



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

MARCOS VINÍCIUS OLIVEIRA DOS SANTOS

***Phytophthora* spp. EM CULTIVOS DIVERSOS NO SUL DA BAHIA E
IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES DE BIOCONTROLE A ESTES PATÓGENOS.**

**ILHÉUS – BAHIA
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARCOS VINÍCIUS OLIVEIRA DOS SANTOS

***Phytophthora* spp. EM CULTIVOS DIVERSOS NO SUL DA BAHIA E
IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES DE BIOCONTROLE A ESTES PATÓGENOS.**

Dissertação apresentada, para obtenção do
título de mestre em Produção Vegetal, à
Universidade Estadual de Santa Cruz.

Área de concentração: Produção Vegetal

Orientadora: Dra. Edna Dora Martins
Newman Luz

Co-orientadores: Dr. José Luiz Bezerra; Dr.
Jorge Teodoro de Souza

**ILHÉUS – BAHIA
2007**

MARCOS VINÍCIUS OLIVEIRA DOS SANTOS

***Phytophthora* spp. EM CULTIVOS DIVERSOS NO SUL DA BAHIA E
IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES DE BIOCONTROLE A ESTES PATÓGENOS.**

Ilhéus, 6 de julho de 2010.

Dra. Edna Dora Martins Newman Luz – CEPLAC/CEPEC
(Orientadora)

Dr. Eduardo Gross – UESC/DCAA

Dr. Hécio Costa – INCAPER

Dra. Stela Dalva Viera Midlej Silva – CEPLAC/CEPEC

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Zuleide e Wenceslau Augusto pelo amor e confiança.

A Dra. Edna Dora, “Mãe”, amiga e orientadora.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por todas as graças recebidas diariamente.

A meus pais, Zuleide Oliveira Santos e Wenceslau Augusto dos Santos; a meus irmãos, Hermes, Vanuza, Wenceslau e Urânia; a meu tio Carlos e a minha tia Antônia; a meus sobrinhos, Tammily, Karem, Diego, Luana, Emerson e Augusto; a Helena, Márcia, Flávio, Vera e a todos os meus familiares pelo apoio e companheirismo.

A minha orientadora Dra. Edna Dora; aos meus co-orientadores Dr. Bezerra e Dr. Jorge Teodoro; a Dr. Stela, a Dr. Karina, pelo auxílio e valiosos ensinamentos.

Aos meus amigos, Cenilda, Denise, Edarcy, Ademilde, Márcia, Dilze, Daniele Cristina, Maria de Lourdes, Virgínia, Ana Rosa, Joel, Maguinaldo, Eduardo Catarino, Clélia, Ananias, João, Kátia, Nadja, Kalúsia, Michelle, Ângela, Marcela, Simone, Larissa, Elisa, Cristiane, Antônio Neto, Silas, Marcos Valiense, Lívia, Leila, Rogério, Chiquinha, Rodrigo, Kaleandra, Nara, Guilherme, Rubens, Vera pela preciosa ajuda e pelo incentivo.

A José Ronaldo, a Jorge Bahia e a toda a equipe do CENEX; as equipes dos setores de Transporte, de Finanças, de Solos, de Fisiologia, de Genética, do Herbário, da Biblioteca do CEPEC; a José Renato e a todos os funcionários do escritório local da CEPLAC de Ituberá; as equipes dos escritórios locais da CEPLAC de Itabuna, Ilhéus e Buerarema pelo auxílio nas diferentes etapas de execução do projeto.

A Simone e a toda equipe da secretaria de agricultura de Itabuna; aos funcionários da EBDA/Itabuna, a Mario, Cinira, Márcia e a toda equipe do Floresta Viva pelo apoio disponibilizado nas coletas.

Aos meus amigos da UESC, Edmée, Emerson, Isabel, Aline, Marília,

Pabliane, Daniel, Thales, Eduardo, Jôsie, Leonardo, Gabriela, Francisvaldo, James e todos os outros; às professoras Maria Aparecida e Norma; a Carol e a toda equipe do curso de Produção Vegetal pela ajuda durante a execução do curso de mestrado.

A professora Arlete e aos professores Quintino e Gil Marcelo pelos esclarecimentos disponibilizados e outras colaborações.

A Valéria, Patrícia, Diego, Mari, aos professores Eduardo Gross, Pedro, Delmira e Larissa e a todos os membros da equipe do Centro de Microscopia Eletrônica-UESC, a Ricardo e a grupo de pesquisa do LAPEM-UEFS pela auxílio e orientação nas atividades desenvolvidas.

Aos produtores rurais que colaboraram com a pesquisa e a todos que contribuíram com a realização deste trabalho

Muito Obrigado...

SUMÁRIO

	Extrato	x
	Abstract	xii
1	INTRODUÇÃO GERAL	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1	O gênero <i>Phytophthora</i>	4
2.2	Espécies de <i>Phytophthora</i> como patógenos de plantas.....	6
2.3	Hospedeiros de <i>Phytophthora</i> na região cacaueteira da Bahia.....	8
2.4	Controle das fitoenfermidades causadas por <i>Phytophthora</i> spp.....	10
2.5	O gênero <i>Trichoderma</i>	12
2.6	O gênero <i>Clonostachys</i>	13
3	CAPÍTULO 1 – Isolamento, caracterização morfofisiológica, molecular e patológica de espécies de <i>Phytophthora</i> obtidas de diversos cultivos no sul da Bahia	15
	Resumo.....	15
	Abstract.....	17
3.1	INTRODUÇÃO	19
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.2.1	Coleta das amostras de <i>Phytophthora</i> spp.....	21
3.2.2	Isolamento de amostras.....	21
3.2.2.1	Isolamento de tecidos vegetais.....	21
3.2.2.2	Isolamento de amostras de solo.....	22
3.2.3	Identificação dos isolados de <i>Phytophthora</i> spp.....	22
3.2.3.1	Caracterização morfológica.....	22
3.2.3.1.2	Análise em substratos.....	22
3.2.3.2	Caracterização fisiológica.....	23
3.2.3.2.1	Teste de temperaturas cardinais.....	23
3.2.3.2.2	Técnica do Extrato de solo não estéril para obtenção de esporulação.....	23
3.2.3.3	Teste de compatibilidade sexual.....	24
3.2.3.4	Caracterização molecular.....	24
3.2.3.4.1	Extração de DNA.....	24
3.2.3.4.2	Seqüenciamento da região ITS.....	25
3.2.4	Teste de patogenicidade.....	26
3.2.5	Processamento de amostras em Microscopia Eletrônica de Varredura.....	27

