

IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS AGENTES FÚNGICOS BIOCONTROLADORES DE *Phytophthora* spp.

**Marcos Vinícius Oliveira dos Santos^{1,2}, Daniele Cristina Silva de Araújo¹, Tacila Ribeiro Santos¹,
Stela Dalva Vieira Midlej Silva¹, José Luiz Bezerra^{1,2}, Edna Dora M. Newman Luz¹**

¹CEPLAC/CEPEC, Setor de Fitopatologia, km 22, Rodovia Ilhéus/Itabuna, Caixa Postal 07, 45600-970, Ilhéus, Bahia, Brasil.

²Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Micologia, Av. Prof. Nelson Chaves, s/nº, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil. Autor para correspondência: marcosvos@ymail.com

Fitopatógenos do gênero *Phytophthora* afetam diversas espécies vegetais. Em busca de métodos de controle menos prejudiciais ao meio ambiente, este trabalho foi desenvolvido objetivando isolar, identificar e selecionar agentes biocontroladores (BCAs) em propriedades agrícolas localizadas no Sul da Bahia e realizar testes *in vitro* entre os BCAs isolados e espécies de *Phytophthora* fitopatogênicas. Através de métodos diretos e indiretos, espécies fúngicas foram isoladas e identificadas por critérios morfofisiológicos. Os isolados obtidos foram confrontados *in vitro* com isolados de *P. nicotiana* (3), *P. palmivora* (2), *Phytophthora* sp. (1) e *P. cinnamomi* (1). Os raios médios das culturas confrontadas e das testemunhas foram comparados pelo teste de Tukey a 5% através do programa SAS e os confrontos avaliados quanto ao tipo de reação antagônica. Quatro isolados de *Trichoderma* foram obtidos e identificados como: *T. harzianum* (2), *T. virens* (1), *T. atroviride* (1) e um como *Clonostachys compactiuscula*. Todos os agentes reduziram significativamente o raio médio das colônias dos fitopatógenos. Nos confrontos entre *Trichoderma* e *Phytophthora* verificou-se substituição, impasse ou entrelaçamento de hifas, além de hiperparasitismo. O isolado de *C. compactiuscula* exerceu antibiose às colônias de *Phytophthora*. Os isolados de *Trichoderma* spp. (164, 167, 168, 171) e de *C. compactiuscula* (174) são potenciais agentes biocontroladores de *Phytophthora* spp.

Palavras-chave: Controle biológico, taxonomia, *Trichoderma* spp., *Clonostachys compactiuscula*.

Identification of potential fungal biocontrol agents against *Phytophthora* spp.

Phytopathogens of the genus *Phytophthora* affect several vegetables species. In search of environmental friendly disease control methods, this study was proposed with two objectives: isolate, identify and select potential biocontrol agents (BCAs) in farms located in Southern Bahia and perform *in vitro* tests of BCAs isolates against phytopathogenic *Phytophthora* species. Fungal species were isolated through direct and indirect methods and identified by morphophysiological criteria. The isolates obtained were confronted *in vitro* with isolates of *P. nicotiana* (3), *P. palmivora* (2), *Phytophthora* sp. (1) and *P. cinnamomi* (1). The average radius of the confronted cultures and controls were compared by Tukey test at 5% using the SAS program. The type of antagonistic reaction of each confrontation was also determined. Four isolates of *Trichoderma*, *T. harzianum* (2), *T. virens* (1), *T. atroviride* (1), and one of *Clonostachys compactiuscula* were obtained and identified. All biocontrol agents reduced significantly the average radius of the pathogens colonies. *Trichoderma* spp. competed against *Phytophthora* spp. by mycelial substitution, mycelial deadlock, hyphal intermingling and hyperparasitism. The *C. compactiuscula* isolate showed antibiosis against colonies of *Phytophthora*. The isolates of *Trichoderma* spp. (164, 167, 168, 171) and of *C. compactiuscula* (174) are potential biocontrol agents of *Phytophthora* spp.

Key words: Biological control, taxonomy, *Trichoderma* spp., *Clonostachys compactiuscula*.

Introdução

As espécies de *Phytophthora* são conhecidas como patógenos de cultivos agrícolas e de algumas espécies florestais. Entre as medidas de controle mais utilizadas contra as doenças provocadas por esses fitopatógenos pode-se citar o uso de fungicidas, o plantio em solos bem drenados, a utilização de cultivares ou porta-enxertos resistentes, a poda fitossanitária, dentre outras (Kinati et al., 2005). O uso de fungicidas, apesar de apresentar eficiência em alguns casos, pode gerar graves impactos no ecossistema, provocar o surgimento de populações do patógeno resistentes ao produto químico e oferecer riscos à saúde humana (Schumann & D' Arcy, 2006), além de aumentar os custos da produção.

Diversas pesquisas têm sido realizadas em busca de métodos que possam substituir ou serem utilizados de forma integrada ao controle químico, visando à implantação de uma agricultura sustentável, da qual o controle biológico é um componente essencial (Steyaert et al., 2004). Os agentes biocontroladores (BCAs), fungos, bactérias, vírus e nematoides, interagem com os fitopatógenos através de um ou mais mecanismos, tais como: indução de resistência, proteção cruzada e antagonismo; sendo este último subdividido em antibiose, competição, hiperparasitismo, predação e hipovirulência, mas é provável que os diferentes mecanismos atuem em sinergia durante a interação antagônica (Punja & Utkhede, 2003).

Entre os BCAs mais conhecidos, destacam-se espécies de *Trichoderma* e *Clonostachys*, formas anamórficas de *Hypocreia* e de *Bionectria* (Filo Ascomycota), respectivamente (Alexopoulos et al., 1996; Schroers, 2001). Estes fungos têm sido muito utilizados em experimentos que visam encontrar medidas de controle menos agressivas ao meio ambiente (Krauss & Soberanis, 2001; Tondje et al., 2007; Moraga-Suazo et al., 2011; Ondráeková et al., 2013). Produtos formulados a partir desses microrganismos já são comercializados, principalmente no exterior, e alguns desses são específicos para o controle de oomicetos, dos gêneros *Pythium* e *Phytophthora* (Blum, 2006).

