

## SELEÇÃO *in vitro* DE FUNGOS ANTAGÔNICOS A *Phytophthora palmivora* DA PUPUNHEIRA

**Aline Brito Vaz<sup>1</sup>, Edna Dora Martins Newman Luz<sup>2,3</sup>, Marival Lopes Oliveira<sup>2</sup>, Stela Dalva Vieira M. Silva<sup>2</sup>, Maria das Graças C. Parada Costa Silva<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Soane Nazaré de Andrade, km 16 - Rodovia Ilhéus-Itabuna, 45650-000, Ilhéus, Bahia, Brasil, alinefito@gmail.com; <sup>2</sup>CEPLAC CEPEC/SEFIT, km 22, Rod. Ilhéus/Itabuna, 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil;  
<sup>3</sup>PPGPV/UESC; <sup>4</sup>CEPLAC/CEPEC/SEFOP, km 22, Rod. Ilhéus/Itabuna, 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil

A podridão do estipe é a mais grave doença da pupunheira na Bahia. Seu agente causal, *Phytophthora palmivora*, apresenta ampla gama de hospedeiros dentre eles cultivos de relevância econômica para o estado. Visando selecionar agentes antagônicos que pudessem ser empregados no controle da doença, foram realizados ensaios *in vitro* confrontando cinco isolados de *P. palmivora* com 40 de agentes de biocontrole (BCAs), 39 isolados de *Trichoderma* spp. e um de *Gliocladium virens*. O percentual de inibição foi calculado e os BCAs comparados em relação a cada isolado de *P. palmivora* através do teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). Embora tenha sido observada variação na atuação dos BCAs em relação aos cinco isolados de *P. palmivora*, todos eles mostraram capacidade de inibir o desenvolvimento do fungo, com os percentuais de redução variando de 7 a 48%. Durante o pareamento entre os isolados foram observadas interações de três tipos: entrelaçamento, impasse (antibiose) e substituição, com a predominância do último. Dois BCAs, TC26 (*T. longibrachiatum*) e TC61 (*T. harzianum*), além de provocarem os três tipos de interações, também esporularam sobre as colônias de *P. palmivora*. O isolado 913 (*P. pseudokoningii*), por sua vez, causou antibiose, sendo observado o parasitismo entre as hifas durante as análises ao microscópio eletrônico de varredura. Treze isolados apresentaram potencial de biocontrole para pesquisas futuras: ES4, 421, 889, 2927, 2952, 4006 B e T61 de *T. harzianum*; TC25 de *T. longibrachiatum*; 64 de *T. piluliferum*; ALF 247 de *T. martiale*; 905 de *T. viride*; 7CC de *T. atroviride* e TC26 de *T. koningiopsis*.

**Palavras-chave:** Controle biológico, *Bactris gasipaes*, podridão-do-estipe.

### ***In vitro* selection of antagonistic fungi to *Phytophthora palmivora* from peach palm.**

Heart rot of peach palm is the most serious disease of this crop in Bahia. Its causal agent, *Phytophthora palmivora*, presents a wide host range including economically important crops. Aiming to select antagonistic agents to control the disease, *in vitro* assays were carried out, where five isolates of *P. palmivora* were confronted with 40 BCAs, 39 isolates of *Trichoderma* spp. and one of *Gliocladium virens*. The percentage of inhibition against *P. palmivora* was calculated and the BCAs were compared using the Scott-Knott test ( $p \leq 0,05$ ). Although there was variation in the BCAs performances all of them have inhibited *P. palmivora* mycelial growth. Inhibition percentages varied from 7% to 48%. Mycelial interactions between colonies were of the types: intermingling, deadlock and substitution. The BCAs TC26 (*T. longibrachiatum*) e TC61 (*T. harzianum*), in addition of showing the three types of interactions, sporulated also on *P. palmivora* colonies. Isolate 913 (*P. pseudokoningii*) caused antibiosis. Hyphal parasitism was observed by SEM. Thirteen isolates deserve more studies: ES4, 421, 889, 2927, 2952, 4006 B, T61 (*T. harzianum*), TC25 (*T. longibrachiatum*), 64 (*T. piluliferum*), ALF 247 (*T. martiale*), 905 (*T. viride*), 7CC (*T. atroviride*) and TC26 (*T. koningiopsis*).

**Key words:** Biological control, *Bactris gasipaes*, heart rot.

## Introdução

A pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth.) é uma palmeira cultivada pertencente à família das arecáceas. No Brasil, seu cultivo teve início na região Amazônica, sendo distribuída em pequenas populações, em áreas abertas por perturbações naturais, ou nas bordas da floresta. A primeira utilização da pupunheira foi para exportação de madeira, depois dos frutos, que são ricos em óleo, e, atualmente, do palmito (kalil Filho e Sturion, 2003).

A pupunheira adaptou-se bem tanto ao cultivo familiar tradicional, como à moderna agricultura com alta utilização de insumos (Clement and Bovi, 1999).

A Região Sul da Bahia possui condições ambientais favoráveis ao seu cultivo, apresentando vantagens, como precocidade, rusticidade, perfilhamento e ausência de oxidação do palmito após o corte. A busca por qualidade, sem comprometer o meio ambiente e a sustentabilidade, tem provocado mudanças no modelo de exploração do palmito no Brasil, cuja atividade foi alimentada até a década de 80, com base apenas no extrativismo das palmeiras juçara (*Euterpe edulis* Mart.) e açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) (Parada, acesso 2009). Atualmente, com o plantio da pupunheira tal extração predatória vem sendo reduzida.

Apesar disso, o monocultivo da pupunheira, para produção de palmito, trouxe algumas consequências indesejáveis. Segundo Hanada (2006), a agricultura moderna, fundamentada em extensas áreas de plantio, resulta em sistemas ecologicamente não balanceados, que facilitam a ocorrência de epidemias. A prevenção das epidemias tem sido tradicionalmente alcançada utilizando-se fungicidas, no entanto, nas últimas décadas, tem aumentado a conscientização não só em relação à preservação do meio ambiente, como também com os resíduos de pesticidas nos alimentos.