3.3	RESULTADOS	27
3.3.1	Isolados obtidos.....	27
3.3.1.1	<i>Phytophthora nicotianae</i> Breda de Haan.....	30
3.3.1.2	<i>Phytophthora palmivora</i> (Butler) Butler.....	32
3.3.1.3	<i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands.....	34
3.3.1.4	<i>Phytophthora cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i> Kröber e Marwitz.....	36
3.3.1.5	<i>Phytophthora</i> sp.....	37
3.3.1.6	<i>Phytophthora bisheria</i> Abad, Abad e Louws.....	38
3.3.1.7	Caracterização molecular.....	44
3.4	DISCUSSÃO	46
4	CAPÍTULO 2 – Isolamento e identificação de agentes biocontroladores de <i>Phytophthora</i> spp. no sul da Bahia	55
	Resumo.....	55
	Abstract.....	57
4.1	INTRODUÇÃO	59
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	60
4.2.1	Isolamento dos possíveis agentes biocontroladores.....	60
4.2.1.1	Coleta das amostras.....	60
4.2.1.2	Método de isolamento direto.....	61
4.2.1.3	Método de isolamento indireto.....	61
4.2.2	Identificação dos possíveis antagonistas.....	61
4.2.2.1	Análise das colônias e mensurações de estruturas fúngicas.....	61
4.2.2.2	Teste de temperaturas.....	62
4.2.3	Confrontos <i>in vitro</i>	62
4.2.3.1	Confrontos entre <i>Phytophthora</i> e BCAs (método 1).....	62
4.2.3.2	Confrontos entre <i>Phytophthora</i> e BCAs (métodos 2).....	63
4.2.4	Processamento de amostras em Microscopia Eletrônica de Varredura.....	63
4.3	RESULTADOS	64
4.3.1	Caracterização morfofisiológica dos isolados obtidos.....	64
4.3.1.1	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai.....	65
4.3.1.2	<i>Trichoderma virens</i> (Miller, Giddens e Foster) Arx.....	67
4.3.1.3	<i>Trichoderma atroviride</i> P. Karst.....	67
4.3.1.4	<i>Clonostachys compactiuscula</i> (Saccardo) Hawksworth e Gams.....	68
4.3.2	Confrontos <i>in vitro</i> entre isolados de <i>Phytophthora</i> spp. e BCAs.....	68

4.3.2.1	<i>Phytophthora</i> spp. x <i>Trichoderma</i> spp.....	68
4.3.2.2	<i>Phytophthora</i> spp. x <i>Clonostachys compactiuscula</i>	70
4.3.3	Histopatologia da interação <i>Phytophthora</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp. utilizando microscopia eletrônica de varredura.....	71
4.4	DISCUSSÃO	73
5	CONCLUSÕES GERAIS	77
	REFERÊNCIAS	80
	ANEXO 1	91

***Phytophthora* spp. EM CULTIVOS DIVERSOS NO SUL DA BAHIA E IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES DE BIOCONTROLE A ESTES PATÓGENOS.**

EXTRATO

A região cacauera do sul da Bahia é considerada um dos principais centros de endemismo do bioma Mata Atlântica, apresentando um dos recordes mundiais em diversidade de plantas arbóreas e riqueza biológica. A principal base da economia da região sul da Bahia ainda é a cultura do cacauero, porém em função da crise econômica desta, vários cultivos foram introduzidos, aproveitando as condições favoráveis de solo e clima que a região desfruta. No entanto, as condições climáticas que beneficiam a exploração agrícola tropical também favorecem a ocorrência de doenças, principalmente aquelas causadas por fitopatógenos do gênero *Phytophthora* que são polípagos e cosmopolitas. O presente trabalho teve como objetivos: i) Isolar, identificar e comprovar a patogenicidade das espécies de *Phytophthora* diagnosticadas em cultivos anuais (abacaxi, feijão e mandioca), olerícolas, plantas ornamentais e medicinais cultivadas em assentamentos rurais e propriedades agrícolas direcionadas a agricultura familiar na região sul da Bahia; ii) isolar, identificar e selecionar possíveis agentes biocontroladores endêmicos a estes cultivos para o controle das doenças causadas por *Phytophthora* spp. Foram realizadas 17 coletas entre junho e outubro de 2008 e janeiro e junho de 2009 em oito municípios da região procedendo-se ao isolamento em meio seletivo PARPH de tecidos vegetais e do solo da rizosfera de plantas doentes. Os isolados de *Phytophthora* encontrados foram identificados por critérios morfológicos, fisiológicos e moleculares (seqüenciamento da região ITS do rDNA) e foram inoculados nos hospedeiros de origem. Obteve-se 81 isolados identificados

como *P. nicotianae* (52), *P. palmivora* (17), *P. cinnamomi* (6), *P. cinnamomi* var. *parvispora* (3) e *P. bisheria*. Todos os isolados foram patogênicos aos respectivos cultivos de origem. Este é o primeiro relato de *P. cinnamomi* var. *parvispora* e *P. bisheria* no Brasil e também do isolamento de *P. nicotianae* em agrião, espinafre, hortelã e dracena baby; de *P. palmivora* em couve e bananeira ornamental e de *P. cinnamomi* em *Heliconia bihai* I, bastão-do-imperador, cebolinha e alface. Em busca de métodos de controle de doenças eficientes e menos prejudiciais ao ecossistema foram coletadas amostras de tecidos vegetais e de solo em áreas que apresentavam plantas com sintomas de doenças e as espécies fúngicas foram isoladas e identificadas por critérios morfofisiológicos. Quatro isolados de *Trichoderma* foram obtidos e identificados como: *T. harzianum* (2), *T. virens* (1), *T. atroviride* (1) e um como *Clonostachys compactiuscula*. Os isolados com potencial para biocontrole foram confrontados *in vitro* com isolados de *P. nicotianae* (3), *P. palmivora* (2), *P. bisheria* (1) e *P. cinnamomi* (1). Todos os agentes biocontroladores reduziram significativamente ($P < 0,05$) o raio médio das colônias dos fitopatógenos e demonstraram antagonismo às quatro espécies de *Phytophthora*, através da competição por interferência. Nos confrontos entre *Trichoderma* spp. e *Phytophthora* spp. verificou-se substituição, impasse, entrelaçamento de hifas e hiperparasitismo. O isolado de *C. compactiuscula* exerceu antibiose às colônias de *Phytophthora*. Ensaio futuros em condições controladas e campo serão necessários para comprovar o potencial dos BCAs. Os resultados obtidos neste trabalho representam importante contribuição à agricultura familiar na região.

Palavras-chave: *Phytophthora* spp.; Oomicetos; taxonomia; gama de hospedeiros; controle biológico; micoparasitas; *Trichoderma* spp; *Clonostachys compactiuscula*.

***Phytophthora* spp. FROM DIFFERENT CROPS IN SOUTH OF BAHIA AND IDENTIFICATION OF BIOCONTROL AGENTS TO THESE PATHOGENS.**

ABSTRACT

The cocoa growing region of south Bahia is considered a major center of endemism in the Atlantic Forest biome, showing one of the world records in woody plant diversity and biological richness. The main base of the south Bahia economy is still the cacao culture, although due to the economic crisis of this crop, various other crops were introduced to benefit of this region favorable conditions of soils and climate. However, these climatic conditions also favor the occurrence of plant diseases, especially those caused by pathogens of the genus *Phytophthora* that are polyphagous and cosmopolitan. The objectives of these work were: i) to isolate, to identify and to confirm the pathogenicity of *Phytophthora* species diagnosed in annual crops (pineapple, beans and cassava), vegetables, ornamental and medicinal plants cultivated on rural settlements and farms practicing familial agriculture in southern Bahia; ii) to isolate, to identify and to select potential biocontrol agents endemic to these crops for the control of diseases caused by *Phytophthora* spp. To achieve the first objective 17 surveys were conducted between June and October 2008 and January and June 2009 in eight districts of the region. Plant tissues and soil from the rhizosphere of diseased plants were isolated in selective medium PARPH. The *Phytophthora* isolates found were identified by morphological, physiological and molecular (sequencing of ITS region of rDNA) criteria and were inoculated onto hosts of origin. Eighty-one isolates were obtained from various crops, in the municipalities of Itabuna, Ilhéus, Itacaré, Ituberá, Uruçuca and in the Serra Grande district, which were identified as *P. nicotianae* (52), *P. palmivora* (17), *P.*