Na região Sul da Bahia estão presentes diferentes patossistemas envolvendo *Phytophthora* spp. e espécies vegetais de importância econômica como o

mamoeiro (*Carica papaya* L.), o cacaueiro (*Theobroma cacao* L.), a seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg) e a pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth). O antúrio (*Anthurium andreanum* Lindl.) apresenta problemas com *P. citrophthora* (Sm. e Sm.) Leonian (Paim et al., 2006); e a espécie *P. nicotianae* Breda de Haan encontra-se presente em diversos cultivos instalados em municípios da região (Santos e Luz, 2011; Santos et al., 2011). Aliam-se a isto as condições ambientais favoráveis como: umidade relativa do ar elevada, chuvas frequentes e temperaturas médias anuais raramente inferiores a 20 °C. Por isso, o presente trabalho teve como objetivos isolar, identificar e selecionar agentes microbianos biocontroladores em propriedades agrícolas localizadas no Sul da Bahia e realizar testes *in vitro* entre os BCAs isolados e espécies do gênero *Phytophthora* fitopatogênicas.

Material e Métodos

Isolamento e identificação dos potenciais agentes biocontroladores

Amostras de tecidos vegetais e de solos de locais onde foram identificados fitopatógenos do gênero *Phytophthora* foram coletadas nos municípios de Itabuna e Uruçuca, Bahia, Brasil, em 2008, em propriedades agrícolas dedicadas à agricultura familiar. As amostras foram processadas no Laboratório de Diversidade de Fungos do Centro de Pesquisas do Cacau, em Ilhéus-BA, para isolamento, utilizando-se dois métodos, o direto e o indireto.

Em campo, foram observadas estruturas fúngicas distintas sobre as lesões típicas de *Phytophthora* e de outros fitopatógenos, as quais, em laboratório, foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) acidificado, com gotas de ácido lático, conforme a técnica de isolamento direto descrita por Krauss & Soberanis (2001).

Outros isolados também foram obtidos de forma indireta por meio da técnica de placa pré-colonizada descrita por Krauss et al. (1998). O isolado de *Phytophthora citrophthora* (521) obtido de antúrio em Ituberá-BA foi cultivado em placas de Petri contendo BDA acidificado e, após a colônia do isolado abranger toda a placa, foram colocados grânulos de

solo obtido nos locais de coleta de *Phytophthora* sobre as áreas mais novas da colônia, em quatro pontos equidistantes por placa. Após três a seis dias, observou-se o desenvolvimento de micélios de antagonistas sobre as colônias de *P. citrophthora* através do microscópio ótico e da visualização “a olho nu” das microcolônias.

Os isolados dos possíveis fungos antagonistas foram caracterizados macroscopicamente através da coloração, formato e crescimento das respectivas colônias. Ao microscópio ótico observou-se a morfologia das hifas, conidióforos e conídios, os quais foram devidamente mensurados, para possibilitar a identificação de gênero e espécie utilizando-se a literatura especializada para cada grupo de fungo estudado (cada característica taxonômica foi aferida em 25 ou 50 estruturas/isolado, de acordo com a disponibilidade das estruturas).

Para a realização de testes de temperaturas cardinais, placas de Petri com BDA, corn meal ágar (CMA) ou corn meal dextrose ágar, contendo discos de cultura com 5 mm de diâmetro de cada isolado, foram incubadas em câmara B.O.D. nas temperaturas de 25; 27; 30; 33; 35 e 40 °C, a depender do gênero fúngico, por um período de três a sete dias. As avaliações foram diárias para medir o crescimento do raio das colônias com o auxílio de uma régua milimetrada.

Confrontos *in vitro* entre *Phytophthora* e BCAs

Em placas de Petri, sete isolados de *Phytophthora* spp. (Tabela 1) e cinco possíveis BCAs foram confrontados entre si, conforme Moore-Landecker (1996). Em confrontos com antagonista de rápido crescimento, inseriu-se discos de colônia de *Phytophthora* com 5 mm de diâmetro, 48 h antes, a 1,5 cm de distância da margem das placas contendo

meio de cultura cenoura-ágar. O antagonista de crescimento lento foi repicado oito dias antes da deposição dos discos de *Phytophthora*. Cada confronto foi repetido quatro vezes e culturas puras dos isolados de *Phytophthora* e dos BCAs foram utilizadas como testemunhas. As placas foram distribuídas aleatoriamente em uma bancada no laboratório à temperatura de 25°C. Realizaram-se leituras em 24, 48, 72 e 96 h após a montagem dos confrontos, medindo o raio das colônias e observando também as reações antagônicas entre os fitopatógenos e os possíveis agentes biocontroladores, segundo a classificação de Moore-Landecker (1996). Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância e ao teste de Tukey ($P < 0,05$) através do programa SAS.

Processamento das amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura

Após o final dos testes *in vitro* entre *Phytophthora* e BCAs, foram selecionados oito confrontos distintos com amostras a serem analisadas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). Fragmentos com aproximadamente 0,5 cm foram retirados da área de encontro das hifas de *Phytophthora* e do BCA e colocados em frascos etiquetados contendo o fixador gluteraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, por 4 horas. Após este período, as amostras foram lavadas seis vezes consecutivas em tampão cacodilato, com duração de 10 minutos para cada lavagem. Em seguida foram colocadas em OsO₄ a 1% em tampão cacodilato 0,1 M, por 4 horas. As amostras foram lavadas novamente com o tampão, como descrito anteriormente, e iniciou-se a desidratação em banhos de série crescente de soluções de álcool a 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% em intervalos consecutivos

Tabela 1. Isolados de *Phytophthora* spp. de diferentes cultivos em municípios do Sul da Bahia utilizados em confrontos *in vitro* com possíveis agentes biocontroladores

