

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CONTROLE DE *Phytophthora palmivora*, AGENTE CAUSAL  
DA PODRIDÃO-PARDA DOS FRUTOS DE CACAUEIRO COM  
FUNGOS ENDOFÍTICOS**

**ROGÉRIO EIJI HANADA**

**MANAUS  
2006**

Ficha Catalográfica  
(Catalogação na fonte realizada pela Biblioteca Central - UFAM)

**Hanada, Rogério Eiji**

**H233c** **Controle de *phytophthora palmivora*, agente causal da podridão-parda dos frutos de cacauero com fungos endofíticos / Rogério Eiji Hanada . - Manaus: UFAM, 2006.**

**101 f.; il.**

**Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2006.**

**Orientador: Prof. Dr. José Odair Pereira**

**Co-orientador: Prof. Dr. Alan William Vilela Pomella**

1. Pragas agrícolas – Controle biológico 2. Fungos endofíticos 4. *Theobroma cacao* - Doenças e pragas I.Título

**CDU 633.74:632.937(043.2)**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ROGÉRIO EIJI HANADA**

**CONTROLE DE *Phytophthora palmivora*, AGENTE CAUSAL  
DA PODRIDÃO-PARDA DOS FRUTOS DE CACAUEIRO COM  
FUNGOS ENDOFÍTICOS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal do Amazonas,  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Doutor em Biotecnologia, área  
de concentração Ciências Agrárias**

**Orientador: Prof. Dr. José Odair Pereira  
Co-Orientador: Dr. Alan William Vilela Pomella**

**MANAUS  
2006**

**ROGÉRIO ELJI HANADA**

**CONTROLE DE *Phytophthora palmivora*, AGENTE CAUSAL  
DA PODRIDÃO-PARDA DOS FRUTOS DE CACAUEIRO COM  
FUNGOS ENDOFÍTICOS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal do Amazonas,  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Doutor em Biotecnologia, área  
de concentração Ciências Agrárias**

Aprovada em 30 de março de 2006

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. José Odair Pereira, Presidente  
Universidade Federal do Amazonas

Dr. Luadir Gasparotto, Membro  
Embrapa Ocidental

Dra. Rosalee Albuquerque Coelho Neto, Membro  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Dr. Rude Emerson de Lima Procópio, membro  
Centro de Biotecnologia da Amazônia

Prof. Dr. José Ferreira da Silva, Membro  
Universidade Federal do Amazonas

**À minha esposa Marineida  
Aos meus filhos Raíza, Rogério e Juíle  
pelo incentivo para realização desse trabalho**

## AGRADECIMENTO

A Deus, pelo dom da vida e pelas bênçãos derramadas a todo instante.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, pela oportunidade de realizar este curso.

À Universidade Federal do Amazonas, especialmente ao curso de Pós-graduação em Biotecnologia pelo apóio na realização deste trabalho.

À Empresa Almirante Cacau pelo suporte financeiro e por ter oferecido condições para realização deste trabalho, particularmente ao Dr. Willian Martin Aitken .

A Suframa pelo auxílio financeiro durante a condução desse trabalho em Itabuna – BA.

Ao Professor José Odair Pereira, pela orientação e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao Dr Alan William Vilela Pomella, pela compreensão, pelas críticas e sugestões durante a condução deste trabalho.

Ao Dr. José Luiz Bezerra pela prestimosa colaboração na identificação dos fungos.

Aos técnicos Aguinaldo, Iara, Ailton, Lívia, Alicio, Rui e Cosme, aos funcionários, Dona Rosa, Marystella, Hélia, Antônio, Nicinha, Angélica, Wolnei, Carlão e Miranildo pela ajuda prestada durante a realização deste trabalho e a convivência no laboratório de Controle Biológico da Empresa Almirante Cacau.

A Dra Rosalee Coelho Neto do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pela valiosa sugestão.

Aos Pesquisadores Dr. José Clério Rezende Pereira e Dr. Luadir Gasparotto da Embrapa pela amizade e incentivo.

Aos colegas Heron, Carlos, Alexandre, Dirceu, Joseane, Whilly, Aítala, Charles e Lanibel pela amizade e pelo companheirismo nas horas difíceis em Itabuna, BA.

A Dra Regina Cele Rebouças e Dr. Edmundo Mandarino pela amizade e pelo incentivo.

Aos pesquisadores e funcionários da Coordenação de Pesquisas de Produtos Florestais o INPA, especialmente as Dra Ceci Sales Neto e Dra. Raimunda Liége de Abreu e Dra. Maria Aparecida de Jesus pela amizade e pelo incentivo ao estudo de fitopatologia.

Aos professores e Funcionários do Departamento de Pós-Graduação em Biotecnologia, em particular ao Professor Dr. Spartaco, pela contribuição para o êxito deste trabalho.

Aos colegas da turma de doutorado em Biotecnologia pela amizade e companheirismo, em particular aos colegas Lídia, Heron e Ceci.

Aos meus pais Nagamitsu e Tukiko (*in memoriam*), principais responsáveis pela minha formação e vocação.

Aos meus irmãos Roberto e Amélia, pelo constante incentivo.

Aos meus primos Washington e Clarice, pela amizade, pelo incentivo, exemplo de grande ser humanos.

Aos meus sogros Fernando e Onézima, pelos incentivos aos estudos.

A todos aqueles que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

### **CONTROLE DE *Phytophthora palmivora*, AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO-PARDA DOS FRUTOS DE CACAUEIRO COM FUNGOS ENDOFÍTICOS**

A podridão-parda do fruto de cacaueteiro (*Theobroma cacao*) é considerada mundialmente a doença mais importante da cultura. Várias espécies de *Phytophthora* estão associadas à doença, sendo *P. palmivora* a de maior ocorrência na Bahia. O trabalho teve como objetivo isolar e selecionar fungos endofíticos com potencial de controlar a podridão-parda. A viabilização da aplicação no campo e o provável modo de ação também foram estudados. Os fungos endofíticos foram isolados de cacaueteiros e cupuaçuzeiros (*T. grandiflorum*) dos estados do Amazonas e Bahia. A seleção foi conduzida em plantio comercial da Empresa Almirante Cacau, em Itajuípe, BA. Posteriormente, oito isolados selecionados, em campo, como os mais eficientes foram submetidos ao estudo de comprovação endofítica utilizando cacaueteiros axênicos. O fungo endofítico mais eficiente no controle da doença, foi aplicado em plantas adultas e a sua sobrevivência foi avaliada nos

órgãos da planta. Concentrações de  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $5,0 \times 10^7$  conídios.ml<sup>-1</sup>, formulações em óleo agrícola vegetal emulsionado (Nortox) 2 % e sacarose 2%, comportamento da severidade da doença com o declínio da população do antagonista, compatibilidade com os fungicidas hidróxido de cobre e fosetil Al, produção massal de inóculo utilizando substrato de arroz e a produção extracelular de quitinase,  $\beta$ 1,3 glucanase e celulase, em meio de cultura líquido, foram também avaliados. Foram testados 103 isolados de fungos endofíticos, sendo que *Trichoderma viride* foi o mais eficiente no controle da doença. Exceto *Tolypocladium* sp., os demais fungos: três isolados de *Fusarium*, dois de *Pestalotiopsis*, um isolado de *Curvularia* sp. e um de *T. viride* foram recuperados após a inoculação em cacauzeiros axênicos. *Trichoderma viride*, em planta adulta, apresentou boa colonização epifítica, na parte externa do fruto, e como endofítico no interior do caule, sendo recuperado, com maior frequência, em até 35 a 50 dias após a aplicação. A severidade da doença foi inversamente proporcional às concentrações de inóculo do antagonista, até  $10^7$  conídios.ml<sup>-1</sup> e a adição do óleo vegetal na suspensão aumentou a eficiência do bioagente. A população de *T. viride* aplicado no fruto diminuiu rapidamente, em 20 dias de aplicação e, aos 40 dias, a recuperação tornou-se difícil. Por outro lado, a severidade da doença aumentou, à medida que a população de *T. viride* diminuiu. *Trichoderma viride* foi mais sensível ao hidróxido de cobre, porém a germinação dos conídios se manteve acima de 90% em solução fungicida na concentração recomendada pelo fabricante. Concentração acima de  $10^8$  conídios.g<sup>-1</sup> do antagonista foi produzida em grãos de arroz. O bioagente cresceu e secretou  $\beta$ 1,3 glucanase e quitinase em todos os meios de cultura, no entanto, somente os meios suplementados com carboximetilcelulose e micélio de *P. palmivora* foram capazes de induzir o fungo a secretar celulase.

## ABSTRACT

### **CONTROL OF *Phytophthora palmivora*, CAUSE AGENT OF BLACK POD ROT OF CACAO WITH ENDOPHYTIC FUNGI**

Black pod rot of cacao (*Theobroma cacao*) is one of the most important diseases affecting the crop worldwide. It is responsible for reducing over than 30% of the cocoa production every year. The disease is caused by *Phytophthora* spp. being *P. palmivora* (Butler) Butler one of the most common species in the cocoa growing area of Bahia, Brazil. Fungal endophytes were collected from healthy plants of cacao and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (willd. ex Spreng.) Shum. from the states of Amazonas and Bahia, Brazil. The main objectives of this project were to isolate and to select endophytic fungi with biocontrol potential against *P. palmivora*. Three hundred fungal endophytes were obtained, being 104 screened against *P. palmivora* based on artificial inoculations of attached pods. Field experiments were performed at Almirante Cacau (Bahia-Brazil). Evaluations of disease severity were possible by using a disease rating scale specifically developed. Eight fungal isolates were selected and tested in the axenic cocoa seedlings for proving the endophytic

behavior. From 103 fungi tested in the field, a *Trichoderma viride* Pers. ex S.F. Gray isolate was selected as the most promising candidate. This fungus was applied on cocoa plants in the field for evaluating its life span in several plant organs. The optimum spore concentration was established and formulation studies for a high performance application were evaluated. The compatibility for a tank mix application with chemical fungicides was tested and also several methods for mass production by solid state fermentation. Studies on the mode of action was carried out by evaluating the production of chitinase,  $\beta$ 1,3 glucanase and celullase. With the exception of *Tolypocladium* sp., all the isolates tested: Three *Fusarium*, 2 *Pestalotiopsis*, one *Curvularia* and *T. viride* were recovered from the axenic cocoa plants. *T. viride* on adult cocoa plants showed an efficient epiphytic colonization on the pod surface and inside the trunk as an endophyte, been recovered after 35 and 50 days after application. The disease severity reduced by increasing the inoculum concentration up to  $10^7$  conídios.ml<sup>-1</sup>. The addition of an emulsified vegetable oil was responsible to increase the antagonist efficacy. The *T. viride* population over the pods decreased after 20 days. After 40 days the fungus was more difficult yor recoveretion. Disease severity increased by decreasing the antagonist population. *T. viride* germination was not affected by the Cooper hydroxide and Fosetil. A spore concentration of over  $10^8$  was achieved using rice as a substrate. The antagonist could grow and secrete  $\beta$ 1,3 glucanase and chytinase in all the liquid media tested, however only on media supplemented with carboxymetilcelulose and *P. palmivora* mycelium were able to induce the production of celullase.

## CONTEÚDO

	Página
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 Podridão-parda dos frutos de cacauero.....	7
2.2 Controle biológico de fungos fitopatogênicos com fungos endofíticos.....	15
2.3 Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo..	20
CAPÍTULO 1 - Diversidade e seleção de fungos endofíticos de cacauero e cupuaçuzeiro visando o controle biológico da podridão-parda dos frutos de cacauero.....	25
INTRODUÇÃO.....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
Obtenção dos isolados de fungos endofíticos.....	28
Obtenção e preservação do isolado de <i>Phytophthora palmivora</i> .....	28
Identificação dos fungos endofíticos.....	29
Produção de inóculo dos antagonistas e do patógeno.....	30
Seleção dos fungos endofíticos.....	30
RESULTADOS.....	31
DISCUSSÃO.....	37
CAPÍTULO 2 – <i>Trichoderma viride</i> : Potencial agente de biocontrole da podridão-parda dos frutos de cacauero ( <i>Theobroma cacao</i> ).....	42
INTRODUÇÃO.....	42
MATERIAL E MÉTODOS.....	44
Eficiência do isolado de <i>Trichoderma viride</i> formulado em sacarose e óleo vegetal.....	44
Eficiência do isolado de <i>Trichoderma viride</i> na supressão da podridão-parda dos frutos de cacauero em diferentes concentrações.....	46
Produção de inoculo de <i>Trichoderma viride</i> em arroz.....	46
Estudo da compatibilidade do isolado de <i>Trichoderma viride</i> com fungicidas.....	47
Avaliação do efeito residual do isolado de <i>Trichoderma viride</i> nos frutos.....	48

RESULTADOS.....	49
Eficiência do isolado de <i>Trichoderma viride</i> formulado em sacarose e óleo vegetal.....	49
Eficiência de diferentes concentrações de <i>Trichoderma viride</i> na supressão da podridão-parda dos frutos de cacauero.....	50
Produção de inoculo de <i>Trichoderma viride</i> em arroz.....	50
Estudo da compatibilidade do isolado de <i>Trichoderma viride</i> com fungicidas.....	51
Efeito residual do isolado de <i>Trichoderma viride</i> no controle da podridão-parda do fruto de cacauero.....	52
DISCUSSÃO.....	53
CAPÍTULO 3 – Comprovação da condição endofítica dos fungos promissores como agentes biocontroladores da podridão-parda dos frutos de cacauero ( <i>Theobroma cacao</i> ).....	57
INTRODUÇÃO.....	57
MATERIAL E MÉTODOS.....	59
Preparo das plantas axênicas.....	59
Preparação empregada para inoculação dos fungos endofíticos.....	60
Avaliação do efeito e reisolamento dos fungos endofíticos.....	60
Sobrevivência e recuperação de <i>Trichoderma viride</i> em cinco cacaueros.....	61
RESULTADOS.....	62
DISCUSSÃO.....	65
CAPÍTULO 4 – Enzimas hidrolíticas secretadas em meios de cultura por <i>Trichoderma viride</i> , potencial agente de biocontrole da podridão-parda dos frutos de cacauero ( <i>Theobroma cacao</i> ).....	70
INTRODUÇÃO.....	70
MATERIAL E MÉTODOS.....	72
Obtenção do isolado e condições de cultivo.....	72
Determinação de proteína total.....	73
Determinação de atividade de quitinase.....	74
Determinação de atividade de glucanase.....	74
Determinação de atividade de celulase.....	75
RESULTADOS.....	75
Efeito de diferentes fontes de carbono sobre o crescimento micelial.....	75
Efeito dos meios de cultura sobre a secreção de proteína total.....	76
Efeito de diferentes meios de cultura sobre a atividade de quitinase.....	77
Efeito da atividade de glucanase em diferentes meios de cultura.....	78
Efeito da atividade de celulase em diferentes meios de cultura.....	79
DISCUSSÃO.....	80
CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS.....	87

## INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao* Lineus) é uma espécie nativa da floresta tropical úmida da América, pertencente à família Sterculiaceae, tem como provável centro de origem as bacias dos rios Amazonas e Orinoco, onde foi primeiramente domesticado. A partir de então, se dispersou cruzando os Andes e avançando para a América Central até o Sul do México, onde foi muito apreciado pelos Astecas. A sua dispersão também se deu ao longo do Rio Amazonas originando as populações encontradas no Brasil e nas Guianas.

Atualmente, além dos países da América, dentro de uma faixa de latitude de 20<sup>0</sup>, acima e abaixo da linha do Equador, o cultivo do cacauieiro se estende por vários países da África e Ásia. As primeiras plantações na África ocorreram nas Ilhas de São Tomé e Príncipe, com sementes provenientes do Brasil. Posteriormente, o cultivo foi introduzido em Gana, Nigéria, Costa do Marfim, Camarões, Malásia e em outros países do continente.

No Brasil, o cultivo do cacauieiro se estende por nove estados da federação, sendo a Bahia o maior produtor. Apesar do cacau ser um produto nobre e tradicionalmente cultivado no Brasil, vem atravessando um processo recente de recuperação, depois de um prolongado período de crise desde a segunda metade da década de 80 e até a década de 90. A consequência dessa crise foi à redução dos preços internacionais devido o aumento da produção mundial e dos estoques dos países produtores. Além do baixo preço, os cacauais do

Brasil, especialmente no sul da Bahia, sofreram com a disseminação de uma doença fúngica conhecida como vassoura-de-bruxa, causada por *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer.

O Brasil já foi o maior produtor e ocupava o segundo lugar no ranking mundial de produção de cacau até a década de 80, tendo a Costa do Marfim na liderança desde a década de 60. A partir de então, iniciou-se a progressiva redução de área plantada e do padrão tecnológico adotado. Atualmente, o Brasil divide o quinto lugar com Camarões sendo ultrapassado por Costa do Marfim, Gana, Indonésia e Nigéria (Gráfico 1), conforme UNCTAD (2006).

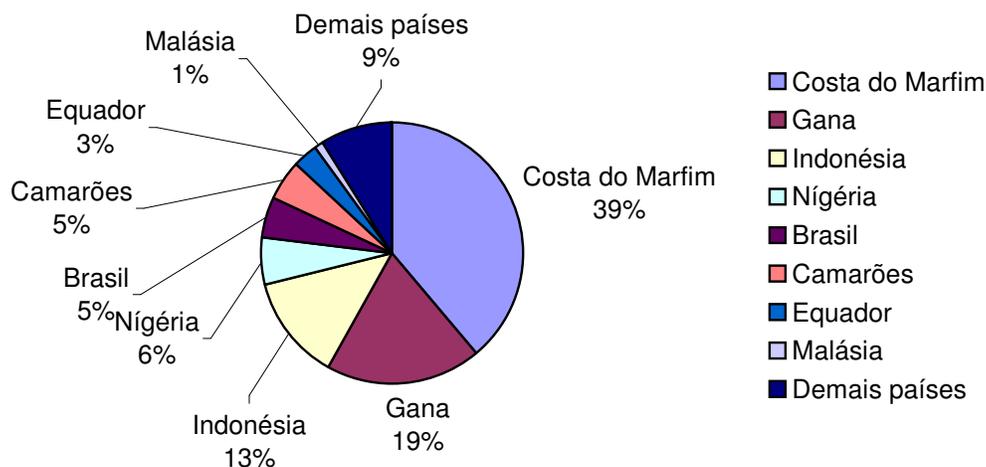


Gráfico 1 – Principais países produtores de cacau, safra 2004/2005.  
FONTE: UNCTAD, 2006.

Após as crises da década de 90, quando o Brasil passou de exportador a importador de cacau, o país se prepara para retomar as exportações de amêndoas de cacau, principalmente com a recuperação da produção na Bahia e com aumento de produção nos Estados da Amazônia como Pará, Rondônia e Amazonas. Em 2002 a exportação de cacau e seus derivados alcançaram U\$ 206 milhões de dólares e, em 2003, houve um incremento de 55,5% saltando para U\$ 321 milhões (MAPA, 2006). O estado da Bahia detém mais de 80 % da produção de amêndoa de cacau do país, seguido, com uma produção bem inferior, pelo Pará

(10 %) e por Rondônia (5,5 %) e em quantidade bem inferior pelos demais estados produtores de cacau, inclui o Amazonas (Suframa, 2003).

Apesar do estado do Amazonas não ter expressão na produção de cacau no cenário Nacional, nos últimos anos, a produção vem crescendo 10 % ao ano. Atualmente, mais de 30 municípios do Estado produzem cacau, sendo Uricurituba e Itacoatiara localizados no baixo rio Amazonas e Coari, localizado no médio rio Solimões, os maiores produtores. Em particular deve se destacar, nessas regiões, a excepcionalidade das condições favoráveis que possuem para implantação da cacaucultura. Condições que se refletem na produtividade, com rendimento de 800 kg/ha/ano, acima dos 450 a 500 Kg/ha/ano da média baiana. Além dessas, há pelo menos duas outras grandes vantagens do cultivo do cacau no Amazonas. A primeira, o cultivo é ecologicamente correto, isento de agrotóxicos e mantém o ambiente em equilíbrio, a segunda, do ponto de vista socioeconômico, é uma excelente estratégia para gerar emprego direto e indireto nas comunidades e, principalmente, promover a fixação do homem no campo.

O aumento crescente da demanda por produtos livres de agrotóxicos tem impulsionado o Brasil a regularizar o sistema da agricultura orgânica. Esse sistema agrícola privilegia a preservação ambiental, a biodiversidade, os ciclos biológicos e a qualidade de vida do homem. No Brasil, a agricultura orgânica cresce a uma taxa anual de 20%. Tal crescimento está fortemente relacionado com a exigência de consumidores internos e externos com a qualidade dos alimentos e do meio ambiente. A expansão também pode ser atribuída a um mercado mais justo, para produtores e consumidores, que é altamente gerador de emprego, uma vez que existe um incremento de 100% no preço do produto orgânico, em relação ao produzido no cultivo convencional. Visando esse mercado, recentemente, os cacaucultores de Uricurituba se reuniram para obter o certificado que dará o direito de comercializar o produto orgânico.

Por outro lado, a cacauicultura no estado da Bahia, o maior produtor do país, tem sofrido constantemente ataque de pragas e, como consequência, além do declínio na produção, também tem provocado colapso na economia da região. Situação que pode ser constatada com o aparecimento da vassoura-de-bruxa no final da década de 80 do século passado quando a produção de 400 mil toneladas caiu para 100 mil toneladas em poucos anos. Atualmente, com o sucesso dos clones de cacau resistente a vassoura-de-bruxa, teve início à recuperação das áreas abandonadas com replantio de materiais genéticos resistentes e novas áreas também estão sendo implantadas. Porém, outra doença igualmente importante, a podridão-parda causada por *Phytophthora* spp. começou a reaparecer.

Por muitos anos, a podridão-parda foi à doença mais importante do cacauero, acarretando perdas entre 20 a 30 % da produção anual. Com o sucesso dos clones resistentes à vassoura-de-bruxa e devido às condições ambientais favoráveis, a podridão-parda voltou a ser novamente uma ameaça com potencial de atingir os mesmos níveis de importância registrados, no passado, preocupando os cacauicultores.

A podridão-parda dos frutos do cacauero, em termos mundiais, se destaca como a principal doença da cultura, causando perdas anuais estimadas na ordem de 30 a 90% da produção dos frutos (Bowers *et al.*, 2001). No Brasil, a doença ocorre em todos os estados produtores e as perdas são variáveis e estão relacionadas com as condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do patógeno. Na Bahia, as perdas podem chegar a 30% da produção anual, enquanto que no Amazonas a perda é de 1% nos plantios de várzea (comunicação pessoal, Dr. Wesley F. Melo, 2006, CEPLAC - Amazonas).

Existem pelo menos seis espécies de *Phytophthora*, já relatadas, causando podridão-parda em cacaueros. Dessas, três espécies já foram registradas no Brasil: *P. palmivora* (Butler) Butler, *P. capsici* Leonian e *P. citrophthora* (Smith) Leonian. Essas espécies possuem habilidade de infectar qualquer parte do cacauero. No entanto, as maiores perdas

ocorrem quando os frutos são infectados, principalmente se a infecção ocorrer dois meses antes do amadurecimento, porque o fungo penetra pela casca e atinge as amêndoas, deixando-as imprestáveis para o beneficiamento.

As principais estratégias empregadas para o controle da doença são o melhoramento genético e o controle químico. Ao contrário da vassoura-de-bruxa, a seleção e o melhoramento genético visando resistência à podridão-parda, até o momento, não teve muito sucesso. O controle químico tem sido usado desde a década de 50 utilizando-se, inicialmente, fungicidas à base de cobre e, mais tarde, com o surgimento dos fungicidas sistêmicos no mercado, estes começaram também a ser adotados. No entanto, para obter um controle satisfatório, são necessárias várias aplicações ao ano. Isso tem implicado em inúmeras desvantagens como a contaminação do ambiente, danos à saúde do homem, viabilização de condições para surgimento de populações de patógenos resistentes, além de onerar a produção.

Dentro do conceito de doença, o processo de interação patógeno-hospedeiro é dinâmico e evolui no tempo e no espaço. Portanto, a busca por alternativas de controle está sempre um passo atrás desse processo evolutivo da doença. Mais recentemente, tem sido dada ênfase para o manejo integrado de pragas e doenças das culturas. Apesar da complexidade dos fatores envolvidos nos agroecossistemas tem se buscado estabelecer procedimentos padrão no chamado manejo integrado. Nessa abordagem do processo de produção agrícola procura-se substituir, pelo menos em parte, produtos sintéticos por produtos de origem biológica. Tais produtos vêm ganhando mercado e credibilidade pelos seus baixos impactos sobre o ambiente e pela segurança à saúde humana. Como exemplos de uso concretos, no Brasil, cita-se o Tricovab, um biofungicida a base do fungo *Trichoderma stromaticum* Samuels & Pardo-Schultheiss, que está sendo usado no controle da vassoura-de-bruxa desde 1999, em plantações de cacau no sul da Bahia.

Portanto, o controle biológico pode ser uma importante alternativa no manejo da doença, em particular com a utilização de fungos endofíticos, aqueles que vivem no interior da planta. A capacidade de colonizar os tecidos do hospedeiro sem causar danos, faz dos endofíticos uma ferramenta importante para aumentar a produtividade das plantas cultivadas e protegê-las contra inimigos naturais. Alguns estudos visando supressão de doenças de plantas utilizando microrganismos endofíticos têm sido viabilizados, principalmente, em países de clima temperado. Infelizmente, em países de clima tropical, como o Brasil, as informações utilizando endófitos como agentes biocontroladores de fitopatógenos ainda são bastante escassas, visto que a maioria dos estudos não vai além de levantamentos.

Na Amazônia, por ser a região de origem do cacaueteiro, existe uma possibilidade maior de se encontrar, na população selvagem de cacaueteiros, plantas que mantêm uma produção elevada de frutos mesmo em presença de população do patógeno no meio. Como premissa, acredita-se que tal condição seja, em parte, favorecida pelo efeito antagônico de endófitos que ocorrem nas condições naturais ou que evoluíram ao longo dos anos.

Este presente trabalho teve como objetivo isolar e selecionar fungos endofíticos com potencial de aplicação no controle da podridão-parda do fruto de cacaueteiro, estudar os aspectos epidemiológicos do antagonista e o provável mecanismo de ação envolvido na interação.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Podridão-parda dos frutos de cacau

A podridão-parda dos frutos do cacau ou podridão-de-*Phytophthora* é a principal doença da cultura de cacau, em termos mundiais, visto que causa prejuízo significativo em todos os países que o cultivam, (Brasier & Griffin, 1979; Evans & Prior, 1987; Fulton, 1989; Luz & Silva, 2001). A doença tem afetado a produção de cacau desde os anos 20 do século passado. As perdas anuais estão estimadas na ordem de 30 a 90% da produção dos frutos (Bowers *et al.*, 2001) e, geralmente, estão relacionadas com local e condições climáticas do ano.

A doença é mais severa no Oeste e na área Central da África, onde os países atualmente contribuem com 60 a 70% da produção de cacau do mundo. Principalmente em Gana, Nigéria e Camarões, as perdas variam entre 50 a 80% (Nyassé, 1997). No Brasil, a doença ocorre em todos os estados produtores de cacau e causa perdas variáveis. Nos anos de 82 e 84, as perdas de frutos em Tomé-Açu, Pará, devido à podridão-parda, foram consideravelmente mais altas do que as causadas pela vassoura-de-bruxa (Andebrhan & Almeida, 1986). Na mesma década, em algumas regiões da Bahia, as perdas atingiram cerca de 80% (Luz *et al.*, 1997).

No Brasil, antes do aparecimento da vassoura-de-bruxa, em 1989, a podridão-parda do cacau foi considerada a doença mais importante acarretando perdas anuais de, aproximadamente, 20 a 30 %. Atualmente, a podridão-parda começa a reaparecer como um problema sério para a cultura, em função do sucesso alcançado pelos clones de cacau com resistência à vassoura-de-bruxa e das condições climáticas voltando a ser favoráveis, trazendo novamente preocupação aos agricultores (Oliveira & Luz, 2005).