cinnamomi (6), *P. cinnamomi* var. *parvispora* (3) and *P. bisheria* (1), 73 from the rhizosphere soil and eight from plant tissues. Two isolates from injured anthurium flower were not identified to species level, requiring sequencing of a larger number of genes. All isolates were pathogenic to the origin cultures. This is the first report of *P. cinnamomi* var. *parvispora* and *P. bisheria* in Brazil and also of the isolation, from the rhizosphere or plant tissues of infected plants, of *P. nicotianae* in watercress, spinach, mint and dracena baby; of *P. palmivora* in cabbage and ornamental banana plant and of *P. cinnamomi* in *Heliconia bihai*, torch ginger, welsh onion and lettuce. To search for methods to control Phytophthora diseases more efficient and less harmful to the ecosystem, samples were collected from soil and plants showing disease symptoms. Fungal species were isolated through direct and indirect methods and identified by morphophysiological criteria. The isolates with biocontrol potential were confronted *in vitro* with isolates of *P. nicotianae* (3), *P. palmivora* (2), *P. bisheria* (1) and *P. cinnamomi* (1), and the average radius of the confronted cultures and controls were compared by Tukey test ($P < 0.05$) using the SAS program. The type of antagonistic reaction of each confront was also evaluated. Four isolates of *Trichoderma* were obtained and identified as *T. harzianum* (2), *T. virens* (1), *T. atroviride* (1) and one as *Clonostachys compactiuscula*. All biocontrol agents reduced significantly the average radius of the pathogens colonies and showed antagonism to the four species of *Phytophthora*. The antagonistic reactions of *Trichoderma* spp. to *Phytophthora* spp. were by substitution, deadlock or intertwining of hyphae, and hyperparasitism. The *C. compactiuscula* isolate exerted antibiosis to the colonies of *Phytophthora*. Future tests under greenhouse and field conditions will be necessary to demonstrate the potential of these BCAs. The results obtained in this work have important mean to the familial agriculture in this region.

Keywords: *Phytophthora* spp.; Oomycetos; taxonomy; hosts range; biological control; micoparasites; *Trichoderma* spp; *Clonostachys compactiuscula*.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A região cacaeira do sul da Bahia compreende 89 municípios e cerca de 90.000 km² cuja formação vegetal primária predominante era de floresta ombrófila densa (LOBÃO et al., 2009). Apresenta clima do tipo Af, floresta tropical quente e úmida sem estação seca, com precipitação anual superior a 1.300 mm, distribuída ao longo do ano – classificação de Köppen. O solo predominante na região é o Latossolo Amarelo distrófico típico (SANTANA et al., 2002), oriundo de rochas intermediárias e básicas, fértil e com boa retenção de água (SILVA et al., 1975). Esta região é considerada um dos principais centros de endemismo do bioma Mata Atlântica. A floresta próxima ao Parque Estadual da Serra do Condurú apresentou um dos recordes mundiais em diversidade de plantas arbóreas, dando-nos a dimensão do que a região representa para o planeta em termos de riqueza biológica e grau de endemismo (MYERS et al., 2000).

A principal base da economia da região sul da Bahia ainda é a cultura do cacaeiro, que se constituiu em importante aliada da preservação da Mata Atlântica, principalmente pelo sistema de cultivo cabruca (raleamento da mata para plantio do cacaeiro) que permitiu a preservação de espécies arbóreas, contribuindo para manter conexão entre os fragmentos florestais remanescentes na região cacaeira (LOBÃO et al., 2009).

Em função dos solos bons para agricultura e do clima favorável, vários cultivos foram introduzidos da região amazônica, como a seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg), o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex. Spreng) Schum.), a pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) entre outras fruteiras e cultivos de relevância econômica. No entanto, embora o clima favoreça a exploração agrícola tropical também favorece a ocorrência de doenças, principalmente aquelas causadas por fungos que requerem temperaturas em torno de 25 °C e umidade relativa alta, freqüentes na região o ano todo. Entre os principais

patógenos encontram-se espécies do gênero *Phytophthora* que pertence ao filo oomycota. Este filo atualmente está no reino Straminipila, enquanto os fungos verdadeiros constituem o reino Fungi (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Estes fitopatógenos são polívoros, cosmopolitas e causam diferentes manifestações de doenças como tombamento, podridão de raízes, cancos, necrose e queima foliar (LUZ et al, 2001). Diversas espécies vegetais são hospedeiras de *Phytophthora spp.*, muitas das quais possuem grande importância econômica, como os citros (*Citrus spp.*), o mamoeiro (*Carica papaya* L.), a acácia-negra (*Acacia mearnsii* de Wild), a batata-inglesa (*Solanum tuberosum* L.), a seringueira, o cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.), entre outros. Também são hospedeiras espécies de importância ecológica no ecossistema como *Parinari alvimii* Prance, *Manilkara maxima* T. D Penn. e *Harleyodendron unifoliolatum* R. S. Cowan, endêmicas ao bioma Mata Atlântica sul baiana (MAGALHÃES, 2009).

Após a crise econômica causada por diversos fatores, inclusive pela doença conhecida como vassoura-de-bruxa que provocou severas perdas no monocultivo do cacauzeiro (ALBUQUERQUE et al., 2005), o cenário agrícola da região sudeste da Bahia passou a considerar a diversificação de cultivos. Ampliaram-se as áreas cultivadas com espécies frutíferas, visando à indústria de polpas e doces; de palmiteiros, principalmente a pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth), para extração e industrialização do palmito, como também de cultivos anuais como: a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), o abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.), bem como de diversas espécies de plantas ornamentais, oléricas e medicinais. Muitas dessas culturas são hospedeiras de *Phytophthora* e cultivos como os do mamoeiro e da pupunheira são severamente afetados por *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler, que também é um dos principais patógenos envolvidos no complexo de espécies deste gênero que causam a podridão-parda do cacauzeiro (CAMPELLO; LUZ, 1981) e ainda a requeima da seringueira (SANTOS et al., 1989).

A diversificação de cultivos tem sido mais acentuada em pequenas propriedades de agricultura familiar e em áreas de assentamentos rurais que estão em expansão em função dos programas governamentais. Estes agricultores muitas vezes não têm acesso ao diagnóstico de doenças e necessitam também de métodos de controle das mesmas, que sejam acessíveis ao tipo de agricultura a que se

dedicam, não podendo usar produtos químicos em função do custo dos mesmos e também para não inviabilizar a produção orgânica que normalmente praticam.

Visando justamente solucionar em parte este problema, principalmente no que diz respeito às doenças causadas por *Phytophthora* spp., idealizou-se esta pesquisa. Assim, o presente trabalho teve os seguintes objetivos: i) Isolar, identificar e comprovar a patogenicidade das espécies de *Phytophthora* diagnosticadas em cultivos anuais (abacaxi, feijão e mandioca), olerícolas, plantas ornamentais e medicinais cultivadas em assentamentos rurais e propriedades com o perfil da agricultura familiar na região sul da Bahia; ii) isolar, identificar e selecionar possíveis agentes biocontroladores endêmicos a estes cultivos visando o controle das doenças causadas por *Phytophthora* spp. de forma acessível aos produtores e ao tipo de agricultura que praticam.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Phytophthora*

O gênero *Phytophthora* (“destruidor de plantas”), foi estabelecido por Anton de Bary em 1876 ao descrever *P. infestans* (Mont.) de Bary como o agente responsável por devastações nos batatais irlandeses, principal fonte alimentícia da população, em consequência deste fato houve a morte de aproximadamente um milhão de irlandeses e a imigração de um milhão e meio de indivíduos da Irlanda para a América do Norte, entre os anos de 1845 e 1846 (LUZ; MATSUOKA, 2001).