Isolado	Espécie	Nome científico (nome comum)
1107 ^{(1)*}	<i>P. palmivora</i> (Butler) Butler	<i>Ocimum basilicum</i> L. (Manjericão)
1187 ^{(1)*}	<i>P. nicotianae</i> Breda de Haan	<i>Solanum lycopersicum</i> L. (Tomate)
1108 ^{(2)*}	<i>P. palmivora</i>	<i>Musa coccinea</i> Ander (Bananeira ornamental)
1186 ^{(2)*}	<i>Phytophthora</i> sp.	<i>Etlingera elatior</i> (Jack) R.M.Smith (Bastão do Imperador)
1178 ^{(3)*}	<i>P. nicotianae</i>	<i>Solanum melongena</i> L. (Berinjela)
1188 ^{(4)*}	<i>P. cinnamomi</i> Rands	<i>Heliconia bihai</i> L. (Helicônia bihai)
1180 ^{(5)**}	<i>P. nicotianae</i>	<i>Dracaena sanderiana</i> Hort. (Dracena baby)

Locais de coleta: ⁽¹⁾Itacaré, ⁽²⁾Ituberá, ⁽³⁾Itabuna, ⁽⁴⁾Ilhéus, ⁽⁵⁾Uruçuca. *Isolados da rizosfera dos cultivos, **isolado de tecido foliar.

de 10 minutos, e após, por três vezes seguidas em álcool 100% a cada 20 minutos. Em seguida, foi realizada a desidratação em solução contendo álcool P.A. e acetona P.A. nas proporções 3:1, 1:1 e 1:3, em intervalos de 10 minutos e, por duas vezes consecutivas, em acetona P.A., com duração de 15 minutos cada. Após esta etapa, as amostras foram submetidas ao Ponto Crítico por 40 minutos. Por último, as amostras foram metalizadas durante 80 s com a deposição de uma fina camada de ouro com cerca de 20 nm de espessura. As amostras processadas foram analisadas através do microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss do Brasil modelo LEO 1430 VP.

Resultados e Discussão

Foram isolados cinco possíveis agentes fúngicos biocontroladores (BCAs) de *Phytophthora*, sendo três destes oriundos do município de Itabuna-BA, através do método indireto (grânulos de solo). O isolado 164, da rizosfera de quiabeiro (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) e 167 e 168 da rizosfera de aboboreira (*Cucurbita moschata* Duch). Os outros dois isolados (171 e 174) foram oriundos do município de Uruçuca, o 174 de folha de abacaxizeiro (*Anonas comosus* L.) através do método direto e o 171 pelo isolamento de tecido foliar de antúrio (*Anthurium andeanum* Lindl.) em meio de cultura BDA acidificado. Os isolados identificados por critérios morfofisiológicos pertencem aos gêneros *Trichoderma* (164, 167, 168 e 171) e *Clonostachys* (174).

Caracterização morfológica

Trichoderma harzianum Rifai

Descrição baseada nos isolados 164 e 168 - conidióforos pouco definidos (Figuras 1A e C), ramificando-se geralmente duas a três vezes em formato piramidal, com longas ramificações próximas à base do eixo principal e ramificações mais curtas em direção à extremidade, sendo que as secundárias e terciárias surgiam em ampla angulação (Samuels et al., 2006). Fiáldes ampuliformes com variação da média do comprimento de $6,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (168) a $7,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$ (164). O ponto médio das fiáldes variou entre $2,9 \mu\text{m}$ (164) e $3,0 \mu\text{m}$ (168). Largura média da base

variando de $1,9 \mu\text{m}$ (164) a $2,0 \mu\text{m}$ (168). A razão comprimento/largura das fiáldes variou de 2,2:1 (168) a 2,6:1 (164). Conídios verde-claros, lisos (Figuras 1B e D), variando de subglobosos a elipsoidais para o isolado 164 e de subglobosos a globosos e elipsoidais no isolado 168. Conídios de $3,1 \pm 0,1 \times 2,7 \mu\text{m}$ (168) a $3,5 \pm 0,1 \times 3,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$ (164) e relação comprimento/largura de 1,2:1. Ambos isolados formaram clamidósporos solitários (exemplo: Figura 1D), terminais e intercalares, subglobosos a globosos com $7,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (164) e $8,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (168) de diâmetro.

O raio médio das colônias, em BDA, após 72 h de incubação variou de 4,4 (168) a 4,3 cm (164) à temperatura de 30 °C e de 2,2 (164) a 2,5 cm (168) à temperatura de 35 °C. Nenhum dos isolados cresceu à temperatura de 40 °C, mas sobreviveram a esta temperatura após a finalização dos testes.

Trichoderma virens (Miller, Giddens e Foster) Arx

Descrição baseada no isolado 167 - conidióforos do tipo Gliocladium (Figura 1E) (Samuels et al., 2006) e fiáldes lageniformes a ampuliformes com dimensões médias de $8,7 \pm 0,3 \times 3,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$, possuindo largura média da base de $2,0 \mu\text{m}$ e relação comprimento/largura de 2,7:1. Conídios verde-claros, lisos (Figura 1F), subglobosos a elipsoidais, $4,2 \pm 0,1 \times 3,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$, com relação comprimento/largura de 1,9:1. Clamidósporos solitários, terminais e intercalares, globosos a subglobosos, com diâmetro médio de $7,7 \mu\text{m} \pm 0,2$. Colônias incubadas a 30 e 35 °C apresentaram raios médios de 4,4 e 2,7 cm, respectivamente. Não houve crescimento micelial à temperatura de 40 °C, mas verificou-se a sobrevivência do isolado após o final do teste.

Trichoderma atroviride P. Karst.