A doença é causada por várias espécies de *Phytophthora*, o gênero chamado por Anton De Bary, em 1876, como “destruidor de plantas”, ao descrever o fungo causador da requeima-da-batatinha, doença que dizimou as plantações de batata, levando à morte por inanição milhares de pessoas na Europa em meados do século XIX (Erwin, 1983). Atualmente, *Phytophthora* pertence ao reino Stramenopila, filo Oomycota, ordem Peronosporales, família Pythiaceae (Patterson, 1989). Os organismos que fazem parte deste reino são morfológica e fisiologicamente semelhantes aos fungos, porém, existem algumas características específicas que diferenciam Stramenopila, tais como; apresentam hifas cenocíticas, suas paredes celulares são celulolíticas formadas primariamente de polímeros de  $\beta$ -glucano; as mitocôndrias apresentam cristas tubulares; as cisternas são múltiplas e achatadas; o sistema vacuolar é tubular móvel; o micélio é diplóide e a meiose ocorre durante o processo da gametogênese; a lisina é sintetizada via ciclo do ácido diaminopimélico; não possuem habilidade para sintetizar esteróis, em seu lugar sintetizam o fucosterol; podem ser homotáticas ou heterotáticas; possuem diferentes tipos de estruturas durante o seu ciclo de vida, que incluem desde zoósporos móveis até oogônios. Os zoósporos são produzidos e completamente diferenciados no interior dos esporângios, apresentam capacidade infectiva, possuem dois flagelos, um maior, direcionado para frente (tinsel), e um menor, direcionado para trás (chicote), possuem habilidade de sintetizar a parede celular para encistamento, em poucos minutos, e são assexuais. Os oogônios são sexuais, de paredes grossas, importantes

pela possibilidade de hibridização intra e interespecífica e na sobrevivência de algumas espécies (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Embora o grupo Oomycota apresente características próprias que o distingue dos chamados fungos verdadeiros, ele mantém inúmeras similaridades morfológicas e fisiológicas as quais permitem que os cientistas ainda continuem usando o termo fungo ao se referirem a esses organismos (Deacon, 1997). Além disso, as diversas espécies de Oomycota são de grande importância fitopatogênica e continuam a ser estudada nos cursos de micologia.

O gênero *Phytophthora* é constituído de, aproximadamente, 60 espécies. Todas são consideradas patogênicas e altamente destrutivas, causando podridões de raízes, caules, folhas e frutos em plantas importantes da agricultura e em ornamentais. Algumas espécies como *P. cinnamomi* Rands, *P. parasítica* J.F. Dastur, e *P. cactorum* (Leb. & Cohn) Schroet. atacam centenas de espécies de plantas hospedeiras. Outras como *P. megasperma* f. sp. *glycinea* T. Kuan & D.C. Erwin e *P. infestans* (Mont.) de Bary tem sua gama de hospedeiro limitada, infectando apenas algumas espécies de plantas (Tyler, 2002).

As três espécies de *Phytophthora* que causam a podridão-parda dos frutos do cacaueteiro, no Brasil, infectam diversas espécies de interesse agrônômico. *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler é a espécie que ataca maior número de hospedeiras, compreendendo 41 famílias botânicas (Chee, 1969; 1974). Além disso, possui habilidade de infectar quase todas as partes da planta, o que a torna um dos mais importantes patógenos de plantas, principalmente, nas regiões de clima mais quente (Wood & Lass, 1985). Entre as espécies infectadas por *P. palmivora* estão: abacaxi (*Ananas comosus* L.), abacate (*Persea americana* Mill.), mamão (*Carica papaya* L.), citros (*Citrus* spp.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), noz-moscada (*Myristica fragrans* Houttuyn), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), seringueira (*Hevea brasiliensis* (Wild. Ex. A. Juss) Muell. & Aug.), pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), coco (*Cocos nucifera* L.), dendê (*Elais guineensis* L.), mamona (*Ricinus communis* L.), fumo

(*Nicotiana tabacum* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), cebola (*Allium cepa* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.), pimentão (*Capsicum annum* L.), ervilha (*Pisum sativum* L.), além de plantas ornamentais e espécies usadas para sombreamento (Bowers *et al.*, 2001). *Phytophthora capsici* Leonian, além do cacau, pode atacar pimentão, tomate, berinjela, seringueira, pimenta-do-reino e plantas da família das cucurbitáceas. Por sua vez, *P. citrophthora* (Smith) Leonian é um importante patógeno, principalmente de citros e de algumas rosáceas de clima temperado (Luz *et al.*, 1997).

Por mais de 50 anos, *P. palmivora* foi considerada a única espécie do gênero causando doença no cacau. No entanto, a existência de considerável variação entre isolados de uma mesma região ou de diferentes locais do mundo já havia sido notada e foi levantada a possibilidade de mais de uma espécie estar envolvida na etiologia da doença. Griffin (1977) relatou a existência de quatro formas morfológicas e as denominou como MF1, MF2, MF3 e MF4. Brasier & Griffin (1979) propuseram que MF1 tratava-se de *P. palmivora*, descreveram MF3 como uma nova espécie, *P. megakarya* Brasier & Griffin, e desconsideraram a existência de MF2. O tipo MF4, devido às semelhanças morfológicas com *P. capsici*, e devido às semelhanças morfológicas com as demais espécies (Alizadeh, 1983), a identificação foi confirmada por meio de estudos moleculares (Mchau & Coffey, 1995). Além dessas espécies mencionadas, estão registradas mais três espécies envolvidas na etiologia da doença, *P. citrophthora*, *P. heveae* Thompson e *P. megalperma* Drechsler (Luz *et al.*, 2001). No Brasil, quatro espécies de *Phytophthora* causam podridão-parda, *P. palmivora*, *P. capsici*, *P. citrophthora* e *P. heveae* (Luz & Silva, 2001), sendo que a última foi relatada associada à podridão de raízes (Luz *et al.*, 1989).

*Phytophthora palmivora* e *P. capsici* estão presentes em quase todos os países produtores de cacau (Luz & Silva, 2001). As perdas anuais ocasionadas por essas espécies, em termos mundiais, estão estimadas entre 15 e 30% da produção (Nyassé *et al.*, 1995). No

Brasil, das quatro espécies relatadas, *P. citrophthora* é considerada a mais virulenta a frutos, folhas, caules, raízes e sementes de cacau, seguida por *P. palmivora* (Luz, 1989). No polo de Tomé-Açu, no Pará, a predominância foi de *P. capsici*, na ordem de 60%, contra 25% para *P. palmivora* e 15% para *P. citrophthora* (Almeida, 1991). Segundo levantamentos realizados entre 1977 e 1981, *P. capsici* foi à espécie predominante na Bahia e no Espírito Santo (Campêlo & Luz, 1981). Levantamentos posteriores, porém, mostraram tendência de crescimento das populações de *P. palmivora* e *P. citrophthora*, especialmente nas áreas consideradas foco da doença, no Estado da Bahia (Luz *et al.*, 1997). Atualmente, na Bahia, a espécie *P. palmivora* tem predominado como maior causadora da podridão-parda do cacau (comunicação pessoal, Dr. Alan W. V. Pomella, 2003, Almirante Cacau - Bahia).

As espécies de *Phytophthora* que causam podridão-parda do cacau produzem esporângios em todas as partes infectadas da planta. Os esporângios normalmente são produzidos em ambientes quase saturados de umidade (95 - 97%) (Duniway, 1983) e, em altas temperaturas (30 e 34 °C), podem germinar diretamente (Clerk, 1972). Por outro lado, a germinação indireta ocorre com a liberação de zoósporos, esporos móveis, que são as principais unidades infectivas do patógeno. Para que isso ocorra, é necessário um filme de água em contato com o esporângio e que a temperatura esteja entre 15 e 18 °C (Tarjot, 1967; Tarjot, 1974; Duniway, 1983). Após um período natatório, o zoósporo se encista, formando uma membrana bem diferenciada. Posteriormente, é formado um tubo germinativo que, por sua vez, vai formar o micélio, o qual, após completar o período vegetativo dá origem a novos esporângios. Portanto, a formação e germinação dos esporângios e o processo de infecção são regulados por diversos fatores ambientais, entre os quais a umidade e a temperatura são de importância primordial para que ocorram epidemias da doença nas plantações de cacau (Hickman & Ho, 1966; Duniway, 1975).

Os maiores danos causados pelas espécies de *Phytophthora* ao cacau são as infecções em frutos que podem ocorrer em qualquer ponto da sua superfície e em qualquer estágio de seu desenvolvimento (Gregory, 1974; Evans & Prior, 1987). Também podem infectar qualquer outra parte da planta como caule, raízes, almofadas florais, folhas, brotos e ramos. Infecção em viveiro pode ocasionar murcha e morte das mudas. Em geral, nos frutos, o grau de suscetibilidade varia de acordo com a idade do fruto e aumenta progressivamente até a maturidade (Lawrence, 1978). Pequenas manchas cloróticas são perceptíveis um ou dois dias após a infecção, tornando-se castanho-escuras, alongando-se rapidamente para formar lesões marrons da cor de chocolate. As manchas iniciais são circulares, tornando-se elípticas, mais tarde, com margens ligeiramente irregulares, podendo tomar totalmente a superfície do fruto entre 10 a 14 dias, dependendo da cultivar de cacau e da espécie de *Phytophthora* envolvida (Luz & Silva, 2001). Os frutos eventualmente tornam-se pretos e mumificados e, em estágio avançado de infecção, *Phytophthora* invade o tecido interno dos frutos causando descoloração e deformação das amêndoas (Bowers *et al.*, 2001)

Em condições de alta umidade relativa, entre três e cinco dias após o aparecimento dos primeiros sintomas, surgem, a partir do centro das lesões, coberturas ralas, pulverulentas e esbranquiçadas formadas pelo micélio e por esporângios. É possível, nesse estágio, identificar o patógeno pelas características dos esporângios observados sob microscópio óptico. Os zoosporângios de *P. palmivora*, *P. capsici* e *P. heveae* são caducos, com diferentes comprimentos de pedicelo. *Phytophthora heveae* forma oósporos, esporos sexuais, enquanto *P. citrophthora* forma uma cobertura micelial densa, cotonosa e abundante na superfície das lesões e seus esporângios são persistentes e de forma irregular (Luz *et al.*, 1997).

Temperatura, umidade do ar e chuvas (frequência e intensidade das precipitações) são os fatores climáticos que mais influenciam a incidência e a severidade da podridão-parda do cacau (Rocha & Machado, 1972; Butler, 1981; Ward & Griffin, 1981). Na Bahia, as

maiores perdas de frutos por esta enfermidade ocorrem nos meses mais frios do ano (julho e agosto), quando a temperatura mínima média fica abaixo de 20°C e a umidade mantém-se acima de 85% (Lellis, 1952; Miranda & Cruz, 1953). Observações semelhantes foram feitas por Orellana & Som (1957), no Ceilão, por Hardy (1958), na Costa Rica e por Dakwa (1974), em Gana. Estudos conduzidos na África Ocidental (Dade, 1927; Wood, 1974) e na Costa do Marfim (Tarjot, 1971) demonstraram que longos períodos com umidade relativa no ponto de saturação são necessários para o desenvolvimento de epidemias da podridão parda. Para Ward & Griffin (1981) a chuva é o fator essencial que possibilita não só a dispersão do inóculo, pelos respingos, como também a infecção.

Das espécies de *Phytophthora* que ocorrerem na Bahia, *P. capsici* é a única que ainda não foi isolada das raízes do cacau e nem do solo (Luz *et al.*, 1992). Presume-se que o seu ciclo de vida se processe inteiramente na parte aérea do cacau, sobrevivendo em ramos e folhas infectados. Estes são, juntamente com o solo e raízes infectados, as principais fontes de inóculo primário da *Phytophthora* spp. (Erwin *et al.*, 1983; Evans & Prior, 1987). Quando o fruto foi infectado e as lesões encontram-se esporulando, estas podem servir de fonte de inóculo para infectar outros frutos. Sob condições úmidas, esporângios (fonte de inóculo secundário) podem ser formados na superfície dos órgãos doentes. Esse tipo de propágulo pode ser disperso pela chuva, respingo de água, ou água movendo-se sobre a superfície do solo. Quando os esporângios estão em água à temperatura abaixo de 20 °C, zoósporos são formados no interior do esporângio, liberados na água e então, nadam até um sítio de infecção. Além disso, têm sido relatados que os propágulos podem ser transportados pelo vento e por formigas (Bowers *et al.*, 2001). Em condições adversas, *P. citrophthora* e *P. palmivora* produzem clamidósporos, esporos de resistência, para sobreviverem no solo e em casqueiros, restos de frutos deixados na serrapilheira nas plantações de cacau. Oósporos foram observados ocorrendo naturalmente em frutos infectados por *P. capsici* (Kellam &

Zentmyer, 1982) e são umas importantes formas de sobrevivência. Tanto clamidósporos como oósporos necessitam de alta umidade para maturação, para a germinação e para produzirem esporângios que iniciam o processo de patogênese (Erwin & Ribeiro, 1996).

O controle de podridão-parda do fruto é difícil porque *Phytophthora* pode persistir no solo e sobreviver por vários anos. Além disso, propágulos podem estar presentes na parte aérea como, por exemplo, em frutos durante grande parte do ano, prontos para causar uma epidemia quando as condições ambientais se tornam favoráveis para esporulação e dispersão. Portanto, medidas profiláticas são importantes para diminuir o potencial de inóculo nas plantações tais como: colheitas frequentes, remoção de frutos infectados, desbrota, manejo do sombreamento e eliminação dos casqueiros (Evans & Prior, 1987; Soberanis *et al.*, 1999). No entanto, sob condições de alta umidade, esses tratamentos culturais não são suficientes para suprimir o inóculo e proporcionar um bom controle (Evans & Prior, 1987).

As medidas quarentenárias são importantes para impedir a entrada, no Brasil, de espécies como *P. megakarya* e *P. megasperma*, de ocorrência restrita em cacauzeiros da África e da Venezuela, respectivamente. Por outro lado, a erradicação da podridão-parda de uma determinada área é altamente improvável, uma vez que seus agentes etiológicos sobrevivem no solo e em outros hospedeiros comumente cultivados nessas regiões (Luz *et al.*, 1997).

O controle químico é o método mais usado para proteger os frutos contra infecções de *Phytophthora*. Os fungicidas recomendados são a base de cobre: óxido cuproso, oxiclreto e hidróxido de cobre. O fungicida sistêmico metalaxyl também controla o desenvolvimento da lesão no fruto, porém, seu uso isolado é limitado por induzir resistência no patógeno (Pereira, 1988; Oliveira, 1990).

O controle genético da podridão-parda tem sido dificultado pela existência de várias espécies de *Phytophthora* que causam a doença. Poucos cultivares apresentaram resistência a

todas as espécies patogênicas, demonstrando a necessidade de seleções locais para as espécies predominantes de *Phytophthora* (Luz *et al.*, 1996).

Poucos estudos têm sido relatados sobre o controle biológico de podridão-parda do cacauero. Figueiredo & Campêlo (1983) identificaram espécies dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* promissoras no controle biológico da podridão-parda do cacauero. Bastos & Figueiredo (1982) comprovaram o efeito inibidor, *in vivo* e *in vitro*, de *ladobotrium amazonensis* Basos, Evans & Sansom sobre *P. capsici*, *P. citrophthora* e *P. palmivora*; Krauss & Soberanis (2002) avaliaram o potencial de *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers *et al.* e *Trichoderma* spp. contra *P. palmivora*. Hoopen *et al.* (2003) isolaram fungos epifíticos de frutos e de almofadas florais de *T. cacao* visando o biocontrole de podridão-parda e Macagnan (2005) verificou que um isolado de *Streptomyces*, formulado em extrato de carne e óleo emulsionável, foi promissor na redução da severidade da doença.

Diante das dificuldades de se adotar um método de controle seguro e eficaz, produtores e pesquisadores têm sido forçados a procurar um sistema de manejo integrado que faça uso de meios de controle diversos. Atualmente, esse sistema envolve agentes de controle biológico, resistência genética e indução de resistência, práticas culturais, produtos naturais e uso limitado de produtos químicos (Krauss & Hebbar, 1999).

## **2.2. Controle biológico de fungos fitopatogênicos com fungos endofíticos**

A agricultura moderna é fundamentada no cultivo de uma ou poucas culturas sobre extensas áreas, resultando em sistemas ecologicamente não balanceados, que facilitam a ocorrência de epidemias de doenças. A prevenção de tais epidemias tem, tradicionalmente, sido alcançada por meio do uso de fungicidas químicos. No entanto, consumidores estão cada vez mais se conscientizando acerca da poluição química no meio ambiente e sobre resíduos de pesticidas nos alimentos. Além disso, produtores estão mais frequentemente sendo defrontados com patógenos resistentes aos fungicidas disponíveis no mercado. Diante dessa

situação, não há dúvida da necessidade de medidas mais eficientes para controlar doenças de plantas e reduzir o inóculo, cujos atributos sejam mais aceitáveis à sociedade. Portanto, ambos, consumidores e empresários comprometidos com agricultura, estão preocupados em encontrar uma alternativa de controle de doenças que não cause danos ao meio ambiente e ao homem.

Dentro desse contexto, nessas últimas décadas, o controle biológico surge como uma importante alternativa para reduzir a quantidade de produtos químicos, podendo ser aplicado isoladamente ou como parte do sistema de manejo integrado de doenças. Segundo Baker & Cook (1974), o controle biológico consiste na redução da densidade de inóculo, de um ou mais patógenos, realizado por um ou mais organismos, que não seja o homem.

O uso de agentes de biocontrole para controlar fungos fitopatogênicos pode apresentar vários benefícios ao homem e ao meio ambiente tais como diminuir o uso de fungicidas na produção de alimentos e a poluição no meio ambiente, evitar a exposição dos trabalhadores, evitar o desenvolvimento de patógeno resistente, entre outros. Por outro lado, ao contrário do método químico, não apresenta efeito imediato e espetacular. O nível de controle obtido pelo método biológico, isoladamente, pode ser abaixo do necessário para que não ocorram danos à produção. Assim, há a necessidade de integração de métodos de modo a promover um efeito aditivo ou sinérgico onde cada medida de controle reforce as demais. O controle biológico deve atuar em um contexto de equilíbrio sem o qual sua chance de sucesso será menor (Baker & Cook, 1974). Se forem incluídas práticas culturais, para criar um ambiente favorável aos antagonistas, cultivares com maior resistência ao patógeno, adequar o hospedeiro às atividades antagônicas de microrganismos e introdução em massa de antagonistas, poderá ser mais eficiente (Redman *et al.*, 2001).

Os mecanismos das interações entre microrganismos patógenos e antagônicos podem ser divididos em antibiose, competição, parasitismo, hipovirulência, predação e

indução de defesa do hospedeiro. Apesar desta divisão, um antagonista pode agir através de um ou mais mecanismos, inclusive é desejável que o antagonista apresente mais de um mecanismo de ação, pois as chances de sucesso do controle biológico serão aumentadas (Köhl & Fokkema, 1998).

Na década de setenta do século XX, um novo nicho de fungos promissores, como agentes de biocontrole, denominados fungos endofíticos, começou a atrair a atenção de inúmeros pesquisadores, principalmente por duas razões: primeiro porque os fungos endofíticos são encontrados em todas as plantas e são extremamente abundantes e diversificados (Stone & Petrini, 1997; Schulthess & Faeth, 1998; Arnold *et al.* 2000); segundo porque podem produzir micotoxinas, ou outras substâncias bioquímicas capazes de alterar a morfologia e a fisiologia do hospedeiro conferindo a capacidade de induzir resistência a inimigos naturais (Clay, 1988, 1990; Carroll, 1988, 1991).

De Bary (1866) citado por Saikkonen *et al.* (1998), foi o primeiro a definir os microrganismos endofíticos como sendo aqueles que habitam no interior dos vegetais, em infecções assintomáticas, ou não, em interações antagonistas ou simbióticas. Mais tarde, consideraram-se endófitos quaisquer microrganismos que, pelo menos uma fase do seu ciclo de vida, colonizam o interior de tecidos vegetais aéreos, sem causar danos aparentes à planta hospedeira (Carroll, 1986). Para Azevedo *et al.* (2003), não existem limites rígidos, mas sim um gradiente entre as três categorias: microrganismos endofíticos, epifíticos e fitopatogênicos. Por exemplo, um microrganismo endofítico, em certas condições, pode ser considerado patogênico e vice-versa, como também um microrganismo epifítico pode, eventualmente, ser encontrado no interior de um vegetal e um endofítico, na sua superfície.

Aparentemente pode parecer que fungos endofíticos são parasitas fitopatogênicos. No entanto, estão presentes mesmo em tecidos vegetais saudáveis. De Bary (1866) citado por Saikkonen *et al.* (1998), além de ser o primeiro a definir os endofíticos fez uma distinção

entre este estado e o patogênico. Na época, não foram considerados benéficos nem prejudiciais às plantas, e seus estudos foram relegados a um segundo plano. Somente um século depois, as pesquisas com os microrganismos endófitos começaram novamente a chamar atenção quando se verificou que esses microrganismos poderiam apresentar papel de relevância. A partir de então, as diversas formas de associação entre os endófitos e seus hospedeiros começaram a ser discutida. Siegel *et al.* (1987) propuseram que os fungos endófitos e seus hospedeiros mantêm uma relação mutualística e Carroll (1988) descreveu dois tipos de associação envolvendo essa interação, mutualismo constitutivo e mutualismo induzido. Segundo o autor, a primeira é uma associação que envolve transmissão de fungos endófitos de uma geração de planta para outra, através de sementes do hospedeiro e a segunda é uma associação que envolve uma transmissão que não ocorre por sementes, mas por disseminação independente através de propágulos dos fungos, principalmente por esporos.

Até a década de 70 do século passado, microrganismos endófitos foram considerados neutros, não causando benefícios nem detrimento às plantas. Posteriormente, com novos estudos, foi possível concluir que, em muitos casos, eles tinham importante função na proteção dos hospedeiros contra predadores e patógenos. A partir de então, os endófitos começaram a ser reconhecidos quanto a sua capacidade de proteger seus hospedeiros contra patógenos. Há duas maneiras de usar os endófitos como agentes de biocontrole: como patógeno fraco que protege a planta de patógeno forte, denominada imunização biológica, e como mutualístico para proteger suas plantas hospedeiras contra ataque de patógenos. Nas duas condições, o hospedeiro é protegido pela infecção dos endófitos, ao passo que os mesmos utilizam fonte de energia para sua sobrevivência dos seus hospedeiros. Além disso, alguns fungos endófitos podem expressar diferentes associações simbióticas (mutualística, parasítica e comensalística) dependendo das condições ambientais e da espécie hospedeira (Schulz *et al.*, 1999).

Vários artigos científicos têm ressaltado os efeitos benéficos de endófitos em aspectos como a produção de metabólitos secundários para controle biológico de pragas e de doenças (Clay, 1991). Nas últimas décadas, inúmeros estudos indicaram que infecções de microrganismos endofíticos podem resultar no aumento do vigor da planta e conferir tolerância a estresse biótico e abiótico (Zaurov, 2001). Microrganismos endofíticos, por exemplo, têm sido associados com tolerância à seca (Bacon, 1993 e West, 1994), tolerância a metais (Read, 1999), aumento da aquisição de nutrientes (Malinowski & Belesky 1999; Read, 1999), promoção de crescimento (Belesky *et al.*, 1987; Marks & Clay, 1990; Varma *et al.*, 1999), aumento na porcentagem de germinação (Clay, 1992), resistência a herbívoros (Latch, 1993), resistência à doença (Carroll, 1986; Freeman & Rodriguez, 1993; Redman *et al.* 1999) e aumento na produção de flôres (Kleifeld & Chet, 1992).

Embora os endófitos tenham despertado atenção da comunidade científica, somente há três décadas estão sendo feitos estudos sobre a ação de fungos endofíticos no controle de fitopatógenos. Narisawa *et al.* (1998) inocularam *Heteroconium choetospora* (Gloves) Ellis, fungo endofítico, em repolho e observaram redução de até 67% na severidade da doença causada por *Verticillium dahliae* Kleb.; Danielsen & Jensen (1999) testaram 34 isolados de fungos endofíticos para o controle de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg; Tunai *et al.* (2000) comprovaram o efeito de quatro isolados de fungos endofíticos, de centeio, "in vitro" no controle de patógenos de podridão de raiz. Narisawa *et al.* (2002) selecionaram 11 fungos endofíticos com potencial de suprimir, quase que completamente, os efeitos da infecção de *V. dahliae* em berinjela.

Fungos endofíticos têm sido observados em todas às espécies de plantas já examinadas. As poucas pesquisas realizadas visando estudar a comunidade endofítica associada com plantas tropicais têm mostrado que essas hospedeiras abrigam uma grande quantidade e diversidade de fungos endofíticos. Guimarães (1998) isolou 4.000 fungos

endofíticos a partir de amostras de folhas de 160 plantas de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke; Arnold *et al.* (2003) isolaram 1172 fungos endofíticos a partir de 126 folhas de *T. cacao* e Souza *et al.* (2004) isolaram 571 fungos endofíticos e 74 bactérias endofíticas a partir de folhas de *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham.

A comunidade endofítica é muito mais diversificada e sua interação é muito mais complexa com a planta do que se acreditava há algumas décadas atrás. Por enquanto, as pesquisas estão apenas iniciando, candidatos a agentes de controle biológicos poderão frustrar as expectativas ou prosperar no campo. Ainda há muitos estudos a serem desenvolvidos na área de biocontrole utilizando fungos endofíticos. A maioria dos estudos desenvolvidos até o momento está concentrada no isolamento, identificação de endófitos e a sua correlação com parâmetros ecológicos e do hospedeiro. Poucos estudos têm como objetivo entender a interação planta-endófitos e a colonização desses microrganismos no tecido do hospedeiro. Menor ainda é o número de estudos visando determinar a capacidade de uso de endofíticos em programas de controle biológico ou no manejo integrado de pragas. Talvez o advento da biotecnologia possa agilizar os ensaios baseados em controle biológico, facilitar o entendimento dessa interação e, conseqüentemente, contribuir na obtenção de resultados mais efetivos. Outros estudos também poderão ser incluídos como: melhoramento de plantas que naturalmente abrigam uma comunidade endofítica que desfavoreça patógenos; exploração mais efetiva dos endófitos universais, ou seja, aqueles que são encontrados em grande número de espécies de plantas; seleção dos endófitos mais competitivos como antagonistas e, principalmente, compreensão do envolvimento dos fungos endofíticos nas respostas sistêmicas da planta a patógenos.

### **2.3. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo**

O controle biológico fundamenta-se nas interações entre microrganismos antagônicos e patogênicos. No entanto, os mecanismos envolvidos ainda não são muito conhecidos. As

interações mais estudadas e melhor caracterizadas são: a) por competição, luta pela aquisição de um recurso indispensável (espaço físico, nutrientes e oxigênio); b) por indução de resistência de defesa dos hospedeiros, alterações dos mecanismos bioquímicos de resposta de resistência do hospedeiro aos fitopatógenos ocasionadas por agentes bióticos e c) por micoparasitismo, destruição das células do patógeno de planta pela digestão, a partir de enzimas hidrolíticas como quitinase, proteases, glucanases e lipases, produzidas pelos antagonistas (Chet, 1992).

Dentre os três processos, micoparasitismo é o que mais se destaca por ser extremamente comum no sistema natural, destruindo estruturas de fungos fitopatogênicos o que diminui sobremaneira a fonte de inóculo (Lima *et al.*, 2000). Apesar de ocorrer naturalmente, o micoparasitismo possui mecanismos de ação bastante complexos que incluem as fases de localização, reconhecimento do alvo pelo antagonista, transmissão de sinais que resulta na interação entre antagonistas e fitopatógenos, indução e produção de metabólitos (enzimas) pelo antagonista e digestão da célula-alvo (Melo, 1996; Lima *et al.*, 2000). A presença, a duração e a importância de cada fase dependem dos fungos envolvidos, o tipo de micoparasita (biotrófico ou necrotrófico) e das condições ambientais prevalentes (Melo, 1996).

As células fúngicas são envolvidas por uma parede celular, estrutura rígida que tem como função proteger e selecionar o fluxo de substâncias do interior para o exterior da célula e vice-versa. De acordo com Bartnicki-Garcia & Sing (1987), a parede celular é a estrutura que determina a forma do fungo. Além dessas funções, a parede celular é responsável pela proteção da célula contra as exposições às condições física, química e biológica adversas, por toda interação do fungo com o ambiente, pela fixação e reconhecimento de vários tipos de substratos além de atuar como imunizadora ou fator de virulência. As enzimas presentes na parede celular podem degradar moléculas grandes, como proteínas, polissacarídeos e lípidios,

para prover nutrientes para o desenvolvimento do organismo. Portanto, a parede celular é uma das estruturas mais importantes do fungo e pode ser a chave para definir este grupo de microrganismo.

Quimicamente, a parede celular dos fungos é uma estrutura complexa constituída de carboidratos, 80 – 90 % deles sob a forma de polissacarídeos (80 a 90%), tais como  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ ,6-glucano, celulose e quitina (Debono & Gordee, 1994). Alguns polímeros são relativamente simples, consistindo de cadeias lineares de resíduos unidos por uma ligação simples, enquanto outros são mais complexos, apresentando uma variedade de ligações, de formas e de cadeias ramificadas. Além desses, outros carboidratos, proteínas, lipídios e íons inorgânicos aparecem também na composição da parede celular. Às vezes, o fungo apresenta também quantidades razoáveis de pigmentos como melanina e caroteno (Bartnicki-Garcia, 1968).