A doença mais importante da pupunheira é a podridão-do-estipe, causada pelo oomicota *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler que, segundo Zentmyer et al. (1977), é um patógeno fisiologicamente variável e capaz de infectar dezenas de outras plantas. No Brasil, a doença foi constatada, pela primeira vez, no Pará por Benchimol et al. (2001), que observaram podridão na base do estipe e clorose de folhas mais novas tanto em mudas quanto em plantas adultas. Pizzinatto et al. (2002), por sua vez, relataram a ocorrência da doença na região do São Francisco, em

Pernambuco, em plantas com um ano de idade, as quais apresentavam podridão do colo, escurecimento dos tecidos internos e amarelecimento da folha bandeira.

O controle biológico surge como uma alternativa para atender não só as demandas públicas em relação aos perigos do uso de produtos químicos sobre o meio ambiente, como também, na sustentabilidade agrícola (Samuels, 2004). De acordo com Lima et al. (2000), a premissa básica do controle biológico é manter a densidade populacional das espécies de pragas e patógenos associadas à agricultura, em níveis econômica e ecologicamente aceitáveis.

Diversos fungos têm sido explorados como agentes de controle de doenças de plantas, por serem amplamente distribuídos e comuns na natureza, por apresentarem alta plasticidade e produção de biomassa, além de possuírem grande capacidade metabólica que os torna competidores agressivos na natureza (Corabi-Adell, 2004). Dentre os fungos filamentosos, os do gênero *Trichoderma* são, reconhecidamente, os hiperparasitas mais importantes e mais estudados, exibindo variabilidade entre linhagens em relação às atividades de biocontrole, além de um amplo espectro de ação (Silva, 2000).

*Trichoderma* é um fungo anamórfico, sapróbio ou hemibiotrófico, freqüentemente isolado de solos em diferentes temperaturas, principalmente, de solos tropicais (Harman et al., 2004). É eficaz no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos (Melo, 1991; 1998), podendo também ser utilizado como protetor de sementes, já que se desenvolve na espermosfera e acompanha o crescimento das raízes da plântula (Harman, 2000). As espécies *T. Harzianum*, *T. virens*, e *T. viride* são as mais utilizadas como agentes de controle biológico de fitopatógenos (Hermosa et al., 2000).

Dentre os mecanismos de ação utilizados pelos antagonistas do gênero *Trichoderma*, existem dois principais: i) antibiose – que consiste na produção de uma série de enzimas extracelulares que degradam as paredes de células fúngicas (Menezes e Souza, 1995); e ii) hiperparasitismo – que é a habilidade de colonizar hifas e esporos do patógeno (Bastos, 1991).

De acordo com Melo (1991), para que uma espécie de *Trichoderma* seja um ótimo agente de biocontrole, é essencial que apresente mais de um mecanismo de ação, que não cause impacto negativo ao meio ambiente, que tenha estruturas de reprodução de fácil

propagação, principalmente, em substratos naturais, e que o tempo de vida em prateleira, quando formulado, seja razoavelmente longo e com boa viabilidade.

Alguns agentes de biocontrole além de controlarem os patógenos, apresentam também a capacidade de promover o crescimento das plantas através da produção de hormônios vegetais e de vitaminas, da conversão de elementos a uma forma utilizável pelas plantas, facilitando assim a absorção e translocação de minerais (Melo, 1998; Howell, 2003).

Na seleção *in vitro* de agentes de biocontrole, existem vários métodos, entretanto, o mais utilizado é o do pareamento das culturas ou de confronto direto (Mariano, 1993), cujos resultados têm mostrado boa correlação com os obtidos em estudos *in vivo* (Ethur et al., 2001). A capacidade de parasitismo do antagonista e a inibição do crescimento do patógeno são avaliadas medindo-se o seu crescimento sobre o patógeno e o deste em relação ao antagonista, em comparação ao crescimento do patógeno sem a presença do antagonista.

Este trabalho teve como objetivos: i) avaliar os efeitos de espécies de *Trichoderma* no controle *in vitro* de isolados de *P. palmivora* obtidos da pupunheira, e ii) estudar a interação e possíveis mecanismos de ação de agentes de biocontrole utilizando-se a microscopia eletrônica de varredura.

## Material e Métodos

### Obtenção dos isolados de *Phytophthora palmivora*

Os isolados tratados foram 401, 524, 859, 870, 1086 de *Phytophthora palmivora* pertencentes à coleção Arnaldo Medeiros do CEPEC, preservados em água pelo método Castellani (Dhingra e Sinclair, 1994). Para a realização dos ensaios, foi utilizado o meio seletivo PARPH (pimaricina, 10mg; ampicilina, 250 mg; rifampicina, 10mg; PCNB, 100mg; cornmeal-ágar, 17 g; água p.s.p. 1000 mL) descrito por Kannwischer e Mitchell (1978).

### Obtenção dos isolados de agentes antagônicos

Foram utilizados 39 isolados de *Trichoderma* spp. sendo 37 pertencentes à Coleção da Unidade de Controle Biológico do CEPEC e dois provenientes de isolamentos de pupunheiras coletadas nos viveiros da

INACERES e um isolado de *Gliocladium virens* que completou o total de 40 isolados de agentes antagônicos avaliados (Tabela 1). Para serem utilizados nos ensaios, os isolados foram multiplicados em placas contendo meio de BDA (200g de batata, 20 de ágar, 10g de dextrose, 800 mL de água destilada) incubadas em laboratório à temperatura ambiente ( $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), por cinco dias.

### Confronto entre isolados de *Phytophthora palmivora* e *Trichoderma* spp.

Discos de micélio com 0,7cm de diâmetro, obtidos de culturas de *P. palmivora*, crescidas em CA, foram colocados a 2 cm das bordas de placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Quarenta e oito horas após, em lados opostos, foram replicados discos de micélio, de igual diâmetro, de cada isolado dos antagonistas (Figura 1). Para as testemunhas foram mantidas placas inoculadas, no centro, com cada um dos isolados de *Phytophthora palmivora* e de *Trichoderma* spp. As placas foram incubadas à temperatura ambiente ( $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e o experimento conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições, e repetido duas vezes.