Espécies do gênero *Phytophthora* (Reino Straminipila, Filo Oomycota, Classe Oomycetes, Ordem Pythiales, Família Pythiaceae), assim como diversos outros Oomicetos são também conhecidos como pseudofungos possuindo características que os distinguem dos fungos verdadeiros como: parede celular composta de celulose, micélio diplóide na maior parte do ciclo de vida, presença de centríolos, produção de esporos biflagelados tendo pêlos em um dos flagelos, diferenças nas seqüências de DNA, entre outras (ALEXOPOULOS et al., 1996; SCHUMANN; D' ARCY, 2006). No entanto, apesar disso, apresentam certas semelhanças com os fungos verdadeiros como: ausência de pigmentos fotossintéticos, crescimento filamentosos, são microrganismos heterotróficos e reproduzem-se através de esporos sexuais e assexuais (SCHUMANN; D' ARCY, 2006; SILVEIRA, 1995).

Diversas características morfológicas, fisiológicas e moleculares são utilizadas para classificação das espécies de *Phytophthora*. Entre os critérios morfológicos, várias estruturas são analisadas. Os esporângios, corpos de frutificação, variam bastante entre as espécies quanto às dimensões, formas e a caducidade; o esporangióforo pode ser irregularmente ramificado, não ramificado, em simpódio simples, em simpódio composto ou umbelado e, em algumas espécies, há a formação (proliferação) interna de novos esporângios; os clamidósporos,

esporos de resistência, geralmente são esféricos possuindo variações quanto à espessura da parede, a inserção na hifa (terminais, laterais, intercalares ou sésseis) e há espécies que não os produzem. Quanto à sexualidade, *Phytophthora* spp. são classificadas em homotáticas (autoférteis) ou heterotáticas (apresentando tipo compatível A1 ou A2); os oósporos (esporos sexuais) variam quanto às dimensões, a espessura da parede e a ornamentação desta; os anterídeos (gametângios masculinos) diferenciam-se pela forma e dimensões, sendo paráginos, anfígenos e em algumas espécies ambos os tipos são formados, também podem ser uni e/ou bicelulares; os oogônios (gametângios femininos) apresentam formas e dimensões variadas entre as espécies e possuem ou não ornamentação na parede.

Com relação à fisiologia das espécies de *Phytophthora* diferentes critérios são avaliados como: as temperaturas cardinais mínima, ótima e máxima para crescimento e esporulação em meio de cultura; a liberação de zoósporos (esporos assexuais) que pode ser abundante ou esparsa; a produção de pigmento em meio de caseína hidrolisada e tirosina; a presença ou não de crescimento em meio com a adição de verde malaquita; o aspecto das colônias em meio de cultura (formas: petalóide, estrelar, roseta, irregular, zonada, concêntrica, e o aspecto do micélio aéreo: ralo, farináceo, cotonoso, floculoso); o aspecto do micélio através da presença ou ausência de hifas intumescidas de forma simples, catenulada, torulosa, em clusters ou irregulares (LUZ, 2006).

A caracterização molecular com base nas diferenças das sequências do DNA ribossomal é bastante utilizada na atualidade (LUZ et al., 2008). Presentemente as espécies de *Phytophthora* são identificadas com base nos critérios morfofisiológicos e moleculares (ABAD et al., 2008).

Entre as estruturas formadas por *Phytophthora* spp. destacam-se os zoósporos, esporos biflagelados, que possuem grande importância na disseminação do patógeno quando na presença de umidade e temperatura favoráveis. Os oósporos também são importantes, pois possibilitam a ocorrência de recombinações genéticas e a formação de híbridos intra ou interespecíficos entre indivíduos geneticamente compatíveis. As paredes grossas presentes nesses esporos sexuais, assim como nos clamidósporos, lhes proporcionam grande resistência às condições ambientais adversas (LUZ; MATSUOKA, 2001).

2.2 Espécies de *Phytophthora* como patógenos de plantas

Mais de 70 espécies fitopatogênicas estão inseridas no gênero *Phytophthora* (SCHENA et al., 2008) e muitas dessas são assinaladas entre os principais fitopatógenos de diversos cultivos economicamente importantes ou não. Várias espécies do gênero são cosmopolitas e polífagas, apresentando-se como patógenos altamente destrutivos podendo infectar todos ou somente alguns órgãos específicos das plantas hospedeiras. Entre as diferentes manifestações de doenças pode-se citar: damping-off, podridões radiculares, do colo, de frutos, lesões foliares, murcha da parte aérea e gomoses (BERGAMIN FILHO et al., 1995).

Existem muitas espécies de plantas catalogadas como hospedeiras de uma ou mais espécies de *Phytophthora*, incluindo-se espécies florestais como carvalho (*Quercus* sp.), pinheiro (*Pinus* sp.), eucalipto (*Eucalyptus* sp.), cultivos agrícolas perenes, tendo como exemplo as plantas cítricas (*Citrus* spp.), o cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.), a seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg) e cultivos anuais como o mamoeiro (*Carica papaya* L.), a batata-inglesa (*Solanum tuberosum* L.) e o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.). Diversas espécies de plantas ornamentais e medicinais também compõem a ampla lista de hospedeiros das espécies de *Phytophthora*, que em sua maioria, além de serem patógenos cosmopolitas são altamente destrutivos, tendo como exemplo *P. ramorum* Werres, De Cock e Man in 't Veld que por ser uma potencial ameaça a flora européia, e por sua causa uma legislação emergencial teve que ser introduzida em novembro de 2002 na Europa (BEALES et al., 2004).

Diversos patossistemas envolvendo *Phytophthora* spp. foram e estão sendo descritos em todo o mundo. Podem-se citar as diferentes espécies de *Phytophthora* que estão associadas ao declínio de florestas de carvalho no continente europeu e na América do Norte (BALCÌ; HALMSCHLAGER, 2003; ROBIN et al., 2001). Possivelmente o declínio possui causa multifatorial em que fatores abióticos e bióticos estão envolvidos, dentre os últimos destacam-se as diferentes espécies de *Phytophthora*, muitas vezes associadas a danos no sistema radicular das plantas.

A gomose dos citros ocorre em todas as regiões produtoras de citros do mundo. No Brasil constitui-se numa das principais doenças da cultura, principalmente em plantios novos (FEICHTENBERGER, 2001). Esta doença afeta as diversas regiões do mundo produtoras de citros e muitas espécies de *Phytophthora*

estão envolvidas, sendo *P. nicotianae* Breda de Haan e *P. citrophthora* (Sm. e Sm.) Leonian as mais importantes e disseminadas. Segundo Viana et al. (2004), *P. nicotianae* é o principal agente causal da gomose no Brasil.

A gomose de *Phytophthora* da acácia-negra (*Acacia mearnsii* de Wild), cujos agentes etiológicos são *P. nicotianae* e *P. boehmeriae* Sawada é considerada o principal problema fitossanitário dessa espécie florestal de importância econômica (SANTOS; LUZ, 2006), e causa perdas severas na produção nas principais regiões produtoras do Brasil, da África do Sul e dos países asiáticos (SANTOS, 2001).