A parede celular das espécies de Oomycota é composta predominantemente de  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6-glucano e celulose. Sendo que a maior proporção da composição da parede celular é  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6-glucano e cerca de 4 a 20 % de celulose. A quitina não está totalmente ausente nos Oomycotas. Quantidade significativa tem sido encontrada em algumas espécies pertencente a ordem Leptomitales (Ruiz-Herrera, 1992) e traços de quitina nas espécies de *Achlya* (Campos-Takaki *et al.*; 1982) e *Saprolegnia* (Bulone *et al.*, 1992), dois importantes gêneros do grupo.

Por outro lado, os micoparasitas têm a capacidade de sintetizar enzimas que degradam ou deformam os componentes da parede celular dos fitopatógenos (Griffin, 1994). As membranas podem ser destruídas por proteases e a parede celular por quitinase, glucanase e celulase. Embora ainda não se saiba quais os fatores envolvidos nessas interações, alguns fungos já foram relatados como potenciais micoparasitas de muitos fitopatógenos. O fato é que esses antagonistas têm a capacidade de hiperparasitar os fitopatógenos e destruir o micélio e os esporos. Enzimas líticas degradadoras da parede celular, tais como quitinase,  $\beta$

1,3-glucanase e protease, em ação isolada ou em conjunto, estão envolvidas no processo de micoparasitismo (Elad *et al.*, 1982; Sivan & Chet, 1989).

Os micoparasitas apresentam destacada importância no controle biológico natural de doenças foliares, sendo essa maior ainda em plantas perenes. Pode ser que o parasitismo seja o mecanismo mais eficiente de antagonismo no controle biológico natural pois os hiperparasitas vivem às custas do próprio patógeno. Dentro desse contexto, recentes investigações científicas têm dado ênfase às interações entre fungos, à composição da parede celular dos fungos e à produção de enzimas hidrolíticas por fungos antagonistas. Fungos do gênero *Trichoderma* têm sido exaustivamente estudados quanto à produção de enzimas hidrolíticas, a possível ação das mesmas no processo antagônico e os possíveis mecanismos envolvidos sobre a participação em controle biológico envolvendo micoparasitismo (Melo, 1998). *Trichoderma harzianum* Rifai, linhagem T-35, produz altos níveis de  $\beta$  - 1,3 - glucanase e quitinase e é capaz de parasitar efetivamente *Rhizoctonia solani* Kühn e *Sclerotium rolfsii* Sacc. devido, provavelmente, aos estímulos das paredes de células desses fungos. *Trichoderma hamatum* (Bonord.) Bainier pode localizar e detectar hifas de fungos suscetíveis, produz celulase e parasita *Pythium ultimum* Trow e *R. solani*.

Sucesso no controle de diversas doenças tem sido obtido com antagonistas que ocorrem naturalmente. Junqueira & Gasparotto (1991) observaram que estromas de *Microcyclus ulei* (P.Henn.) v. Arx, agente causal do mal-das-folhas da seringueira, foram colonizados naturalmente por *Dicyma pulvinata* (Berk & Curt) Arx. Sudo (1989) demonstrou que *Acremonium persicium* (Nicot) W. Gams e *A. alternatum* Link & Gray controlavam *Phyllachora torrendiella* (Batista) Subileau e *Shaerodothis acrocomiae* (Montagne) Von Arx & Muller, agente causal da lixa do coqueiro. *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viegas foi relatado colonizando várias ferrugens: *Hemileia vastatrix* Berk & Br. (Vélez & Rosillo, 1995), *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger var. *appendiculatus* (Grabski & Mendgen,

1986), *Coleosporium domingense* F. Kern & Cif. (McMillan Jr, 1985), *Puccinia horiana* Henn. (Srivastava *et al.*, 1985), *Puccinia graminis* Pers. var. *tritici* (Hanssler *et al.*, 1982), *Uromyces dianthi* Niessl (Spencer, 1980), entre outras.

Microrganismos que ocorrem naturalmente na superfície da planta, caso possuam efetiva ação antagonística contra patógeno, deverão ser preferidos em relação aos de outros habitats. Possivelmente, os microrganismos de outros habitats são menos adaptados a viver por longo período no filoplano e, conseqüentemente, haverá necessidade de ser reaplicá-los, com mais freqüência, na superfície foliar (Blakeman & Fokkema, 1982). Geralmente, apenas uma aplicação de *A. persicium* e *A. alternatum*, isolados de estromas de *P. torrendiella* e *S. acrocomiae*, controlou efetivamente a lixa do coqueiro (Sudo, 1989). Por outro lado, Sundheim & Amundsen (1982), utilizando antagonistas de outros habitats, obtiveram aumentos superiores a 50% na produção de pepino quando aplicaram semanalmente esporos de *Ampelomyces quisqualis* Ces. para o controle de oídio.

## Capítulo 1 - Diversidade e seleção de fungos endofíticos de cacauzeiro e cupuaçuzeiro visando o controle biológico da podridão-parda dos frutos de cacauzeiro

### INTRODUÇÃO

Fungos colonizando plantas internamente têm sido descritos praticamente em todas as espécies examinadas. Embora muitos desses fungos sejam fitopatógenos, um número considerável é encontrado colonizando plantas sem causar doença. Tais fungos são referidos como fungos endofíticos e geralmente colonizam os espaços intercelulares e os tecidos vasculares (Wilson, 1995).

A diversidade de fungos endofíticos encontrada nas espécies de plantas tropicais tem sido maior do que nas espécies temperadas (Arnold *et al.*, 2003). Muitos estudos relacionaram a maior infecção endofítica em plantas tropicais com a maior exposição dessas plantas a estresses abióticos e bióticos. Por outro lado, como resposta, os fungos endofíticos podem conferir às plantas maior tolerância a esses estresses, inclusive aumentando a resistência a doenças (Coley & Aide, 1989).

Recentemente, vários estudos foram relatados envolvendo o uso de fungos endofíticos como agentes de controle biológico das enfermidades do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.). Mejía *et al.* (2003) conduziram um experimento *in vitro* visando avaliar a atividade antagônica de 50 fungos endofíticos do cacauzeiro contra *Phytophthora* sp. e Rubini *et al.* (2005) isolaram cerca de 150 fungos endofíticos a partir de ramos de plantas de cacauzeiro visando o controle de vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer).

A podridão-parda dos frutos do cacauzeiro causada por várias espécies de *Phytophthora* é, em termos mundiais, a principal doença da cultura, visto que ocorre em todos os países produtores de cacau (Luz & Silva, 2001). A doença ataca todos os órgãos do cacauzeiro e as maiores perdas ocorrem quando os frutos são infectados, podendo acarretar uma redução de

até 90% da produção dos frutos, dependendo do local e das condições climáticas (Bowers *et al.*, 2001).

O principal método de controle adotado para proteger os frutos contra infecções de *Phytophthora* tem sido o controle químico. Geralmente é recomendado fungicida à base de cobre como óxido cuproso, oxiclreto de cobre, hidróxido de cobre e fungicidas sistêmicos como metalaxil e fosetil-Al (Luz & Silva, 2001). Para regiões de alta pluviosidade, onde o ataque da doença é muito intenso, 10 a 12 pulverizações anuais de fungicidas protetores podem ainda não ser eficiente (Lass, 1985), assim como os fungicidas sistêmicos (Holderness, 1992).

O controle genético tem sido indicado como a alternativa mais eficiente. No entanto, a baixa eficiência dos métodos de seleção, pela diversidade de espécies de *Phytophthora* que causam a doença e a escassa informação sobre os componentes e os tipos de resistência têm trazido dificuldades aos programas de melhoramento (Kennedy, 1987). Dos estudos realizados no Brasil visando obter cultivares resistentes ao patógeno, poucos cultivares apresentaram resistência a todas as espécies patogênicas (Luz & Silva, 2001). Isto sugere a necessidade de método(s) alternativo(s) ou complementar(es) para se obter controle mais efetivo da doença.

Portanto, investir na prevenção e no combate à podridão-parda é uma estratégia de longo prazo, pois, uma vez estabelecida a doença, torna-se remota sua eliminação. Apesar da complexidade dos fatores envolvidos, em outros patossistemas tem se buscado substituir produtos sintéticos por produtos de origem biológica. Tais produtos estão ganhando mercado e credibilidade pelos seus baixos impactos negativos sobre o ambiente e pela segurança à saúde humana. Como exemplo concreto no Brasil, cita-se o Tricovab, um biofungicida a base do fungo *Trichoderma stromaticum* Samuels & Pardo-Schultheiss, que está sendo aplicado no controle da vassoura-de-bruxa desde 1999, em plantações de cacau no sul da Bahia (Costa &

Bastos, 2001). Nas últimas décadas, o controle biológico se tornou como uma importante alternativa para reduzir a quantidade de produtos químicos, podendo ser aplicado isoladamente ou como parte do sistema de manejo integrado de doenças.

Os estudos sobre controle biológico de podridão-parda de frutos de cacaueteiro ainda são muito escassos. As espécies dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* foram citadas por Figueiredo & Campêlo (1983) como promissores agentes para o controle biológico da podridão-parda do cacaueteiro. Krauss & Soberanis (2002) avaliaram o potencial de *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers *et al.* e *Trichoderma* spp. e Hoopen *et al.* (2003) isolaram fungos epifíticos de frutos e almofadas florais de *T. cacao* visando o biocontrole de podridão-parda. Macagnan (2005) verificou que, dos dois isolados de actinomicetos testados, identificados como pertencentes ao gênero *Streptomyces*, formulados em extrato de carne e óleo emulsionável, o isolado Ac 26 foi o mais promissor na redução da severidade dessa doença. Contudo, nenhum destes antagonistas citados anteriormente se transformou em produto comercial ou estão sendo utilizados de alguma forma pelo produtor.

Na Amazônia, a região de origem do cacaueteiro, a co-evolução do patógeno e do hospedeiro pode ter favorecido os fungos endofíticos que, por meio da seleção natural, promoveram vantagens ao hospedeiro. Como premissa, acredita-se que tais vantagens incluam a produção de compostos antimicrobianos pelos endofíticos ou a elicitação de compostos similares pelo hospedeiro. Diante disso, o trabalho teve como objetivo determinar o potencial de fungos endofíticos de cacaueteiro e cupuaçuzeiro no controle da podridão-parda em condições de campo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Patologia de Madeira, da Coordenação de Pesquisas de Produtos Florestais (CPPF) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA, Manaus, AM e no laboratório de Fitopatologia e na fazenda experimental da empresa Almirante Cacau, Itajuípe, BA.

### **Obtenção dos isolados de fungos endofíticos**

Os fungos endofíticos foram isolados a partir de cacauzeiros aparentemente saudáveis do Amazonas e da Bahia e cupuaçuzeiros do Amazonas. O isolamento foi feito do interior de ramos e da parte interna da casca de caule. Com auxílio de bisturi flambado, cinco fragmentos de aproximadamente 25 mm<sup>2</sup> foram retirados dos referidos órgãos da planta e transferidos para placas de Petri contendo 20 ml de meio de batata-dextrose-agar (BDA) acrescido de 25 µg.ml<sup>-1</sup> de cloranfenicol. As placas foram mantidas em incubadoras a 25 °C no escuro. Diariamente fez-se monitoramento visando observar estruturas fúngicas emergindo dos fragmentos. Ao ser constatado o crescimento de micélio, o mesmo foi repicado para novas placas de Petri contendo meio de BDA e 25 µg.ml<sup>-1</sup> de cloranfenicol e incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Os fungos endofíticos obtidos foram enumerados e armazenados em sílica gel, conforme a metodologia descrita por Dhingra & Sinclair (1995), para posterior identificação e avaliação do seu potencial no uso de biocontrole a *P. palmivora* (Butler) Butler.

### **Obtenção e preservação do isolado de *Phytophthora palmivora***

*Phytophthora palmivora* foi isolado a partir de frutos de cacauzeiro, apresentando sintomas e sinais de podridão-parda, coletado na área experimental da Fazenda Almirante Cacau, Itajuípe, BA. A partir dos sinais do patógeno foi feito isolamento direto para placas de Petri contendo BDA acrescidos de 25 µg.ml<sup>-1</sup> de cloranfenicol. As placas foram mantidas a 25

<sup>0</sup>C, por 10 dias, no escuro. Posteriormente, discos de 3 mm de diâmetro foram cortados, com vazador de cortiça esterilizado, e transferidos para frascos tipo de penicilina contendo água destilada esterilizada. Os frascos contendo os discos de micélio de *Phytophthora* sp. foram armazenados em refrigerador a 5 <sup>0</sup>C para estudos posteriores.

A identificação foi baseada nos caracteres morfológicos e biométricos principalmente, observadas com auxílio de microscópio estereoscópico e óptico. Levou-se em consideração os sintomas da doença nos frutos, as características culturais do patógeno crescido em meio de BDA, formato e tamanho do esporângio e comprimento do pedicelo. Os dados foram comparados com os descritos por Cerqueira *et al.* (1999).

#### **Identificação dos fungos endofíticos**

Os fungos endofíticos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de BDA (decoção de 40 g de batata, 20 g de dextrose, 15 g de agar, para 1000 ml de água destilada), por até oito semanas, a 25 <sup>0</sup>C, sob fotoperíodo de 12 horas fornecida por lâmpadas fluorescente de 40 watts, tipo luz do dia, localizada a 40 cm acima das placas. Os fungos que conseguiram esporular abundantemente nessas condições foram identificados em nível de gênero ou espécie baseados nas características morfológicas. Para tanto, foram preparadas lâminas das estruturas reprodutivas dos fungos em lactofenol, com e sem azul-de-algodão, e observadas sob microscópio óptico. Para observar estruturas morfológicas mais delicadas, foram preparados microcultivos (Fernandez, 1993). Os aspectos morfológicos e biométricos das estruturas foram comparados com os descritos em chaves taxonômicas, assim como, também, as comparações das características culturais (Ellis, 1971, 1976; Carmichael *et al.*, 1980; Sutton, 1980).

### **Produção de inóculo dos antagonistas e do patógeno**

Para obtenção de inóculo, os fungos endofíticos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de BDA, a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h. Foram testados apenas os isolados que produziram em três placas de Petri, 30 ml de suspensão acima de  $5 \times 10^6$  conídios.ml<sup>-1</sup>.

A suspensão de *P. palmivora* foi preparada a partir do seu cultivo em placas de Petri contendo meio de T3 (decoção de 20 g de cenoura; 45 g de extrato de tomate; 3 g de carbonato de cálcio e 15 g de agar para 1 litro de água destilada), mantido a 25 °C, por 10 dias no escuro e por três dias sob luz contínua (lâmpada fluorescente 20 watts a 30 cm de distância da placas). Após o período de incubação, a cada placa foram acrescidos 10 ml de água destilada esterilizada a 4 °C. As placas foram então mantidas em um refrigerador a 5 °C por 15 minutos e, em seguida, por 30 minutos a 25 °C. As culturas foram examinadas quanto à liberação de zoósporos, sob microscópio óptico, na objetiva de 10 x. Constatada a liberação de zoósporos, os mesmos foram coletados e a concentração ajustada para  $2,0 \times 10^5$  zoosporos.ml<sup>-1</sup> com auxílio de uma câmara de Neubauer.

### **Seleção dos fungos endofíticos**

A avaliação do potencial dos fungos endofíticos no controle da podridão-parda foi conduzida em campo e realizada em duas etapas. Na primeira etapa, denominada preliminar, cada isolado foi inoculado em três frutos de cacaueteiro, cultivar SIAL 70, não destacados da planta, aparentemente sadios, livres de ferimentos visíveis ou outros defeitos, com aproximadamente quatro meses de idade. Na inoculação foi utilizado atomizador manual pulverizando-os até antes do ponto de escorrimento. Os frutos inoculados foram identificados com fitas coloridas e cobertos com sacos de polietileno transparentes, umedecidos e amarrados com arame ao redor do pendúnculo (câmara úmida), 24 horas antes e após a inoculação. Sete dias após a inoculação dos endofíticos, os mesmos frutos foram inoculados com uma suspensão de *P. palmivora* na concentração de  $2,0 \times 10^5$  zoosporos.ml<sup>-1</sup>. Antes e após a

inoculação, os frutos foram submetidos à câmara úmida conforme descrito anteriormente. Nesse experimento foram aplicados os controles: positivo (frutos inoculados somente com *P. palmivora*) e negativo (frutos pulverizados somente com água estelirizada). Oito dias após a inoculação do patógeno, avaliou-se a severidade da doença, conforme a escala de nota especialmente desenvolvida: 1 – fruto livre de sintomas; 2 – lesões localizadas distinguíveis com aproximadamente 2 cm de diâmetro ou 5 mm em estrias; 3 - lesões em expansão que variam de 0,2 mm a 2 cm de diâmetro; 4 – lesões expandidas e/ou coalescidas com diâmetro próximo a 25% da área inoculada, envolvendo outras lesões menores; 5 – lesões expandidas e coalescidas acima de 25 % da área inoculada.

Na segunda fase da seleção, oito fungos endofíticos que apresentaram ser promissores no controle da doença foram submetidos a avaliação em 20 frutos. Os procedimentos foram semelhantes ao descrito para o experimento anterior. Para a análise da variância, os dados do controle negativo foram excluídos e as demais notas de severidade foram transformadas em raiz quadrada. A comparação das médias foi feita utilizando o teste Dunnett a 5 % de probabilidade.

## RESULTADOS

Obtiveram-se 124 isolados de fungos endofíticos de cacauzeiros aparentemente sadios dos municípios de Tabatinga, Itacoatiara, Benjamin Constant, São Paulo de Olivença e Manaus e 13 de cupuaçuzeiros dos municípios de Presidente Figueiredo e Manaus, no estado do Amazonas, perfazendo um total de 137 isolados. Desses, 80 isolados foram avaliados para o controle de *P. palmivora*. (Tabela 1). Dos outros 57 isolados, 17 não cresceram após o armazenamento, 35 não esporularam e cinco tiveram esporulação insuficiente, menor que  $5 \times 10^6$  conídios.ml<sup>-1</sup>. Também, foram testados 23 isolados endofíticos de cacauzeiros provenientes da coleção de microrganismos da empresa Almirante Cacau.

Dos fungos endofíticos isolados de cacauzeiro no Amazonas, *Fusarium* e *Pestalotiopsis* foram os que tiveram maior prevalência (8,9%). *Arthrinium*, *Coniothyrium*, *Cylindrocladium*, *Myrothecium*, *Paecylomyces* e *Septoria* foram os de menor prevalência, representados apenas com um exemplar cada (0,8%). *Pestalotiopsis* também foi o que teve maior prevalência (23,1%) do total isolado de cupuaçuzeiro, seguido por *Acremonium* e *Lasiodiplodia* com 15,4% cada. Do total, 23 isolados foram identificados ao nível de espécie e 57 ao nível de gênero. *Asteromella* foi o único gênero isolado em cupuaçuzeiro e não isolado em cacauzeiro (Tabela 2).

Número de isolados	Hospedeiro	Localidade	Isolados testados
1	Cacauzeiro	Tabatinga	1
12	Cacauzeiro	São Paulo de Olivença	10
98	Cacauzeiro	Benjamim Constant	54
9	Cacauzeiro	Manaus	5
1	Cupuaçuzeiro	Manaus	1
4	Cacauzeiro	Itacoatiara	1
12	Cupuaçuzeiro	Presidente Figueiredo	8
Sub total = 137			80
23	Cacauzeiro	Coleção Almirante Cacau	23
Total = 160			103

Tabela 1 - Fungos endofíticos isolados de *Theobroma cacao* e *T. grandiflorum* provenientes do Estado do Amazonas e da coleção da empresa Almirante Cacau, BA, avaliados para o controle da podridão-parda dos frutos de cacauzeiro.

Fungos	Isolados	Prevalência do Amazonas (%)	
		Cupuaçuzeiro	cacaueiro
<i>Acremonium</i> spp.	8	2 (15,4%)	6 (4,8%)
<i>Arthrinium</i> sp.	1	0	1 (0,8%)
<i>Aspergillus</i> spp.	6	0	6 (4,8%)
<i>Asteromella</i> sp.	1	1 (7,7%)	0
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz.	2	0	2 (1,6%)
<i>Coniothyrium</i> sp.	1	0	1 (0,8%)
<i>Curvularia</i> spp.	6	0	6 (4,8%)
<i>Cylindrocladium</i> sp.	1	0	1 (0,8%)
<i>Fusarium</i> spp.	11	0	11 (8,9%)
<i>Gliocladium</i> sp.	2	0	2 (1,6%)
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griff & Maubl.	6	2 (15,4%)	4 (3,3)
<i>Myrothecium verrucaria</i> (Alb. & Schw.) Ditmar ex Fries	1	0	1 (0,8%)
<i>Paecilomyces</i> sp.	1	0	1 (0,8%)
<i>Penicillium</i> spp.	9	0	9 (7,3)
<i>Pestalotiopsis maculans</i> (Corda) Nag Raj.	14	3 (23,1%)	11 (8,9%)
<i>Phoma</i> spp.	3	1 (7,7%)	2 (1,6%)
<i>Septoria</i> sp.	1	0	1 (0,8%)
<i>Tolypocladium</i> spp.	3	0	3 (2,4%)
<i>Trichoderma</i> spp.	3	0	3 (2,4%)
Fungos endofíticos não identificados	57	4 (30,7)	53 (42,8%)
Total	137	13 (100%)	124 (100%)

Tabela 2 - Prevalência de fungos endofíticos isolados de cupuaçuzeiro e cacaueiro no Amazonas.

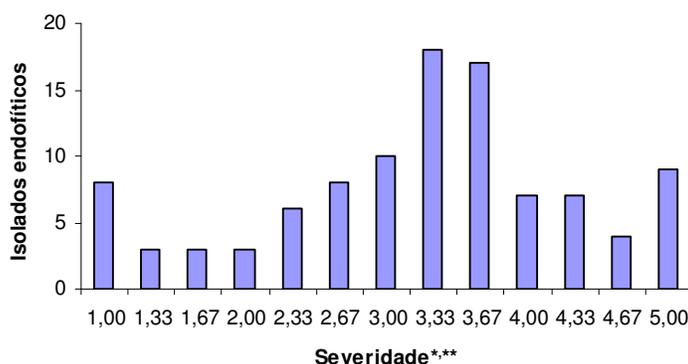
Na primeira etapa da seleção foram testados 103 isolados endofíticos, representados por 21 gêneros. Nenhum gênero se sobressaiu na redução da severidade da doença. Alguns isolados do mesmo gênero mostraram-se ineficientes, enquanto outros se mostraram eficientes no controle da doença. Para a maioria dos gêneros testados obtiveram-se resultados semelhantes em relação à severidade da doença (Tabela 3).

Fungos	Isolados testados	Índice de severidade*			
		1,0 – 2,0	2,1 – 3,0	3,1 – 4,0	4,1 – 5,0
<i>Acremonium</i> spp.	8	1	1	5	1
<i>Arthrinum</i> sp.	1	0	0	0	1
<i>Aspergillus</i> spp.	6	0	0	4	2
<i>Asteromella</i> sp.	1	0	1	0	0
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	2	0	1	1	0
<i>Coniothyrium</i> sp.	1	0	1	0	0
<i>Curvularia</i> spp.	6	1	3	2	0
<i>Cylindrocladium</i> sp.	1	0	0	1	0
<i>Fusarium</i> spp.	11	4	2	4	1
<i>Gliocladium</i> spp.	2	0	0	2	0
<i>G. catenulatum</i>	1	0	0	1	0
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	6	0	0	4	2
<i>Myrothecium verrucaria</i>	1	0	0	1	0
<i>Paecilomyces</i> sp.	1	0	0	0	1
<i>Penicillium</i> spp.	9	0	4	2	3
<i>Pestalotiopsis maculans</i>	15	4	1	6	4
<i>Phoma</i> spp.	3	1	0	0	2
<i>Septoria</i> sp.	1	0	0	1	0
<i>Talaromyces</i> sp.	1	0	0	1	0
<i>Tolypocladium</i> sp.	3	1	0	1	1
<i>Trichoderma</i> sp.	9	1	4	4	0
<i>T. asperellum</i>	2	0	1	1	0
<i>T. stromaticum</i>	6	2	3	0	1
<i>T. virens</i>	1	0	0	1	0
<i>T. viride</i> Pers. ex. S. F. Gray	1	1	0	0	0
<i>Verticillium</i> spp.	2	1	0	1	0
Controle positivo	1	0	0	0	1
Controle negativo	1	1	0	0	0

Tabela 3 – Severidade média da podridão-parda em três frutos de cacauete inoculados artificialmente com isolados de fungos endofíticos e com *Phytophthora palmivora*.

\*Notas de severidade dos sintomas de podridão-parda em frutos avaliada de acordo com escala onde: 1 – fruto livre de sintomas; 2 – lesões localizadas distinguíveis com aproximadamente 2 cm de diâmetro ou 5 mm em estrias; 3 - lesões em expansão que variam de 0,2 mm a 2 cm de diâmetro; 4 – lesões expandidas e/ou coalescidas com diâmetro próximo a 25% da área inoculada, envolvendo outras lesões menores; 5 – lesões expandidas e coalescidas acima de 25 % da área inoculada.

Mais de 70% dos isolados de fungos endofíticos reduziram a severidade da doença em relação ao controle. Sendo que, para os oitos isolados mais eficientes no controle da podridão-parda, os frutos não apresentaram sintomas de infecção de *Phytophthora* e a severidade dos três frutos foi igual a do controle negativo pulverizado com água. Por outro lado, a severidade média para 27 isolados foi igual ou superior ao controle positivo, que apresentou severidade



média 4 (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Performance dos 103 isolados de fungos endofíticos quanto a severidade média de podridão-parda em três frutos de cacauete inoculados artificialmente com isolados de fungos endofíticos e com *Phytophthora palmivora*.

\* Notas de severidade dos sintomas de podridão-parda em frutos de acordo com escala onde: 1 – fruto livre de sintomas; 2 – lesões localizadas distinguíveis com aproximadamente 2 cm de diâmetro ou 5 mm em estrias; 3 – lesões em expansão que variam de 0,2 mm a 2 cm de diâmetro; 4 – lesões expandidas e/ou coalescidas com diâmetro próximo a 25% da área inoculada, envolvendo outras lesões menores; 5 – lesões expandidas e coalescidas acima de 25 % da área inoculada. \*\*controle negativo igual a 1 (frutos inoculados somente com água) e controle positivo igual a 4 (frutos inoculados somente com *Phytophthora palmivora*).

Oito isolados que protegeram os frutos da infecção de *P. palmivora* (nota de severidade igual a 1), foram novamente testados em 20 frutos de cacauete. Todos os isolados, exceto ALF 247 (*T. viride*), foram provenientes do Amazonas. Dos isolados amazonenses, cinco foram provenientes de Benjamim Constant. Sete isolados foram provenientes de cacauete e dos oitos isolados, seis foram obtidos a partir do caule dos seus respectivos hospedeiros (Tabela 4).

Isolado	Fungos endofíticos	Hospedeiro	Órgão	Localidade
ALF 247	<i>Trichoderma viride</i>	Cacaueiro	Caule	Inema-BA
ALF1587	<i>Fusarium</i> sp2	Cacaueiro	Ramo	Itacoatiara -AM
ALF1586	<i>Pestalotiopsis maculans</i>	Cupuaçuzeiro	Ramo	P. Figueiredo-AM
ALF821	<i>Pestalotiopsis maculans</i>	Cacaueiro	Caule	B. Constant-AM
ALF829	<i>Curvularia</i> sp.	Cacaueiro	Caule	B. Constant-AM
ALF839	<i>Fusarium</i> sp3	Cacaueiro	Caule	B. Constant-AM
ALF849	<i>Fusarium</i> sp1	Cacaueiro	Caule	B. Constant -AM
ALF902	<i>Tolypocladium</i> sp.	Cacaueiro	Caule	B. Constant-AM

Tabela 4 - Procedência dos isolados endofíticos com potencial para controle da podridão-parda do fruto do cacaueiro.

Os frutos de cacaueiro inoculados com os oito isolados endofíticos selecionados apresentaram severidade de podridão-parda abaixo do controle. O isolado ALF247 foi o que promoveu melhor resultado dentre os selecionados e o menos eficiente foi o ALF 821 (Gráfico 2). Houve diferença significativa a 5 % de probabilidade entre todos os tratamentos com o controle (Tabela 5).

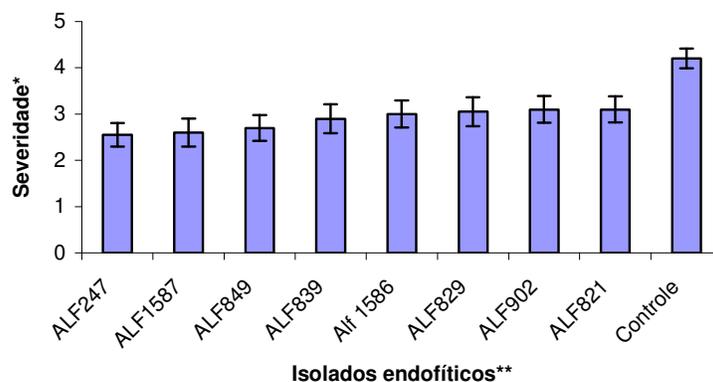


Gráfico 2 - Severidade média de podridão-parda em 20 frutos de cacaueiro inoculados artificialmente com isolados de fungos endofíticos e com *Phytophthora palmivora*. As barras representam o erro padrão da média.