O experimento foi avaliado com base no diâmetro das colônias a 24, 48 e 72h após o confronto. Os dados obtidos foram utilizados nos cálculos dos percentuais de inibição no crescimento de *Phytophthora palmivora* por isolados de *Trichoderma* spp., ao se considerar o seu crescimento em placas sem a confrontação (testemunha). Os dados foram analisados pelo método de agrupamentos e pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Ao se observar as culturas confrontadas, ao microscópio estereoscópico, procurou-se fazer distinção entre os tipos de interações que ocorreram, considerando-se a classificação de Moore-Landecker (1996).

### Estudos histopatológicos das interações entre *P. palmivora* e *Trichoderma* spp. utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura

Objetivando estudar, histopatologicamente ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), as interações entre isolados de *P. palmivora* e *Trichoderma* spp., foram efetuados pareamentos entre os isolados 870, 859 e 401 de *P. palmivora* e os isolados 2076; 4508; T70; T68; ALF247 e 281 de *Trichoderma* spp.

Setenta e duas horas após o confronto entre isolados de *Trichoderma* com os de *P. palmivora*,

Tabela 1 - Relação de isolados de diferentes espécies de Trichoderma e Gliocladium utilizados

Isolados	Espécie	Cultura	Local	Origem
<b>ALF247</b>	<i>Trichoderma martiale</i>	Cacau	Ilhéus	CEPLAC
<b>ES4</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Tronco/cacau	Ilhéus	CEPLAC
<b>SF04</b>	<i>Trichoderma asperellum</i>	Tronco de cacau	Ilhéus	CEPLAC
<b>TRIC CUD 3</b>	<i>Trichoderma</i> sp.	Cacau	Ilhéus	CEPLAC
<b>7CC</b>	<i>Trichoderma atroviride</i>	Solo	Mucugê	CEPLAC
<b>TC25</b>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Tronco de cacau	Ilhéus	CEPLAC
<b>TC26</b>	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	Tronco de cacau	Ilhéus	CEPLAC
<b>TC61</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Cacau	Ilhéus	CEPLAC
<b>62</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Cacau	Ilhéus	CEPLAC
<b>64</b>	<i>Trichoderma piluliferum</i>	Cacau	Ilhéus	CEPLAC
<b>T68</b>	<i>Gliocladium virens</i>	Pupunha	Eunápolis	CEPLAC
<b>T70</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Maracujá	Eunápolis	CEPLAC
<b>213</b>	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	Mamão	Teixeira	ALGE
<b>281</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Cacau	Ilhéus	CEPLAC
<b>291</b>	<i>Trichoderma asperellum</i>	Tronco/cacau	Ilhéus	CEPLAC
<b>312</b>	<i>Trichoderma martiale</i>	Tronco/cacau	Ilhéus	CEPLAC
<b>316</b>	<i>Trichoderma asperellum</i>	Tronco/cacau	Ilhéus	CEPLAC
<b>421</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Mamão	Teixeira	F.P*
<b>611</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Mamão	Eunápolis	F.E*
<b>854</b>	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	Casqueiro	Ilhéus	CEPLAC
<b>889</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Casqueiro	Ilhéus	CEPLAC
<b>905</b>	<i>Trichoderma viride</i>	Solo	Uruçuca	Inaceres
<b>906</b>	<i>Trichoderma piluliferum</i>	Madeira	Uruçuca	CEPLAC
<b>909</b>	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	Solo	Ilhéus	CEPLAC
<b>910</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Solo	Ilhéus	CEPLAC
<b>911</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Solo	Ilhéus	CEPLAC
<b>913</b>	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	Madeira	Ilhéus	CEPLAC
<b>2076</b>	<i>Trichoderma atroviride</i>	Cacau	Uruçuca	CEPLAC
<b>2927</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Pupunha	Arataca	CEPLAC
<b>2952</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Casqueiro	Porto Seguro	CEPLAC
<b>3188</b>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Cacau	Jacareci	CEPLAC
<b>3196</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Cacau	Ilhéus	CEPLAC
<b>3225</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Pupunha	Eunápolis	CEPLAC
<b>4090</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	-	Ilhéus	CEPLAC
<b>4005</b>	<i>Trichoderma piluliferum</i>	Substrato	Inaceres	Inaceres
<b>4006 A</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Substrato	Inaceres	Inaceres
<b>4006 B</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Substrato	Inaceres	Inaceres
<b>4083</b>	<i>Trichoderma asperellum</i>	Tronco cacau	Ilhéus	CEPLAC
<b>4506</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Raiz/pupunha	Una	CEPLAC
<b>4508</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Colmo/pupunha	Una	CEPLAC