Descrição baseada no isolado 171 - conidióforos com ramificações opostas (Figura 1G) terminando em grupos de fiáldes lageniformes. Fiáldes com dimensões médias de $8,4 \pm 0,3 \times 2,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$, largura média da base de $1,9 \mu\text{m}$ e relação comprimento/largura de 3,2:1. Conídios verde-claros, lisos (Figura 1H), predominantemente subglobosos, e ocasionalmente elipsoides a ovoides, medindo em média $3,7 \pm 0,1 \times 3,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$, com relação comprimento/largura de 1,2:1. Clamidósporos terminais

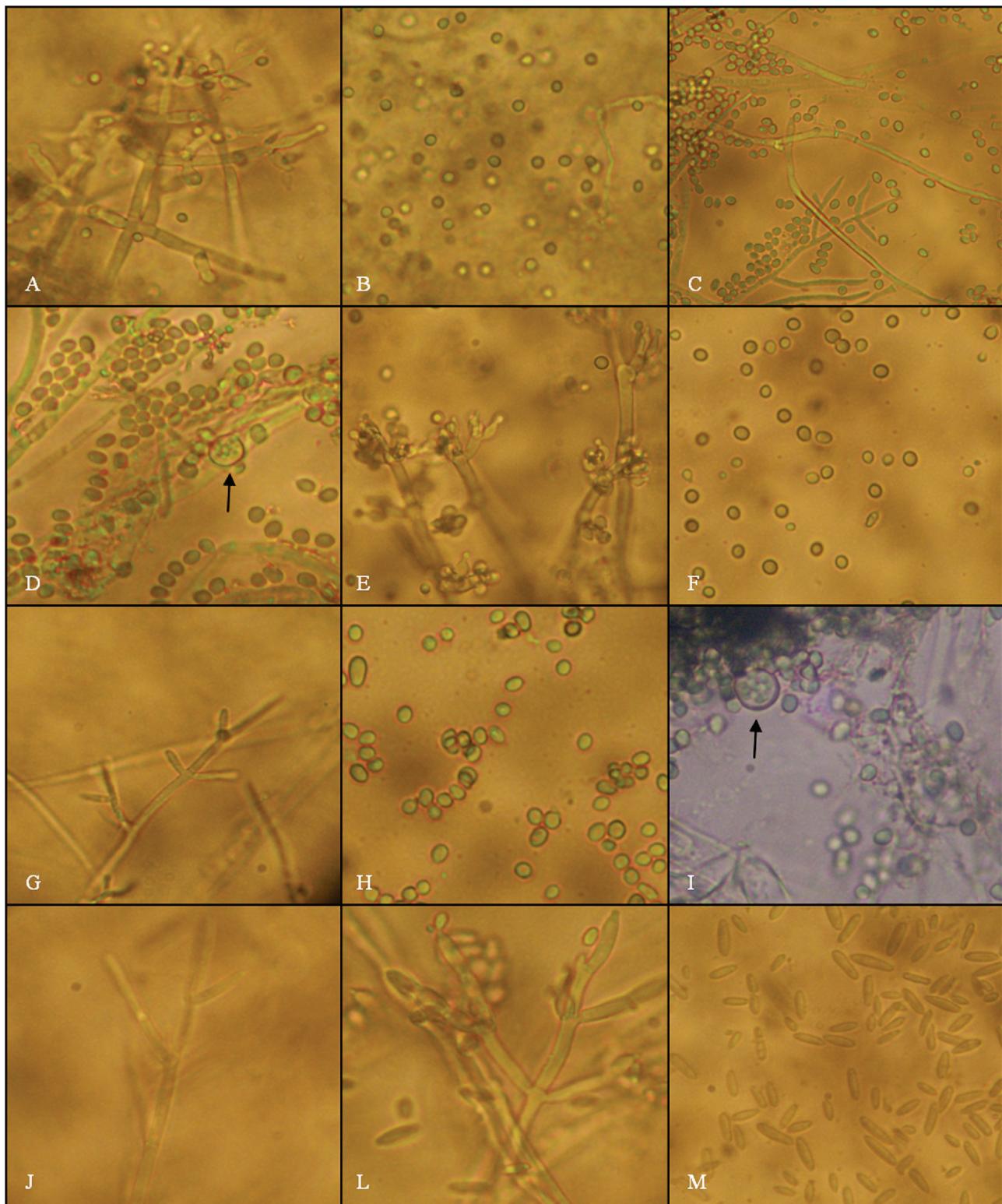


Figura 1. Estruturas assexuadas dos possíveis agentes biocontroladores. Conidióforos e conídios dos isolados de *Trichoderma*. *T. harzianum*: 164 (A, B) e 168 (C); *T. virens*: 167 (E, F); *T. atroviride*: 171 (G, H). Clamidósporos, indicados pelas setas, e conídios dos isolados 168 (D) e 171 (I). Conidióforo primário (J), secundário (L) e conídios (M) do isolado de *Clonostachys compactiuscula*, 174.

e intercalares, com diâmetro médio de $7,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$ (Figura 1I). Colônias com 4,3 cm de raio médio à 30 °C e 0,6 cm à 35 °C, não se verificando crescimento micelial a 40 °C, embora as colônias tenham sobrevivido a esta temperatura. Odor forte e doce de côco nas colônias (Samuels et al., 2002) tanto em BDA como em corn meal dextrose ágar, sendo esta característica importante na taxonomia desta espécie.

A identificação dos isolados de *Trichoderma* baseou-se nos critérios presentes na chave interativa de Samuels et al. (2002). As dimensões médias dos isolados 164 e 168 (*T. harzianum*) enquadram-se nos limites estabelecidos por este autor; Samuels et al. (2006), com exceção da relação comprimento/largura e do comprimento médio das fiáldes do isolado 164 que foi superior ao valor máximo definido na chave interativa (2,1:1 - 2,2:1; 6,5 - 6,7 μm , respectivamente). As médias das estruturas dos isolados de *T. virens* (167) e de *T. atroviride* (171) estão inseridas nos intervalos definidos nas duas descrições.

***Clonostachys compactiuscula* (Saccardo) Hawksworth e Gams**

Descrição baseada no isolado 174 - conidióforos dimórficos, sendo raros os conidióforos primários (Figura 1J), do tipo *Verticillium*, os quais são mononematosos, monoverticilados ou poliverticilados (Schroers, 2001). Fiáldes retas, cilíndricas, $14,6 \pm 0,5 \times 2,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$, com largura média da base de 2,1 μm . Conidióforos secundários (Figura 1L) com penicílos frequentemente ramificados, bi a quadri-verticilados. Fiáldes, $11,2 \pm 0,4 \times 3,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$, com largura média da base de $1,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$. Conídios hialinos (Figura 1M), quase retos, elipsoides a cilíndricos, possuindo um hilo lateral, $9,0 \pm 0,5 \times 2,4 \mu\text{m}$. Não houve crescimento micelial dos isolados, em meio BDA e CMA, após sete dias de incubação a 35 °C. A temperatura limite máxima para crescimento foi de 33 °C.