Freqüentemente são divulgados relatos sobre novos hospedeiros de *Phytophthora*, tendo como exemplos: o primeiro registro de *P. nicotianae* causando a necrose em bulbos de lírio da paz (*Spathiphyllum wallisi* Regel) no Brasil (FISCHER et al., 2004); o primeiro relato da podridão de frutos de abacate (*Persea americana* Mill.) causados por *P. cactorum* (Lebert e Cohn) Srhroter na Espanha (LÓPEZ-HERRERA et al., 2005); o primeiro relato mundial de *P. tropicalis* Aragaki e Uchida infectando folhas de fruta-pão (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) no Brasil (CERQUEIRA et al., 2006); o primeiro registro de *P. nicotianae* causando danos em *Dendrobium candidum* (erva da tradicional medicina chinesa) na China (ZHANG et al., 2008). Também tem sido descritas com certa freqüência, nos últimos anos, novas espécies como *P. bisheria* Abad, Abad e Louws diagnosticada como o agente causal da podridão de raízes em morango, roseira e framboesa nos respectivos locais: norte da Califórnia (EUA), nos Países Baixos e na Austrália (ABAD et al., 2008). *Phytophthora siskiyouensis* Reeser e Hansen, espécie descrita recentemente, foi primeiramente diagnosticada em corpos hídricos e no solo de ecossistemas naturais em Oregon, posteriormente, foram obtidos isolados a partir de cancos em *Lithocarpus densiflorus* (Hook. e Arn.) Rehd. e de tecidos necrosados de *Umbellularia californica* (Hook. e Arn.) Nutt. (REESER et al., 2007).

No Chile em meados da 1ª década de 2000 apareceu uma nova doença em uma espécie de pinheiro (*Pinus radiata* D. Don) denominada dano foliar do pinheiro que tem se disseminado rapidamente ameaçando esta espécie de *Pinus*, cujas plantações naquele país (1,5 milhões de ha) representam mais de um terço da área total plantada com esta espécie no mundo, e formam a base da mais importante atividade industrial do Chile. Em 2008 foi descoberto o agente etiológico da doença e descrita uma nova espécie *Phytophthora pinifolia* sp. nov. (DURÁN et al., 2008).

No Brasil diferentes espécies de *Phytophthora* são patógenos de diversos cultivos rentáveis, havendo relatos de sua ocorrência em todas as regiões do país (LUZ; MATSUOKA, 2001). Algumas espécies ocorrem em hospedeiros e localidades específicas como *P. infestans*, outras estão mais disseminadas e ocorrem em diferentes regiões do país como *P. palmivora* (Butler) Butler e *P. nicotianae*, esta última espécie está amplamente disseminada no mundo e particularmente no Brasil, onde é o fitopatógeno do gênero *Phytophthora* que possui o maior número de hospedeiros (31) conforme Luz (2006).

2.3 Hospedeiros de *Phytophthora* na região cacaeira da Bahia

A região sul da Bahia apresenta clima quente e úmido, propiciando o desenvolvimento de doenças em espécies vegetais cultivadas ou não, principalmente as fitomoléstias causadas por *Phytophthora*. Diferentes patossistemas foram e estão sendo estudados no sul da Bahia, envolvendo *Phytophthora* e espécies vegetais de importância econômica como o cacaeiro, o mamoeiro, a pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) e a seringueira.

No cacaeiro *Phytophthora* spp. causam a podridão-parda e o cancro, entre outras doenças, particularmente na região sul da Bahia, *P. capsici* Leonian, *P. palmivora* e *P. citrophthora* são as espécies mais frequentes, sendo a última a mais agressiva a este hospedeiro (OLIVEIRA; LUZ, 2005), ocasionalmente registra-se a ocorrência de *P. hevea*. A podridão-parda dos frutos do cacaeiro é a principal doença da cultura, considerando a sua ocorrência em todos os países produtores (FALEIRO et al., 2004). *Phytophthora palmivora* causa também a podridão-das-raízes e dos frutos do mamoeiro, considerada como uma das mais importantes doenças da cultura, (OLIVEIRA et al., 1999; SILVA; DOIHARA, 2003), prejudicando a produção da fruta em diferentes localidades produtoras no sul da Bahia. A pupunheira, cultivo que está despontando economicamente na região, sofre sérios danos devido a podridão-do-estipe, também causada por *P. palmivora* (SANTOS et al., 2004). A seringueira, muito cultivada no sul da Bahia, em monocultivo ou consorciada com outras espécies apresenta doenças como a requeima, a queda-anormal-das-folhas, além do cancro do painel causadas por *Phytophthora* spp. que diminuem a rentabilidade do cultivo em certas épocas do ano (GASPAROTTO et al., 1997).

Com a substituição do monocultivo do cacauzeiro, devido a fatores ambientais (fitopatológicos, climáticos) e econômicos, muitas áreas nas fazendas que não eram muito adequadas ao plantio do cacauzeiro, foram destinadas a diversificação de cultivos agrícolas, e assim a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), o abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.), olerícolas, plantas ornamentais e medicinais, especiarias, entre outros passaram a ter espaço na economia agrícola da região cacauzeira. Cultivos anuais como o abacaxizeiro e a mandioca são hospedeiros de *Phytophthora*, nestas espécies ocorrem as doenças: podridão-do-olho do abacaxizeiro (MATOS; SANTOS FILHO, 2001), e a podridão mole das raízes da mandioca (POLTRONIERI et al., 2001). Além disso, o feijoeiro também é catalogado como hospedeiro de *Phytophthora*, embora nenhuma dessas doenças tenha sido assinalada na região cacauzeira baiana.

Em assentamentos rurais e propriedades direcionadas a agricultura familiar no sul da Bahia é muito comum o cultivo de olerícolas, como a berinjela (*Solanum melongena* L.), o jiló (*Solanum gilo* Raddi), a abóbora (*Cucurbita moschata* Duch) e o coentro (*Coriandrum sativum* L.), todas estas espécies passíveis de serem atacadas por *Phytophthora* spp., por serem assinaladas como hospedeiras em outras regiões. No entanto, até 2008, não haviam registros de infecções causadas por estes fitopatógenos nesses cultivos agrícolas, possivelmente porque muitos produtores rurais não tinham acesso ao diagnóstico fitopatológico. Também nessas propriedades rurais são cultivadas as plantas medicinais, algumas suscetíveis a injúrias causadas por *Phytophthora* spp. Estes cultivos podem ainda servir como fonte de inóculo do patógeno, para outras culturas. Recentemente foi diagnosticada *P. nicotianae* em folha-da-costa (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.) causando lesões foliares no município de Itajuípe-BA (LUZ, comunicação pessoal).

O cultivo de flores tropicais e de plantas ornamentais no sul da Bahia está em expansão, com diversas espécies sendo comercializadas. Em antúrio, foi diagnosticada podridão das folhas e inflorescências causadas por *P. citrophthora* em um viveiro no município de Ituberá (PAIM et al., 2006). Outras espécies de flores presentes na região podem ser hospedeiras de *Phytophthora* spp., embora sem assinalamento na região. Do mesmo modo que as flores, outras plantas ornamentais são suscetíveis a *Phytophthora* spp. e é preciso conhecer os agentes causais para poder controlar as doenças e evitar perdas futuras, levando-se em consideração o potencial de *Phytophthora* spp. como patógenos.