F.P = Fazenda Primavera; F.E = Fazenda Eduardo

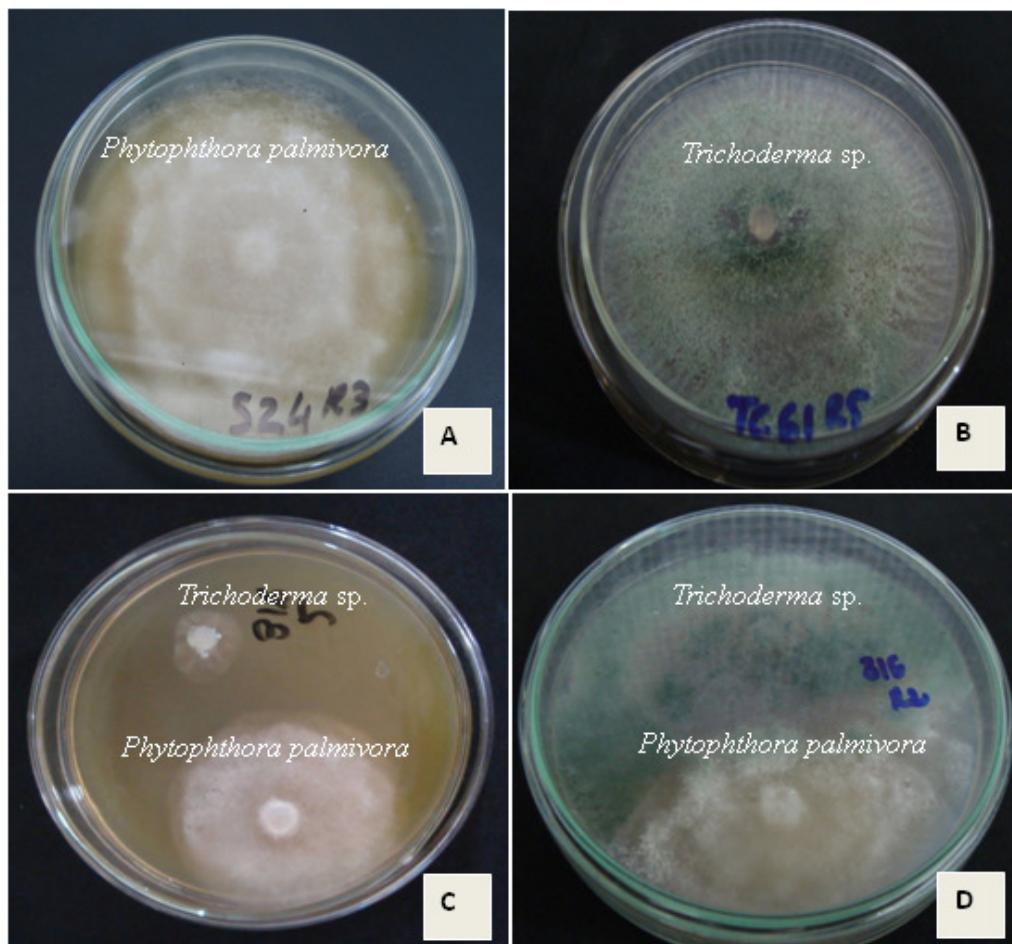


Figura 1-Detalhes do método de pareamento entre isolados de *P. palmivora* e *Trichoderma* spp.: (A) cultura de *P. palmivora*; (B) cultura de *Trichoderma* sp. (C-D) confronto entre *P. palmivora* e um BCA. Detalhes das culturas confrontadas 24h (C), e 72 (D) após a inoculação do BCA.

fragmentos com espessura de 1 mm<sup>3</sup> foram retirados da área de contato entre hifas, os quais foram então mantidos em frascos contendo solução de gluteraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, por 4 horas. Após este período, as amostras foram lavadas, seis vezes consecutivas, durante 10 minutos em tampão cacodilato. Efetuou-se a seguir, a pós-fixação em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 1 % em tampão cacodilato 0,1 M, por 4 horas, sendo as amostras novamente lavadas, seis vezes consecutivas, durante 10 minutos, com o mesmo tampão. Procedeu-se então a desidratação seqüencial em uma série alcoólica 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, em intervalos de 10 minutos, e por três vezes seguidas, em álcool 100%, a cada 20 minutos. As amostras foram a seguir submetidas à desidratação em soluções contendo álcool

e acetona, nas proporções 3:1, 1:1, e 1:3, em intervalos de 10 minutos, e por duas vezes consecutivas, em acetona (P.A.) por 15 minutos cada. As amostras foram então submetidas ao processo de ponto crítico, por cerca de 40 minutos. Ao final, foi feita a metalização através da deposição de uma fina camada de ouro de 20 nm de espessura, durante 80 segundos (Figura 2).

## Resultados

Os cinco isolados de *Phytophthora palmivora* avaliados cresceram de forma similar e tomaram quase completamente as placas com CA aos cinco dias de cultivo, enquanto que os dos BCAs apresentaram um crescimento ligeiramente superior, tomando as placas entre 48 e 72 horas, e muitos já apresentando esporulação.