As dimensões médias das estruturas do isolado de *C. compactiuscula* (174) estão de acordo com os valores encontrados por Schroers (2001) e Samuels et al. (2006), variando apenas quanto ao comprimento médio das fiáldes do conidióforo primário, que encontra-se abaixo do limite mínimo estabelecido pelo primeiro autor (17 μm). Destaca-se também que o isolado 174 cresceu a 33 °C, temperatura um pouco superior ao limite estabelecido para a espécie (30 °C).

No entanto, as demais características taxonômicas suportam a sua classificação nesta espécie.

Confrontos *in vitro*

Nos confrontos *in vitro*, todos os possíveis BCAs apresentaram atividade antagônica aos isolados de *Phytophthora*. Nos confrontos realizados entre os sete isolados de *Phytophthora* spp. e os de *Trichoderma* spp. observou-se interações antagônicas, ocorrendo a competição por interferência (um organismo interfere na atividade de outro) e hiperparasitismo. Em decorrência da competição houve substituição, impasse ou entrelaçamento de hifas (Figuras 2A; B; C e D, respectivamente) segundo a classificação de Moore-Landecker (1996). Também foi observado que os isolados de *Trichoderma* spp. penetraram e colonizaram propágulos de *Phytophthora* spp. (relação hiperparasítica) (Figuras 2E, F e G).

Nos testes *in vitro* realizados entre os isolados de *Trichoderma* e os de *P. palmivora* (1107, 1108), *P. nicotianae* (1178, 1180 e 1187), *Phytophthora* sp. (1186) e *P. cinnamomi* (1188), observou-se que após 72 h do confronto, os raios médios das colônias de todos os patógenos confrontados diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) das suas testemunhas (culturas puras de cada um dos isolados, respectivamente), demonstrando o efeito inibidor dos isolados de *Trichoderma* (Tabela 2). Quando comparou-se o efeito dos possíveis BCAs para cada patógeno de “per se” ficou demonstrado que em relação aos confrontos com os isolados de *P. palmivora* (1108), *P. nicotianae* (1178 e 1180), *Phytophthora* sp. (1186) e *P. cinnamomi* (1188) não houve diferença estatística para efeito dos quatro antagonistas testados (Tabela 2). No entanto, para os isolados 1107 de *P. palmivora* e 1187 de *P. nicotianae* houve variação para o efeito dos possíveis BCAs.

Com relação ao isolado 1107, observou-se que o raio médio das colônias de *Phytophthora* confrontadas (RMC), diferiu estatisticamente do raio médio da testemunha (cultura pura de 1107) (Tabela 2). O confronto 1107x167, apresentou o menor RMC (3,53 cm) e não diferiu estatisticamente do confronto 1107x164, sendo que, o raio médio das colônias deste último tratamento não diferiu pelo teste de Tukey a 5% dos confrontos 1107x171 ou 1107x168.

