonio Ronaldo Camacho Baena

Normalização: Célia Maria Lopes Pereira

Revisão Gramatical: Maria de Nazaré Magalhães dos Santos

Moacyr Bernardino Dias Filho (texto em inglês)

Composição: Euclides Pereira dos Santos Filho

STEIN, R.L.B.; ITO, T.; ALBUQUERQUE, F.C. de; NASCIMENTO, R.M. do. **Produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso* do cupuaçuzeiro em meio de farelo-vermiculita.** Belém: Embrapa-CPATU, 1996. 15p. (Embrapa-CPATU. Boletim de Pesquisa, 167).

1. Cupuaçu – Doenças – Fungo. 2. Fungo – Meio de cultura. 3. ***Crinipellis pernicioso***. I. Ito, T., colab. II. Albuquerque, F.C. de, colab. III. Nascimento, R.M. do, colab. IV. Embrapa. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (Belém, PA). V. Título. VI. Série.

CDD: 589.22

© Embrapa – 1996

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	6
MATERIAL E MÉTODOS	8
RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
CONCLUSÃO	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13

PRODUÇÃO ARTIFICIAL DE BASIDIOCARPOS DE *Crinipellis pernicioso* DO CUPUAÇUZEIRO EM MEIO DE FARELO-VERMICULITA

Ruth Linda Benchimol Stein¹

Tsutaé Ito²

Fernando Carneiro de Albuquerque¹

Risaldo Muniz do Nascimento³

RESUMO: A produção artificial de basidiocarpos pelo isolado C990 de *Crinipellis pernicioso* do cupuaçuzeiro foi obtida após a colonização, durante oito semanas, pela fase saprofítica do patógeno em um meio de cultura artificial à base de farelo-vermiculita (50 g de farelo de trigo; 40 g de vermiculita; 6 g de CaSO₄ · 2H₂O; 1,5 g CaCO₃; 120 ml de água destilada; pH 7,0-7,5) e posterior transferência para um telado com 50% de sombreamento e irrigação controlada, com ciclos diários de 6 horas de molhamento e 18 horas de seca, objetivando induzir à produção de basidiocarpos. Após as primeiras quatro semanas de incubação em laboratório, foi acrescentada sobre as culturas uma fina camada (5-10g) à base de musgo desidratado (200g de musgo desidratado; 50g de CaCO₃; 50g de vermiculita; 125ml de água destilada). A produção de basidiocarpos pelo isolado C990 de *C. pernicioso* do cupuaçuzeiro teve início após dez semanas de permanência no telado e foi observada por um período de 38 dias. A patogenicidade dos basidiocarpos produzidos artificialmente foi comprovada através de inoculações em mudas de cupuaçuzeiro.

Termos para indexação: *Crinipellis pernicioso*, basidiocarpos, *Theobroma grandiflorum*, produção artificial.

¹ Eng.- Agr., M.Sc., Embrapa-CPATU, Cx. Postal 48, CEP 66017-970, Belém-PA.

² Consultor Convênio Embrapa-CPATU/JICA.

³ Bolsista CNPq/Embrapa-CPATU.

ARTIFICIAL BASIDIOCARP PRODUCTION OF THE "CUPUAÇU" TREE PATHOGEN *Crinipellis pernicioso* USING A BRAN-VERMICULITE MEDIUM

ABSTRACT: *Basidiocarps artificial production by the isolate C990 of "cupuaçu" tree pathogen **Crinipellis pernicioso**, the witches' broom disease agent, was achieved after a eight-week colonization by the saprophytic phase of the fungus on a bran-vermiculite medium (50g wheat bran; 40g vermiculite; 6g CaSO₄ · 2H₂O; 1,5g CaCO₃; 120ml distilled water; pH 7,0-7,5) in laboratory conditions and subsequent remove to a cabinet with 50% of shade and controlled daily cycle of 6 hours of wetting and 18 hours of drying, in order to induce basidiocarp production. After the first four weeks of incubation in the laboratory, the application of a 5-10g peat moss based case (200g peat moss; 50g CaCO₃; 50g vermiculite; 125ml distilled water) was put on the incubated cultures. The fruitification of the isolate C990 began after 10 weeks in the cabinet and lasted for 38 days. The pathogenicity of the artificially produced basidiocarps was confirmed through inoculations on "cupuaçu" seedlings.*

*Index terms: **Crinipellis pernicioso**, basidiocarps, **Theobroma grandiflorum**, artificial production*

INTRODUÇÃO

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) é uma fruteira tropical com grande potencial econômico, cujas áreas de plantio racional estão em franca expansão na Amazônia (Calzavara et al. 1984; Müller et al. 1995). Este fato favorece o aumento da incidência da principal doença que ataca essa cultura na região, a vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer).