\*Notas de severidade dos sintomas de podridão-parda em frutos de acordo com escala onde: 1 – fruto livre de sintomas; 2 – lesões localizadas distinguíveis com aproximadamente 2 cm de diâmetro ou 5 mm em estrias; 3 – lesões em expansão que variam de 0,2 mm a 2 cm de diâmetro; 4 – lesões expandidas e/ou coalescidas com diâmetro próximo a 25% da área inoculada, envolvendo outras lesões menores; 5 – lesões expandidas e coalescidas acima de 25 % da área inoculada. \*\* ALF 247 – *Trichoderma viride*, ALF 1587 – *Fusarium* sp.2, ALF 849 *Fusarium* sp.1, ALF 839 – *Fusarium* sp.3, ALF 1586 – *Pestalotiopsis maculans*, ALF 829 *Curvularia* sp., ALF 902 – *Tolypocladium* sp., ALF 821 – *P. maculans*, Controle (frutos inoculados somente com *Phytophthora palmivora*).

Contrastes <sup>1/2/</sup>	
$\hat{Y}_1$	= Controle - ALF 247 = 2,0352 - 1,5534 = 0,4818*
$\hat{Y}_2$	= Controle - ALF 1587 = 2,0352 - 1,5554 = 0,4798*
$\hat{Y}_3$	= Controle - ALF 849 = 2,0352 - 1,5936 = 0,4416*
$\hat{Y}_4$	= Controle - ALF 839 = 2,0352 - 1,6464 = 0,3888*
$\hat{Y}_5$	= Controle - ALF 1586 = 2,0352 - 1,6846 = 0,3506*
$\hat{Y}_6$	= Controle - ALF 829 = 2,0352 - 1,6940 = 0,3412*
$\hat{Y}_7$	= Controle - ALF 902 = 2,0352 - 1,7172 = 0,3180*
$\hat{Y}_8$	= Controle - ALF 821 = 2,0352 - 1,7178 = 0,3174*

Tabela 5 - Contrastes entre os isolados pré-selecionados de fungos endofíticos em relação ao controle, não tratado com endofíticos.

<sup>1/</sup> Dados médios provenientes de 20 frutos. <sup>2/</sup> Dados transformados em raiz quadrada da nota. \* significativo a 5 % probabilidade pelo teste Dunnett.

## DISCUSSÃO

Os fungos endofíticos de ocorrência mais comum isolados de cacaueteiro e cupuaçueteiro foram *Pestalotiopsis*, *Fusarium* e *Acremonium*, e os de ocorrência mais rara foram *Arthrinium*, *Asteromella*, *Coniothyrium*, *Cylindrocladium*, *Myrothecium*, *Paecylomyces*, *Septoria* e *Talaromyces*, com um isolado cada (Tabela 1). No total de 103 fungos endofíticos, obtiveram-se 21 gêneros (Tabela 2). Muitos desses gêneros já têm sido relatados como endofíticos e, ou, como potenciais controladores biológico.

Os fungos endofíticos *Acremonium*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis*, *Trichoderma* e *Verticillium* foram também isolados por Rubini *et al.* (2005) a partir do córtex de ramo de cacaueteiro na Bahia. Os gêneros *Colletotrichum* e *Fusarium* foram isolados como endofíticos por Arnold *et al.* (2003) a partir de folhas de cacaueteiro, no Panamá. Mais de 50 % dos fungos endofíticos isolados nesse trabalho ainda não haviam sido relatados infectando cacaueteiro. Essa dinâmica da população de fungos endofíticos pode estar relacionada com algumas propriedades do hospedeiro como a variação da composição química (Espinosa-Garcia & Langenheim, 1991) e as condições fisiológicas (Lappalainen *et al.*, 1999). As condições ambientais também

podem influenciar na dinâmica da comunidade fúngica endofítica tanto no tempo como no espaço e sua composição de espécie pode ser alterada de um ano para outro (Kinkel, 1991).

Alguns gêneros de fungos endofíticos isolados nesse trabalho também foram isolados de outros hospedeiros. *Asteromella* foi isolado do interior de folhas de *Quercus emoryi* e parece envolvido no controle de larvas de *Cameraria* sp. (Faeth & Hammon, 1997). Duas espécies de *Coniothyrium* foram isoladas do córtex de galhos de *Picea abies* L. Karst., uma conífera, por Barklund & Kowalski (1996) e *Phoma* está entre os fungos endofíticos isolados de folhas de trigo por Dingle & Mcgee (2003). Os fungos *Aspergillus*, *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma* foram isolados por Paz Junior & Menezes (2005) associados internamente a sementes de girassol.

A diversidade de fungos endofíticos encontrada no presente trabalho corrobora com os resultados obtidos por Arnold *et al.* (2003) que em seus estudos observaram uma abundância e diversidade no levantamento realizado com árvores de regiões tropicais. Hawksworth (1993) reforça esses resultados quando menciona que a maioria da diversidade de fungos ainda não identificada encontra-se associada a plantas tropicais. A explicação dessa alta diversidade pode estar nas condições climáticas e no baixo uso de pesticidas, nessa região, comparadas com a agricultura de países de clima temperado. Segundo Kinkel (1991), as altas temperatura e umidade da região tropical favorecem a comunidade endofítica. Por outro lado, o uso de elevadas concentrações de metais pesados e outros poluentes podem afetar quantitativa e qualitativamente essa composição (Gadd, 1993; Magan *et al.*, 1996). Um outro fator é que as plantas da região Tropical Úmida estão constantemente sujeitas à pressão de inimigos naturais como fungos fitopatogênicos e, em resposta, muitas delas têm recorrido a defesas promovidas por substâncias antifúngicas produzidas principalmente por microrganismos endofíticos (Coley & Aide, 1989).

Há de se convir que a metodologia de isolamento dos fungos endofíticos empregada nesse trabalho pode ter restringido a obtenção de muitos gêneros como, por exemplo, daqueles que crescem somente em meios específicos e os biotróficos, que não crescem em meio de cultura. Certamente a comunidade fúngica endofítica no cacaueteiro e do cupuaçuzeiro é maior do que a encontrada, porém, mesmo assim, obteve-se uma diversidade significativa de fungos endofíticos e provavelmente muitas dessas espécies são novas para ciência. Segundo Lodge *et al.* (1996) e Saikkonem *et al.* (1998), os fungos endofíticos podem ser componentes chaves da diversidade fúngica principalmente aqueles encontrados nas regiões tropicais e devido a essa diversidade teriam um papel fundamental na contribuição de novas espécies desse universo ainda desconhecido. A afirmação reforça a estimativa de Hawksworth (1991), quem calculou existirem 1,5 milhões de espécies de fungos e até o momento apenas 5% seriam conhecidos pela ciência.

A abundância e a diversidade fúngica endofítica observada em cacaueteiro e cupuaçuzeiro indica a ocorrência da interação mutualística endofítico-hospedeiro apesar de ainda não ser possível explicar o custo e o benefício da sua presença. Segundo Read (1999), os fungos endofíticos exercem um papel fundamental na manutenção da estrutura e do funcionamento dos órgãos vitais da planta e aumentam a resistência a inimigos naturais. De acordo com Redman (2001), as chances de sobrevivência das plantas seriam mínimas sem essas associações simbióticas, uma vez que existe uma pressão muito grande por parte dos fungos fitopatogênicos. Clay (1991) sugeriu que os fungos endofíticos sobrevivem primariamente sobre o efluxo apoplástico dos nutrientes dos tecidos da planta. No entanto, os mecanismos dessa interação endofítico-hospedeiro ainda não estão bem esclarecidos (Müller *et al.*, 2001).

Mais de 70% dos isolados de fungos endofíticos testados nesse trabalho, em condições de campo, reduziram a severidade da podridão-parda do fruto de cacaueteiro (Figura 1). Sendo

que o isolado ALF 247, identificado como *T. viride*, foi o mais eficiente na redução da severidade da doença. Esses resultados comprovam que fungos endofíticos podem controlar fungos patogênicos de plantas, confirmando o que já tinha sido mencionado por Carroll (1986).

Considerando que os experimentos foram conduzidos em condições de campo, os resultados obtidos reforçam ainda mais a capacidade dos fungos endofíticos como agentes de biocontrole de fitopatógenos. Segundo Melo (1996), um dos principais fatores que contribui para o insucesso da implantação do biocontrole é a falta de correlação entre testes *in vitro* e ensaios em condições de campo. Portanto, espera-se que o isolado ALF 247 quando aplicado em áreas de produção comercial tenha mais chances de controlar satisfatoriamente a podridão-parda dos frutos de cacaueteiro.

O uso de *T. viride* como agente de biocontrole de fitopatógenos tem sido relatado em muitos trabalhos. Barràs & Aguilar (1990) observaram atividade antagonista de *T. viride* a *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr) Sacc. Laranjas inoculadas com *P. digitatum*, não produziam lesão após cinco dias quando *T. viride* foi aplicado 48 h ou 72 h antes da inoculação. Martins-Corder & Melo (1998) verificaram que *T. viride* e *T. koningii* Rifai selecionados através da antibiose, competição por substrato e hiperparasitismo, mostraram ampla potencialidade para antagonizar *Verticillium dahliae* Kleb. e Stefanova *et al.*, (1999) constataram atividade carboximetilcelulase, glucanases, quitinase e a presença de um metabólito volátil, denominado de lactona, em um isolado de *T. viride* que inibiu o crescimento de *Phytophthora nicotinae*, patógeno fúngico habitante de solo. Mathivanan *et al.* (2005) aplicando *T. viride* formulado com talco reduziram significativamente a incidência da queima da bainha de arroz causada por *Rhizoctonia solani* Kühn, além de promover crescimento da planta e um aumento significativo na produção de grãos. Espécies de *Trichoderma* apresentam as vantagens de serem inócuas ao ser humano, não causarem impacto ao meio ambiente, serem facilmente

propagados e formulados em laboratório e que, quando formuladas, oferecem boa capacidade de armazenamento, possibilitando sua comercialização (Melo, 1996).

Esses resultados evidenciam que os fungos endofíticos de cacaueteiro e cupuaçueteiro, de ocorrência natural, apresentam potencial para serem avaliados como agentes de biocontrole de doenças de plantas. No entanto, aparentemente *T. viride* é capaz de reduzir a severidade da doença, mas não consegue eliminar totalmente o patógeno. Dessa forma, o controle biológico deverá integrar um programa de manejo de doença somado a outras estratégias de controle como químico, genético e cultural, contribuindo na redução do número de aplicações de defensivos.

No futuro será importante elucidar os mecanismos envolvidos nessa complexa interação antagônica, como também a interação endofítico-planta cujos resultados poderão otimizar a metodologia e as estratégias a serem aplicadas no controle biológico ou no controle integrado de outras doenças do cacaueteiro. Além disso, não se pode considerar endofíticos somente como agentes de biocontrole, mas levar em conta também os prováveis efeitos sinérgicos que o *T. viride* está promovendo na interação endofítico-hospedeiro como no aumento de produtividade.

## Capítulo 2 - *Trichoderma viride*: Potencial agente de biocontrole da podridão-parda dos frutos de cacau (*Theobroma cacao*)

### INTRODUÇÃO

A podridão-parda dos frutos do cacau (*Theobroma cacao* L.), causada por várias espécies de *Phytophthora*, é considerada mundialmente a principal doença da cultura, visto que ocorre em todos os países que a cultivam (Brasier & Griffin, 1979; Evans & Prior, 1987; Fulton, 1989; Luz & Silva, 2001). Além disso, a doença afeta significativamente a produção de cacau desde os anos 20 do século passado causando perdas anuais de até 90% da produção dos frutos (Bowers *et al.*, 2001). Essas perdas, no entanto, estão relacionadas com local de cultivo e com as condições ambientais.

A doença é mais severa no Oeste e na área Central da África, onde os países produtores contribuem com 60 a 70% da produção mundial de cacau. Principalmente em Gana, Nigéria e Camarões, as perdas variam entre 50 a 80% (Nyassé, 1997). No Brasil, a doença ocorre em todos os estados produtores de cacau e causa perdas variáveis. Nos anos de 82 e 84, as perdas de frutos em Tomé-Açu, Pará, devido à podridão-parda, foram consideravelmente mais altas do que as causadas pela vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer) (Andebrhan & Almeida, 1986). Na mesma década, em algumas regiões da Bahia, as perdas atingiram cerca de 80% (Luz *et al.*, 1997).

O controle químico e o genético são os principais métodos adotados para proteger os frutos de cacau contra infecções de *Phytophthora*. No controle químico são geralmente recomendados fungicidas à base de cobre como óxido cuproso, oxiclreto de cobre e hidróxido de cobre e fungicidas sistêmicos, como metalaxil e fosetil-Al (Luz & Silva, 2001). Dependendo das condições climáticas, e se a doença estiver muito intensa, são necessárias

várias aplicações de fungicidas que, muitas vezes, podem não ser eficientes (Lass, 1985), aumentando o custo de produção, contaminando o ambiente e favorecendo surgimento de populações resistentes do patógeno. A resistência genética, por outro lado, poderia ser uma alternativa importante para o controle da podridão-parda se não fossem as dificuldades encontradas na seleção de materiais resistentes. Isso se dá pela existência de várias espécies de *Phytophthora* causando a doença no Brasil e pela falta de uniformização da metodologia utilizada nos testes para avaliação de resistência nos diversos países produtores (Luz & Silva, 2001).

O controle biológico pode ser uma importante alternativa para reduzir a quantidade de produtos químicos aplicado. No entanto, estudos sobre controle biológico de podridão-parda de frutos de cacaueteiro ainda são muito escassos. Particularmente, até o momento, nenhum dos antagonistas estudados transformou-se um produto comercial ou está sendo utilizado, de alguma forma, pelo produtor.

Para se obter sucesso usando o controle biológico, muitas vezes é necessário incluir várias práticas para criar um ambiente favorável aos antagonistas, para permitir introdução em massa de antagonistas e desenvolver tecnologias que sejam competitivas no mercado e adequadas para o uso por produtores. É importante também que os agentes de biocontrole possam ser usados em programas de manejo integrado de pragas e não sejam onerosos.

Em levantamento recente de fungos endofíticos em cacaueteiros e cupuaçuzeiros visando encontrar agentes para o controle biológico da podridão-parda dos frutos de cacaueteiro (Hanada *et al.*, 2004). Os autores selecionaram o isolado ALF 247, identificado como *Trichoderma viride* Pers. ex. S.F. Gray, como o antagonista mais eficiente no controle de *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler.

Espécies de *Trichoderma* têm sido citadas como promotoras de vários efeitos benéficos a plantas cultivadas como aumento de produtividade, promoção de crescimento e

proteção contra fitopatógenos (Harman *et al.*, 2004). Como biocontroladores de fitopatógenos, geralmente são micoparasitas e apresentam as vantagens de serem inócuos ao ser humano e não causarem impacto negativo ao meio ambiente. Esses fungos antagonistas também são facilmente propagados e formulados em laboratório e apresentam boa capacidade de armazenamento possibilitando sua comercialização (Melo, 1996). Além disso, algumas espécies de *Trichoderma* podem tolerar importantes fungicidas utilizados no sistema de produção (Batista *et al.*, 2002). Tais vantagens podem qualificar o fungo a ser um dos componentes do manejo integrado de doenças.

Dentro desse contexto este trabalho teve como objetivo otimizar o uso do *T. viride* por meio da determinação da concentração e da formulação adequada, da sensibilidade a fungicidas de contato e sistêmicos, do efeito residual do antagonista nos frutos e da metodologia de produção massal de conídios.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Patologia de Madeira, da Coordenação de Pesquisas de Produtos Florestais, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM e no laboratório de Fitopatologia e na fazenda experimental, do Centro de Pesquisas da Empresa Almirante Cacau, Itajuípe, BA.

### **Eficiência do isolado de *Trichoderma viride* formulado em sacarose e óleo vegetal**

Uma suspensão de  $10^7$  conídios.ml<sup>-1</sup> do isolado ALF 247 (*T. viride*) foi obtida a partir do cultivo, em placas de Petri contendo meio de BDA (decocção de 40 g de batata, 20 g de dextrose, 20 g de agar, para 1000 ml de água destilada) a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. Da suspensão, prepararam-se as seguintes formulações: a) *T. viride* + óleo vegetal agrícola emulsionado derivado de soja (Nortox) 2%; b) *T. viride* + sacarose 2%; c) *T. viride* +

sacarose 2% + óleo vegetal 2%. Nesse experimento foram aplicados os seguintes controles: d) *T. viride*; e) óleo vegetal 2% + sacarose 2% ; f) óleo vegetal 2%; g) sacarose 2% e h) água.

Cada formulação foi pulverizada em 10 frutos de cacau, cultivar SIAL 70, aparentemente saudáveis, livres de ferimentos visíveis ou outros defeitos, com aproximadamente quatro meses de idade, com auxílio de pulverizador manual até antes do ponto de escorrimento. Os frutos pulverizados foram identificados com fitas coloridas e cobertos com sacos de polietileno transparentes, umedecidos e amarrados com um arame ao redor do pedúnculo (câmara úmida), 24 horas antes e após a inoculação.

Após sete dias da aplicação desses tratamentos, os mesmos frutos foram inoculados com uma suspensão de  $2,0 \times 10^5$  zoósporos. $\text{ml}^{-1}$  de *P. palmivora*. Antes e após a inoculação, os frutos também foram submetidos à câmara úmida, conforme procedimento descrito anteriormente. A suspensão de zoósporos de *P. palmivora* foi preparada a partir do cultivo em placas de Petri contendo meio de T3 (decoção de 20 g de cenoura; 45 g de extrato de tomate; 3 g de carbonato de cálcio e 15 g de agar para 1 litro de água destilada), mantido a 25 °C, por 10 dias, no escuro, e por três dias, sob luz contínua (lâmpada fluorescente 20 watts a 30 cm acima das placas). Após o período de incubação, foram adicionados 10 ml de água destilada esterilizada e gelada a cada placa de Petri que foram mantidas em refrigerador, a 5 °C, por 15 minutos. Em seguida, as placas permaneceram, por 30 minutos, a 25 °C, e as culturas foram examinadas quanto à liberação de zoósporos, sob microscópio óptico, na objetiva de 10 x. Constatada a liberação de zoósporos, os mesmos foram coletados e a concentração ajustada com auxílio de uma câmara de Neubauer. Nesse experimento foram aplicados os controles: positivo (frutos inoculados somente com o patógeno) e negativo (frutos pulverizados somente com água).

A avaliação foi realizada após oito dias da inoculação do patógeno, conforme a escala de nota: 1 – fruto livre de sintomas; 2 – lesões localizadas de aproximadamente 2 mm de

diâmetro ou 5 mm em estrias; 3 - lesões em expansão medindo de 0,2 mm a 2 cm de diâmetro; 4 - lesões com diâmetro próximo a 25 % da área inoculada, envolvendo outras lesões menores; 5 - lesões expandidas e coalescidas acima de 25 % da área inoculada.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado considerando cada fruto uma repetição. Para a análise de variância os dados do controle negativo (frutos pulverizados com água) foram excluídos e as demais notas de severidade foram transformadas em raiz quadrada. A comparação das médias foi feita utilizando o teste da diferença mínima significativa (DMS) a 5 % de probabilidade.

#### **Eficiência de diferentes concentrações do isolado de *Trichoderma viride* na supressão da podridão-parda dos frutos de cacaueteiro**

Realizou-se uma pulverização dos frutos de cacaueteiro com o isolado de *T. viride* nas concentrações de:  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $5,0 \times 10^7$  conídios.ml<sup>-1</sup>. A produção dos propágulos de *T. viride* e de patógeno, bem como as inoculações e avaliação do experimento foram semelhantes às citadas anteriormente. Para cada concentração foram utilizados 10 frutos e o ensaio foi repetido após um mês. O delineamento foi o inteiramente casualizado e considerou-se cada concentração um tratamento e cada fruto uma repetição. Para a análise da variância os dados do controle negativo foram excluídos e as demais notas de severidade foram transformadas em raiz quadrada. A comparação das médias foi feita utilizando o teste DMS a 5 % de probabilidade.

#### **Produção de inóculo do isolado de *Trichoderma viride* em arroz**

Prepararam-se em sacos de 2 kg de polietileno: 1) 100 g de arroz com 30% de água destilada + 0,45% de carbonato de cálcio pH = 6,0; 2) 100 g de arroz com 30% de água destilada + 0,6% de uréia; 3) 100 g de arroz com 30% de água destilada + 0,225% de carbonato de cálcio pH 6,0 + 0,3% de uréia; 4) 100 g de arroz com 30% de água destilada, como controle. O material foi esterilizado duas vezes, em dias alternados, por 30 minutos, a 121 °C. Cada formulação foi infestada com: a) 10 discos de 5 mm de micélio de *T. viride* +

conídio do fungo cultivado em BDA a 25 °C, por 7 dias; b) 5 ml de uma suspensão de  $4,5 \times 10^7$  conídios.ml<sup>-1</sup> e c) 5 g de arroz colonizado com isolado *T. viride* apresentando uma concentração de  $5 \times 10^7$  conídios.g<sup>-1</sup>. Os sacos foram fechados com um arame e mantidos a 25 °C, por seis dias, no escuro. No segundo dia, os sacos foram abertos a fim de melhorar a oxigenação. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado constituído de 12 tratamentos, com três repetições cada. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para controle de qualidade, transferiu-se 1 g de arroz colonizado com o fungo, para tubo de Falcon. Em seguida, adicionaram-se 10 ml de água destilada, uma gota de Tween 80 e homogeneizou por um minuto, em Vortex. A concentração de conídios foi determinada com auxílio de uma câmara de Neubauer. Da suspensão preparada, uma alíquota de 100 µl foi semeada em placas de Petri contendo meio de BDA, visando avaliar a germinação do inóculo. Após 16 horas do semeio, com auxílio de um microscópio óptico na objetiva de 40 x, determinou-se o total de conídios, germinados e não germinados, em 100 conídios de cada amostra.

### **Estudo da compatibilidade do isolado de *Trichoderma viride* com fungicidas**

Nesse experimento foram avaliados os efeitos dos fungicidas hidróxido de cobre e fosetil Al na germinação conidial do isolado *T. viride*. Para tanto, suspensões de  $10^6$  conídios.ml<sup>-1</sup> de *T. viride* foram preparadas em soluções de fungicida hidróxido de cobre (1,5 % do princípio ativo) e fosetil Al (0,4 % de princípio ativo) e em água destilada estéril, como controle. Em seguida, alíquotas de 100 µl das misturas foram semeadas, nos tempos de 0, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos, em placas de Petri contendo meio de BDA, mantidas a 25 °C. Para cada tempo de incubação foram feitas três réplicas. Dezesesseis horas após a distribuição das suspensões nas placas, realizaram-se contagens de 200 conídios, com auxílio de um microscópio óptico na objetiva de 40 x, contabilizando conídios germinados e não

germinados. O delineamento utilizado nesse experimento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 6, sendo o fator **A** representado por fungicidas e controle e o fator **B** representado por seis intervalos de tempo, com três repetições por tratamento. Para análise de variância os dados referentes a porcentagem de germinação foram transformados para raiz quadrada e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

#### **Avaliação do efeito residual do isolado de *Trichoderma viride* nos frutos**

Uma suspensão de  $5 \times 10^7$  conídios.ml<sup>-1</sup> do isolado de *T. viride* foi formulada com 2 % de óleo vegetal e 2 % de sacarose e inoculada em 150 frutos seguindo a metodologia descrita no ensaio anterior. Posteriormente, uma suspensão de  $2,0 \times 10^5$  zoósporos.ml<sup>-1</sup> de *P. palmivora* foi inoculada, nos intervalos de 1, 5, 10, 20, 30 e 40 dias, após a aplicação de *T. viride*, em 20 frutos para cada intervalo. Como controle foram utilizados: frutos inoculados somente com o patógeno (controle positivo) e frutos pulverizados somente com água (controle negativo). As inoculações e avaliação da severidade da doença seguiram os procedimentos descritos nos ensaios anteriores.

Também foram quantificados esporos viáveis, aderidos à superfície dos frutos. A cada intervalo de 1, 5, 10, 20, 30 e 40 dias, três frutos foram colhidos e levados para o laboratório, onde 10 discos da casca de 2,5 cm de diâmetro foram retirados, com auxílio de um vazador de cortiça, de cada fruto e colocados em um béquer contendo 25 ml de água destilada e esterilizada e duas gotas de Tween 20. A partir desta suspensão, foram feitas diluições seriadas até 10<sup>-7</sup>. De cada diluição, 100 µl foram transferidos para placa de Petri contendo meio de BDA acrescido de 25 µg.ml<sup>-1</sup> de cloranfenicol e espalhados sobre o meio com auxílio de uma alça de Drigalski. Para cada diluição foram feitas três repetições. Posteriormente, as placas foram mantidas em incubadora a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. Como parâmetros de comparação, também foram avaliados três frutos colhidos antes e três frutos colhidos

imediatamente após a aplicação de *T. viride*. A contagem do número de colônias foi feita após 98 horas da distribuição das suspensões nas placas de Petri com BDA.

## RESULTADOS

### Eficiência do isolado de *Trichoderma viride* formulado com sacarose e óleo vegetal

A suspensão de *T. viride* sozinho ou acrescido de óleo vegetal, sacarose ou óleo vegetal + sacarose promoveu redução da severidade da doença. Porém não se observou diferença entre esses tratamentos pelo teste de média DMS a 5 % de probabilidade (Tabela 1).

Tratamentos	Índice de severidade <sup>1/2/3</sup>
Controle (+)	4,2a
Óleo + sacarose	4,1a
Óleo	4,0a
Sacarose	3,8a
<i>T. viride</i> + sacarose	2,6b
<i>T. viride</i>	2,3b
<i>T. viride</i> + óleo + sacarose	2,2b
<i>T. viride</i> + óleo	2,1b
CV (%) = 23,2	

Tabela 1 – Severidade da podridão-parda do fruto de cacauero inoculado artificialmente com *Trichoderma viride* formulado com sacarose e óleo vegetal e inoculado com *Phytophthora palmivora*.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste DMS a 5 % de probabilidade.

<sup>1</sup>Média da severidade de 10 frutos.

<sup>2</sup>Dados originais, transformados para fins de análise estatística em raiz quadrada.

<sup>3</sup>Escala de severidade de podridão-parda em frutos: 1 – fruto livre de sintomas; 2 – lesões com aproximadamente 2 mm de diâmetro ou 5 mm em estrias; 3 - lesões medindo de 0,2 mm a 2 cm de diâmetro; 4 – lesões com diâmetro próximo a 25 % da área inoculada, envolvendo outras lesões menores; 5 – lesões acima de 25 % da área inoculada.

### Eficiência de diferentes concentrações de *Trichoderma viride* na supressão da podridão-parda dos frutos de cacauero

Os resultados dos dois experimentos foram semelhantes indicando que concentrações abaixo de  $10^7$  conídios.ml<sup>-1</sup> são menos eficientes e acima dessa concentração foram praticamente iguais e não diferiram estatisticamente pelo teste de média DMS a 5 % de probabilidade dos tratamentos  $10^6$  conídios.ml<sup>-1</sup> e  $5 \times 10^7$  conídios.ml<sup>-1</sup> (Gráfico 1).

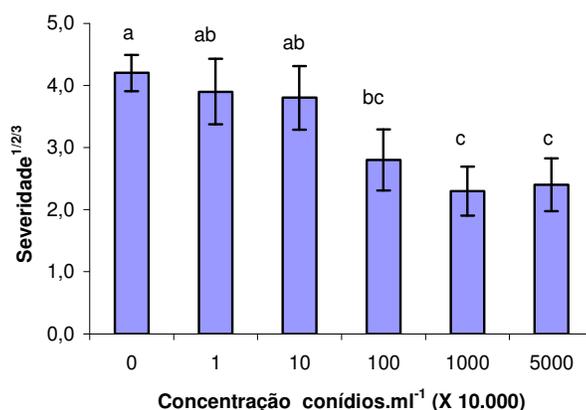


Gráfico 1 – Índice de severidade da doença nos frutos de cacauero, inoculados com *Phytophthora palmivora* e com diferentes concentrações de conídios de *Trichoderma viride*. CV (%) = 24,8  
Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste DMS a 5 % de probabilidade. As barras são referentes ao erro padrão.

<sup>1</sup>Média do índice de severidade da doença de 10 frutos.

<sup>2</sup>Dados originais, transformados para fins de análise estatística em raiz quadrada.