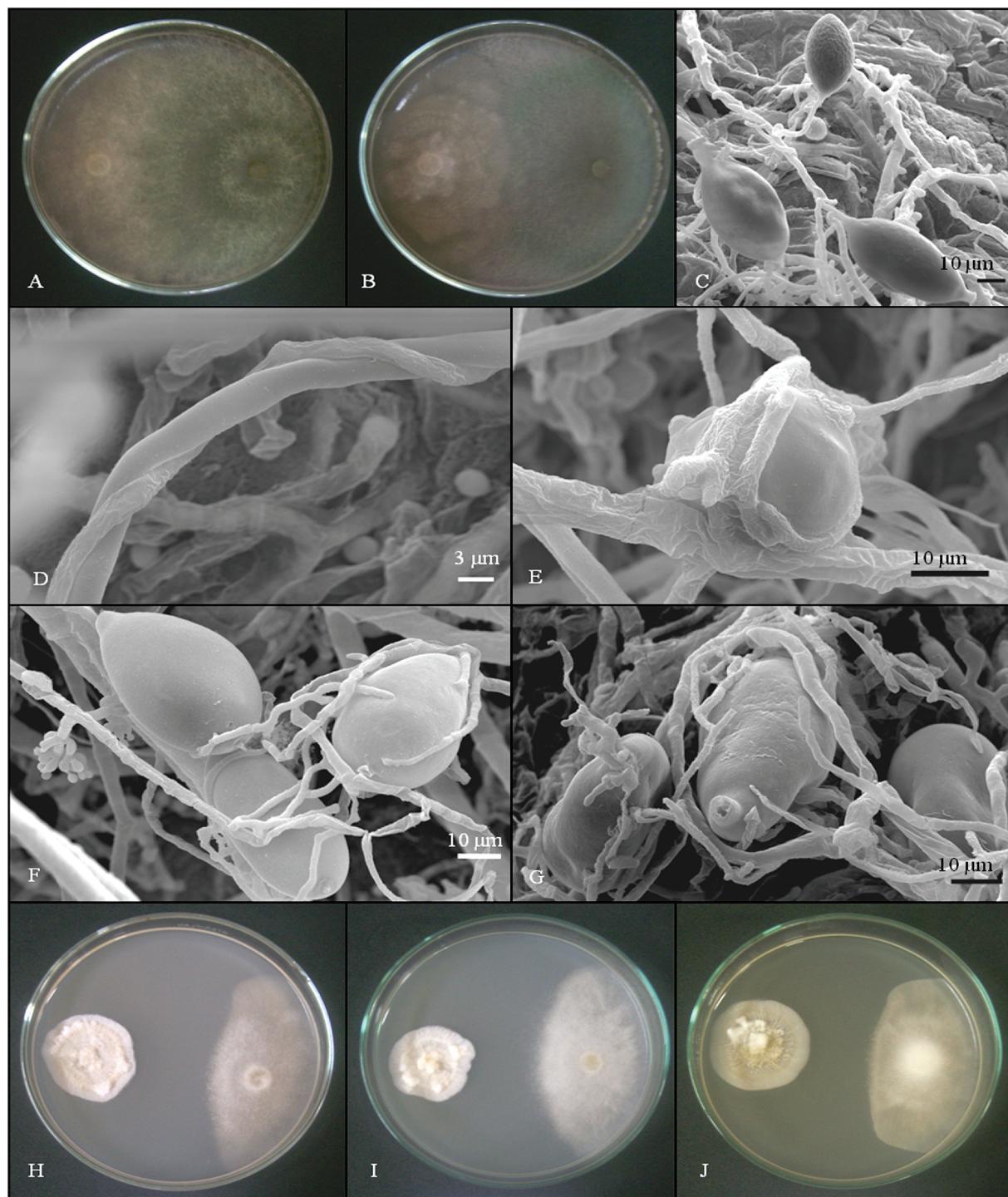


Figura 2. Testes *in vitro*. Confrontos entre isolados de *Phytophthora* spp. e de *Trichoderma* spp. (A - G), substituição, 1107x167 (A); impasse, 1186x171 (B); entrelaçamento de hifas, 1108x164 (C) e 1187x167 (D); hiperparasitismo de *Trichoderma* em propágulos de *Phytophthora* spp., 1186x168 (E), 1107x167 (F), 1108x164 (G). C, D, E, F e G são visualizações ao MEV. Confrontos entre isolados de *Phytophthora* spp. e de *Clonostachys compactiuscula* (174), antibiose (H - J), 1108x174, 1180x174 e 1188x174, respectivamente. Legenda dos isolados de *Phytophthora*: 1107, 1108 - *P. palmivora*; 1186 - *Phytophthora* sp.; 1187, 1180 - *P. nicotianae*; 1188 - *P. cinnamomi*. Legenda dos BCAs: 164 e 168 - *Trichoderma harzianum*; 167 - *T. virens*; 171 - *T. atroviride*; 174 - *Clonostachys compactiuscula*.

Quanto ao isolado 1187 de *P. nicotianae* também no confronto com o possível BCA 167 (*T. virens*) observou-se o menor raio médio das colônias, porém, o valor do RMC deste tratamento não diferiu daqueles obtidos para os confrontos desse patógeno com os isolados 168 (*T. harzianum*) e 171 (*T. atroviride*), os quais, por sua vez, não diferiram em inibição em relação ao isolado 164 (*T. harzianum*).

Nas observações ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) dos oito confrontos envolvendo os isolados de *Phytophthora* (Tabela 1) e os quatro isolados de *Trichoderma* (1107x167; 1108x164; 1108x171; 1178x167; 1180x167; 1186x168; 1187x167; 1188x171) foi visualizado o entrelaçamento das hifas de *Trichoderma* spp. sobre as das quatro espécies de *Phytophthora* (Figuras 2C e D) e também o entrelaçamento em esporângios de *P. palmivora* pelos isolados 167 e 164 (Figuras 2F e G). Isto comprova o hiperparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora* spp.

De acordo com Moore-Landecker (1996), o contato entre o micoparasita e o hospedeiro pode se dar pela produção de apressório ou de ramificações em forma de gancho. A morte do hospedeiro também pode ser induzida pela difusão de toxinas produzidas pelo micoparasita. Os dois modos de ação são utilizados por *Trichoderma* spp. que podem matar o hospedeiro pelo contato externo, mas algumas vezes penetram nas células hospedeiras. De acordo com Erwin et al. (1983), a lise hifal de *Phytophthora* devido a ação de fungos de solo é rápida. No caso de *Trichoderma* spp. existe o contato e o enrolamento

do parasita em torno da hifa do hospedeiro antes da penetração, como observado nos confrontos *in vitro* realizados (Figuras 2C e D).

Espécies de *Trichoderma* produzem enzimas hidrolíticas (α -1,3-glucanase e quitinase) que são responsáveis por romper a parede do hospedeiro, além disso, *Trichoderma* spp. produzem metabólitos voláteis (incluindo etileno e acetona) e antibióticos (difusíveis) (Moore-Landecker, 1996), tendo como exemplo *T. atroviride* que produz o antibiótico antifúngico 6-pentila-pirona, composto que proporciona o odor doce de côco, característico da espécie (Dodd et al., 2003), como observado em culturas do isolado 171.

Nos testes realizados, os quatro isolados de *Trichoderma* demonstraram agressividade aos fitopatógenos hospedeiros, reduzindo significativamente ($P < 0,05$) o crescimento das colônias, conforme observado pelas medidas do raio das colônias dos fitopatógenos quando confrontados em comparação com as culturas puras dos mesmos (Tabela 2).

Ao microscópio eletrônico de varredura comprovou-se o hiperparasitismo dos isolados de *Trichoderma* sobre *P. palmivora*, *P. nicotianae*, *Phytophthora* sp. e *P. cinnamomi*. Particularmente, notou-se a extrema agressividade dos isolados de *T. harzianum* (164), *T. virens* (167) e *T. atroviride* (171) quando confrontados com os isolados 1107 (de manjericão) e 1108 (de bananeira ornamental), ambos de *P. palmivora*. Como esta espécie produz esporângios com rapidez e em grande quantidade, foi possível visualizar o efeito das hifas de *Trichoderma* spp. parasitando os mesmos, parecendo já os haver penetrado (Figuras 2F e G).

Tabela 2. Raio médio (cm) das colônias de isolados de *Phytophthora* spp., após 72 h, crescendo em meio de cultivo cenoura-ágar em cultura pura (Test) ou confrontadas com isolados de *Trichoderma* spp. (BCAs)

Isolado	Espécie	Tratamento				
		Test	164	167	168	171
1107	<i>P. palmivora</i>	4,40a*	3,63bc	3,53c	3,80b	3,78b
1108	<i>P. palmivora</i>	3,98a	3,48b	3,18b	3,30b	3,18b
1178	<i>P. nicotianae</i>	3,96a	3,35b	3,13b	3,15b	3,18b
1180	<i>P. nicotianae</i>	4,13a	3,15b	3,20b	3,08b	3,21b
1186	<i>Phytophthora</i> sp.	4,19a	3,20b	2,85b	3,20b	3,18b
1187	<i>P. nicotianae</i>	4,41a	3,60b	3,35c	3,58bc	3,50bc
1188	<i>P. cinnamomi</i>	3,49a	2,73b	2,80b	2,78b	2,78b

*Médias seguidas de letras iguais, em linhas, não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Legenda dos BCAs: 164 e 168 - *Trichoderma harzianum*; 167 - *T. virens*; 171 - *T. atroviride*.