2.4 Controle das fitoenfermidades causadas por *Phytophthora* spp.

O controle das fitoenfermidades ocasionadas por *Phytophthora* spp. compreende o uso de produtos químicos (fungicidas), medidas culturais, escolha do porta-enxerto, desinfestação de solos para produção de mudas, dentre outros (MAY-DE MIO et al., 2002). Fungicidas são bastante utilizados no controle de doenças causadas por *Phytophthora* spp. e apesar de apresentarem eficiência, o seu uso exclusivo pode ser considerado restrito quando são mencionadas questões como forma de aplicação inadequada, impacto ambiental e o surgimento de raças resistentes de patógenos (TÓFOLI et al., 2005).

Em cultivos de tomateiro, nos quais epidemias de requeima, provocadas por *P. infestans*, causam perdas significativas de produção, os produtores dispõem expressiva parcela do custo de produção com seu controle. Do ponto de vista populacional, a seleção e a recombinação são mecanismos evolutivos que têm implicações para o manejo da requeima por interferirem na predominância de indivíduos resistentes a fungicidas. A pressão de seleção exercida por fungicidas específicos contribui para o estabelecimento de populações resistentes (REIS et al., 2006).

Existem diversas medidas de controle que podem ser utilizadas como alternativa ou conjuntamente ao controle químico, destacando-se dentre estas o controle biológico. De acordo com Schumann e D'Arcy (2006), de forma similar aos produtos químicos, o controle biológico também pode ser usado na proteção das plantas contra infecções ou na erradicação do inóculo primário.

Conforme Blum (2006), de forma simplificada, os mecanismos envolvidos no controle biológico de doenças de plantas são o antagonismo, a indução de resistência e a proteção cruzada. Apesar da subdivisão dos mecanismos, um antagonista pode agir através de um ou mais desses. A atuação por mecanismos múltiplos é altamente desejada para um agente de biocontrole por ampliar as chances de sucesso do controle biológico (BETTIOL; GHINI, 1995).

A antibiose é definida como a interação entre organismos na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm efeito danoso sobre o outro. A competição refere-se à interação entre dois ou mais organismos, que competem por alimento, espaço e oxigênio. Quanto ao termo para definir o parasitismo é usado à situação em que um microrganismo vive sobre e alimenta-se do outro; enquanto o

hiperparasitismo é o tipo de interação em que os hiperparasitas atacam hifas e estruturas de reprodução e sobrevivência dos fitopatógenos, reduzindo a infecção e o inóculo do patógeno. A predação ocorre quando os predadores obtêm seu alimento a partir dos patógenos e de várias outras fontes; o último dos mecanismos segundo (BETTIOL; GHINI, 1995) a hipovirulência que diz respeito à introdução de uma linhagem do patógeno menos agressiva ou não patogênica, capaz de transmitir esta característica às linhagens patogênicas.

De acordo com Blum (2006) há diferença entre indução de resistência e proteção cruzada. No mecanismo de indução de resistência o agente de controle biológico previamente inoculado induz a planta a se defender contra o patógeno, através do estímulo a produção de enzimas, fitoalexinas, fenóis e barreiras morfológicas. Com relação a proteção cruzada, o organismo de controle biológico previamente inoculado na planta age diretamente sobre o patógeno, através de antagonismo direto por um ou mais mecanismos (antibiose, competição ou hiperparasitismo).

A eficácia do controle biológico de fitopatógenos depende da interação recíproca entre o agente de controle biológico, o fitopatógeno, a planta e os fatores ambientais. Os organismos com potencial para uso em controle biológico podem ser encontrados entre espécimes dos fungos, bactérias, nematóides e vírus. Porém, entre os fungos e bactérias é que são encontrados agentes biocontroladores com maior possibilidade de multiplicação em massa e de formulação de um produto para uso comercial.

Segundo Schumann e D' Arcy (2006) o uso bem sucedido de um agente biocontrolador para proteção de plantas depende dos seguintes fatores: 1) **fonte do controle**: organismos isolados das superfícies de plantas são mais prováveis de serem bem sucedidos porque eles são adaptados ao ambiente no qual deverão ser efetivos. Tais microrganismos são descritos como filoplano-competente ou rizosfera-competente; 2) **a aplicação correta de isolados específicos**: provavelmente a alta população do agente biocontrolador introduzido no ambiente não será mantida por longos períodos. As interações microbianas naturais resultarão no rápido balanceamento da população. Neste caso o uso do sistema de previsão de doenças poderá ajudar a determinar a época específica em que a proteção é requerida. Provavelmente, repetidas aplicações dos agentes biocontroladores poderão ser necessárias para manter a alta população requerida para garantir a eficácia do

controle; 3) **formulações**: estas devem permitir que os organismos biocontroladores sejam armazenados de forma conveniente e que tornem-se ativos prontamente em contato com a água de aplicação e os compostos adicionais; 4) **manuseio seguro**: populações de microrganismos concentrados tem seus próprios riscos potenciais portanto devem ser manuseados cautelosamente; 5) **informação confiável**: diferentes experimentos em laboratório, casa de vegetação e campo devem ser realizados para determinar com segurança quais as condições de campo, do ambiente e as espécies de plantas nas quais os produtos poderão ser utilizados.

Entre os fungos utilizados como agentes biocontroladores (BCAs) pode-se citar *Penicillium*, *Verticillium*, *Trichoderma* e *Clonostachys*. Espécies dos dois últimos gêneros são bastante utilizadas em experimentos e em aplicações práticas.

Diferentes produtos desenvolvidos a partir de isolados de *Trichoderma* são comercializados no exterior e têm como uns dos patógenos alvos espécies dos gêneros *Phytophthora* e *Pythium*. Estes produtos são utilizados incorporando-os ao solo ou através de pulverização no hospedeiro (BLUM, 2006).

2.5 O gênero *Trichoderma*

Espécies do gênero *Trichoderma*, formas anamórficas de *Hypocrea*, pertencem ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Ascomycetes, Ordem Hypocreales, Família Hypocreaceae.

Segundo a descrição de Samuels et al. (<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>), os conidióforos de *Trichoderma* spp. são bastante ramificados e por isso de difícil definição ou mensuração, soltos ou compactados em forma de tufo, freqüentemente formados em anéis concêntricos distintos ou dispostos ao longo de hifas aéreas escassas. A ramificação principal do conidióforo produz vertentes laterais que podem por sua vez ser ramificadas ou não, sendo que a parte mais ramificada encontra-se distante da extremidade, com as fiáides surgindo freqüentemente diretamente do eixo principal, próximo da extremidade. As ramificações podem subdividir-se, e as ramificações secundárias são freqüentemente pareadas com a parte inferior, a mais ramificada, unida ao eixo principal. Todas as ramificações primárias e secundárias surgem em ângulos de 90° ou próximo a 90°, em relação ao eixo principal. O conidióforo típico de *Trichoderma*, com ramificações pareadas, assume um aspecto piramidal,

terminando em uma ou poucas fiálides. Em algumas espécies, as ramificações principais terminam em compridas elongações, simples ou ramificadas, em forma de gancho, retas ou sinuosas, septadas, com paredes finas, estéreis ou com terminações férteis. O eixo principal pode ter largura igual ou ser muito mais largo que a base da fiálide.

As fiálides são tipicamente mais largas no ponto médio, mas, podem ser cilíndricas ou quase subglobosas, podendo inserir-se em verticílios, em ângulo de 90° em relação a outras no mesmo verticílio, ou podem ser diversamente peniciladas (do tipo gliocladium). As fiálides podem ser ainda densamente agrupadas em um eixo principal amplo, ou solitárias. Os conídios tipicamente aparentam ser secos, mas em algumas espécies eles podem estar contidos em gotas de líquido amarelo ou verde claro. Na maioria das espécies são elipsoidais; conídios globosos são raros. São tipicamente lisos, mas conídios tuberculados ou sutilmente verrugosos são observados em poucas espécies. Clamidósporos podem ser produzidos por todas as espécies.