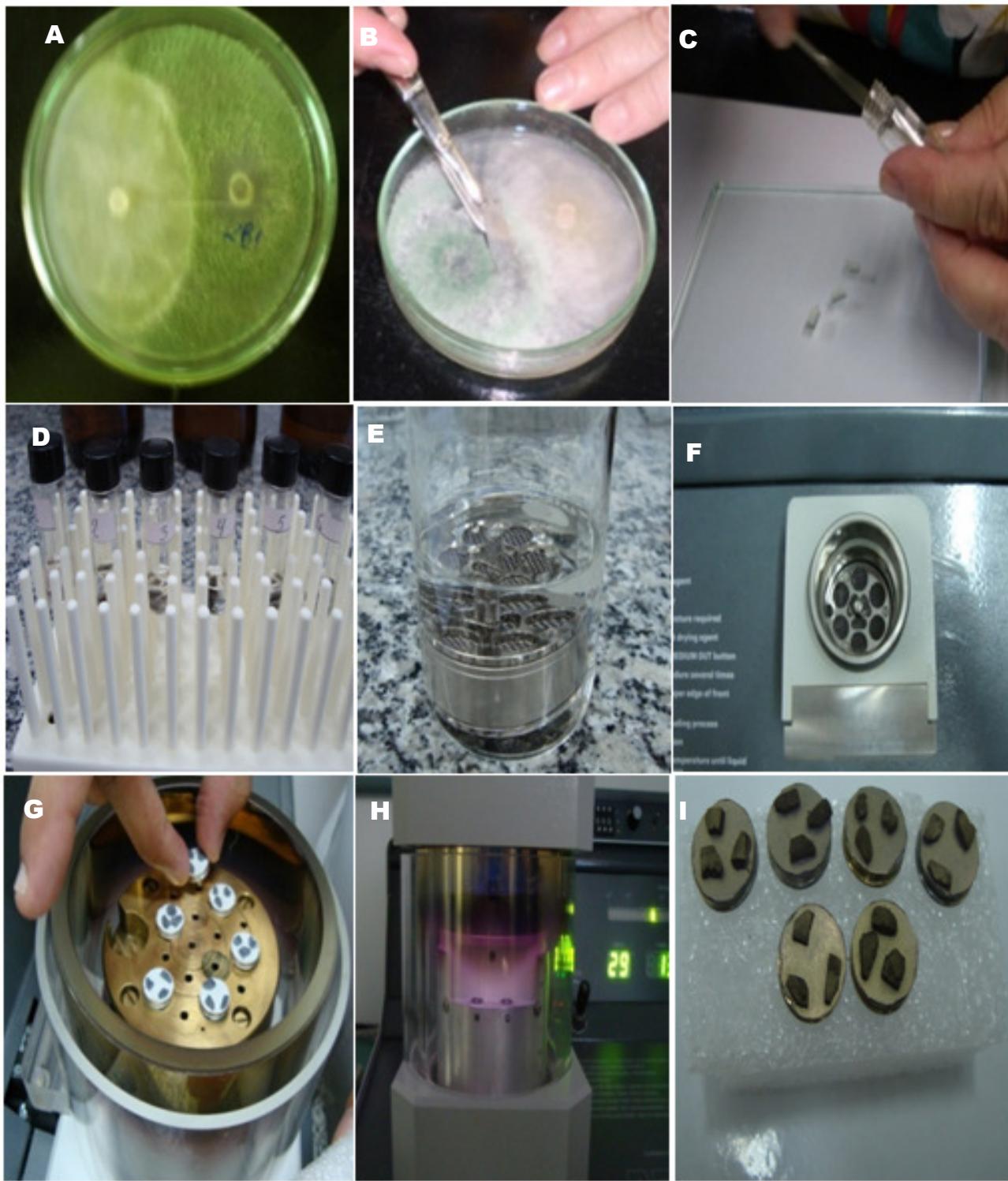


Figura 2 - (A-F) Obtenção e processamento de amostras para serem examinadas ao MEV, processo de metalização: (A) antagonismo; (B) corte na interseção; (C) amostras em Glutaraldeído; (D) estante com as amostras; (E) fixação; (F) Ponto Crítico (Batttec- CPD 030 Critical Point Dryer). (G) Stubs com as amostras colocadas no metalizador; (H) final do processo de metalização com a deposição de uma fina camada de ouro, por 80 s utilizando-se o metalizador (Batttec-SCD 050 Sputter Coater); e (I) amostras metalizadas.

Todos os BCAs testados provocaram alguma inibição no crescimento dos cinco isolados de *P. palmivora*, embora não tão perceptíveis, como no caso dos isolados 906 e 4508 em relação ao isolado 870. A máxima inibição no crescimento micelial de *P. palmivora* provocada pelos BCAs foi de 48%, registrada no confronto do isolado 401 com os BCAs 64, ALF247 e ES4; e a mínima, de 7%, no confronto do isolado 870 com o BCA 906.

Foi observada variação na atuação dos BCAs em relação aos cinco isolados de *P. palmivora* testados. Pela ANOVA, o valor de F para a variável isolados de *P. palmivora* foi altamente significativo. Os isolados 401, 859 e 524 de *P. palmivora*, foram os que sofreram maiores inibições em relação a todos os BCAs avaliados. Ao se analisar cada isolado de *P. palmivora* em relação aos BCAs, foi observada significância somente para os isolados 401, 870 e 1086, com base no teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ), havendo a formação de grupos apenas para tais isolados. Para o isolado 524, a variação na inibição do seu crescimento quando confrontado com os BCAs, foi de 20% (BCA 4090) a 33% (BCA 3188), e para o isolado 859 de 18% (BCA TRICCUD3) a 37% (BCA4508) (dados não mostrados).

Para o isolado 401, onde a variação na redução do crescimento foi maior, de 28% (BCAs 905, 213 e 62) a 48% (BCAs 64, ALF247 e ES4), três grupos foram formados (Tabela 2), com destaque para os BCAs do grupo A (64, ALF247, ES4 e 889), os quais causaram redução entre 45 e 48% no crescimento do patógeno. Alguns isolados do grupo B alem de serem distinguidos com base na redução do crescimento, o foram também através de observações visuais.

Para o isolado 870, a variação na inibição do crescimento foi entre 7% (BCA 906) e 28% (BCA 4090), com apenas dois grupos sendo formados. No primeiro grupo, com 16 BCAS, a variação na inibição foi de 20 e 28%, e no segundo, ficaram os BCAs que provocaram inibições inferiores a 20% no crescimento do patógeno. Para o isolado 1086, a inibição variou entre 15 (291) e 35% (ES4) sendo formados quatro grupos. Os dois primeiros, compostos de apenas um BCA cada, com inibição de 29 (3196) e 35% (ES4), respectivamente.

Observando os tipos de interação entre os isolados de *P. palmivora* quando confrontados com os 40 candidatos a BCAs, tanto a olho nu quanto ao microscópio, constatou-se que os três tipos de interação, descritos por Moore-Landecker (1996), ocorreram no

Tabela 2. Porcentagem de redução do crescimento das colônias de três isolados de *Phytophthora palmivora* (401, 870, 1086) por ação de 40 agentes de biocontrole potenciais

BCAs X Iso 401	BCAS X Iso 870	BCAs X 1086
64	48 a	4090
ALF247	48 a	316
ES4	48 a	4006A
889	45 a	64
909	44 b	2952
4083	43 b	TC61
4006 A	43 b	4005
281	43 b	3225
312	40 b	421
7CC	39 b	4006B
TC61	39 b	4083
911	39 c	7CC
2952	37 c	ALF247
854	37 c	611
2076	37 c	909
3225	37 c	312
4506	36 c	SF04
TRICCUD3	35 c	911
421	35 c	3196
2927	35 c	281
T70	34 c	854
TC25	34 c	3188
611	33 c	TRICCUD3
4006B	33 c	ES4
4005	33 c	913
T68	33 c	2076
TC26	32 c	TC26
316	32 c	889
4090	32 c	291
291	31 c	62
SF04	31 c	213
910	30 c	T70
913	30 c	2927
3188	30 c	910
3196	30 c	T68
4508	30 c	TC25
906	29 c	905
905	28 c	4090
213	28 c	4508
62	28 c	906
		7 b
		291
		15 d

Valores percentuais seguidos da mesma letra indicam indivíduos pertencentes ao mesmo cluster de acordo com o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

experimento. Sem distinguir os isolados de *P. palmivora*, os BCAs 312, 4083, 4006 A, 64, 3188, 4508 e 4090 apresentaram entrelaçamento (Figura 3 B); T68, T70, 213, 291, 611, 909, 910 e 3188, substituição (Figura 3 C); e 913, TC26 e TC61 foram os únicos a causar impasse,