Em confrontos realizados entre os isolados de *Phytophthora* spp. (Tabela 1) e o de *Clonostachys compactiuscula* (174) houve competição por interferência através de antibiose (Figuras 2H, I e J), com suposta liberação de antibiótico no meio de cultura, capaz de inibir, em parte, o crescimento das colônias de *Phytophthora* sp. formando uma nítida barreira nas colônias dos fitopatógenos ao aproximarem-se das do possível BCA. Por isso, não houve o contato entre as colônias confrontadas.

Os raios médios das colônias dos isolados de *P. palmivora* (1107 e 1108), *P. nicotianae* (1178, 1180 e 1187), *Phytophthora* spp. (1186) e *P. cinnamomi* (1188) confrontadas com o isolado de *C. compactiuscula* (174) diferiram estatisticamente das testemunhas e não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5% (Tabela 3). Os raios médios das culturas de *Phytophthora* spp. confrontadas variaram de 1,80 cm (1108) a 2,43 cm (1178).

Espécies dos gêneros *Trichoderma* e *Clonostachys* são amplamente utilizadas em pesquisas, sob condições controladas e, ou a campo, como estratégias de controle mais sustentáveis para várias doenças causadas por *Phytophthora* (Krauss et al., 1998; Krauss & Soberanis, 2001; Deberdt et al., 2008; Sukhada et al., 2011; Vaz et al., 2012) e também por outros fitopatógenos, tais como *Botrytis cinerea* Pers. (Freeman et al., 2004, Silvera-Pérez et al., 2010), *Moniliophthora perniciosa* (Stahel Aime & Phillips-Mora (Bastos, 2011, 2012), *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (Ondráèková et al., 2013), entre outros.

Existem mais de 50 produtos a base de *Trichoderma* comercializados no mundo. No Brasil produtos formulados a partir de *Trichoderma* spp. e de *Clonostachys rosea* são utilizados no controle de doenças de plantas (Bettoli & Morandi, 2009), embora nenhum destes produtos tenha indicação para controle de doenças causadas por *Phytophthora* spp. Um dos últimos produtos lançados no mercado é o Tricovab, biofungicida elaborado a partir de propágulos de *T. stromaticum* Samuels & Pardo-Schulth., recomendado para o controle da vassoura-de-bruxa do cacaueiro (Ceplac, 2013).

Ambos os métodos direto e indireto proporcionaram de forma eficiente a obtenção de agentes fúngicos potenciais biocontroladores. Como os possíveis BCAs foram obtidos em diferentes cultivos a partir do solo ou diretamente dos tecidos vegetais, isto pode favorecer o sucesso destes agentes no controle de doenças causadas por fitopatógenos de solo como o são as espécies de *Phytophthora*. De acordo com Blum (2006) um antagonista tem mais chance de se adaptar a um determinado nicho (solo, semente, fruto, raízes ou folhas) se o mesmo tiver sido coletado em condições semelhantes. Em todos os locais de coleta as plantas apresentavam sintomas típicos de doenças e os isolados 164, 168 e 167 são provenientes de uma área agrícola onde se obteve isolados de *Phytophthora*.

Todos os micoparasitas obtidos demonstraram, em testes *in vitro*, potencial antagônico aos sete isolados das quatro espécies de *Phytophthora* testadas, o que sugere a sua ampla ação sobre espécies deste gênero,

Tabela 3. Raio médio (cm), obtido após 96 h, das colônias de isolados de *Phytophthora* spp. crescidas em cultura pura (Test) ou confrontadas com o isolado de *Clonostachys compactiuscula* (174)

Isolado	Espécie	Tratamento	
		Test	174
1107	<i>P. palmivora</i>	4,34a*	2,35b
1108	<i>P. palmivora</i>	3,95a	1,80b
1178	<i>P. nicotianae</i>	3,93a	2,43b
1180	<i>P. nicotianae</i>	3,73a	2,23b
1186	<i>Phytophthora</i> sp.	3,85a	2,16b
1187	<i>P. nicotianae</i>	4,24a	2,30b
1188	<i>P. cinnamomi</i>	3,13a	1,90b

*Médias seguidas de letras iguais, em linhas, não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

que é constituído de importantes fitopatógenos cosmopolitas e polífagos, que, em muitos casos, causam grandes impactos em cultivos agrícolas ou em ecossistemas naturais. São necessários testes futuros sob condições controladas e em campo para que os isolados fúngicos possam ser recomendados como agentes biocontroladores.

A presença de *Trichoderma* spp. e de *Clonostachys compactiuscula* nos cultivos agrícolas indica que, naturalmente, estes fungos devem estar agindo no controle biológico de fitopatógenos nas áreas onde foram encontrados. Demonstra também o potencial deste tipo de controle, se for utilizado adequadamente e em condições favoráveis à disseminação e ao estabelecimento dos BCAs presentes no agroecossistema, minimizando assim os impactos ambientais e os custos de produção, principalmente para propriedades direcionadas à agricultura familiar, tais como as utilizadas no presente estudo.

Conclusões

1. Nos municípios de Itabuna e Uruçuca foram isolados e identificados cinco possíveis agentes biocontroladores: *Trichoderma harzianum* (2), *T. virens* (1), *T. atroviride* (1) e *Clonostachys compactiuscula* (1) que demonstraram antagonismo *in vitro* a *Phytophthora palmivora*, *P. nicotianae*, *Phytophthora* sp. e *P. cinnamomi*.

2. Os quatro isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram antagonismo a *Phytophthora* spp. por mecanismos de competição dos tipos impasse, substituição ou entrelaçamento de hifas, enquanto *C. compactiuscula* apresentou antibiose nos confrontos com as quatro espécies de *Phytophthora*.