O agente causal da vassoura-de-bruxa é um basidiomiceto da família Agaricaceae, cujos propágulos infectivos são representados unicamente por basidiosporos (Evans, 1980). Esses propágulos, liberados por corpos frutíferos do patógeno denominados basidiocarpos, são produzidos apenas

em determinadas épocas do ano (Rocha & Wheeler, 1985), o que dificulta a condução de trabalhos de pesquisa sobre a biologia, epidemiologia e controle de **C. pernicioso**. Para que esses estudos tenham continuidade, há necessidade de um suprimento constante desses propágulos infectivos.

Diversos trabalhos têm sido conduzidos a fim de produzir basidiocarpos em condições artificiais, mais especificamente do isolamento de **C. pernicioso** que infecta o cacaueteiro. Diferentes métodos têm sido utilizados, como: micélio do fungo em potes de porcelana pendurados sob árvores (Stahel, 1919); vassouras penduradas em "cabinets" com controle de umidade e temperatura (Suarez, 1977; Rocha & Wheeler, 1982, 1985); micélio do patógeno cultivado assepticamente e inoculado em vassouras esterilizadas (Purdy et al. 1983; Purdy & Dickstein, 1990); micélio inoculado em vassouras esterilizadas embebidas em agar-água (Merchan, 1979; Purdy et al. 1983; Pickering & Hedger, 1987); micélio formando estromas semelhantes a calos em meio de cultura (Bastos & Andebrhan, 1987); e micélio inoculado em meio de farelo-vermiculita, mantido em condições utilizadas convencionalmente para a produção de cogumelos (Elliot, 1985; Griffith & Hedger, 1993).

O objetivo deste trabalho foi testar, no isolamento C990 de **C. pernicioso** do cupuaçueteiro, a metodologia de produção artificial de basidiocarpos de **Crinipellis pernicioso** proposta por Griffith & Hedger (1993) para isolamentos do cacaueteiro.

MATERIAL E MÉTODOS

*Para a produção artificial de basidiocarpos de **C. pernicioso** do cupuaçuzeiro na ausência desse hospedeiro, foi testada a metodologia proposta por Griffith & Hedger (1993), com modificações no período de molhamento e no controle de temperatura e umidade. Foi utilizado o meio de farelo-vermiculita, em cujo preparo misturou-se 50g de farelo de trigo, 40g de vermiculita; 6 g de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,5g de CaCO_3 ; e 120ml de água destilada (pH 7,0-7,5). Após a homogeneização, o meio foi distribuído em cinco bandejas descartáveis de alumínio (15 x 10 x 5 cm), na proporção de 25 a 30g de meio de cultura/bandeja, e autoclavado (20 minutos; 15 psi). Após o resfriamento, cada bandeja foi inoculada com dois discos equidistantes de micélio ($\varnothing = 5\text{mm}$) retirados com vazador-de-rolha da extremidade de colônias de um isolamento de **C. pernicioso** do cupuaçuzeiro (C990), obtido em Castanhal, A, e cultivado por 15 dias em meio de cultura de extrato de malte-agar (Extrato de malte 3g; Extrato de levedura 2g; KH_2PO_4 0,5g; MgSO_4 0,5g; Agar 20g; Água destilada 1.000 ml)*

Após quatro semanas de incubação no laboratório, as bandejas foram abertas em condições assépticas e as culturas recobertas com uma fina camada (5 a 10g por cultura) de substrato previamente autoclavado, composto de 200g de musgo desidratado, 50g de CaCO_3 , 50g de vermiculita e 125ml de água destilada, permanecendo incubadas por mais quatro semanas. Após esse período, as bandejas foram novamente abertas, as culturas tiveram a sua camada superior escarificada e foram imediatamente transferidas para uma casa-de-plástico (2 x 2 x 3m), envolvida por sombrite (50%), com sistema artificial de irrigação por aspersão regulado para funcionar durante seis horas/dia, no intervalo entre 16:00 e 22:00 h, proporcionando uma precipitação artificial de 121mm/dia, medida através de pluviômetro instalado no local. Um termohigrógrafo registrou as médias de temperatura

e umidade relativa no interior da casa-de-plástico durante o período do experimento, que foram de 27,1 °C e 85 %, respectivamente. Essas condições foram modificadas em relação à metodologia original proposta por Griffith & Hedger (1993), onde o período de molhamento foi de sete horas diárias, nos intervalos de 2:00 às 8:00h e 16:00 às 17:00h, a luminosidade foi artificial (8:00 às 20:00h; lâmpadas fluorescentes brancas de 65-80W) e a temperatura foi mantida a 27 °C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