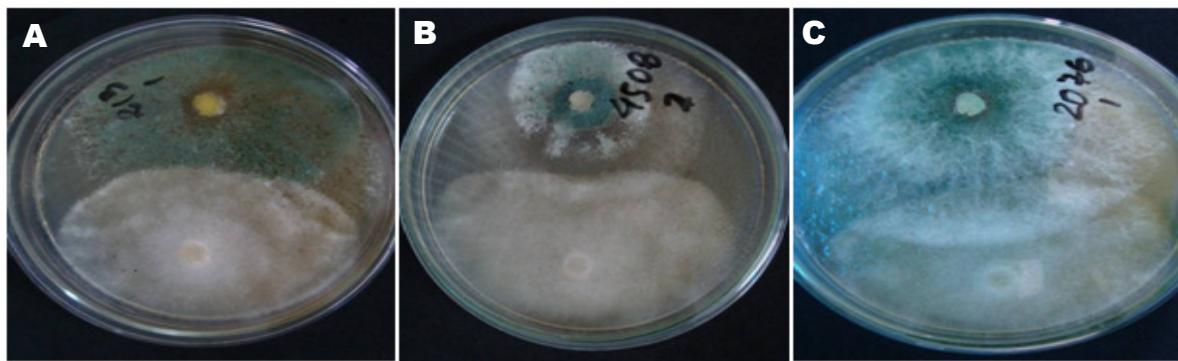


Figura 3 - Classificação das interações entre *P. palmivora* e *Trichoderma* sp: (A) impasse; (B) entrelaçamento e (C) substituição.

com a formação de um nítido halo amarelo ao redor das colônias de *P. palmivora*, caracterizando assim antibiose (Figura 3 A). Os BCAs: Es4, TC25, 64, ALF 247, 421, 829, 905, 2927, 2952 e 4006B, além de apresentarem interação do tipo substituição, esporularam sobre as colônias do patógeno, o mesmo ocorrendo com SF04, 281, e 316.

Dois BCAs, TC26 (*T. longibrachiatum*) e TC61 (*T. harzianum*), apresentaram todos os três tipos de interação, além de esporularem sobre as colônias do patógeno.

Em função da impossibilidade de se examinar, ao MEV, um grande número de colônias confrontadas, foram selecionados cinco BCAs (2076, 4508, T70, T68, e ALF247) e três isolados de *P. palmivora* (870, 859 e 401). A escolha dos BCAs foi feita com base nos tipos de interação apresentados, priorizando aqueles que apresentaram esporulação sobre as culturas do patógeno. Ao MEV foi visualizado, na região de confronto, o enrolamento das hifas de *Trichoderma* spp. no micélio de *P. palmivora* (Figura 4), comprovando, assim, o parasitismo dos BCAs sobre os isolados do patógeno.

## Discussão

Visando selecionar agentes de biocontrole (BCAs) *in vitro* que pudesse ser utilizados futuramente no controle da podridão-do-estipe da pupunheira, foram realizados ensaios de pareamento procurando confrontar cinco isolados de *P. palmivora*, com 40 candidatos a BCAs. Os cinco isolados de *P. palmivora* avaliados apresentaram diferenças entre si quando

confrontados com os BCAs. Alguns BCAs que provocaram redução de 30 ou 40% no crescimento de isolados de *P. palmivora* mostraram menor ação sobre uns do que sobre outros, indicando que existem variações entre os isolados obtidos de pupunheira. Paim (2005), também observou variações morfométricas e moleculares (RAPD) entre os isolados de *P. palmivora* de pupunheira, notadamente quando comparados com àqueles obtidos de mamoeiro e cacau. Desta forma, haveria a necessidade da realização de mais investigações em relação à variabilidade entre isolados desta espécie originários da pupunheira.

Observou-se que a maior ação inibitória exercida pelos BCAs sobre o crescimento dos isolados do patógeno, foi de 48% (isolado 401 com os BCAs 64, ALF247 e ES4), resultados estes inferiores aos apresentados por diversos agentes de biocontrole já confrontados com isolados de *P. palmivora* provenientes de outros hospedeiros.

Tavares (2009) testando 70 BCAs de diferentes espécies de *Trichoderma* contra isolados do agente causal da podridão das raízes do mamoeiro *in vitro*, observou reduções de 46,3 a 74,5%, com pelo menos 21 isolados apresentando mais de 50% de inibição. Os resultados de Tocafundo (2008), por outro lado, são mais semelhantes aos obtidos neste trabalho. De um total de 18 isolados de *Trichoderma* avaliados, a autora observou que 16 apresentaram inibição no crescimento de *P. palmivora* de 29 e 54%. Dois isolados foram capazes de inibir 50% ou mais do crescimento do patógeno.

Com relação à atuação de *Trichoderma* em outras espécies de *Phytophthora*, Corrêa et al. (2002) observaram bom desempenho dos BCAs, *in vitro*,