Agradecimentos

Ao CNPq e a FINEP, pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsas a Marcos Vinícius O. dos Santos, Edna Dora M. N. Luz e José Luiz Bezerra. À Ceplac, ao PPGPV - UESC, ao CME - UESC e ao DCBIO - UEFS pelo auxílio na execução dos experimentos realizados.

Literatura citada

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. 1996. *Introductory mycology*. 4 ed. New York, John Wiley e Sons, Inc. 869p.
- BASTOS, C. N. 2011. Avaliação do potencial de *Clonostachys* sp. no biocontrole da vassoura-de-bruxa do cacaueiro. *Agrotrópica (Brasil)* 23 (2,3): 95-100.
- BASTOS, C. N. 2012. Isolate of *Trichoderma brevicompactum* for the control of cocoa witches' broom disease: preliminary results. *Agrotrópica (Brasil)* 24(1): 21-26.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. 2009. Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas. 1 ed. Jaguariúna, SP, EMBRAPA MEIO AMBIENTE. 341p.
- BLUM, L. E. B. 2006. Controle biológico de fitopatógenos. In Blum, L. E. B.; Cares, J. E.; Uesugi, C. H. *Fitopatologia: estudo das doenças de plantas*. 1 ed. Brasília, Otimismo. pp.196-205.
- COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA - CEPLAC. 2013. Tricovab tem eficácia de até 97% contra vassoura-de-bruxa. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/restrito/lerNoticia.asp?id=2085>>. Acesso em: 16 jun. 2013.
- DEBERDT, P. et al. 2008. Impact of environmental factors, chemical fungicide and biological control on cacao pod production dynamics and black pod disease (*Phytophthora megakarya*) in Cameroon. *Biological Control* 44 (2):149-159.
- DODD, S. L.; LIECKFELDT, E.; SAMUELS, G. J. 2003. *Hypocreah atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia* 95 (1): 27-40.
- ERWIN, D. C.; BARTNICKI-GARCIA, S.; TSAO, P. H. eds. 1983. *Phytophthora Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. St. Paul, APS Press. 392p.

- FREEMAN, S. et al. 2004. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. European Journal of Plant Pathology 110 (4): 361-370.
- KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. eds. 2005. Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4 ed. São Paulo, SP, Agronômica Ceres. v. 2. 663p.
- KRAUSS, U.; BIDWELL, R.; INCE, J. 1998. Isolation and preliminary evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of crown rot of banana. Biological Control 13 (2): 111-119.
- KRAUSS, U.; SOBERANIS, W. 2001. Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. Biological Control 22 (2): 149-158.
- MOORE-LANDECKER, E. 1996. Fundamentals of the fungi. 4 ed. New Jersey, Prentice-Hall. 574p.
- MORAGA-SUAZO, P.; OPAZO, A.; ZALDÚA, S.; GONZÁLEZ, G.; SANFUENTES, E. 2011. Evaluation of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. strains to control *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings. Chilean Journal of Agricultural Research 71 (3): 412-417.
- ONDRÁCKOVÁ, E.; ONDREJ, M.; PROKINOVÁ, E.; NESRSTA, M. 2013. Mycoparasitic fungi reducing the incidence and virulence of *Bipolaris sorokiniana*. Czech Mycology 65 (1): 103-112.
- PAIM, M. C. A.; LUZ, E. D. M. N.; SOUZA, J. T.de; CERQUEIRA, A. O.; LOPES, J. R. M. 2006. *Phytophthora citrophthora* as a pathogen of *Anturium andeanum* in Bahia, Brazil. Australasian Plant Pathology 35 (2): 275-277.
- PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. Trends in Biotechnology 21 (9): 400-407.
- SAMUELS, G. J.; CHAVERRI, P.; FARR, D. F.; MCCRAY, E. B. 2002. Trichoderma Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/taxadescritions/keys/TrichodermaIndex.cfm>>. Acesso em: 2 jun. 2010.
- SAMUELS, G. J.; ROSSMAN, A. Y.; CHAVERRI, P.; OVERTON, B. E.; PÖLDMAA, K. 2006. Hypocreales of the Southeastern United States: An Identification Guide. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures. 145p.
- SANTOS, M. V. O.dos; LUZ, E. D. M. N. 2011. *Phytophthora nicotianae* na rizosfera de tomateiro e berinjela no Sudeste da Bahia. Summa Phytopathologica (Brasil) 37(2):153.
- SANTOS, M. V. O. dos; LUZ, E. D. M. N.; SOUZA, J. T.de. 2011. First record of *Phytophthora nicotianae* causing leaf blight on *Dracaena sanderiana*. New Disease Reports 24:28.
- SCHROERS, H-J. 2001. A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. Studies in Mycology 46: 215p.
- SCHUMANN, G. L.; D' ARCY, C. J. 2006. Essential Plant Pathology. St. Paul, APS Press. 338p.
- SILVERA-PÉREZ, A. E.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; DUARTE, V.; SANTOS, H. P.; FELIPPETO, J. 2010. Controle do mofo cinzento com *Clonostachys rosea* na produção de mudas de fúcsia. Tropical Plant Pathology 35 (3): 163-169.
- STEYAERT, J. M.; STEWART, A.; JASPERS, M. V.; CARPENTER, M.; RIDGWAY, H. J. 2004. Co-expression of two genes, a chitinase (chit42) and proteinase (prb1), implicated in mycoparasitism by *Trichoderma hamatum*. Mycologia 96 (6): 1245-1252.
- SUKHADA, M.; MANJULA, R.; RAWAL, R. D. 2011. Evaluation of arbuscular mycorrhiza and other biocontrol agents against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* infecting papaya (*Carica papaya* cv. *Surya*) and enumeration of pathogen population using immunotechniques. Biological Control 58 (1): 22-29.
- TONDJE, P. R. et al. 2007. Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. Biological Control 43 (2): 202-212.

VAZ, A. B.; LUZ, E. D. M. N.; OLIVEIRA, M. L.; SILVA, S. D. V. M.; SILVA, M. das G. C. P. C. 2012. Seleção *in vitro* de fungos antagônicos a

Phytophthora palmivora da pupunheira. Agrotrópica (Brasil) 24 (3):157-168.