<sup>3</sup>Escala de severidade de podridão-parda em frutos: 1 – fruto livre de sintomas; 2 – lesões com aproximadamente 2 mm de diâmetro ou 5 mm em estrias; 3 - lesões que medem de 0,2 mm a 2 cm de diâmetro; 4 – lesões com diâmetro próximo a 25% da área inoculada, envolvendo outras lesões menores; 5 – lesões acima de 25 % da área inoculada.

### Produção de inóculo de *Trichoderma viride* em grãos de arroz

Nos tratamentos enriquecidos com CaCO<sub>3</sub>, uréia e CaCO<sub>3</sub> + uréia obteve-se maior produção de conídios em relação ao controle, exceto quando se utilizou arroz infestado, como inóculo inicial (Tabela 2). O tratamento enriquecido com CaCO<sub>3</sub> e tendo como inóculo inicial disco de micélio e o tratamento arroz + CaCO<sub>3</sub> + uréia infestado com suspensão de esporos foram o que obtiveram as melhores produções de conídios e não diferiram pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade (Tabela 2).

A viabilidade dos conídios do isolado de *T. viride*, em todos os tratamentos, foi superior a 96 % de germinação e, não houve diferença significativa entre os tratamentos, com base no teste F, a 5 % de probabilidade.

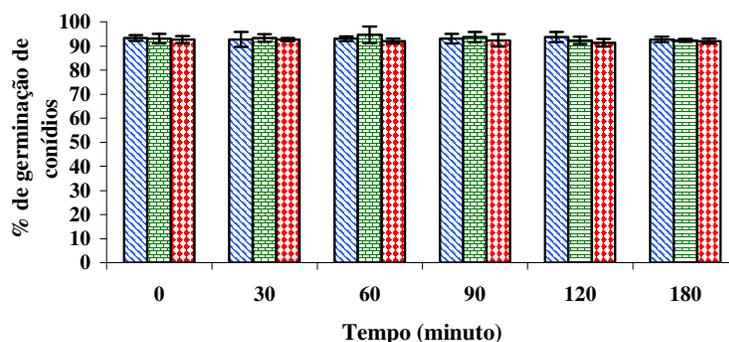
Enriquecimento nutricional ao arroz	Inóculo inicial	Concentração de conídios (x 10 <sup>7</sup> x g <sup>-1</sup> de arroz)
CaCO <sub>3</sub>	Disco de micélio	10,17 a
CaCO <sub>3</sub> + uréia	Suspensão de esporos	9,77 a
Uréia	Disco de micélio	8,60 b
CaCO <sub>3</sub> + uréia	Disco de micélio	8,50 b
Controle	Disco de micélio	7,20 c
Uréia	Suspensão de esporos	6,50 c
CaCO <sub>3</sub>	Suspensão de esporos	5,53 d
Controle	Suspensão de esporos	4,30 e
CaCO <sub>3</sub>	Arroz infestado	4,10 e
Controle	Arroz infestado	1,97 f
CaCO <sub>3</sub> + uréia	Arroz infestado	1,70 f
Uréia	Arroz infestado	1,53 f
CV (%) = 8,8 %		

Tabela 2 – Produção de conídios do isolado de *Trichoderma viride* em arroz com diferentes enriquecimentos nutricionais.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

### Compatibilidade do isolado de *Trichoderma viride* com fungicidas

Os fungicidas hidróxido de cobre e fosetil Al, na concentração testada e no tempo de incubação, não interferiram na germinação dos conídios de *T. viride*. A germinação dos conídios foi mais sensível ao hidróxido de cobre (Gráfico 2), porém, não houve diferença significativa com o controle, pelo teste F a 5 % de probabilidade.



■ T. viride ■ T. viride + fosetil-Al ■ T. viride + hidróxido de cobre

Gráfico 2 – Porcentagem de germinação de conídios de *Trichoderma viride* em soluções de fungicidas hidróxido de cobre (1,5 % p.a.) e fosetil-Al (0,4 % p.a.) em diferentes tempos. As barras são referentes ao erro padrão.

### Efeito residual do isolado de *Trichoderma viride* no controle da podridão-parda do fruto do cacauero

A redução da severidade da podridão-parda do fruto de cacauero foi mais efetiva nos primeiros 10 dias da inoculação do *T. viride*. Esse período corresponde a uma maior quantidade de esporos de *T. viride* na superfície do fruto conforme Gráfico 3.

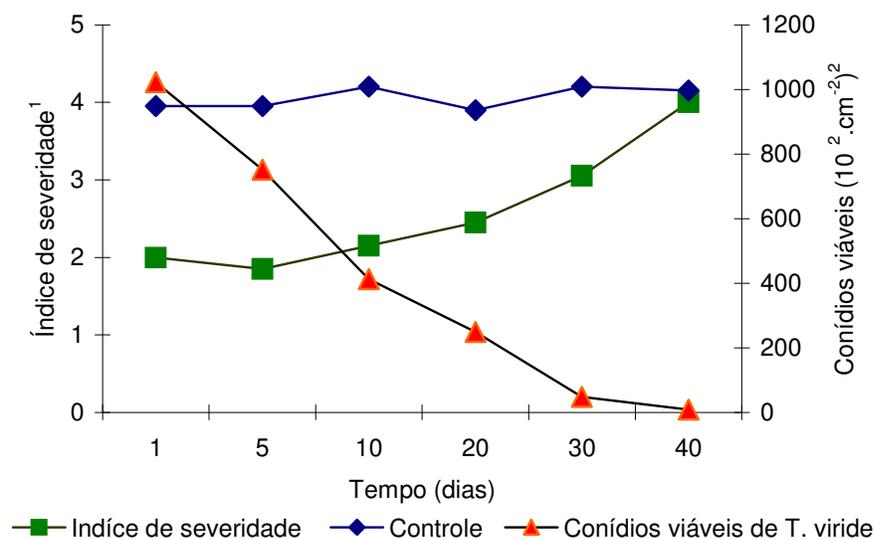


Gráfico 3 - Severidade média da podridão-parda do cacauero de 10 frutos inoculados com *Trichoderma viride* e posteriormente com *Phytophthora palmivora* e conídios viáveis de *Trichoderma viride* na superfície do fruto de cacauero após inoculação artificial.

<sup>1</sup>Escala de severidade de podridão-parda em frutos: 1 – fruto livre de sintomas; 2 – lesões com aproximadamente 2 mm de diâmetro ou 5 mm em estrias; 3 - lesões que medem de 0,2 mm a 2 cm de diâmetro; 4 – lesões com diâmetro próximo a 25% da área inoculada, envolvendo outras lesões menores; 5 – lesões acima de 25 % da área inoculada. <sup>2</sup>Conídios viáveis de *Trichoderma viride* referente a média de três frutos. Controle – frutos inoculados somente com *Phytophthora palmivora*.

## DISCUSSÃO

*Trichoderma viride*, quando formulado em óleo vegetal, apresentou melhor controle da doença. Porém, novos estudos de formulação são necessários para otimizar a efetividade do antagonista no controle, uma vez que não houve diferença significativa, pelo teste DMS a 5 % de probabilidade, com o *T. viride* formulado somente com água (Tabela 1). Além disso, é importante dar ênfase ao desenvolvimento de uma formulação capaz de manter o antagonista mais tempo viável na superfície do fruto sob várias condições ambientais, principalmente durante o período chuvoso. Esse pré-requisito é de suma importância para o sucesso do antagonista em condições de campo. Segundo Harman (1991), a formulação é um passo importante porque permite que o antagonista seja capaz de sobreviver em condições ambientais adversas, superar as pressões do patógeno, a micoflora da superfície do hospedeiro e não ser afetado por falta de nutrientes. Isso significa que o uso de uma formulação adequada pode aumentar o período de sobrevivência do antagonista e, conseqüentemente, diminuir o número de aplicações.

Quando *T. viride* foi aplicado em diferentes concentrações, a severidade da doença foi menor quando foram utilizadas concentrações entre  $10^7$  e  $5 \times 10^7$  conídios.ml<sup>-1</sup>, porém os resultados desses tratamentos não diferiram estatisticamente do tratamento que foi inoculado com concentração de  $10^6$  conídios.ml<sup>-1</sup> (Gráfico 1). Observou-se que há necessidade de alta concentração do agente de biocontrole para reduzir a doença, geralmente, acima de  $10^6$  esporos.ml<sup>-1</sup>. Barràs & Aguilar (1990) observaram que suspensões entre  $2,5 \times 10^6$  e  $2,5 \times 10^9$  conídios.ml<sup>-1</sup> de *T. viride* controlava *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc., agente causal do bolor verde pós-colheita de citrus. Esse tipo experimento é de grande valia, visto que permite a definição da dose adequada do antagonista para se obter um controle mais eficaz da doença com maior economia do inóculo.

A necessidade de altas concentrações do antagonista pode ser explicada por uma maior chance do fungo se estabelecer no substrato, enquanto que baixas concentrações diminuem a eficiência de colonização e, conseqüentemente, criam oportunidades para o desenvolvimento de outros microrganismos. Essa situação foi constatada por Morandi (1997) quando utilizou concentrações mais altas de *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers *et al.*, antagonista de *Botrytis cinerea* Persoon ex. Pers., agente causal do mofo cinzento de roseira, obteve maior efeito inibitório de contaminantes do que nas concentrações mais baixas. Por outro lado, a introdução massal do antagonista pode representar a eliminação de populações de outros organismos acarretando o desequilíbrio microbiano no filoplano. Portanto, na batalha entre antagonista e patógeno, a quantidade de inóculo pode fazer diferença no resultado final. Infelizmente não existe uma formulação e uma concentração padrão que seja eficiente para todos os agentes de controle biológico e é importante ter em mente, conforme Melo (1996), que o uso prático de agentes de biocontrole requer métodos de aplicação e doses adequadas com produtos formulados.

O processo de produção massal de *T. viride* desenvolvido nesse trabalho mostrou que quantidades industriais podem ser atingidas sem o uso de técnicas especiais. Além disso, a colonização natural do fungo em arroz, facilitou a distribuição, a aplicação e o armazenamento. Esse processo de produção, em larga escala, e as características do produto podem facilitar a comercialização do agente biológico (Moraes *et al.*, 1991). É importante salientar que, além da colonização em arroz, o *Trichoderma* tem sido formulado em outros substratos como semente de sorgo (Valderbenito-Sanhueza, 1991) e grãos de milho (Bettiol, 2004).

O baixo custo de produção é um dos requerimentos para uma boa aceitabilidade do produto pelos agricultores (Jacobsen & Backman, 1993). Apesar de não ter sido realizado nenhum estudo econômico do custo de produção massal de inóculo desse fungo, a tecnologia

desenvolvida nesse trabalho não requer muito recurso financeiro. Além disso, a produção massal do *T. viride* foi baseada no processo de produção do Tricovab, produto desenvolvido e comercializado pela CEPLAC desde 1999, utilizado para controlar a vassoura-de-bruxa do cacaueteiro (Costa & Bastos, 2001). Portanto, *T. viride* cultivado em arroz apresenta boa chance de sucesso na cacauicultura pois, não é dispendioso, pode ser produzido em grande quantidade, mantém boa viabilidade, sem estocagem especial, e é de fácil distribuição e aplicabilidade.

Tanto o fungicida à base de cobre como o sistêmico, avaliados nesse trabalho, são empregados no controle de *Phytophthora* (Davis, 1982; Wood & Lass, 1985). Os fungicidas não interferiram na germinação dos conídios do isolado selecionado de *T. viride*, promissor na redução da severidade da podridão-parda dos frutos. A combinação de agentes de biocontrole com produtos químicos pode melhorar o nível de controle (Melo, 1998), além de diminuir a pressão de seleção de fitopatógenos resistentes aos fungicidas. Com essas prerrogativas, a chance de sucesso do isolado *T. viride* como agente de biocontrole aumenta, por se mostrar compatível com fungicidas e poder ser aplicado em conjunto com esses produtos e, ou ser recomendado no manejo integrado de doença.

A severidade da doença e a quantidade de esporos viáveis sobre os frutos foram inversamente proporcionais, ou seja, a severidade da doença manteve-se baixa enquanto a quantidade de esporos viáveis do *T. viride* manteve-se alta. A partir do momento que a quantidade de esporos viáveis foi diminuindo, a severidade da doença começou a aumentar evidenciando uma diminuição na eficiência do controle. Segundo Elad (1990), a efetividade do biocontrole envolve também a capacidade que o agente possui em colonizar e proliferar na planta por um bom tempo após a aplicação, principalmente nas partes novas, geralmente áreas mais predispostas à infecção. Por outro lado, o curto período de sobrevivência do *T. viride* na superfície do fruto não diminui a sua potencialidade como agente biocontrolador, uma vez

que o antagonista foi isolado como endofítico e uma das grandes virtudes dos organismos endofíticos é conviver com o hospedeiro mutualisticamente, uma vez que já estão adaptados ao ambiente da planta.

Os esforços desse trabalho culminaram na otimização da utilização do *T. viride* como um agente de biocontrole da podridão-parda dos frutos do cacauzeiro. Foi observado que *T. viride* possui características desejáveis para o desenvolvimento de um biofungicida. No controle, porém, a grande vantagem desse isolado pode estar na possibilidade do seu uso em conjunto com fungicidas. Contudo, vários estudos ainda precisam ser implementados para elucidar os mecanismos de ação envolvidos nessa interação, para ampliar os conhecimentos a respeito do antagonista e melhorar a sua eficiência por meio de técnicas biotecnológicas.

### **Capítulo 3 - Comprovação da condição endofítica dos fungos promissores como agentes biocontroladores da podridão-parda dos frutos de cacauero (*Theobroma cacao*)**

#### **INTRODUÇÃO**

Anualmente cerca de 30 % da produção de cacau é perdida devido os efeitos das pragas e doenças, em todo o mundo. Recentemente a eficiência de fungos como agente de biocontrole de doenças de cacau tem sido reconhecida (Krauss & Hebbbar, 1999). Em particular, uma nova estratégia de controle biológico usando fungos endofíticos tem-se mostrado muito promissora (Mejía *et al.*, 2003; Hanada *et al.* 2004). Os fungos endofíticos são aqueles que têm a capacidade de colonizar o tecido interno sem prejudicar o hospedeiro (Wilson, 1995). Esses microrganismos podem ser detectados por observações microscópicas em tecidos de plantas ocupando espaços intercelulares ou no interior de tecido vascular. O interesse em esclarecer melhor a interação entre hospedeiro e fungos edofíticos tem aumentado e estudos nesse sentido foram realizados nessas últimas décadas.

O principal mecanismo de controle biológico de doença, na maioria dos estudos já realizados envolvendo fungos ou bactérias endofíticas, tem sido a indução de resistência sistêmica. Nesse tipo de mecanismo é importante que ocorra a penetração ativa do microrganismo endofítico e este induza o hospedeiro a sintetizar compostos que atuem sobre os patógenos ou compostos que alterem a morfologia e, ou, a fisiologia vegetal (Azevedo *et al.* 2002; Faeth, 2002).

Os endófitos também podem atuar diretamente sobre patógenos, parasitando suas células e impedindo o surgimento dos sintomas da doença. Nesse mecanismo estão envolvidas, geralmente, as enzimas líticas como a quitinase, as glucanases e a celulase que

degradam a parede celular, matando o patógeno. Geralmente a relação micoparasítica é caracterizada por um longo período de contato físico ou metabólico (Melo, 1996). A produção de composto com ação antibiótica contra o patógeno-alvo é outra forma de atuação dos endófitos sobre o patógeno (Azevedo *et al.*, 2002).

Qualquer que seja o mecanismo envolvido no controle biológico é fundamental que o antagonista consiga sobreviver por um período razoável na planta. Para que sua permanência seja prolongada, há necessidade de vários fatores como condições ambientais favoráveis, nível de nutrientes, biologia da planta e do antagonista (Elad, 1992). Apesar do efetivo biocontrole envolver a habilidade de sobrevivência do antagonista, pouco estudos têm sido direcionados para selecionar agentes de biocontrole que sobrevivam bem no habitat onde foi aplicado ou sob condições ambientais capazes de aumentar a sobrevivência e a atividade deles (Elad, 1990). É óbvio que o agente de biocontrole mais bem adaptado ao ambiente da planta e que possuir maior capacidade competitiva com outros microrganismos tem maior chance de sucesso no biocontrole. Portanto, a utilização prática de um agente de biocontrole de planta exige muitos estudos os quais poderão indicar a melhor estratégia a ser aplicada e, conseqüentemente, dar maior confiabilidade e efetividade no controle. Este, no entanto, é um dos aspectos menos entendido do biocontrole.

Recentemente, Hanada *et al.* (2004) realizaram um levantamento de fungos endofíticos de cacauzeiro e cupuaçuzeiro, visando o controle de *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler, agente causal da podridão-parda do fruto do cacauzeiro, considerada a doença mais importante dessa espécie no mundo. A seleção foi efetuada em condições de campo onde os autores selecionaram oito fungos com potencial para serem utilizados como agente de biocontrole da doença. O isolado ALF 247, identificado como *Trichoderma viride* Pers. ex. S.F. Gray foi o mais eficiente. Dentro desse contexto, visando elucidar alguns aspectos relacionados à interação entre os fungos endofíticos e hospedeiro, o trabalho teve como

objetivo comprovar a condição endofítica de oito isolados pré-selecionados, em plantas axênicas e estudar o comportamento endofítico e epifítico de *T. viride*, avaliando o seu período de sobrevivência, em diferentes órgãos de cacauzeiros adultos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Fitopatologia e na área experimental do Centro de Pesquisas Almirante Cacau, localizado em Itajuípe, BA.

Os fungos endofíticos utilizados neste experimento foram isolados do interior dos ramos e caules de cacauzeiros dos estados do Amazonas e Bahia e cupuaçuzeiro do estado do Amazonas (Tabela 1).

Fungos	Isolados	Hospedeiro	Local de coleta	Órgão de isolamento
<i>Trichoderma viride</i>	ALF 247	Cacauzeiro	Inema - BA	Caule
<i>Pestalotiopsis maculans</i>	ALF 821	Cacauzeiro	Benjamim Constant - AM	Caule
<i>Curvularia</i> sp.	ALF 829	Cacauzeiro	B. Constant - AM	Caule
<i>Fusarium</i> sp.	ALF 839	Cacauzeiro	B. Constant - AM	Caule
<i>Fusarium</i> sp.	ALF 849	Cacauzeiro	B. Constant - AM	Caule
<i>Tolypocladium</i> sp.	ALF 902	Cacauzeiro	B. Constant - AM	Caule
<i>Fusarium</i> sp.	ALF 1587	Cacauzeiro	Itacoatiara- AM	Ramo
<i>P. maculans</i>	ALF 1586	Cupuaçuzeiro	Presidente Figueiredo - AM	Ramo

Tabela 1 – Local de origem, hospedeiro e órgão de isolamento de fungos endofíticos promissores no controle da podridão-parda dos frutos de cacauzeiro.

### Preparo das plantas axênicas

As mudas de, cacauzeiro foram preparadas em tubos de ensaio (2 x 19 cm), contendo casca de arroz carbonizado, preenchido até 80% do recipiente e 35 ml de água destilada. Os tubos contendo substrato foram esterilizados duas vezes em autoclave, em dias consecutivos, por 30 minutos, a 121 °C.

As sementes utilizadas foram do cacau, cultivar Sial 70, retiradas de frutos colhidos na área experimental da Almirante Cacau. Os frutos foram lavados com detergentes e água corrente com auxílio de uma esponja e, em câmara de fluxo laminar, foram desinfestados com

álcool 70%. Posteriormente, os mesmos foram abertos com auxílio de uma faca flambada e as sementes extraídas. A mucilagem foi removida com auxílio de um estilete e as sementes tratadas com solução de hipoclorito a 2 %, por 10 minutos, e lavadas com água destilada estéril, por três vezes.

Durante o semeio tomou-se à precaução de colocar as sementes com a extremidade que contém o embrião, a parte mais fina da semente, em contato com o substrato. Os tubos foram fechados e mantidos em uma sala de crescimento a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### **Procedimento empregada para inoculação dos fungos endofíticos**

A inoculação das plantas axênicas foi feita quatro dias após o semeio. Suspensões de conídios, dos oito fungos selecionados, foram preparadas a partir do cultivo em placas de Petri, contendo meio de BDA (decoção de 40 g de batata, 20 g de dextrose, 20 g de agar, para 1000 ml de água destilada) e incubados a  $25^{\circ}\text{C}$ , sob fotoperíodo de 12 horas, por 10 dias. Uma alíquota de 100  $\mu\text{l}$  da suspensão na concentração de  $10^7$  conídios. $\text{ml}^{-1}$  foi inoculada na radícula, com auxílio de uma pipeta automática. O tratamento controle recebeu 100  $\mu\text{l}$  de água destilada esterilizada. O delineamento foi inteiramente casualizado, com 12 repetições por tratamento.

### **Avaliação do efeito e reisolamento do fungo endofítico**

Aos 40 dias da inoculação, as mudas foram submetidas à avaliação biométrica (altura, diâmetro do caule e número de folhas) e, posteriormente, foi feito o reisolamento dos fungos endofíticos.

Com auxílio de uma régua milimetrada foram tomadas duas medidas em relação à altura. A primeira mediu a altura do colo da planta até os cotilédones e a outra a altura total da planta. Foram realizadas duas medidas para o diâmetro do caule, sendo a primeira, um centímetro abaixo dos cotilédones e a outra um centímetro acima, com auxílio de um

paquímetro. Também foi anotado o número de folhas considerando somente as maiores que 2 cm de comprimento.

Em seguida, procedeu-se ao reisolamento dos fungos endofíticos da raiz, caule (na altura mediana da planta e no ápice) e folha. De cada órgão foram retirados quatro fragmentos de aproximadamente 0,5 cm, sendo que as amostras de folhas e raízes foram retiradas de plantas diferentes. Posteriormente, os fragmentos foram desinfestados com álcool 70%, por um minuto, hipoclorito de sódio a 2,5 % por três minutos, álcool 70% por 30 segundos e lavados em água destilada esterilizada por duas vezes. As amostras, então, foram transferidas, para pontos equidistantes, em placas de Petri contendo meio de BDA e mantidas em incubadoras a 25 °C, por 30 dias, sob fotoperíodo de 12 horas. Diariamente, foi realizado monitoramento dos fragmentos visando observar estruturas fúngicas emergindo do material vegetal. Foi feita a quantificação do número de recuperação por planta. Dessa forma, considerou-se que houve colonização interna na muda quando um dos fragmentos desenvolveu o fungo endofítico inoculado.

### **Sobrevivência e recuperação de *Trichoderma viride* em cinco cacauzeiros**

Cinco cacauzeiros da cultivar, Sial 70, foram selecionados dentro de um plantio comercial da fazenda Almirante Cacau. As plantas foram pulverizadas com uma suspensão de  $10^7$  conídios.ml<sup>-1</sup> de *T. viride*, com auxílio de um pulverizador manual. Cada planta recebeu cerca de 250 ml da suspensão de inóculo.

Os isolamentos realizaram-se nos intervalos de 5, 20, 35, 55, 80 e 110 dias, após a inoculação, sendo que o primeiro isolamento realizou-se antes da pulverização, e foi considerado tempo zero. O material vegetal avaliado constituiu de casca de caule, de dois segmentos de galhos com aproximadamente 1 cm de diâmetro, de dois frutos com três a cinco meses de idade e de quatro folhas maduras, por planta. As amostras foram levadas ao laboratório de Fitopatologia, devidamente identificadas e foram lavadas com água corrente e

sabão e secas em papel absorvente, exceto os frutos. Da casca do caule, os fragmentos foram retirados da parte interna, enquanto que, dos segmentos de galhos, foram retirados do córtex. Dos frutos os isolamentos foram feitos, tanto da parte externa quanto da interna. De cada órgão retiram-se 20 fragmentos de 25 mm<sup>2</sup>, com auxílio de estilete, de tesoura de poda ou de faca, no interior de uma câmara fluxo laminar. Todas as amostras foram desinfestados com álcool 70% por um minuto, hipoclorito de sódio a 2,5% por três minutos, álcool 70% por 30 segundos e lavadas, por duas vezes, com água destilada esterilizada, por 30 segundos. Em seguida, os fragmentos foram depositados em placas de Petri contendo meio de BDA e mantidos a 25 °C sob fotoperíodo de 12 horas, por 30 dias. Diariamente foi realizado monitoramento dos fragmentos visando observar estruturas fúngicas do *T. viride* emergindo do material vegetal.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, considerando-se cada árvore, uma repetição. A avaliação foi feita em percentagem de *T. viride* recuperado das plantas, nos diferentes órgãos estudados. Também se avaliou o número de fragmentos colonizados pelo *T. viride*, dividido pelo número total de fragmentos depositados no meio, proveniente de cada órgão, para cada tempo.

## **RESULTADOS**

Não houve diferença significativa pelo teste F a 5 % de probabilidade, nos resultados da biometria das plantas axênicas inoculadas com fungos endofíticos e as não inoculadas (Tabela 2).

Isolados*	Médias**				
	Altura 1 (cm)	Altura 2 (cm)	Diâm 1 (mm)	Diâm 2 (mm)	Número de folhas
ALF 247	17,27	26,37	3,492	2,708	5,92
ALF 821	15,97	25,53	3,408	2,758	5,33
ALF 829	15,15	25,33	3,333	2,625	5,27
ALF 839	16,87	25,29	3,375	2,525	6
ALF 849	16,38	25,19	3,475	2,692	5,83
ALF 902	16,21	26,55	3,408	2,775	5,5
ALF 1586	15,07	23,65	3,455	2,583	5,92
ALF1587	14,71	22,99	3,392	2,525	5,25
Controle	16,31	26,31	3,35	2,617	5,42
	F (P > 0,05)	F (P > 0,05)	F (P > 0,05)	F (P > 0,05)	F (P > 0,05)
	CV = 18,9%	CV = 13,4%	CV = 7,6 %	CV = 10,8%	CV = 22,8%

Tabela 2 – Avaliação biométrica de mudas de cacaueteiro cultivadas axenicamente e inoculadas com fungos endofíticos.

\*247 – *Trichoderma viride*, 1587 - *Fusarium* sp1, 902 – *Tolyocladium* sp. 839 – *Fusarium* sp2, 849 – *Fusarium* sp3, 829 - *Curvularia* sp., 821 – *Pestalotiopsis maculans*, 1586 - *Pestalotiopsis maculans*. \*\*Altura 1 – altura entre o colo da planta e os cotilédones; altura 2 – altura total da planta; diâm 1 e diâm 2 – diâmetro do caule a um centímetro abaixo e superior dos cotilédones, respectivamente; número de folhas – folhas com comprimento superior a 2 cm.

Exceto o isolado ALF 902, que não foi recuperado em nenhum dos órgãos analisados, todos os demais fungos endofíticos inoculados foram recuperados em, pelo menos, um dos órgãos da planta analisado, conforme os resultados apresentados no Gráfico 1. As mudas que serviram de controle também estavam livres de fungos endofíticos. A maior recuperação ocorreu na raiz e no caule, respectivamente, onde sete fungos foram reisolados. A recuperação na folha ocorreu em duas plantas inoculadas com ALF 247 e no ápice, em duas plantas inoculadas com ALF 1587.

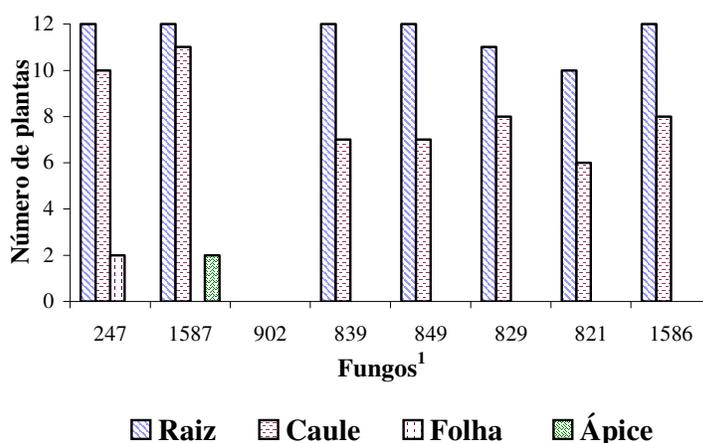


Gráfico 1. Recuperação de fungos endofíticos nos respectivos órgãos de plantas axênicas de cacauero. <sup>1</sup>Fungos: 247 – *Trichoderma viride*, 1587 - *Fusarium* sp1, 902 – *Tolypocladium* sp. 839 – *Fusarium* sp2, 849 – *Fusarium* sp3, 829 - *Curvularia* sp., 821 – *Pestalotiopsis maculans*, 1586 - *Pestalotiopsis maculans*.