2.6 O gênero *Clonostachys*

Espécies do gênero *Clonostachys*, algumas das formas anamórficas de *Bionectria*, pertencem ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Ascomycetes, Ordem Hypocreales, e Família Bionectriaceae. Possuem conidióforo dimórfico mononematoso (referidos como conidióforos primário e secundário), ou monomórfico, mononematoso ou esporodoquial, liso, hialino. O conidióforo primário pode ser: do tipo verticillium ou estreitamente penicilado (tipo gliocladium), ou do tipo acremonium, solitário, produzindo uma cabeça conidial unida e mais ou menos descoloridas. O conidióforo secundário é penicilado agregado ou frouxo, com ramificações mais ou menos divergentes, mononematoso, densamente agregado e/ou distintamente esporodoquial formando cadeias ou colunas de conídios imbricados que podem colapsar para uma massa viscosa.

Espécies do gênero *Clonostachys* possuem células conidiogênicas sempre fialídicas, variando de cilíndricas ao formato de frasco, retas ou levemente curvadas, com a parte apical mais ou menos reta, e a extremidade com espessamento periclinal, truncada, raramente estreitando exatamente abaixo do ápice, fiálides intercalares ausentes, raramente formadas abaixo de verticílios de fiálides terminais.

Massa conidial sem cor, amarelo pálido e levemente alaranjado, laranja pálido a claro, laranja amarronzado, raramente marrom ou verde claro a escuro. Conídios unicelulares, lisos, alongados, levemente curvados por causa de um achatamento em um dos lados, com hilo disposto lateralmente ou quase reto, ovoidal a elipsoidal, com hilo quase mediano ou invisível, hialino ou hialino esverdeado (SCHROERS, 2001).

3 CAPÍTULO 1

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, MOLECULAR E PATOLÓGICA DE ESPÉCIES DE *Phytophthora* OBTIDAS DE DIVERSOS CULTIVOS NO SUL DA BAHIA.

RESUMO

Visando conhecer a distribuição de *Phytophthora* spp. na região sul da Bahia, foram realizadas coletas em cultivos anuais, olerícolas, ornamentais e medicinais em assentamentos rurais e propriedades agrícolas direcionadas a agricultura familiar, procedendo-se ao isolamento em meio seletivo PARPH de tecidos vegetais e do solo da rizosfera de plantas doentes. Os isolados de *Phytophthora* encontrados foram identificados por critérios morfológicos, fisiológicos e moleculares (seqüenciamento da região ITS do rDNA) e foram inoculados nos hospedeiros de origem. Pareamentos também foram realizados entre isolados das espécies heterotáticas para determinação do tipo de compatibilidade sexual. Foram realizadas 17 coletas entre junho e outubro de 2008 e janeiro e junho de 2009 em oito municípios da região. Obteve-se 81 isolados de cultivos diversos, oriundos dos municípios de Itabuna, Ilhéus, Itacaré, Ituberá, Uruçuca e do distrito de Serra Grande, que foram identificados como *P. nicotianae* (52), *P. palmivora* (17), *P. cinnamomi* (6), *P. cinnamomi* var. *parvispora* (3) e *P. bisheria* (1), sendo 73 provenientes da rizosfera e oito de tecidos vegetais. Dois isolados obtidos de inflorescência de antúrio lesionadas não foram identificados ao nível de espécie, havendo necessidade do seqüenciamento de maior número de genes. Todos os isolados foram patogênicos aos respectivos cultivos de origem. Este é o primeiro relato de *P. cinnamomi* var. *parvispora* e *P. bisheria* no Brasil e também do isolamento, na rizosfera ou em tecidos vegetais, de *P. nicotianae* em agrião,

espinafre, hortelã e dracena baby; de *P. palmivora* em couve e bananeira ornamental; e de *P. cinnamomi* em *Heliconia bihai* l, bastão do imperador, cebolinha e alface.

Palavras-chave: Oomicetos; taxonomia; gama de hospedeiros.

ISOLATION, MORPHOPHYSIOLOGICAL, MOLECULAR AND PATHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF *Phytophthora* SPECIES FROM DIFFERENT CROPS IN SOUTH OF BAHIA.

ABSTRACT

Aiming to know the distribution of *Phytophthora* spp. in south Bahia region, surveys were realized in annual, horticulture, ornamental and medicinal crops in rural settlements and farms practicing familial agriculture. Plant tissues and soil from the rhizosphere of diseased plants were isolated in selective medium PARPH. The *Phytophthora* isolates found were identified by morphological, physiological and molecular (sequencing of ITS region of rDNA) characters and were inoculated onto hosts of origin. Pairings were also done among isolates of the heterothallic species to determine the mating type. Seventeen surveys were conducted between June and October 2008 and January and June 2009 in eight municipalities. Eighty-one isolates were obtained from various crops, in the municipalities of Itabuna, Ilhéus, Itacaré, Ituberá, Uruçuca and in the Serra Grande district, which were identified as *P. nicotianae* (52), *P. palmivora* (17), *P. cinnamomi* (6), *P. cinnamomi* var. *parvispora* (3) and *P. bisheria* (1), 73 from the rhizosphere soil and eight from plant tissues. Two isolates from injured anthurium flower were not identified to species level, requiring sequencing of a larger number of genes. All isolates were pathogenic to the origin cultures. This is the first report of *P. cinnamomi* var. *parvispora* and *P. bisheria* in Brazil and also of the isolation, from the rhizosphere or plant tissues of infected plants, of *P. nicotianae* in watercress, spinach, mint and dracena baby; of *P.*

palmivora in cabbage and ornamental banana plant and of *P. cinnamomi* in *Heliconia bihai*, torch ginger, welsh onion and lettuce.

Keywords: Oomycetos; taxonomy; host range.

3.1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Phytophthora* pertencem ao reino Straminipila, estes microrganismos distinguem-se dos fungos devido à presença de celulose na parede celular, a diferenças nas seqüências de DNA, dentre outros caracteres (ALEXOPOULOS et al., 1996). Caracterizam-se por apresentar micélio cenocítico, típico dos oomicetos, e diferentes propágulos como esporângios (corpos de frutificação), clamidósporos e zoósporos (esporos assexuais) e oósporos (esporos sexuais). A presença, a forma e as dimensões destas estruturas, além de características fisiológicas e da filogenia molecular, são essenciais para a identificação das espécies do gênero. Os diferentes propágulos têm funções específicas no ciclo de vida destes patógenos bem como na epidemiologia das doenças por eles causadas (LUZ et al., 2001).

É incerto o número de espécies do gênero *Phytophthora* conhecidas na atualidade. Schena et al. (2008) mencionam serem mais de 70 espécies fitopatogênicas. Nesta década tem sido freqüente o relato de novas espécies, *P. ramorum* (WERRES et al., 2001), *P. alni* Brasier e Kirk (BRASIER et al., 2004), *P. bisheria* e *P. siskiyouensis* (ABAD et al., 2008; REESER et al., 2007), são alguns exemplos.