*A produção de basidiocarpos pelas culturas artificiais do isolamento C990 de **C. pernicioso** (Fig. 1) foi iniciada 70 dias após ser transferida do laboratório para o telado. Nos primeiros 13 dias, foram produzidos de oito a 19 basidiocarpos/dia, a intervalos de dois a cinco dias. Nas duas semanas seguintes, houve uma redução na produção para a média de um basidiocarpo a cada seis dias e subsequente aumento para a média de dez basidiocarpos a cada 6-7 dias (Tabela 1). Após cada contagem, os basidiocarpos foram removidos e conduzidos ao laboratório, para indução à liberação de basidiosporos, os quais foram usados em testes de patogenicidade em mudas de cupuaçuzeiro.*

Os resultados observados são semelhantes àqueles obtidos por Griffith & Hedger (1993), onde a produção de basidiocarpos se verificou após um período variável de incubação entre dez e 16 semanas. O período produtivo das culturas dentro das condições referidas anteriormente durou 38 dias, após o que não foi mais observada a emissão de basidiocarpos.

Os basidiocarpos produzidos artificialmente apresentaram cor e tamanho semelhantes aos produzidos naturalmente. Os testes de patogenicidade de basidiosporos

liberados por basidiocarpos produzidos artificialmente e inoculados em mudas de cupuaçuzeiro com seis meses de idade foram positivos.

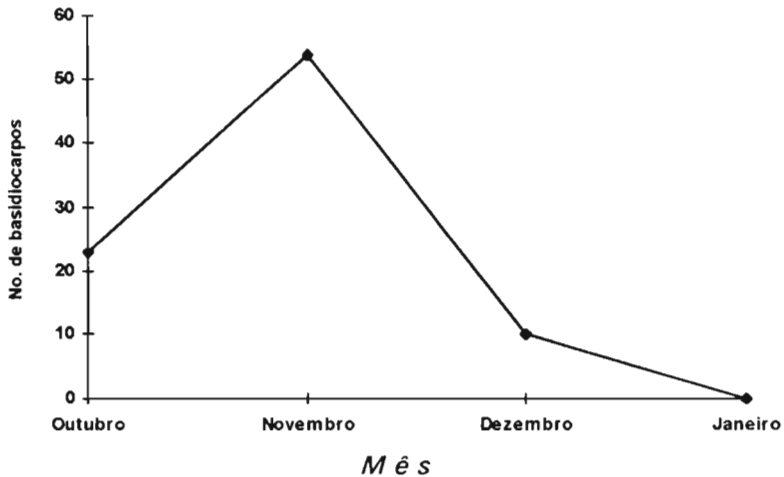
*Tabela 1. Produção de basidiocarpos pelo isolado C990 de **C. pernicioso** do cupuaçuzeiro em meio de farelo-vermiculita*

<i>Dias após a transferência das culturas para o telado</i>	<i>Nº médio de basidiocarpos</i>
70	11
72	12
75	08
77	13
82	19
90	02
95	01
101	11
108	10
115	0
122	0
129	0
143	0
157	0



FIG. 1. Basidiocarp de *Crinipellis pernicioso* do cupuaçuzeiro (isolamento C990) produzido artificialmente em meio de farelo-vermiculita.

*Estudos sobre a produção natural de basidiocarpos de **C. pernicioso** do cupuaçuzeiro em vassouras destacadas, realizados sob telado, em Belém, PA, demonstraram que a produção dessas estruturas reprodutivas foi mínima ou inexistente nos períodos de janeiro-abril e agosto-dezembro, aumentando progressivamente a partir de maio, com pico em julho (Stein, 1994; Stein et al. 1996). No entanto, usando-se uma metodologia de produção artificial que permite a manutenção de condições nutricionais e de umidade para o patógeno durante qualquer época do ano, foi possível a produção dessas estruturas reprodutivas no período de outubro-dezembro (Fig. 2).*



*FIG. 2. Produção mensal de basidiocarpos pelo isolamento C990 de **C. pernicioso** do cupuaçuzeiro em meio artificial de farelo-vermiculita.*