O máximo da recuperação do *T. viride* em cacauero adulto ocorreu entre o 35<sup>o</sup> e 55<sup>o</sup> dia após a aplicação, para a maioria dos órgãos. Também se observou que *T. viride* apresentou melhor colonização como epifítico no fruto, tendo 100% de recuperação, na primeira avaliação, e um rápido declínio, a partir da quarta avaliação. A maior recuperação do *T. viride* como endofítico foi obtida no caule, no 35<sup>o</sup>, quando se constatou o crescimento do *T. viride* em 90 % dos fragmentos (Tabela 3), sendo que foi constatada no 35<sup>o</sup> e 55<sup>o</sup> dia a presença do fungo em todas as plantas inoculadas (Gráfico 2). Nos outros órgãos avaliados sua colonização foi limitada (Tabela 3 e Gráfico 2).

Órgão da planta	% de recuperação / tempo (dias)						
	0	5	20	35	55	80	110
Caule	0	35	55	90	79	20	10
Ramo	0	5	3	15	24	5	0
Folha	0	0	5	3	1	0	0
Fruto (Ext.)	0	100	88	90	68	4	0
Fruto (Int.)	0	0	5	5	10	0	0

Tabela 3 – Porcentagem dos fragmentos de tecido de diferentes órgãos de cacauero colonizados por *Trichoderma viride* em diferentes períodos de tempo.

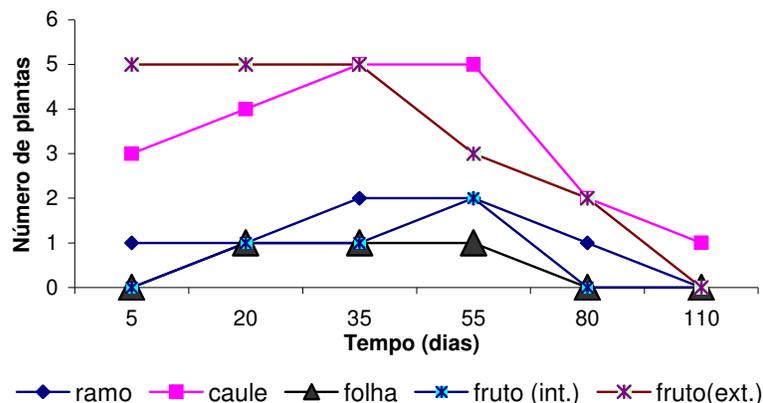


Gráfico 2 – Recuperação de *Trichoderma viride*, inoculado artificialmente, em diferentes órgãos de plantas de cacau (*Theobroma cacao*) em função do tempo.

## DISCUSSÃO

Fungos endofíticos podem conferir vários benefícios às plantas, entre elas à promoção de crescimento (Varma *et al.* 1999), fenômeno que não foi observado nesse trabalho. Os oito isolados endofíticos submetidos à comprovação da condição endofítica não promoveram e nem retardaram o crescimento das mudas de cacau, em relação ao controle (Tabela 2). Também não ocorreu nenhum sintoma de doença ou qualquer outra alteração que comprometesse o desenvolvimento normal das mudas. Aparentemente, os fungos endofíticos testados podem viver no interior da planta mutualisticamente. Alguns estudos têm mostrado que os fungos endofíticos têm ajudado algumas plantas a tolerar fatores abióticos e bióticos, inclusive patógenos de plantas (Mejía *et al.*, 2003). Assim, os fungos endofíticos avaliados nesse trabalho podem ser utilizados nos programas de biocontrole ou em programas de manejo integrado da podridão-parda do fruto do cacau, sem ocasionar consequências maléficas à planta.

Em todas as espécies de plantas examinadas, em que se constatou a presença de fungos endofíticos em tecidos aéreos assintomáticos, a sua transmissão se dá verticalmente, via

semente, ou horizontalmente, através de esporos de uma planta a outra (Carroll, 1988). Pelos resultados obtidos nesse trabalho, ficou evidenciado que os fungos endofíticos de *T. cacao* são transmitidos horizontalmente, pois nas mudas que serviram como controle não foi constatada a presença de fungos endofíticos. A mesma observação foi feita por Arnold *et al.* (2003), em um experimento semelhante. Os autores verificaram que em mudas de cacaueteiro, crescendo em condições controladas, a infestação de fungos endofíticos foi menor que 1 %. Além disso, verificaram também que em folhas novas não havia presença de fungos endofíticos mas, que esses são ubíquos em folhas maduras, em condições não controladas, e concluíram que a transmissão de fungos endofíticos em cacaueteiro ocorre horizontalmente. A diversidade de fungos endofíticos associados a *T. cacao*, conforme os levantamentos realizados por Arnoldo *et al.* (2003); Rubini *et al.* (2005) é outra evidência que caracteriza a transmissão horizontal dos mesmos.

Tanto nas plantas axênicas como em plantas adultas ficou evidente que os fungos endofíticos têm seus sítios de preferência para colonização. Nas plantas axênicas, exceto na raiz, onde o inóculo foi depositado, o caule foi o órgão de maior recuperação dos fungos endofíticos (Gráfico 1). Coincidentemente este foi o órgão de onde foi isolada a maioria desses fungos. Resultados semelhantes também foram observados quando o isolado de *T. viride* foi inoculado em planta adulta. Os caules e os ramos foram os órgãos de onde se obtiveram as maiores recuperações do fungo, seguidos por fruto e folha (Gráfico 2). Esses resultados podem ser explicados com base nas observações feitas por Espinosa-Garcia & Longenheim (1990). Segundo os autores, as alterações fisiológicas e químicas dos diferentes órgãos podem determinar a distribuição espacial de fungos endofíticos na planta.

Em condições de campo, *T. viride*, além de endofítico se comportou como epifítico, pois conseguiu sobreviver na parte externa do fruto por um período entre 80 e 110 dias (Tabela 3 e Gráfico2), sendo que até o 35<sup>o</sup> dia a sua recuperação foi próxima de 100%, nos

fragmentos utilizados para isolamento (Tabela 3). Resultados semelhantes foram obtidos por Piper *et al.* (2000) quando aplicaram *Trichoderma* sp. nos frutos de cacaueteiro e observaram que o pico de recuperação se estabeleceu entre 30 e 35 dias. Esses autores recomendaram que o agente de biocontrole deveria ser aplicado a intervalos de três a quatro semanas para controlar a podridão-parda. Bastos (1996b) estudando a sobrevivência de *T. viride* aplicado em vassoura secas de cacaueteiro, constatou que até aos 30 dias a sua sobrevivência foi de 100% e, aos 90 dias, reduziu-se para 35%. Portanto, uma das características positivas do *Trichoderma viride* é a capacidade de sobreviver, por longo tempo na planta, sob condições ambientais adversas.

Por outro lado, a recuperação do *T. viride* na parte interna do fruto foi baixíssima. Conforme os resultados apresentados na Tabela 3, a recuperação máxima foi no 55<sup>o</sup> dia, quando 10 % dos fragmentos desenvolveram o fungo. Além disso, não se observou presença de outros fungos endofíticos. Esse resultado diverge dos relatos feitos por Mejía *et al.* (2003) quando mencionaram que fungos endofíticos são abundantes e diversificados nos frutos de *T. cacao*, em condições de campo.

A recuperação de *T. viride* em folha de cacaueteiro foi baixa, tanto em mudas axênicas como em cacaueteiro adulto (Tabela 2 e 3 e Gráfico 2). Isso pode ter ocorrido pela baixa preferência por esse sítio de colonização na planta ou pelo processo de assepsia. De acordo com Azevedo *et al.* (2002), devido a sua textura, a folha é mais sensível ao hipoclorito de sódio. Por outro lado, é importante salientar que, nessas mesmas amostras houve crescimento de *Phomopsis* sp. e *Colletotrichum* sp., em mais de 90 % dos fragmentos. A presença abundante desses dois fungos pode ter dificultado a colonização das folhas por *T. viride* devido a forte competição. Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade da assepsia ter inibido o crescimento de *T. viride* nas folhas, uma vez que não foi realizado estudo sobre a sensibilidade do fungo ao hipoclorito de sódio.

Embora o *T. viride* tenha sido isolado como endofítico, parece normal que sua população diminua, no interior da planta após a aplicação, com o passar do tempo. Além disso, as populações de outros organismos endofíticos continuam presentes, o que pode provocar uma forte competição entre si. Por outro lado, a dificuldade de recuperação nas últimas avaliações não significa que o fungo esteja ausente, mas sim em pequena quantidade, tornando praticamente impossível a sua recuperação. Portanto, é provável que a diminuição da população de *T. viride* tenha ocorrido devido a pressão populacional dos organismos endofíticos já existentes na planta até a sua estabilização.

Um bom agente biocontrole deve colonizar eficientemente a planta por maior período possível. Assim, é fundamental compreender os fatores bióticos e abióticos envolvidos no processo de sobrevivência do antagonista (Melo, 1996). Diante desse contexto, quanto maior à longevidade do *T. viride* na planta maiores serão as chances de seu sucesso como biocontrolador. Para isso, formulações adequadas poderiam estender a sua sobrevivência ou aumentar a sua população no interior e/ou exterior da planta. Fatores abióticos como disponibilidade de nutriente e condições ambientais podem estimular a ocorrência natural dos antagonistas, como também prolongar a colonização destes (Köbl & Fokkema, 1994). Apesar de muitos agentes de biocontrole potenciais já terem sido identificados e muitos mecanismos de ação já terem sido esclarecidos, Jacobsen & Backman (1993) mencionam que a falta de conhecimento sobre os requerimentos ecológicos para sobrevivência e colonização dos agentes de biocontrole de doenças de plantas têm diminuído a eficiência da sua utilização para suprimir doença. Portanto, além de entender os fatores envolvidos na interação, é necessário também oferecer condições para aumentar o período de sobrevivência, com densidade populacional alta, do *T. viride* no cacaueteiro.

Pelos resultados obtidos nesse trabalho concluiu-se que, em condições de campo, *T. viride* apresenta comportamento tanto epifítico como endofítico e que a colonização

endofítica é dependente do órgão colonizado. Esses resultados podem ajudar a definir estratégias para aumentar a eficiência do *T. viride* como controlador de podridão-parda do fruto do cacauero. Para melhorar a eficiência do controle biológico é fundamental também conhecer os mecanismos envolvidos na interação entre antagonista e patógeno. Geralmente os organismos endofíticos estão associados com indução de resistência contra fungos fitopatogênicos, através de produção de metabólitos tóxicos ou através da alteração da fisiologia e da morfologia do hospedeiro (Faeth, 2002). Nesse trabalho constatou-se que *T. viride* também tem comportamento epifítico. Assim não se pode descartar a possibilidade da atuação do *T. viride* como micoparasita. Além disso, existem inúmeros trabalhos relatando que muitas espécies de *Trichoderma* possuem habilidades de secretar metabólitos secundários tóxicos (Souza, 2004) e enzimas líticas degradadoras de parede celular de patógenos como quitinase, glucanases e celulases (Papavizas, 1985). Portanto, a elucidação dos mecanismos pode ser fundamental para se empregar métodos racionais de melhoramento genético e, principalmente, para aumentar a vantagem competitiva no ambiente, garantindo assim, maior expressão do *T. viride* e, conseqüentemente, alcançando o objetivo proposto.

## Capítulo 4 – Enzimas hidrolíticas secretadas em meios de cultura por *Trichoderma viride*, potencial agente de biocontrole da podridão-parda dos frutos de cacauero (*Theobroma cacao*)

### INTRODUÇÃO

A podridão-parda do cacauero (*Theobroma cacao* L.), causada por *Phytophthora* spp., foi considerada a principal doença da cultura, no Brasil, até o aparecimento da vassoura-de-bruxa, causada por *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, na região cacauera na Bahia, em 1989. Atualmente, com o sucesso das pesquisas na obtenção de clones resistentes à vassoura-de-bruxa, a podridão-parda volta a preocupar os cacauicultores, principalmente do Estado da Bahia, onde as condições climáticas, num determinado período do ano, favorecem o desenvolvimento do patógeno (Oliveira & Luz, 2005).

Vários métodos são adotados pelos produtores para o controle da doença. O mais comum é o uso de fungicidas à base de cobre ou sistêmicos. Embora tenha certa eficiência, o controle químico aumenta o custo de produção e pode acarretar sérios problemas ao meio ambiente e ao homem (Fulton, 1989). A obtenção de plantas geneticamente resistentes a podridão parda dos frutos do cacauero é dificultada devido à diversidade de espécies de *Phytophthora* que causam a doença e a inexistência de um método efetivo de seleção (Luz *et al.*, 1996). Algumas práticas culturais, visando tornar o ambiente desfavorável ao patógeno, podem ser empregadas, contudo apresentam um custo elevado e uma baixa efetividade de controle (Evans & Prior, 1987).

Visando reduzir o custo do controle químico e os impactos ambientais, o controle biológico tem despontado como uma alternativa altamente promissora. Os agentes de biocontrole atuam por meio de interações antagonísticas como indução de resistência, antibiose, competição e micoparasitismo (Jacobsen & Backman, 1993).

Alguns microrganismos têm sido selecionados como potenciais agentes de controle da podridão-parda dos frutos de cacaueteiro. Recentemente, um isolado de *Trichoderma viride* Pers. ex. S.F. Gray, denominado de ALF 247, foi selecionado por Hanada *et al.* (2004), em condições de campo. Durante a sua avaliação, apresentou significativo controle da doença, o que possibilita a sua utilização em programas de controle biológico ou como componente de um manejo integrado. Apesar da sua eficiência no controle da doença em campo, o conhecimento dos mecanismos de ação envolvidos pode orientar as estratégias adotadas, durante os vários estádios de desenvolvimento do patógeno (Köhl & Fokkema, 1998). Na maioria das vezes, o insucesso do controle biológico está relacionado com a falta de conhecimento dos mecanismos envolvidos na interação antagonista-fitopatógeno (Belanger *et al.*, 1995). Na elucidação do mecanismo de ação de agentes de biocontrole têm sido utilizadas técnicas da biologia molecular na identificação, inativação e suplementação de genes responsáveis por mecanismos como a produção de antibióticos (Köhl & Fokkema, 1998). De certa forma, o modo de ação de um agente de biocontrole ajuda a definir as circunstâncias nas quais ele pode ser usado.

Vários modos de ação estão associados com a efetividade de *Trichoderma* spp. no controle de doenças como competição por substrato e espaço (Silvan & Chet, 1989), produção de antibióticos voláteis e não voláteis (Baker & Griffin, 1995) e micoparasitismo direto (Chet *et al.*, 1996). Além de suprimir doenças em plantas, *Trichoderma* spp. podem, também, agir como promotores de crescimento (Inbar *et al.*, 1994).

As espécies de *Trichoderma* têm sido usadas comercialmente como agente de biocontrole contra fungos fitopatogênicos, principalmente devido a sua característica micoparasítica (Zeilinger *et al.*, 2005). Vários estudos indicam que fungos desse grupo produzem grande quantidade de enzimas hidrolíticas incluindo quitinase, glucanase e

celulase, que podem degradar a parede celular dos fungos fitopatogênicos e se alimentar do interior da célula-alvo (Olmedo-Monfil *et al.*, 2003).

Dentro desse contexto, esse trabalho teve como objetivo estudar o crescimento de *T. viride* e a indução da produção das enzimas celulase, quitinase e glucanase pelo fungo quando cultivado em meio com diferentes fontes de carbono.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Fitopatologia do Centro de Pesquisas Almirante Cacau, Itajuípe, BA, e no laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA.

### Obtenção do isolado e condições de cultivo

O isolado ALF 247, *T. viride*, foi proveniente da coleção do laboratório de Fitopatologia do Centro de Pesquisas Almirante Cacau. Para a produção de enzimas, o isolado de *T. viride* foi cultivado em meio líquido mínimo (0,1% bactopectona; 0,03% uréia; 0,2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,14%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,03%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,03%  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01% solução de traço elementos ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ )) (Lima *et al.*, 1997). Nesse meio mínimo foram adicionadas diversas fontes de carbono, a saber: 1 - meio de cultura de glicose (MSG): meio mínimo acrescido de 0,3 % de glicose, pH 5,5; 2 - meio de cultura suplementado com quitina coloidal (MSQ): meio mínimo acrescido de 0,03% de glicose; 0,27% de quitina coloidal, pH 5,5; 3 - meio de cultura suplementado com celulose (MSC): meio mínimo acrescido de 0,03% de glicose; 0,27% de carboximetilcelulose (CMC), pH 5,5; 4 - meio de cultura suplementado com micélio de *P. palmivora* (MSMP): meio mínimo acrescido de 0,03% de glicose; 0,27% de micélio fresco de *P. palmivora* macerado em nitrogênio líquido, pH 5,5.

O isolado de *T. viride* foi inicialmente cultivado em meio de BDA (decoção de 40 g de batata, 20 g de dextrose, 15 g de agar, para 1000 ml de água destilada), por cinco dias a 25

<sup>0</sup>C. Em seguida, transferiram-se cinco discos de 5 mm de diâmetro, retirados da borda da cultura, contendo micélio e conídios, para Erlenmeyers de 200 ml contendo 50 ml dos meios MSG, MSQ, MSC e MSMP. Para cada meio, foram preparados trinta Erlenmeyers que foram mantidos sob agitação, a 100 rpm, a 25 <sup>0</sup>C, até por oito dias.

Nos intervalos de um, três, quatro, cinco, seis e oito dias o micélio de cinco Erlenmeyers, de cada meio de cultura, foi filtrado em papel de filtro Whatman n<sup>o</sup> 2. Os papéis, antes da filtragem e após a filtragem, foram secos a 60 <sup>0</sup>C, em estufa, e pesados diariamente até se obter peso constante. A massa micelial foi obtida por diferença entre o peso com o micélio, menos o peso do papel.

Do meio filtrado, retirou-se uma alíquota de 7 ml para determinação de proteína total e das atividades das enzimas glucanase, quitinase e celulase. A amostra foi dialisada contra tampão fosfato 100 mM, pH 6,0, na proporção de 1/100 (v/v), em membrana com ponto de corte de 3,5 a 5,0 KDa (MWCO) por 24 horas, sobre agitação, a 5 <sup>0</sup>C. Após a diálise, o meio de cultura foi coletado em microtubos de 1,5 ml e mantido em refrigerador a 5 <sup>0</sup>C para estudos posteriores.

#### **Determinação de proteína total**

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se o reagente concentrado comercial da Bio-Rad<sup>TM</sup> e albumina de soro bovino (ASB), como padrão. Em microtubos de 1,5 ml foi acrescentado 1 ml do meio de cultura dialisado e acrescentado 250 µl do reagente de Bradford concentrado. A mistura foi incubada por cinco minutos para ocorrer à reação. Foi determinada a absorbância do produto da reação em espectrofotômetro, marca CELM, modelo E-225D, no comprimento de onda ajustado para 595 nm. Os valores da concentração de proteína total de cada amostra foram expressos em µg de proteína por ml do meio de cultura dialisado (µg de proteína x ml<sup>-1</sup> de cultura), considerando a curva-padrão de concentração de ASB.

### **Determinação de atividade de quitinase**

A atividade da quitinase foi determinada por meio da degradação de quitina marcada com remazol violeta brilhante (CM-chitin RBV, Loewe Biochemica, Munique, Alemanha). Em um microtubo de 1,5 ml, foram diluídos 200 µl do meio de cultura dialisado em 400 µl de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e acrescentados 200 µl do substrato CM-chitin-RBV. O conteúdo foi agitado por dois segundos em Vortex e incubado a 38 °C em banho-maria, por duas horas. A reação foi interrompida com 200 µl de HCl 2N e os microtubos foram colocados, por 15 minutos, em banho de gelo. Posteriormente, o material foi centrifugado a 14.000 rpm, por 10 minutos, e a absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro a 550 nm. Nas provas em branco, a amostra dialisada foi substituída pelo mesmo volume de solução tampão. Os resultados de atividades específicas foram expressos em unidades de absorbância a 550 nm por ml de extrato protéico por hora ( $ABS_{550}.ml^{-1}.h^{-1}$ ).

### **Determinação de atividade de glucanase**

A atividade de glucanase foi determinada por meio da degradação de glucanos marcados com remazol azul brilhante (CM-curdlan-RBB, Loewe Biochemica, Munique, Alemanha). Em um microtubo de 1,5 ml, foram diluídos 200 µl do meio de cultura dialisado em 400 µl de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e acrescentados 200 µl do substrato CM-curdlan-RBB. O conteúdo foi agitado por dois segundos no Vortex e incubado a 38 °C em banho-maria por duas horas. A reação foi interrompida com 200 µl de HCl 2N e os microtubos foram colocados, por 15 minutos, em banho de gelo. Posteriormente, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos e a absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro a 600 nm. Nas provas em branco, a amostra dialisada foi substituída pelo mesmo volume de solução tampão. Os resultados de atividades específicas foram expressos em unidades de absorbância a 600 nm por ml de extrato protéico, por hora ( $ABS_{600}.ml^{-1}.h^{-1}$ ).

### **Determinação de atividade de celulase**

Para a determinação da atividade de CM-celulase, seguiu-se a metodologia descrita por Miller (1959) e König *et al.* (2002), com modificações. Em um microtubo de 1,5 ml foram diluídos 400 µl da amostra dialisada em 400 µl de tampão acetado de sódio (100 mM), pH 5,0; cloreto de cálcio (20 mM), pH 5,0, contendo 0,04 % de Tween 20 e 4 % (w/v) de carboximetilcelulose (CMC) de baixa viscosidade. A mistura foi incubada por cinco dias a 50 °C, em banho-maria, sob agitação. Em seguida, a solução foi resfriada em gelo, por cinco minutos, centrifugada a 10.000 rpm, por cinco minutos. Uma alíquota de 150 µl do sobrenadante foi coletada em tubo de 5 ml com tampa rosqueável e a reação foi interrompida com 100 µl do reativo dinitrossalicilato (DNS), sob aquecimento em banho-maria a 100 °C, por cinco minutos. Logo após, foram adicionados 750 µl de água deionizada e a quantidade de açúcar redutor foi determinada medindo-se a absorbância em espectrofotômetro a 540 nm. Glicose foi utilizada como padrão. Uma unidade de enzima foi definida como sendo a quantidade de enzima que libera um µmol de açúcar redutor, por litro, por hora.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Foi realizada análise da variância com regressão linear dos dados do crescimento micelial do *T. viride* em diferentes meios, da produção de proteínas e das atividades de quitinase, glucanase e celulase em função do tempo.

## **RESULTADOS**

### **Efeito de diferentes fontes de carbono sobre o crescimento micelial do *Trichoderma viride***

*Trichoderma viride* cresceu em todos os meios testados, sendo que o fungo produziu mais massa micelial quando foi cultivado em MSG, enquanto que, o MSMP foi o que induziu a menor produção de massa micelial do fungo (Tabela 1 e Gráfico 1). Em todos os

tratamentos o valor de F de regressão linear foi significativo. Também constatou que a regressão linear ajustou melhor no meio MSC conforme o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) (Tabela 1).

Meios <sup>1</sup>	Regressão linear	$r^2$	P
MSG	$Y = 18 + 11,6x$	0,85	0,005
MSQ	$Y = 22,8 + 7,52x$	0,80	0,010
MSC	$Y = 16,2 + 9,39x$	0,91	0,002
MSMP	$Y = 21,7 + 6,65x$	0,89	0,003

Tabela 1 – Análise de regressão da massa micelial (mg) de *Trichoderma viride* cultivado com quatro diferentes meios de cultura em função do tempo.

<sup>1</sup>MSG - meio de glicose, MSQ - meio suplementado com quitina coloidal, MSC – meio suplementado com carboximetilcelulose e MSMP – meio suplementado com micélio de *P. palmivora*.

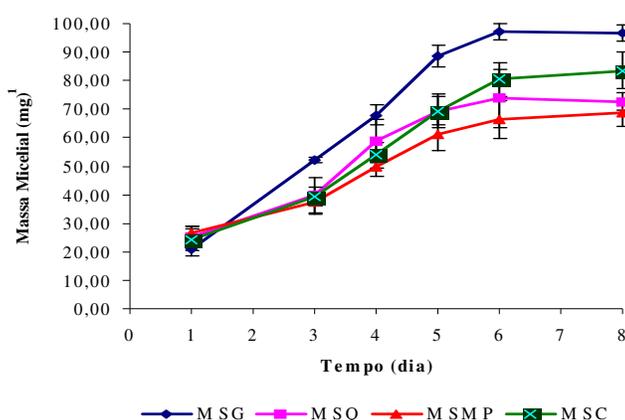


Gráfico 1 - Produção da biomassa micelial do *Trichoderma viride* cultivado em diferentes meios de cultura e em diferentes períodos de crescimento. As barras representam o desvio-padrão da média. MCG – meio de cultura com glicose; MSQ – meio suplementado com quitina coloidal; MSMP – meio suplementado com micélio de *Phytophthora palmivora*; MSC – meio suplementado com carboximetilcelulose. <sup>1</sup>Média de cinco repetições.

### Efeito dos meios de cultura sobre a secreção de proteína total

*Trichoderma viride* secretou proteína em todos os meios testados. O MSG estimulou maior acúmulo de proteína em todos os tempos avaliados (Gráfico 2). O MSMP foi o que apresentou maior coeficiente de determinação entre produção de proteína e tempo (Tabela 2), apesar de ser o meio que induziu o fungo a produzir menor quantidade de proteína (Gráfico 2). O valor de F foi significativo para todos os tratamentos na análise de regressão linear (Tabela 2).

Meios <sup>1</sup>	Regressão linear	r <sup>2</sup>	P
MSG	Y = 8,10 + 2,83x	0,78	0,012
MSQ	Y = 4,24 + 1,42x	0,89	0,003
MSC	Y = 4,46 + 0,964x	0,96	<0,001
MSMP	Y = 3,88 + 0,697x	0,97	<0,001

Tabela 2 – Regressão linear de proteína total ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) produzida por *Trichoderma viride* cultivado em diferentes meios de cultura em função do tempo

<sup>1</sup>MSG - meio de glicose, MSQ - meio suplementado com quitina coloidal, MSC – meio suplementado com carboximetilcelulose e MSMP – meio suplementado com micélio de *P. palmivora*.

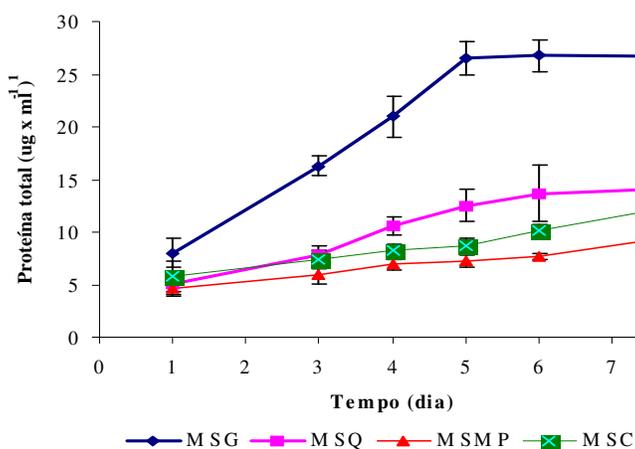


Gráfico 2 - Concentração de proteína total secretada por *Trichoderma viride* em diferentes meios de cultura e diferentes períodos de crescimento sobre agitação. As barras representam o desvio-padrão da média. MSG – meio de cultura com glicose; MSQ – meio suplementado com quitina coloidal; MSMP – meio suplementado com micélio de *Phytophthora palmivora*; MSC – meio suplementado com carboximetilcelulose. <sup>1</sup>Média de cinco amostras.

### Efeito da atividade de quitinase em diferentes meios de cultura

A atividade de quitinase foi constatada em todos os meios testados, sendo que no meio de MSG, *T. viride* secretou maior quantidade da enzima em relação aos outros meios (Tabela 3 e gráfico 3). O MSQ foi o meio que apresentou maior coeficiente de determinação, seguido pelo meio MSG. Na análise de regressão linear o valor de F foi significativo para todos os tratamentos (Tabela 3)

Meios <sup>1</sup>	Regressão linear	r <sup>2</sup>	P
MSG	Y = 0,273 + 0,226x	0,79	0,010
MSQ	Y = 0,167 + 0,209x	0,88	0,004
MSC	Y = 0,272 + 0,101x	0,69	0,025
MSMP	Y = 0,330 + 0,095x	0,59	0,044

Tabela 3 – Regressão linear da atividade quitinase ( $\text{ABS}_{550} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) por *Trichoderma viride* cultivado em diferentes meios de cultura em função do tempo.

<sup>1</sup>MSG - meio de glicose, MSQ - meio suplementado com quitina coloidal, MSC – meio suplementado com carboximetilcelulose e MSMP – meio suplementado com micélio de *P. palmivora*.