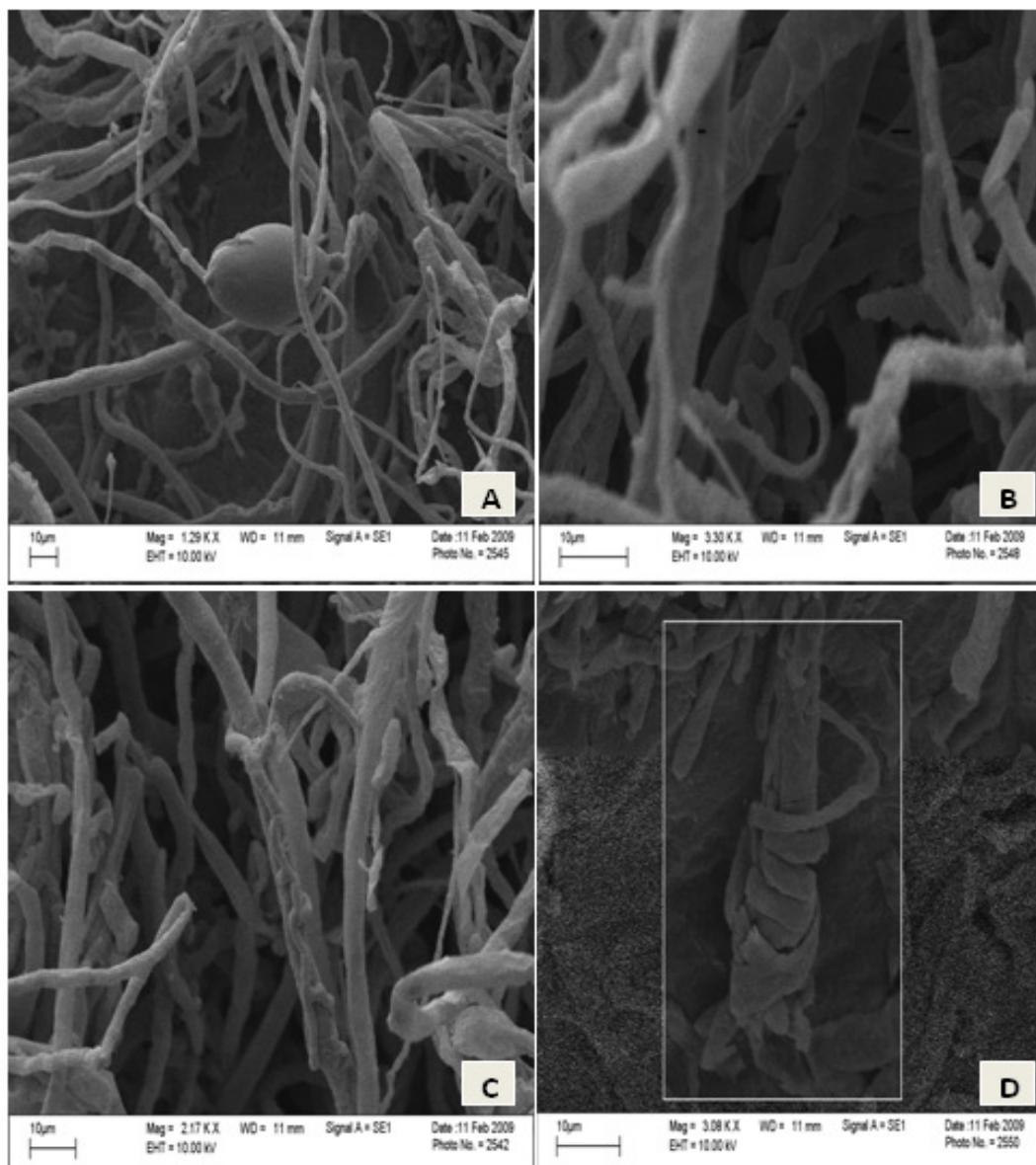


Figura 4 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostrando o parasitismo e interações de *Trichoderma* sp. com *Phytophthora palmivora*. (A) esporângio de *P. palmivora* sendo parasitado pela hifa de *Trichoderma* sp. (B, C e D) hifas de *Trichoderma* sp. enroladas nas hifas de *P. palmivora*.

também sobre *P. nicotianae*. Contra patógenos de outros gêneros, como *Rhizoctonia solani*, mais de 20 isolados de *Trichoderma* entre 68 testados, foram capazes de inibir o crescimento do fungo de 70 e 100% (Pinto, 2002).

Espécies de *Trichoderma* são parasitas de uma ampla gama de fitopatógenos, a despeito da maioria dos empregados como agentes no biocontrole de doenças de plantas, apresentarem certo grau de especialização.

Desta forma, o nível de controle pode variar dentro e entre espécies de *Trichoderma* a depender de sua adaptação às condições bióticas e abióticas (Louzada et al, 2009).

No presente estudo, a grande maioria dos isolados de *Trichoderma* era proveniente da região sul da Bahia, e vários deles se revelaram efetivos *in vitro* contra diversos fitopatógenos importantes, tais como *P. palmivora* do mamoeiro e da pupunheira e

*Moniliophthora perniciosa* do cacaueiro (dados não publicados). O potencial dos isolados testados, necessita ainda ser melhor avaliado em ensaios conduzidos sob condições controladas e de campo.

Os três tipos de interação descritos por Moore-Landecker (1996), foram aqui observados entre *P. palmivora* x *Trichoderma spp* (Figura 3). No caso do isolado de *Gliocladium virens* (T68) avaliado, foi observada interação do tipo substituição, havendo superposição do micélio em todos os isolados de *P. palmivora* testados, além da esporulação sobre as colônias do patógeno. Três isolados de *Trichoderma* T26 (*T. koningiopsis*), T61 (*T. harzianum*) e 913 (*T. pseudokoningii*) causaram antibiose, embora, tivessem crescido, posteriormente, sobre a colônia de *P. palmivora*, paralisando o seu desenvolvimento. A antibiose é um dos principais mecanismos de ação dos antagonistas do gênero *Trichoderma* (Bastos, 1991), sendo este mecanismo ainda mais importante, quando está aliado ao parasitismo. A associação de mais de um mecanismo de ação em um BCA é essencial, segundo Melo (1998).

A despeito de não ter sido usada neste trabalho, a metodologia mais adequada para avaliar a existência de antibiose (Bharat et al., 1980), foi possível observar algumas mudanças de coloração do meio de cultura (Figura 4 A), além da formação de halo, indicando a produção de substâncias antibióticas por parte dos antagonistas. Para Claydon et al. (1987), antibióticos são produtos do metabolismo secundário que podem ser até mais importantes do que a competição, por espaço ou nutrientes, na inibição de outros organismos.

Bonfim (2007) comprovou a produção de metabólitos voláteis por várias espécies de *Trichoderma*, principalmente, pela espécie *T. viride*.

Todos os tipos de interação observados mostraram, em maior ou menor grau, a capacidade antagônica dos BCAs na inibição do crescimento de *P. palmivora*. Entretanto, a interação por substituição, demonstrou ser visualmente mais drástica que o entrelaçamento, principalmente, quando acompanhada da esporulação sobre a colônia do patógeno (Figura 4). Neste trabalho, os seguintes BCAs apresentaram tal característica: ALF 247, ES 4, 421, 889, 2927, 2952, 4006 B, T 61, TC 25, 64, 905, 7CC e TC26. Tais isolados pertencem a diferentes espécies de *Trichoderma*, o que mostra que esta característica é comum ao gênero.

Ao serem observadas interações do tipo substituição ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), se constatou a presença de hifas de *Trichoderma* enovelando as de *P. palmivora* (Figura 4), caracterizando assim o mecanismo de hiperparasitismo.