CONCLUSÃO

A metodologia de produção artificial de basidiocarpos de *C. pernicioso* do cacaueteiro, proposta por Griffith & Hedger (1993), com modificações no período de molhamento das vassouras e no controle de temperatura e umidade, foi aplicada com sucesso para o isolamento C990 de *C. pernicioso* do cupuaçueteiro, podendo ser utilizada para a obtenção de inóculo sem a presença do hospedeiro, em épocas do ano onde não se verifica a produção natural de basidiocarpos do patógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASTOS, C.N.; ANDEBRHAN, T. *In vitro* production of basidiospores of *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Sing., the causative agent of witches' broom disease of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Transaction of British Mycological Society*, v. 88, p. 404-409, 1987.
- CALZAVARA, B.B.G.; MÜLLER; C.H.; KAWAGE, O.N.C. *Fruticultura tropical: o cupuaçueteiro: cultivo, beneficiamento e utilização do fruto*. Belém: Embrapa-CPATU, 1984. 101p. ilustr. (Embrapa-CPATU. Documentos, 32).
- ELLIOT, T.J. Spawn-making and spawns. In: FLEGG, P.B.; SPENCER, D.M.; WOOD, D.A. eds. *The biology and technology of the cultivated mushrooms*. London: John Willey and sons, 1985. p.131-140.
- EVANS, H.C. Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. *Transaction of British Mycological Society*, v. 74, p.515-523, 1980.

- GRIFFITH, G.W.; HEDGER, J.N. A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis pernicioso* using a bran-vermiculite medium. *Netherland Journal of Plant Pathology*, v. 99, p. 227-230, 1993.
- MERCHAN, V.M. Formación en medios de cultivo de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso*. *Ascolfi Informa*, v. 5, p. 54-56, 1979.
- MÜLLER, C.H.; FIGUEIRÊDO, F.J.C.; NASCIMENTO, W.M.D. do; GALVÃO, E.U.P.; STEIN, R.L.B.; SILVA, A. de B.; RODRIGUES, J.E.L.F.; CARVALHO, J.E.U. de; NUNES, A.M.L. *A cultura do cupuaçu*. Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 61p. (Embrapa-SPI. Coleção Plantar, 24).
- PICKERING, V.; HEDGER, J.N. Production of basidiocarps of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso* in in vitro culture. *Transaction of British Mycological Society*, v. 88, p.404-406, 1987.
- PURDY, L.H.; DICKSTEIN, E.R. Basidiocarp development on mycelial mats of *Crinipellis pernicioso*. *Plant Disease*, v. 74, p. 473-496, 1990.
- PURDY, L.H.; TRESE, A.T.; ARAGUNDI, J.A. Proof of pathogenicity of *Crinipellis pernicioso* to *Theobroma cacao* by using basidiospores produced in in vitro cultures. *Revista Theobroma*, v. 13, p.157-163, 1983.
- ROCHA, H.M.; WHEELER, B.E.J. Water balance as an important factor in basidiocarp production by *Crinipellis pernicioso*, the causal fungus of cocoa witches' broom. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 8th., 1981, Cartagena, Colômbia. *Proceedings*. Lagos, Nigeria: Cocoa Producers' Alliance, 1982. p.368-381.

- ROCHA, H.M.; WHEELER, B.E.J. Factors influencing the production of basidiocarps and the deposition and germination of basidiospores of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease on cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Plant Pathology*, v. 34, p.319-328, 1985.
- STAHEL, G. Contribution to the knowledge of witchbroom disease. *Tropical Agriculture*, v. 9, p.167-176, 1919.
- STEIN, R.L.B. **Resumo das atividades do Projeto "Geração de Tecnologia Agroindustrial para o Desenvolvimento do Trópico Úmido"**. Belém: Embrapa-CPATU/JICA, 1994.
- STEIN, R.L.B.; ALBUQUERQUE, F.C.; ROCHA NETO, O. G.; CONCEIÇÃO, H.E.O.; BASTOS, C. N.; ENDO, T.; ITO, T. *Biologia e fisiologia de Crinipellis perniciosa do cupuaçuzeiro, em relação à fisiopatologia*. In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (Belém, PA). **Geração de Tecnologia Agroindustrial para o Desenvolvimento do Trópico Úmido**. Belém: Embrapa-CPATU/JICA, 1996. p.59-82. (Embrapa-CPATU. Documentos, 85).
- SUAREZ, C. **Growth of *Crinipellis perniciosa* (Stahel) singer in vivo and in vitro**. London: University of London, 1977. Tese Doutorado.

**QUALIDADE TOTAL É UMA FILOSOFIA QUE
ENVOLVE TODOS OS FUNCIONÁRIOS
DE TODAS AS HIERARQUIAS DA EMPRESA.**



Impressão e acabamento: Embrapa - SPI