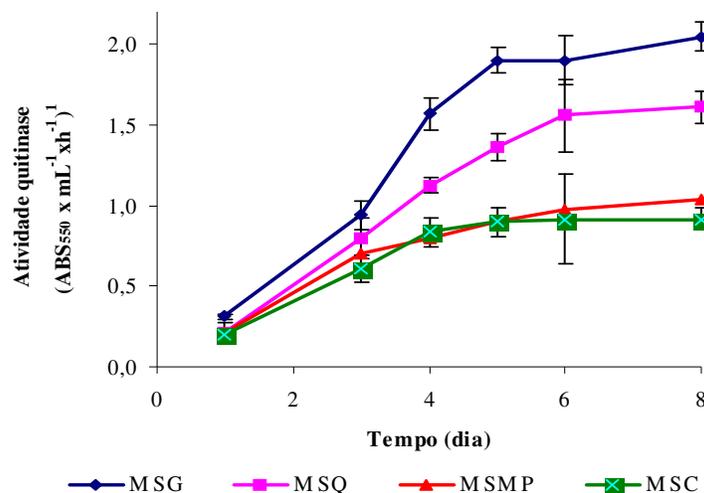


Gráfico 3 - Secreção de quitinase por *Trichoderma viride* em diferentes composições de meios de cultura e diferentes períodos de crescimento sobre agitação. As barras representam o desvio-padrão da média. MCG – meio de cultura com glicose; MSQ – meio suplementado com quitina coloidal; MSMP – meio suplementado com micélio de *Phytophthora palmivora*; MSC – meio suplementado com carboximetilcelulose. <sup>1</sup>Média referente a cinco repetições.

### Efeito da atividade de glucanases em diferentes meios de cultura

A atividade de glucanase foi constatada em todos os meios testados (Tabela 4 e Gráfico 4). O MSG induziu *T. viride* a secretar maior quantidade de glucanase até o 6<sup>o</sup> dia, quando foi superado pelo MSMP (Gráfico 4). Por outro lado, o MSQ foi o menos estimulador de glucanase. O MSMP apresentou maior coeficiente de determinação da regressão linear, seguido pelo MSC. O valor de F foi altamente significativo para todos os tratamentos (Tabela 4).

Meios <sup>1</sup>	Regressão linear	r <sup>2</sup>	P
MSG	Y = 0,444 + 0,309x	0,84	0,006
MSQ	Y = 0,288 + 0,151x	0,88	0,004
MSC	Y = 0,274 + 0,284x	0,92	0,001
MSMP	Y = 0,125 + 0,346x	0,96	<0,001

Tabela 4 – Regressão linear da atividade de glucanases ( $\text{ABS}_{600} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) por *Trichoderma viride* cultivado em diferentes meios de cultura em função do tempo.

<sup>1</sup>MSG - meio de glicose, MSQ - meio suplementado com quitina coloidal, MSC – meio suplementado com carboximetilcelulose e MSMP – meio suplementado com micélio de *P. palmivora*.

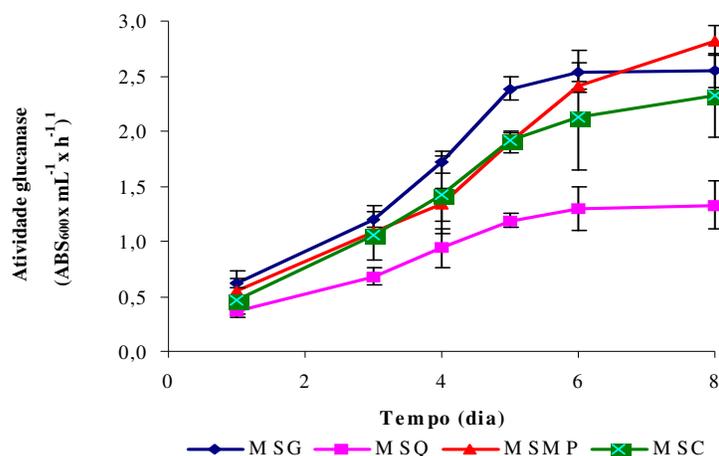


Gráfico 4 – Secreção de glucanase por *Trichoderma viride* em diferentes composições de meios de cultura e diferentes períodos de crescimento sobre agitação. As barras representam o desvio-padrão da média. MCG – meio de cultura com glicose; MSQ – meio suplementado com quitina coloidal; MSMP – meio suplementado com micélio de *Phytophthora palmivora*; MSC – meio suplementado com carboximetilcelulose. <sup>1</sup>Média de cinco amostras.

### Efeito da atividade de celulase em diferentes meios de cultura

Os meios MSG e MSQ não estimularam *T. viride* a secretar celulase (Tabela 5 e Gráfico 5). Por outro lado, os meios contendo celulose como fonte de carbono estimularam a produção de celulase sempre crescente até o oitavo dia (Gráfico 5). A atividade de celulase determinada no MSC foi superior à produzida no MSMP durante todo o período de avaliação (Gráfico 5). O coeficiente de determinação da regressão linear foi maior para MSC e o valor de F foi altamente significativo para os dois meios (Tabela 5).

Meios <sup>1</sup>	Regressão linear	r <sup>2</sup>	P
MSG	-	-	-
MSQ	-	-	-
MSC	Y = 6,70 + 15,1x	0,93	0,001
MSMP	Y = 0,280 + 9,19x	0,91	0,002

Tabela 5 – Regressão linear de atividade celulase ( $\mu\text{mol glicose} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) secretada em diferentes meios de cultura por *Trichoderma viride*.

<sup>1</sup>MSG - meio de glicose, MSQ - meio suplementado com quitina coloidal, MSC – meio suplementado com carboximetilcelulose e MSMP – meio suplementado com micélio de *P. palmivora*.

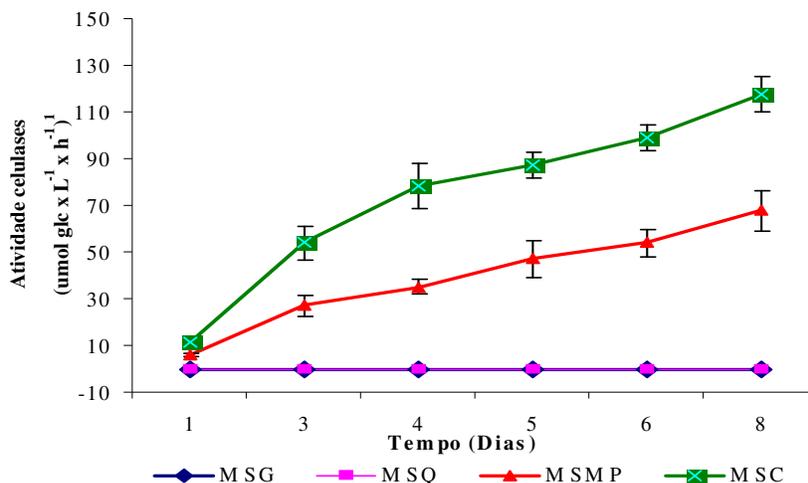


Gráfico 5 - Secreção de celulase por *Trichoderma viride* em diferentes meios de cultura e diferentes períodos de crescimento sobre agitação. As barras representam o desvio-padrão da média. MCG – meio de cultura com glicose; MSQ – meio suplementado com quitina coloidal; MSMP – meio suplementado com micélio de *Phytophthora palmivora*; MSC – meio suplementado com carboximetilcelulose. <sup>1</sup>Média de cinco amostras.

## DISCUSSÃO

A parede celular do fungo é um dos principais obstáculos que o agente de biocontrole se depara no processo antagônico por micoparasitismo. Para destruí-la, o agente de biocontrole precisa da ação de enzimas. Dentre as principais enzimas hidrolíticas da parede celular de fungo destacam-se as celulases, as quitinases e as glucanases (Haran *et al.*, 1996). A secreção de enzimas pelo isolado ALF 247 (*T. viride*), em meio de cultura, indica o potencial bioquímico desse isolado para o micoparasitismo de *P. palmivora*. As espécies de *Trichoderma*, que apresentam potencial como agentes de biocontrole, são geralmente produtoras de enzimas hidrolíticas (Carsolio *et al.*, 1999; Cortes *et al.*, 1998; Lima *et al.*, 1997; Omedo-Monfil *et al.*, 2003). Estudando especificamente *T. viride*, Bastos (1996a) verificou que, em meio de cultura sólido, esta espécie produziu enzimas extracelulares, tais como: celulase, amilase e protease.

Embora, tenha-se determinado a atividade de quitinase por *T. viride*, é importante esclarecer que o gênero *Phytophthora* pertencente ao grupo Oomycota que apresenta parede celular composta basicamente de  $\beta$  1,3 glucano,  $\beta$  1,6 glucano e celulose, em vez de quitina (Alexopoulos *et al.*, 1996). No entanto, a inclusão da determinação de quitinase visou ampliar o conhecimento sobre a ação do antagonista a fungos fitopatogênicos que contém quitina na parede celular. Em todos os meios testados, *T. viride* secretou quitinase, sendo que o meio suplementado com glicose (MSG) proporcionou uma quantidade superior aos demais (Gráfico 3). Por outro lado, a regressão linear ajustou melhor no meio suplementado com quitina coloidal (MSQ), indicando que nesse meio, a atividade de quitinase é melhor explicada em função do tempo. Portanto, os meios isentos de quitina coloidal apresentaram menor correlação entre a atividade de quitinase em função de tempo.

Com o desenvolvimento de ferramentas na área de biologia e genética molecular, têm sido obtidos microrganismos geneticamente modificados. Para melhorar a atividade de biocontrole do *T. harzianum*, Pe'er *et al.* (1991) introduziram o gene *chiA* no fungo, via transformação protoplasto, usando DNA plasmidial, obtendo dois transformantes que mostraram um aumento significativo na atividade de quitinase. Dessa forma, caso haja interesse em se utilizar *T. viride* em programas de biocontrole de fungos fitopatogênicos, essas ferramentas poderão ser acionadas de maneira que se possa aumentar a produção de quitinase.

A parede celular de *Phytophthora* é composta predominantemente de glucanas e celulose, sendo que a glucana corresponde à cerca de 75 – 90 % e celulose de 4 a 20 % do peso seco da parede (Bartnicki-Garcia, 1968; Alexopoulos *et al.*, 1996). A função das glucanas é bem diversificada, dependendo das propriedades físico-químicas e da localização. Na parede celular, sua função está relacionada com a proteção contra desidratação e manutenção da rigidez da célula. As glucanas também podem ser degradadas pelo próprio

fungo e utilizadas como meio nutricional, quando ocorre falta de nutrientes externos (Ruiz-Herrera, 1992). Portanto, imensa é a importância da glucana na parede celular nesse grupo de fungo, o que faz a atividade de glucanase ter um papel fundamental no processo antogônico. *Trichoderma viride* apresentou atividade de glucanase em todos os meios de cultura aqui estudados (Tabela 4 e Gráfico 4). Indicando que a fonte de carbono não foi o fator limitante na produção dessa enzima, o que corrobora com os resultados obtidos por Cruz *et al.* (1993) que observaram que *Trichoderma* produziu glucanases nos diversos substratos avaliados.

A atividade de glucanase diferiu entre os meios, sendo que no MSG houve maior atividade até o sexto dia, quando a atividade no MSMP passou a ser maior (Gráfico 4). É importante ressaltar que no MSG foi onde o fungo produziu maior massa micelial (Tabela 1) e maior produção de proteína total (Tabela 2). Portanto, é provável que a atividade de glucanase no MSG esteja diretamente correlacionada com a produção micelial e de proteína total. O MSMP, suplementado com micélio de *P. palmivora*, apresentou maior coeficiente de determinação, indicando que a regressão linear ajustou melhor nesse meio (Tabela 4). Quando *T. viride* foi cultivado no meio MSQ apresentou a menor atividade de glucanase e maior atividade de quitinase, em função do crescimento micelial do fungo. Enquanto que, no MSC a atividade de glucanase ficou na faixa intermediária (Gráfico 4). Com base nos resultados, conclui-se que os substratos foram fundamentais para secreção das enzimas, uma vez que o MSQ é basicamente formado por polímeros que têm moléculas de N-acetil-D-glicosamina como unidade e o MSC é basicamente composto de celulose, um polissacarídeo linear do tipo  $\beta$ -1,4-glucano. Portanto, é possível que o contato dos micélios de *T. viride* e *P. palmivora* resulte na indução de sinais para secreção de enzimas hidrolíticas como a glucanase.

Além de comprovar que *T. viride* produz enzimas hidrolíticas, esse trabalho também constatou que a fonte de carbono foi um fator importante na quantidade de cada enzima produzida. Entretanto, para produção de celulase, a fonte de carbono foi um fator

determinante, uma vez que *T. viride* somente foi estimulado a produzir celulase em meio de cultura suplementado com celulose e micélio de *P. palmivora* (Tabela 5 e Gráfico 5). Resultados semelhantes foram obtidos com outras espécies de *Trichoderma*. Ahmed *et al.* (2003), estudando a indução de xilanase e celulase, por *T. harzianum* Rifai, em diferentes fontes de carbono, observaram que a glicose inibiu a produção das enzimas, mas quando se forneceu xilano e carboximetilcelulose, como fonte de carbono, a produção de xilanase e celulase aumentou significativamente. Em um outro estudo, efetuado por Abrão-Neto *et al.* (1995), *T. reesei* Simmons induziu a produção de celulase quando celulose foi à única fonte de carbono. Carle-Urioste *et al.* (1997) demonstraram que dois genes que expressam a produção de celulase em *T. reesei*, *cbh1* e *egl1*, expressavam baixa atividade na ausência de celulose e, na presença, sua expressão foi multiplicada em pelo menos 1100 vezes. Portanto, fica evidente que *Trichoderma* tem capacidade de degradar celulose quando esta fonte de carbono encontra-se presente no meio de cultura. Esse resultado é particularmente importante nessa interação antagonista-patógeno, porque celulose é um dos principais componentes da parede celular de *Phytophthora*.

Apesar de se ter comprovado que *T. viride* é capaz de produzir enzimas hidrolíticas para atuar na degradação da parede celular de *P. palmivora*, também é importante esclarecer a participação de outros mecanismos envolvidos nesse processo antagônico. Tradicionalmente, a interação entre *Trichoderma* e outros fungos está associada com antibiose, micoparasitismo e competição por nutrientes. Esses mecanismos podem não ser exclusivos, ou seja, vários mecanismos podem estar envolvidos simultaneamente, na interação entre antagonista-patógeno de planta. Dubos (1987) mencionou que a supressão da capacidade de *Botrytis* causar doença em videira, por *Trichoderma* sp., envolvia tanto competição por nutrientes como micoparasitismo. Schirmböck *et al.* (1994), estudando o mecanismo de ação de *T. harzianum* contra fungos fitopatogênicos, observaram ação sinérgica de antibiose e enzimas

hidrolíticas. Bélanger *et al.* (1995) observaram que, nos eventos associados com a degradação de *B. cinérea* Pers. ex Fr. por um isolado de *T. harzianum*, ocorria primeiramente à morte celular do fitopatógeno por antibiose, seguido de penetração, devido à pressão mecânica ou digestão enzimática da parede celular e, somente após dez dias de antagonismo, surgiram os indícios de hidrólise generalizada da quitina. Outras interações podem não se enquadrar em nenhuma das categorias clássicas. Zimand *et al.* (1996) sugeriram que *T. harzianum*, T39, suprimiu a patogenicidade de *B. cinerea*, em consequência da redução na quantidade de pectinase produzida pelo patógeno.

O processo de micoparasitismo pode envolver a produção de enzimas hidrolíticas, antibiose, competição ou a combinação destas atividades (Carsolio *et al.*, 1999). Vários trabalhos mencionam que a produção de enzimas hidrolíticas pelo antagonista pode ser um indicativo da ocorrência da ação micoparasítica. Segundo Elad *et al.* (1983), o micoparasitismo é um dos principais mecanismos no processo antagônico de *Trichoderma*. Porém, não se pode descartar que existem interações em que a participação de metabólitos tóxicos é importante no processo de micoparasitismo. Geralmente, a antibiose está relacionada com a produção de substâncias químicas capazes de causar a morte do fungo fitopatogênico, o que pode facilitar a lise da parede celular, cujos processos podem ocorrer isoladamente ou simultaneamente (Bélanger *et al.*, 1995). Apesar da produção de quitinase por *T. harzianum* ter sido sugerida por Chet (1987) como sendo responsável pela atividade antifúngica, evidência indica que o antagonista primeiro utiliza a antibiose que provoca a morte da célula, seguido pela degradação da parede celular pela quitinase (Bélanger *et al.*, 1995).

Apesar do *T. viride* (ALF 247) ter sido isolado como fungo endofítico (Hanada *et al.*, 2004), o fungo atuou tanto como endofítico como epifítico, quando aplicado em plantas adultas de cacauero (Hanada *et al.*, 2005). No ambiente do filoplano, a competição por

nutriente passa a ser intensa entre o antagonista e o fitopatógeno. Os antagonistas micoparasíticos nesse ambiente apresentam destacada importância uma vez que podem parasitar e destruir estruturas de fungos fitopatogênicos, diminuindo, sobretudo, a fonte de inóculo (Bettiol, 1997). Com base nos resultados obtidos nesse trabalho, *T. viride* desenvolveu melhor na presença de fonte de carbono menos complexa. Essa preferência pode caracterizar, inicialmente, a ocorrência de competição por nutrientes, principalmente por açúcares simples, com os microrganismos do filoplano. Então, dessa forma, é possível que a competição por nutrientes anteceda o micoparasitismo, uma vez que, a parede celular dos fungos é uma estrutura complexa constituída de carboidratos, quase todos sobre forma de polissacarídeos (Debono & Gordee, 1994). Porém, todas essas especulações necessitam de confirmação experimental. Além do mais, estudos envolvendo competição por nutrientes parecem ser menos proveitoso para biologia molecular do que outros mecanismos nos quais um simples produto está envolvido. Conseqüentemente, apesar da sua importância, a competição por nutrientes passa a ser o último mecanismo a ser estudado, quando se enfoca a questão pelo prisma do interesse da biotecnologia (Köhl & Fokkema, 1998).

Sabe-se que enzimas hidrolíticas são fundamentais na degradação da parede celular do patógeno, entretanto, o micoparasitismo de *Trichoderma* é um processo muito mais complexo cuja elucidação ainda depende de muitos estudos tais como: a função e a importância dessas enzimas no mecanismo de controle biológico, a determinação da estrutura e da base molecular da interação celular e reconhecimento entre *T. viride* e *P. palmivora*, a possível ação das enzimas hidrolíticas no processo antagônico e os possíveis modos de participação dessas enzimas no controle biológico envolvendo micoparasitismo. Além do mais, esses estudos, somados com os resultados obtidos nesse trabalho, poderão contribuir nas estratégias visando melhorar o potencial do *T. viride* como agente de biocontrole a podrião-parda do cacauero.

## CONCLUSÃO

O presente trabalho concluiu que o isolado ALF 247, identificado como *Trichoderma viride*, apresenta potencial para ser utilizado como agente biocontrolador da podridão-parda dos frutos de cacauero.

## REFERÊNCIAS

- Abrahão-Neto, J.; Rossini, C.H.B.; El-Gogary, S.; Henrique-Silva, F.; Crivellaro, O.; El-Dorry, H. Mitochondrial functions mediate cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. **Biochemistry**, Washington, DC, v.34, n.33, p.10456-10462. 1995.
- Ahmed, S.; Qurrat-al-Ain; Aslan, N.; Naeem, S.; Sajjad-ur-Rahman; Jamil, A. Induction of xylanase and cellulase genes from *Trichoderma harzianum* with different carbon sources. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, Pakistan, v.6, n.22, p.1912-1916. 2003.
- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. **Introductory Mycology**. 4.ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1996. 869p.
- Alizadeh, A. **Comparative morphology and reproductive physiology of *Phytophthora capsici* and *P. palmivora* MF4 from black papper and other hosts**. 1983. (Tese Ph.D.). University of California, Riverside.
- Almeida, L.C. **Levantamento populacional de *Phytophthora* spp. em plantações de cacau da Amazônia Brasileira**. Belém, PA, Brasil: CEPLAC/DEPEA. 1989/90. p.40-41. 1991. Informe Pesquisa.
- Andebrhan, T.; Almeida, L.C. **Incidência de podridão-parda do cacauero (*Phytophthora* spp.) na Amazônia brasileira**. Belém, PA, Brasil: CEPLAC/DEPEA. 1985. p.64-65. 1986. Informe Pesquisa.
- Arnold, A.E.; Maynard, Z.; Gilbert, G.S.; Coley, P.D.; Kursay, T.A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, Oxford, v. 3, n.4, p. 267-274. 2000.
- Arnold, A.E.; Mejía, L.C.; Kyllö, D.; Rojas, E.I.; Maynard, Z.; Robbins, N.; Herre, E.A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, St. Paul, MN, v.100, n.26, p.15649-15654. 2003.

- Azevedo, J.L.; Maccheroni Junior, W.; Araújo, W.L.; Pereira, J.O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: Serafini, L.A.; Barros, N.M.; Azevedo, J.L. (Eds.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p. 233-268.
- Azevedo, J.L., Maccheroni Junior, W.; Araújo, W.L. Importância dos microrganismos endofíticos na agricultura. **Revisão Anual de Patologia de Planta**, Passo Fundo, RS, v.11, p.333-371. 2003.
- Bacon, C.W. Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte-infected tall fescue. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, London v.44, n.1-4, p.123-141. 1993.
- Baker, K.F.; Cook, R.J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: Freeman W.H., 1974. 433p.
- Baker, R.; Griffin, G.J. Molecular strategies for biological control of fungi plant pathogens. In: Reuveni, R. (Ed.). **Novel approaches to integrated pest management**. Boca Raton, Florida, USA: Lewis Publishers Inc., 1995. p.153-182.
- Barklund, P.; Kowalski, T. Endophytes fungi in branches of Norway spruce with particular reference to *Tryblidiopsis pinastri*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.74, p.673-678. 1996.
- Barrás A.D.; Aguilar R. V. Biological control of *Penicillium digitatum* by *Trichoderma viride* on postharvest citrus fruits. **International Journal of Food Microbiology**, London, v.11, n.2, p. 179-183. 1990.
- Bartnicki-Garcia, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, CA, v.22, p.87-109. 1968.
- Bartnicki-Garcia, S.; Sing, V.O. Adhesion of zoospores of *Phytophthora* to solid surfaces. In: Fuller, M.S. & Jaworski, A. (Eds.). **Zoosporic Fungi in Teaching and Research**. Athens, GA: Southeastern Publishing, 1987. p. 279-283.
- Bastos, C.N.; Figueiredo, J.M. Efeitos do filtrado de *Cladobotryum amazonenses* Bastos, Evans e Sansom sobre três espécies de *Phytophthora* isoladas de cacaueteiro. **Revista Theobroma**, Ilhéus, BA, Brasil, v.13, n.2, p.113-117. 1983.
- Bastos, C.N. Mycoparasitic nature of the antagonism between *Trichoderma viride* and *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, n.1, p.50-54. 1996a.
- Bastos, C.N. Potencial de *Trichoderma viride* no controle da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacaueteiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, n.4, p.509-512. 1996b.
- Batista, D.C.; Oliveira, S.M.A.; Tavares, S.C.C.H.; Laranjeira, D.; Neves, R.A.F., RLX. Efeitos de fungicidas inibindo o crescimento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* e interferência com *Trichoderma*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.28, n.4, p.305-310. 2002.

Belesky, D.P.; Devine O.J.; Pallas, J.E.; Stringer, W.C. Photosynthetic activity of tall fescue as influenced by a fungal endophyte. **Photosynthetica**, Czech Republic, v.21, p.82-87. 1987.

Bélanger, R.R.; Dufour, N.; Caron, J.; Benhamou, N. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.5, n.1, p.41-53. 1995.

Bettiol, W. Biocontrole na fitosfera: problemas e perspectivas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, RS, v.5, p.59-97. 1997

Bettiol, W. Perspectivas de produtos biológicos para o controle de doenças de plantas. In: Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos, 7, 26 a 28 de novembro de 2003. Ilhéus, BA. Anais... Ilhéus, BA: CEPLAC/CEPEC, 2004. p.50-62.

Blakeman, J.P.; Fokkema, N.J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.20, p.167-192. 1982.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254. 1976.

Brassier, C.M.; Griffin, M.J. Taxonomy of "*Phytophthora palmivora*" on cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, UK, v.72, p.111-143. 1979.

Bowers, J.H.; Bailey, B.A.; Hebbar, P.K.; Sanogo, S. Lumsden, R.D. The impact of plant disease on world chocolate production. Plant Health Progress. Disponível em: <[Http://www.apsnet.org/online/feature/cacao](http://www.apsnet.org/online/feature/cacao)>. Acesso em: 17-02-2006. 2001.

Bulone, V.; Chanzy, H.; Gay, L.; Girard, V.; Fevre, M. Characterization of chitin and chitin synthase from the cellulosic cell wall fungus *Saprolegnia monica*. **Experimental Mycology**, London, v.16, n1, p.8-21. 1992.

Butler, D. Microclimatic factors associated with the incidence of black pod disease of cocoa. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 6, 1977, Caracas, Venezuela. **Proceedings...** Lagos, Nigéria: Cocoa Producers Alliance, 1981. p.171-180.

Campêlo, A.M.F.L.; Luz, E.D.M.N. Etiologia da podridão-parda do cacauero nos Estados da Bahia e Espírito Santo, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, p.313-321. 1981.

Campos-Takaki, G.M.; Dietrich, S.M.C.; Mascarenhas, Y. Isolation and characterization of chitin from the cell walls of *Achlya radiosa*. **Journal of Genetics Microbiology**, v.128, p.207-209. 1982.

Carle-Urioste, J.C.; Escobar-Vera, J.; El-Gogary, S.; Henrique-Silva, F.; Torigoi, E.; Crivellaro, O.; Herrera-Estrella, A.; El-Dorry, H. Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.272, n.15, p.10169-10174. 1997.

- Carmichael, J.W.; Kendrick, W.B.; Connors, I.L.; Sigler, L. **Genera of Hiphomycetes**. Edmonton, Alberta, Canada: The University of Alberta Press, 1980. 386p.
- Carroll, G.C. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: Fokkema, N.J.; van den Heuvel, J. (Eds.). **Microbiology of the phyllosphere**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1986. p.205-222.
- Carroll, G.C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. – **Ecology**, Washington, DC, v.69, p.2-9. 1988.
- Carroll, G.C. Beyond pest deterrence. Alternative strategies and hidden costs of endophytic mutualisms in vascular plants. In: Andrews, J.H. and Hirano, S.S. (Eds.). **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer-Verlag. 1991. p.358-375.
- Carsolio, C.; Benhamou, N.; Haran, S.; Cortés, C.; Gutiérrez, A.; Chet, I.; Herrera-Estrela, A. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v.65, n.3 p.929-935. 1999.
- Cerqueira, A.O.; Luz, E.D.M.N.; Rocha, C.S.S. Caracterização Morfológica e biométrica de alguns isolados de *Phytophthora* ssp. da micoteca do Centro de Pesquisas do Cacau. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, n.2, p.114-119. 1999.
- Chee, K.H. Hosts of *Phytophthora palmivora*. In: Gregory, P.H. (Ed.). **Phytophthora diseases of cocoa**. London: Longman Group Limited, 1974. p.71-81.
- Chee, K.H. Hosts of *Phytophthora palmivora*. **Review of Applied Mycology**, Kew, Surrey, England, v.48, p.337-344. 1969.
- Chet, I. Microbiol control of plant diseases. In: Mitchell, R. (Ed.). **Environmental microbiology**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1992. p. 335-354.
- Chet, I. *Trichoderma*-application, mode of action and potencial as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: Chet, I. (Ed.) **Innovative Approaches to Plant Disease Control**. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1987. p.137-160.
- Chet, I., Inbar, J.; Hadar, Y. Fungal antagonists and mycoparasitism. In: Wicklow, D.T.; Soderstrom, B.E. (Eds.). **The Mycota**. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1997. v.4, p.165-184.
- Clay, K. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. **Ecology**, Washington, DC, v.69, p.10-16. 1988.
- Clay, K. Fungal endophytes of grasses. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, CA, v.21, p.275-297. 1990.
- Clay, K. Fungal endophytes, grasses, and herbivores, In: Barbosa P.; Krischik, V.A.; Jones, C.G. (Eds.). **Microbial mediation of plant-herbivore internactions**. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc., 1991. p.199-226.