Inbar et al. (1996) e Ávila et al. (2005), também verificaram por meio do MEV e da microscopia de luz, interações semelhantes entre hifas de *T. harzianum* e *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*.

Deve ser levado em consideração que os resultados com antagonistas obtidos *in vitro*, nem sempre podem ser confirmados em condições de campo, uma vez que esses organismos estão sujeitos a reações diferenciais do hospedeiro e do ambiente (Harman, 1990), embora Mariano (1993) e Ethur et al. (2001), tenham obtido boas correlações entre resultados de estudos *in vitro* com aqueles obtidos em campo para diversos patógenos e culturas.

Deste modo, os isolados ES 4, 421, 889, 2927, 2952, 4006 B, T 61 (*T. harzianum*), TC 25 (*T. longibrachiatum*), 64 (*T. piluliferum*), ALF 247 (*T. martiale*), 905 (*T. viride*), 7CC (*T. atroviride*), TC26 (*T. koningiopsis*) e 913 (*T. pseudokoningii*) poderiam ser recomendados para serem testados *in vivo* no controle da podridão-do-estipe da pupunheira, uma vez que apresentaram os mecanismos de antibiose e parasitismo, além da capacidade de esporularem sobre as colônias do patógeno.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão de bolsas as duas primeiras autoras, a Comissão Executiva da Lavoura Cacauícola- CEPLAC e a Ana Rosa Niella e Ademilde Cerqueira.

## Literatura Citada

- ÁVILA, Z. R. et al. 2005. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfsi* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos. Boletim Técnico de Desenvolvimento e Pesquisa n° 177. 30p.

- BAKER, K. F.; COOK, R. J. 1974. Biological control of plant pathogens. San Francisco, W.F. Freeman. 433p.
- BASTOS, C.N. 1991. Possibilidade do controle biológico da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacaueiro. In: Bettoli, W., org. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna, EMBRAPA-CNPDA. pp.333-335.
- BENCHIMOL, R. L. et al. 2001. Podridão-do-estipe da Pupunheira In: Luz, E. D. M. N. et al., ed. Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas,SP, Livraria e Editora Rural Ltda. pp.609-628.
- BETTIOL, W. 1991. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: Bettoli, W. org. Controle biológico de doenças de plantas. Brasília, EMBRAPA. pp. 1-5.
- BHARAT, R.; SINGH, V. N.; SINGH, D. B. 1980. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. Plant and Soil 57:131-135.
- BRAVO, E.; HEDGER, J. 1988. Microflora associated with "witches broom" in cocoa and its potential role in the biological control of the pathogen *Crinipellis perniciosa*. In International Cocoa Conference, 10°, 1987. Proceedings. Santo Domingo, República Dominicana, Cocoa Producers Aliance. pp. 345-353.
- BONFIM, P. M. 2007. Antagonismo *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. A *Rhizopus stolonifer*. Em maracujazeiro amarelo. Vitória da Conquista, BA. UESB.
- CAPALBO, D. M. F.; NARDO, E. A. B. 2000. Análise de risco e impacto ambiental do uso de agentes de controle biológico. In: Melo, I. S.; Azevedo, J.L.,eds. Controle biológico. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente pp. 351-387.
- CLAYDON N. et al. 1987. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. Transactions of the British Mycological Society 88, 503-13.
- CLEMENT, C. R.; BOVI, M. L. A. 1999. Melhoramento genético da pupunheira: conhecimentos atuais e necessidades In: I Seminário do Agronegócio de Palmito de Pupunha na Amazônia. Rondônia,Embrapa, Porto Velho,RO., SEBRAE & Cooperama.
- COOK, R. J.; BAKKER, K. F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul,The American Phytopathological Society. 615p.
- CORABI-ADELL, C. 2004. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (Hypocreales - FUNGI) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica. Tese Doutorado. Rio Claro,SP.Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 220p.
- CORRÊA, E. B; MORETTO, K.C.K; GOES, A. de. 2002. Estudo da potencialidade de isolados de *Trichoderma* spp. como agente de controle biológico de *Phytophthora nicotiana* VAR. *parasitica*. In: Congresso Paulista de Fitopatologia, 25°. Resumo 070. Pinhal, APF. pp.112.
- DIANESE, A.C. de. 2006. Variabilidade e Controle de *Phytophthora palmivora* (podridão-do-pé) e Controle da Varíola (*Asperisporium caricae*) do mamoeiro (*Carica papaya*).Tese Doutorado. Brasília, DF, UNB. 104 p.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. 1994. Basic plant pathology methods. 2° ed., London, Lewis Publishers. 434 p.
- ETHUR, L. Z.; CEMBRANEL, C. Z.; DA SILVA, A. C. F. 2001. Selection of *Trichoderma* spp. seeking the control of *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. Ciência Rural (Brasil) 31(5).
- GUERREIRO, L. F. 2002. Palmito de Pupunha Agencia de Fomento do Estado da Bahia Desenbahia. Estudo de Mercado. pp.6-7.
- HANADA, R. E. 2006. Controle de *Phytophthora palmivora*, agente causal da podridão-parda dos frutos de cacaueiro com fungos endofíticos. Tese Doutorado. Manaus, AM - UFA. 101 p.
- HARMAN, G. E. 1990. Development tactics for biocontrol fungi in plant pathology. In: Baker, R.R.; Dunn, P.E. New directions in biological control. New York, Willey - Liss. pp. 779-792.
- HARMAN, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol-changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84: 377-393.
- HARMAN, G. E. 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature 2: 43-56.

- HERMOSA, M. R. et al. 2000. I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. Applied Environmental Microbiology 66: 1890-1898.
- HOWELL, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease 87: 4 -10.
- INBAR, J.; MENENDEZ, A.; CHET, I. 1996. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. Soil Biology and Biochemistry 28(6): 757-763.
- KALIL FILHO, A. N. K; STURION, J. A. 2003. Componentes da variância e herdabilidade do peso das sementes de Pupunha (*Bactris gasipaes* Kunt). Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo, n.º 46. pp. 85-90.
- KANNWISCHER, M. E.; MITCHELL, D. J. 1978. The influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco. Phytopathology 68:1760-1765.

●