- Clay, K. Fungal endophytes of plants: biological and chemical diversity. **Natural Toxins**, Fort Collins, CO, v.1, p.147-149. 1992.
- Clerk, G.C. Germination of sporangia of *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. **Annals of Botany**, Oxford, v.36, n.4, p.801-807. 1972.
- Coley, P.D.; Aide, T.M. Red coloration of tropical young leave: A possible antifungal defense? **Journal of Tropical Ecology**, London, v.5, p.293-300. 1989.
- Cortes, C.; Gutierrez, A.; Omedo V.; Inbar, J.; Chet, I.; Herrera-Estrela, A. The expression of genes envolved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by diffusible factor. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.260, n.2-3, p.218-225. 1998.
- Costa, J.C.B.; Bastos, C.N. Controle biológico da vassoura de bruxa do cacauero. In: REUNIÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS, 7, 26-27 de novembro de 2001, Bento Gonçalves, RS. **Anais...** Bento Gonçalves, RS: Embrapa, 2001. p.45-51.
- Dade, H.A. Factors determining the incidence of diseases of cacao pods. Gold Coast Department. **Agricultural Bulletin**, v.7, p.28-34. 1927.
- Dakwa, J.T. The availability of *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. Inoculum for the development of cacao black pod disease. **Ghana Journal of Agricultural Science**, Ghana, v.7, p.117-20. 1974.
- Danielsen, S.; Jensen, D.F. Fungal endophytes from stalks of tropical maize and grasses: isolation, indentification, and screening for antagonism against *Fusarium verticillioides* in maize stalks. **Biocontrol Science and Tecnology**, Oxford, v.9, n.4, p.545-553. 1999.
- Davis, R.M. Control of *Phytophthora* root and foot rot of citrus with the systemic fungicides metalaxyl phosetyl-aluminum. **Plant Disease**, Minnesota, v.66, p.218-220. 1982.
- Deacon, J. W. **Modern Mycology**. Edinburch: Blackwell Science, 1997. 303p.
- Debono, M.; Gordee, R.S. Antibiotcs that inhibit fungal cell wall development. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.48, n.1, p.471-497. 1994.
- Cruz, J.; Rey, M.; Lora, J.M.; Hidalgo-Gallego, A.; Dominguez, F.; Pintor-Toro, J.A.; Llobell, A.; Benitez, T. Carbon source control on  $\beta$ -glucanases, chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.159, n.4, p.316-322. 1993.
- Dhingra, O.D.; Sinclair, J.B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, 1995. 434p.
- Dingle, J.; Mcgee, P.A. Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in wheat. **Mycological Research**, London, v.107, n.3, p.310-316. 2003.
- Dubos, B. Fungal antagonism in aerial agrobiocinoses. In: Chet, I. (Ed.). **Innovative Approaches to Plant Disease Control**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1987, p.107-135.

- Duniway, J.M. Formation of sporangia by *Phytophthora drechsleri* in soil at high matric potentials. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.53, p.1270-1275. 1975.
- Duniway, J.M. Role of physical factors in the development of *Phytophthora* diseases. In: Erwin, D.C.; Bartnicki-Garcia, S.; Tsao, P.H. (Eds.). **Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology**. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society Press, 1983. p.175-187.
- Elad, Y.; Chet, I.; Henis, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.28, p.719-725. 1982.
- Elad, Y.; Chet, I.; Boyle, P.; Henis, Y. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* – Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. **Phytopathology**, St. Paul, Minnesota, v.73, p.85-88. 1983.
- Elad, Y. Reasons for the delay in development of biological control of foliar pathogens, **Phytoparasitica**, Rehovot, v.18, p.99-105. 1990.
- Elad, Y.; Kirshner, B. Establishment of an active *Trichoderma* population in the phylloplane and its effect on grey mould (*Botrytis cinerea*). **Phytoparasitica**, Rehovot v.20, p.137S-141S. 1992.
- Ellis, M.B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608p.
- Ellis, M.B. **More Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 1976. 505p.
- Erwin, D.C. Variability within and among species of *Phytophthora*. In: Erwin, D.C., Bartnicki-Garcia, S.; Tsao P.H. (Eds.). **Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology**. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society Press, 1983. p.149-165.
- Erwin, D.C.; Ribeiro, O.K. **Phytophthora disease worldwide**. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society Press, 1996. 562p.
- Espinosa-Gracia, F.J.; Longenheim, J.H. The leaf fungal endophytic community of a coastal redwood population – diversity and spatial patterns. **New Phytologist**, Oxford, v.116, p.89-98. 1990.
- Espinosa-Garcia, F.J., Langenheim, J.H. Effect of some essential oil phenotypes from coastal redwood on growth of its predominant endophytic fungus, *Pleuroplaconema* sp. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, Florida, v.17, n.9, p.1837-1857. 1991.
- Evans, H.C.; Prior, C. Cocoa pod disease: causal agents and control. **Outlook on Agriculture**, London, v.16, p.35-41. 1987.
- Faeth, S.H.; Hammon, K.E. Fungal endophytes in oak trees: Experimental analyses of interactions with leafminers. **Ecology**, Washington, DC, v.78, n.3, p.820-827. 1997.

- Faeth, S.H. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? **Oikos**, Oxford, v.98, n.1, p.25-36. 2002.
- Fernandez, M.R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo, RS: Embrapa-CNPT, 128p. 1993.
- Figueiredo, J.M.; Campêlo, A.M.F.L. **Efeito de tratamentos com microrganismos antagônicos e tratamento químico na esporulação de *Phytophthora* spp. em superfícies de casqueiros**. Ilhéus, BA, Brasil: CEPLAC/CEPEC, 1982. 31p. Informe Técnico.
- Freeman, S.; Rodrigues, R.J. Genetic conversion of fungal pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualistic. **Science**, Washington, DC, v.260, n.5104, p.75-78. 1993.
- Fulton, R.H. The cacao disease trilogy: black pod, monilia pod rot, and witches'-broom. **Plant Disease**, St. Paul, Minnesota, v.73, p.601-603. 1989.
- Gadd, G.M. Interactions of fungi with toxic metals. **New Phytologist**, Oxford, v.124, p.25-60. 1993.
- Grabski, G.C.; Mendgen, K. Die parasitierung des bohnenrostes *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* durch den hyperparasiten *Verticillium lecanii*: Untersuchungen zur wirt-erkennung penetration und Abban der rostpilzporen. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.115, p.123. 1986.
- Gregory, P.H. ***Phytophthora* disease of cocoa**. London: Longman, 1974.
- Griffin, D.H. **Fungal physiology**. 2 ed. New York: Wiley & Sony, Inc., 1994. 458p.
- Griffin, M.J. Cocoa *Phytophthora* Workshop, 24 – 26 may, 1976, Rothamsted Experimental Station, England. **Proceedings...** England: PANS, 1977, v. 23, p107-110.
- Guimarães, V.C. **Isolamento de fungos endofíticos do hospedeiro *Paulinia cubana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart) Ducke e análise da variabilidade genética, detectada por marcadores RAPD, no endófito *Glomerella cingulata***. 1998. 115p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de São Carlos / Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.
- Hanada, R.E.; Pomella, A.W.V.; Salazar, H.; Pereira, J.O. Seleção de fungos endofíticos visando o controle biológico de *Phytophthora* sp., agente causal da podridão-parda dos frutos de cacau. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.134. 2004. Resumo.
- Hanada, R.E.; Pomella, A.W.V.; Pereira, J.O. Avaliação da colonização do endofítico *Trichoderma viride*, potencial agente de biocontrole de *Phytophthora palmivora*, em cacaueiros adultos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, p.135. 2005. Resumo.
- Hanslser, G.; Hermanns, M.; Reisener, H.J. Elektronenmikroskopische beobachtungen der interaktion zwischen uredosporen von *Puccinia graminis* var. *tritici* und *Verticillium lecanii*. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v.103, p.139-148. 1982.

- Haran, S.; Schickler, H.; Chet, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, London, v.142, p.2321-2331. 1996.
- Hardy, F. The effects of air temperature on growth and production in cacao. **Cacao**, Turrialba, Costa Rica, v.3, n.17, p.1-14. 1958.
- Harman, G.E. Seed treatments for biological control of plant disease. **Crop Protection**, Oxford, v.10, p.166-171. 1991.
- Harman, G.E.; Petzoldt, R.; Comis, A.; Chen, J. Interaction between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize Inbraid line Mo17 and effects in these interactions on disease caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, St. Paul, Minnesota, v.94, n.2, p.147-153. 2004.
- Hawksworth, D.L. The tropical fungal biota: census, pertinence, prophylaxis and prognosis. In: Isaac, S.; Frankland, J.C.; Watling, R.; Whalley, A.J.S. (Eds.). **Aspects of tropical micology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1993. p.265-293.
- Hawksworth, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude significance and conservation. **Mycological Research**, Cambridge, v.95, p.641-655. 1991.
- Hickman, C.J.; Ho, H.H. Behaviour of zoospores in plant pathogenic Phycomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, CA, v.4, p.195-220. 1966.
- Holderness, M. Comparison of matalaxyl/cuprous oxide sprays and potassium phosphonate as sprays and trunk injections for control of *Phytophthora palmivora* pod rot and canker of cocoa. **Crop Protection**, Oxford, v.11, n.1, p.141-147. 1992.
- Hoopen, G.M.T.; Rees, R.; Aisa, P.; Stirrup, T.; Krauss, U. Population dynamics of epiphytic micoparasites of the genera *Clonostachys* and *Fusarium* for the biocontrol of black pod (*Phytophthora palmivora*) and (*Moniliophthora roreri*) on cocoa (*Theobroma cacao*). **Mycological Research**, Cambridge, v.107, n.5, p.587-596. 2003.
- Inbar, J.; Abramsky M.; Cohen, D.; Chet, I. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. **European Journal of Plant Pathology**, Amsterdam, Netherlands, v.100, p.337-346. 1994.
- Jacobsen, B.J.; Backman, A. Biological and cultural plant disease controls: Alternatives and supplements to chemicals in IPM systems. **Plant disease**, St. Paul, Minnesota, v.77, n.3, p.311-315. 1993.
- Junqueira, N.T.V.; Gasparotto, L. Controle biológico de fungos estromáticos causadores de doenças foliares em seringueira. In: Bettioli, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna, SP: Embrapa-CNPMA. 1991. p.307-331.
- Kellam, M.K.; Zentmyer, G.A. Natural occurrence of oospores of "*Phytophthora palmivora* MF4" (*P. capsici*) in cacao pods in Brazil. **Phytopathology**, St. Paul, v.72, p.865. 1982.

Kennedy, A.J.; Lackwood, G.; Simmonds, N.W.; Tan, G.Y. Cocoa breeding: past, present and future. **Cocoa Growers' Bulletin**, Bournville, v.38, p.5-22. 1987.

Kinkel, L., Fungal community dynamics. In: Andrews, J.H., Hirano, S.S. (Eds.). **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991. p.253-270.

Kleifeld O.; Chet I. *Trichoderma harzianum*-interaction with plants and effect on growth response. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.144, n.2, p.267-272. 1992.

Köhl, J.; Fokkema, N.J. Strategies for biological control of fungal foliar pathogens. In: Boland, G.J.; Kuykendall, L.D. (Eds.). **Plant-microbe interactions and biological control**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 49-88.

Köhl, J.; Fokkema, N.J. Fungal interactions on living and necrotic leaves. In: Blakeman, J.P.; Williamson, B. (Eds.). **Ecology of plant pathogens**. Cambridge, UK, CAB International, 1994. p 321-334.

König, J.; Grasser, R.; Vogel, H.K. Determination of xylanase,  $\beta$ -glucanase, and cellulase activity. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**; Berlin, v.374, p.80-87. 2002.

Krauss, U.; Hebbbar, K.P. Research methodology in biocontrol of plant disease. In: WORKSHOP MANUAL, 28 June - 4 July, 1999, Turrialba, Costa Rica. **Proceedings...** Turrialba, Costa Rica: Catie, 1999.

Krauss, U.; Soberanis, W. Effect of fertilization and Biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. **Biological Control**, San Diego, v.24, n.1, p.82-89. 2002.

Lappalainen, J.H.; Koricheva, J.; Helander, M.L.; Haukioja, E. Densities of endophytic fungi and performance of leafminers (Lepidoptera: Eriocraniidae) on birch along a pollution gradient. **Environmental Pollution**, London, UK, v.104, n.1, p.99-105. 1999.

Lass, R.A. *Phytophthora* pod rot (often called black pod). In: Wood, G.A.R. & Lass, R.A. (Eds.). **Cocoa**. London: Longman, 1985. p.267-282.

Latch, G.C.M. Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts. Biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, London, v.44, n.1-4, p.143-156. 1993.

Lawrence, J.S. **Evaluation of methods for assessing resistance of cacao (*Theobroma cacao* L.) cultivars and hybrids to *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler**. Ilhéus, BA: CEPLAC/CEPEC, 1978. n.62, 47p. Boletim Técnico.

Lellis, W.T. **A temperatura como fator limitante da podridão-parda dos frutos de cacaueiro**. Salvador: Instituto de Cacau da Bahia, 1952. 6p. Boletim Técnico.

Lima, H.C. L.; Ulhoa, C.J.; Fernandes, A.P.; Félix, C.R. Purification of a chitinase from *Trichoderma* sp. and its action on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v.43, n.1, p.31-37. 1997.

Lima, L.H.C.; Marco, J.L.; Felix, C.R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna, SP: Embrapa-CNPMA, 2000. v.2, p.263-304.

Lodge, D.J.; Fisher, P.J.; Sutton, B.C. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. **Mycologia**, New York, v.88, p.733-738. 1996.

Luz, E.D.M.N.; Mitchell, D.L.; Brugnerotto, M.I.B. Levantamento populacional de *Phytophthora* spp. em solo de cacauero na Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.17, n.2, p.152. 1992.

Luz, E.D.M.N.; Yamada, M.M.; Lopes, U.V.; Braga, M.C.T.; Brugnerotto, M.I.B. Selection of cacao genotypes resistant to *Phytophthora capsici*, *P. palmivora* and *P. citrophthora* in Bahia, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, n.1, p.71-79. 1996.

Luz, E.D.M.N.; Bezerra, J.L.; Resende, M.L.V. de; Oliveira, M.L. de. Cacau (*Theobroma cacao* L.) controle de doenças. In: Ribeiro do Vale, F.X.; Zambolim, L. (Eds.). **Controle de doenças de plantas – grandes culturas**. Viçosa, MG: UFV, 1997. v.2, p.617-622.

Luz, E.D.M.N. **The roles of five species of *Phytophthora* in infection and disease of roots, stems, and pods of *Theobroma cacao* L.** 1989. 184p. (Ph.D. Thesis). Gainesville, University of Florida, Florida, USA.

Luz, E.D.M.N.; Silva, S.D.V.M.; Mitchell, D.J. *Phytophthora hevea*: outra espécie causando podridão-parda do cacauero na Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.14, n.2, p.160. 1989. Resumo.

Luz, E.D.M.N.; Silva, S.D.V.M. Podridão-parda dos frutos, cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacauero. In: Luz, E.D.M.N.; Santos, A.F. dos; Matsuoka, K.; Bezerra, J.L. (Eds.). **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria Rural, 2001. p.175-265.

Magan, N.; Smith, M.K.; Kirkwood, I.A. Effects of atmospheric pollutants on phyllosphere and endophytic fungi. In: Frankland, J.C.; Magan, M.; Gadd, G.M. (Eds.). Fungi and environmental change. Cambridge: Cambridge University Press, p.90-101. 1996.

Macagnan, D. **Isolamento e seleção de bactérias endosporânicas e do tipo actinomicetos visando o biocontrole da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) da podridão-parda (*Phytophthora* spp.) do cacauero (*Theobroma cacao* L.) e estudos dos mecanismos de antagonismos ao fungo *Crinipellis pernicioso*.** 2005. 122p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

Malinowski, D.P.; Belesky, D.P. Neotyphodium coenophialum - endophyte infection affects the ability of tall fescue to use sparingly available phosphorus. **Journal of Plant Nutrition**, London, v.22, n.4-5, p.835-853. 1999.

MAPA. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 17-02-2006. 2006.

Marks S.; Clay, K. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment, nutrient addition, and fungal endophyte-infection on the growth of two grasses. **Oecologia**, New York, v.84, n.2, p.207-214. 1990.

- Martins-Corder, M.P.; Melo, I.S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.55, n.1, p.1-7. 1998.
- Mathivanan, N.; Prabavathy, V. R.; Vijayanandraj, V.R. Application of talc formulations of *Pseudomonas fluorecens* Migula and *Tichoderma viride* Pers. ex. S. F. Gray decrease the sheath blight decrease and enhance the plant and growth and yied in rice. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.153, n.11-12, p.697-701. 2005.
- Mchau, G.R.A.; Coffey, M.D. Evidence for the existence of two distint subpopulations in phytophthora capsici and redescription of the species. **Mycology Research**, London, v.99, n.1. p.89-102. 1995.
- Mcmillan Jr, R.T. Biological control of frangipani rust with *Verticillium lecanii*. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Florida, v.98, p.328-329. 1985.
- Mejía, L.C.; Rojas, E.I.; Maynard, Z.; Arnold, A.E.; Kylo, D.; Robbins, N.; Herre, E.A. Inoculation of beneficial endophytic fungi into *Theobroma cacao* tissues. In: International Cocoa Research Conference, 14, October 12-18, 2003, Accra, Ghana **Proceedings ...** Accra, Ghana: Cocoa Producer Alliance, 2003. p.70-77.
- Melo, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, RS, v.4, p.261-395. 1996.
- Melo, I.S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. (Eds.). **Controle Biológico**. Jaguariúna, SP: Embrapa – CNPMA, 1998. v.1, p.17-68.
- Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v.31, n.3, p.426-428. 1959.
- Miranda, S.; Cruz, H.M. Fighting brown pod rot disease in Bahia. In: Report Cocoa of the London Cocoa Conference, 1953. **Proceedings...** London: Cocoa Chocolate and Confectionery Alliance, 1953. p. 120-122.
- Moraes, I.O.; Capalbo, D.M.F.; Moraes, R.O. Multiplicação de agentes de controle biológico. In: Bettiol, W. (Ed.). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1991. p.253-272.
- Morandi, M.A.B. **Influência de fatores bióticos e abióticos no estabelecimento de *Clonostachys rosea* em tecidos de roseira e controle biológico de *Botrytis cinerea* pelo antagonista em restos culturais**. 2001. 72p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Müller, M.M.; Valjakka, R.; Suokko, A.; Hantula, J. Diversity of endophytic fungi of single Norway spruce needles and their role as pioneer decomposers. **Molecular Ecology**, London, v.10, n.7, p.1801-1810. 2001.
- Narizawa, K.; Tolumasu, S.; Hashiba, T. Supression of clubroot formation in Chinese cabbage by the root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*. **Plant Pathology**, Oxford, v.47, n.2, p.206-210. 1998.

Narisawa, K.; Kawamata, H.; Currah, R.S.; Hashiba, T. Supression of *Verticillium* wilt in egg plant by some fungal root endophytes. **European Journal Plant Pathology**, London. v.108, p.103-109. 2002.

Nyassé, S.; Cilas, C.; Herail, C. Blaha, G. Leaf inoculation as an early screening test for cocoa (*Theobroma cacao* L.) resistance to *Phytophthora* black pod disease. **Crop Protection**, Amsterdam, Netherland, v.14, n.8, p.657-663. 1995.

Nyassé, S. **Etude de la diversite de *Phytophthora megakarya* et caracterization de la resistance du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) a cet agent pathogene**. 1997. 133p. (These) – Institut National Politechnique de Toulouse. Toulouse, France.

Oliveira, M.L. **Studies on the taxonomy, ecology, survival and control of *Phytophthora palmivora*, *P. capsici* and *P. citrophthora* from cacao (*Theobroma cacao* L.) in Brazil**. 1990. 216p. (Tese Ph.D) - University of California, Riverside.

Oliveira, M.L.; Luz, E.D.M.N. **Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil**. Ilhéus, BA, Brasil: CEPLAC/CEPEC/SEFIT, 2005. 132p.

Olmedo-Monfil, V.; Mendoza-Mendoza, A.; Gomes, I.; Cortés, C.; Herrera-Estrella, A. Multiple environmental signals determine the transcriptional activation on the mycoparasitism related gene *prb1* in *Trichoderma artroviride*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.267, p.703-712. 2003.

Orellana, R.G.; Som, R.K. Correlation between low temperature and incidence of *Phytophthora* pod rot of cacao in Ceylon. **FAO Plant Protection Bulletin**, Rome, Italy, v.6, p.6-8. 1957.

Papavizas, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potencial for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, CA, v.23, p.23-54. 1985.

Patterson, D.J. Stramenopila: Chromophytes from a Protistan Perspective. In: Green, J.C.; Leadbeater, B.S.C.; Diver, W.L. (Eds.). **The chromophyte algae: problems and perspectives**. Oxford, United Kingdom: Claredon, 1989. v. 38. p. 357-379.

Paz Junior, F.B.; Menezes, M. Fungos endofíticos em sementes de girassol e diferenciação morfológica e enzimática de espécies de *Fusarium*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.31, n.1, p.87-93. 2005.

Pe'er, S.; Barak, Z.; Yarden, O.; Chet, I. Stability of *Trichoderma harzianum* and S transformants in soil and rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Reading, UK, v.23, p.1043-1046. 1991.

Pereira, J.L. **Alternative strategies for the chemical control of *Phytophthora* pod rot of cocoa in Bahia, Brazil**. 1998. 220p. (Tese Ph.D.) - University of Bristol, Bristol Kingdom.

Piper, S., Martinez, A.; Hidalgo, E.; Krauss, U. Effect of formulation on population dynamics of mycopasites on the surface of cocoa pods. In: INCOPED INTERNATIONAL SEMINAR, 3, 16-17 october, 2000. Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. **Proceedings...** Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia: Cocoa Producer Alliance, 2000. p.21-32.

- Read, D.J. Mycorrhiza – the state of the art. In: Varma A.; Hock, B. (Eds.). **Mycorrhiza**. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1999. p.3-34.
- Redman, R.S.; Freeman, S.; Clifton, D.R.; Morrel, J.; Brown, G.; Rodriguez, R.J. Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic endophytic mutant of *Colletotrichum magna*. **Plant Physiology**, Bethesda, v.119, n.2, p.795-804. 1999.
- Redman, R.S.; Dunigan, D.D.; Rodriguez, R.J. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? **New phytologist**, Oxford, v.151, p.705-716. 2001.
- Rocha, H.M.; Machado, A.D. Fatores ambientais associados com a podridão-parda do cacauero. **Revista Theobroma**, Itabuna, v.2, p.26-34. 1972.
- Rubini, M.R.; Silva-Ribeiro, R.T.; Pomella, A.W.V.; Maki, C.S.; Araújo, W.L.; Santos, D.R.; Azevedo, J.L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease. **International Journal of Biological Sciences**, Bethesda, MD, v.1, p.24-33. 2005.
- Ruiz-Herrera, J. **Fungal cell wall: structure, synthesis and assembly**. Boca Raton, USA: CRC Press, 1992. 333p.
- Saikkonen, K; Faeth, S.H.; Helander, M.; Sullivan, T.J. Fungal endophytes: A continuum of interactions with Host Plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, CA, v.29, p.319-343. 1998.
- Schirmböck M.; Lorito, M.; Wang, Y.L. Hayes, C.K. Arizan-Atac, I.; Scala, F.; Harman, G.; Kubicek C. Parallel formation and sinergism of hidrolitic enzymes and peptabiol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v.60, p.4364-4370. 1994.
- Schultess, F.M. and Faeth, S.H. Distribution, abundances, and associations of the endophytic fungal community of Arizona fescue (*Festuca arizonica*). – **Mycologia**, New York, v.90, p.569-578. 1998.
- Schulz, B.; Rommert, A.K.; Dammann, U.; Aust, H.J.; Strack, D. The endophyte-host interation: a balanced antagonism? **Mycological Research**, Cambridge, v.103, n.10, p.1275-1283. 1999.
- Siegel, M.R.; Latch, G.C.M.; Johnson, M.C. Fungal endophytes of grasses. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.25, p.293-315. 1987.
- Sivan, A.; Chet. I. The posible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. **Phytopathology**, Minnesota, v.79, p.198-203. 1989.

Soberanis, W.; Ríos, R.; Arévalo, E.; Zúniga, L.; Cabezas, O.; Krauss, U. Increased frequency of phytosanitary pod removal in cacao (*Theobroma cacao*) increases yield economically in eastern Peru. **Crop Protection**, Guildford, v.18, p.677-685. 1999.

Souza, A.Q.L.; Souza, A.D.L.; Astolfi Filho, S.; Pinheiro, M.L.B.; Sarquis, M.I.M.; Pereira, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benth. **Acta Amazonica**, Manaus, Amazonas, v.34, n.2, p.185-195. 2004.

Spencer, D.M. Parasitism of carnation rust (*Uromyces dianthi*) by *Verticillium lecanii*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v.74, p.191-194. 1980.

Srivastava, A.K.; De'Fago, G.; Kern, H. Hyperparasitism of *Puccinia horiana* and other microcyclic rust. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v.114, p.73-78. 1985.

**Stefanova, M.; Leiva, A.; Larrinaga, L.; Coronado, M.F. Atividade metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo.** Revista de la Facultad Agronomía, Maracaibo, Venezuela, v.16, p.509-516. 1999.

**Stone, J.K.; Petrini, O. Endophytes of forest trees: a model for fungus-plant interactions.** In: **Caroll, G.C.; Tudzynski, P. (Eds.). The Mycota. V. Plant Relationships. Part B. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1997. p. 129-142.**

Sudo, S. Biocontrole de *Catacauna torrendiella* e *Coccostroma palmicola*, agentes causadores da lixa-preta no coqueiro. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 3, 1989, Piracicaba, SP. **Anais...** Piracicaba, SP: USP/Embrapa, 1989. p.57-59.

Suframa. **Potencialidades regionais estudo de viabilidade econômico: cacau.** Manaus, Amazonas: Suframa, 2003. 18p.

Sundheim, L.; Amundsen, T. Fungicide tolerance in the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* and integrated control of cucumber powdery mildew. **Acta Agriculturae Scandinavica**, London, v.32, p.349-355. 1982.

**Sutton, B.C. The Coelomycetes. Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696p.**

Tarjot, M. Etude de la pourriture des cabosses due au *Phytophthora palmivora* en Côte d'Ivoire. **Café Cacao Thé**, Paris, France, v.11, p.321-330. 1967.

Tarjot, M. Nouvelle contribution a l'étude de la pourriture des cabosses du cacaoyer due au *Phytophthora palmivora* (Butl. ) Bult., em Côte d'Ivoire. **Café Cacao Thé**, Paris, France, v.15, p.31-48. 1971.

Tarjot, M. Physiology of the fungus . In: Gregory, P.H. (Ed.). **Phytophthora Disease of Cacao.** London: Longman, 1974. p.103-116.

- Tunai, B.; Marshal, D.; Royo, C. Antagonistic effect of endophytes against several root-rot pathogens of wheat. 12-14 April, 2000. **Proceedings of a Seminar**, Zaragoza, Spain, 2000. v.40, p.381-386.
- Tyler, B.M. Molecular Basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their host. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.40, p.137-167. 2002.
- UNCTAD. Based on the data from International Cocoa Organization, Quaterly Bulletin of Cocoa Statistics, 2005, <http://r0.unctad.org/infocomm/anglais/cocoa/market.htm>. Acesso: 17-02-2006. 2006.
- Valdebenito-Sanhueza, R.M. Possibilidade de controle biológico de *Phytophthora* em macieira. In: Bettiol, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1991. p.303-305.
- Varma, A.; Verma, S.; Sudha, A.; Sahay, N.; Bütehorn; B.; Franken, P. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p.2741-2744. 1999.
- Vélez, P.E. & Rosillo, A.G. Evaluación del antagonismo del hongo *Verticillium lecanii*, sobre *Hemileia vastatrix*, en condiciones de invernadero y de campo. **Cenicafé**, Chinchiná, Caldas, Colômbia, v.46, p.45-55. 1995.
- Ward, M.R. & Griffin, M.J. Soil phase of cacao *Phytophthora*. In: Gregory, P.H.; Maddison, A.C. (Eds.). **Epidemiology of *Phytophthora* on cocoa in Nigeria**. Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 1981. n.25, p.50-61.
- West, C.P. Physiology and drought tolerance of endophyte-infected grasses. In: Bacon, C.W.; White Jr., J.F. (Eds.). **Biotechnology of Endophytic fungi of Grasses**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994. p. 87-99.
- Wilson, D. Endophyte – the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, Oxford, v.73, p.274-276. 1995.
- Wood, G.A.R. Black pod-meteorological factors. In: Gregory P.H. (Ed.). ***Phytophthora* disease of cocoa**. London: Longman, 1974. p.153-159.
- Wood, G.A.R.; Lass, R.A. **Cocoa**. London: Longman, 1985. 620p.
- Zaurov, D.E., Bonos, S.; Murphy, J.A.; Richardson, M.; Belanger, F.C. Endophyte infection can contribute to aluminum tolerance in fine fescues. **Crop Science**, Madison, v.41, p.1981-1984. 2001.
- Zeilinger, S.; Reithner, B.; Scala, V.; Peissl, I.; Lorito, M.; Mach, R.L. Signal transduction by Tga3, a novel G protein  $\alpha$  subunit of *Trichoderma atroviride*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v.71, n.3, p.1591-1597. 2005.
- Zimand, G.; Elad, Y.; Chet, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. **Phytopathology**, Minnesota, v.86, p.1255-1260. 1996.