Muitas espécies de *Phytophthora* são cosmopolitas e possuem uma ampla gama de hospedeiros, causando danos em cultivos agrícolas ou em ecossistemas naturais. A lista de hospedeiros destas espécies é ampliada constantemente com novos relatos em todo o mundo. Podem ser citados os primeiros relatos de: *P. ramorum* em castanha doce (*Castanea sativa* Mill.) no Reino Unido (DENMAN et al., 2005); *P. tropicalis* infectando folhas de fruta-pão (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) (CERQUEIRA et al., 2006); *P. cactorum* em castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), em faia comum (*Fagus sylvatica* L.) e em álamo-branco (*Populus Alba* L.) na República Tcheca (CERNY et al., 2009).

No Brasil, até 2006, 20 espécies de *Phytophthora* haviam sido assinaladas em cultivos economicamente relevantes para o país (LUZ, 2006). Na região cacaueteira baiana, várias destas espécies ocorrem causando danos a algumas das culturas de maior destaque como: o cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) o mamoeiro (*Carica papaya* L.), a seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg), a pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) e a pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.).

Devido a crise na lavoura cacaueteira gerada por diversos fatores, inclusive pela vassoura-de-bruxa, doença causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime e Phillips-Mora, o monocultivo do cacaueteiro foi em parte substituído por sistemas agroflorestais (SAFs) e outros cultivos, propiciando também, o aumento do número de assentamentos e de pequenas propriedades rurais com o perfil da agricultura familiar, dedicando-se principalmente às culturas de subsistência como a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), além da produção de especiarias, frutas, hortaliças e flores tropicais. Nestas pequenas propriedades, olerícolas, como o coentro (*Coriandrum sativum* L.), o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.), e a abóbora (*Cucurbita* spp.) são cultivadas conjuntamente com várias espécies de plantas medicinais, como o hortelã (*Mentha* sp.), a folha-da-costa (*Bryophyllum pinnatum* Kurz.), o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), entre outras. Muitas destas plantas compõem a lista de hospedeiros de *Phytophthora*, no entanto, não há ainda relatos, na Bahia, da ocorrência destes patógenos em vários destes cultivos.

Diversas espécies de flores tropicais são também cultivadas ao campo ou em viveiros na região, podendo ser citadas entre as mais plantadas a alpínia (*Alpinia purpurata* (Viell) K. Schum), o antúrio (*Anthurium andreanum* Lindl.) e as helicônias (*Heliconia* spp.). No Brasil várias espécies de plantas ornamentais são hospedeiras de *Phytophthora* (SILVA et al., 2001), como o lírio (*Spathiphyllum wallisi* Regel), a violeta africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl), e o antúrio. No sudeste da Bahia registrou-se, apenas *P. citrophthora* (Smith et Smith) Leonian em antúrio (PAIM et al, 2006).

A região sudeste da Bahia possui clima quente e úmido, sendo altamente favorável ao desenvolvimento de doenças fúngicas. No entanto, muitos pequenos produtores rurais não tem acesso ao diagnóstico destas doenças e seus agentes etiológicos, atribuindo à morte de suas plantas à “meleira”, nome utilizado para designar a perda do cultivo nas épocas em que as temperaturas baixam um pouco e

aumenta a umidade relativa. Como este é o nome vulgar atribuído à podridão-parda do cacauzeiro, causada por diversas espécies de *Phytophthora* (CAMPELO; LUZ, 1981), foi sentida a necessidade de pesquisar a ocorrência de espécies deste gênero de fitopatógenos, principalmente em pequenas propriedades.

O presente trabalho teve como objetivos: i) Inspeccionar cultivos anuais (abacaxi, feijão e mandioca), olerícolas, plantas ornamentais e plantas medicinais cultivadas em assentamentos rurais e propriedades agrícolas direcionadas a agricultura familiar na região sul da Bahia para coletar amostras de tecido vegetal e da rizosfera de plantas possivelmente infectadas por *Phytophthora* spp.; ii) Isolar e identificar através de caracteres morfofisiológicos e moleculares às espécies de *Phytophthora* encontradas; iii) realizar os testes de patogenicidade e re-isolar os patógenos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coleta das amostras de *Phytophthora* spp.

As 17 coletas foram realizadas, entre junho a outubro de 2008 e janeiro a julho de 2009, nos municípios de Camamu, Itabuna, Ilhéus, Itacaré, Ituberá, Nilo Peçanha, Uruçuca e Una em propriedades direcionadas a agricultura familiar e assentamentos rurais com a produção de cultivos anuais; olerícolas; plantas ornamentais; plantas medicinais. Os locais de coleta foram registrados por GPS, quando possível. Coletou-se as amostras em pelo menos quatro áreas pertencentes a cada linha de cultivo, tendo os produtores rurais respondido a um questionário (Anexo 1) sobre os caracteres agrônômicos relacionados às suas propriedades. Foram coletados os tecidos vegetais com sintomas típicos de *Phytophthora*, além de amostras de solo obtidas da rizosfera dos cultivos. Os materiais coletados foram armazenados em sacos plásticos etiquetados, para a posterior análise em laboratório.

3.2.2 Isolamento de amostras

3.2.2.1 Isolamento de tecidos vegetais

Amostras de tecidos vegetais lesionados foram primeiramente lavadas em água corrente, após isso se retirou fragmentos entre a área sadia e infectada dos

tecidos, os quais foram desinfestados em hipoclorito de sódio a 1%, álcool 70% e água corrente. Consecutivamente, as amostras foram secadas em papel toalha e plaqueadas em meio seletivo PARPH (KANMWISCHER; MITCHELL, 1978), preparado 24 horas antes, e incubadas a 25 °C, no escuro por 72 horas, quando avaliou-se a presença de colônias de *Phytophthora* spp.

3.2.2.2 Isolamento de amostras de solo

Para este procedimento utilizou-se o método de diluição do solo em placas de meio seletivo (FEICHTENBERGER, 2001). Amostras de solo obtidas da rizosfera (0-10 cm) dos diferentes cultivos foram coletadas com o auxílio de um trado, em quatro pontos equidistantes da planta hospedeira, formando desse modo uma amostra de solo composta. Posteriormente, adicionou-se 10 g de cada amostra a 90 mL de meio de cultura ágar-água 0,25%, a solução foi homogeneizada com um agitador magnético, em seguida distribuiu-se 1 mL da solução em cada uma das 10 placas (repetições) contendo meio seletivo PARPH. As placas foram incubadas no escuro, à 25 °C por 48 h. Após o que, foram lavadas cuidadosamente com água corrente para retirar a solução do solo da superfície do meio de cultura, e, em seguida realizou-se a leitura das colônias típicas de *Phytophthora* que foram contabilizadas e repicadas para meio seletivo PARPH. Uma nova leitura foi realizada no dia seguinte nas mesmas placas para verificar se novas colônias haviam aparecido.

3.2.3 Identificação dos isolados de *Phytophthora* spp.

3.2.3.1 Caracterização morfológica

3.2.3.1.2 Análise em substratos

Após o isolamento, as colônias crescidas em meio seletivo foram repicadas para meio de cultura cenoura-ágar (CA) e, posteriormente, para placas de Petri contendo água e meio líquido de cenoura. As observações foram realizadas em colônias entre cinco a 10 dias de idade, para as seguintes características de valor taxonômico: i) **esporângios**, presença ou ausência, comprimento, largura, razão comprimento/largura, caducidade, comprimento do pedicelo, tipo de papila, abertura e profundidade do poro apical; ii) **clamidósporos**, presença ou ausência e diâmetro; iii) **oósporos**, tipo e dimensões do anterídeo (anfígenos ou paráginos), diâmetro dos

oogônios e dos oósporos, presença ou ausência de ornamentações na parede do oogônio.

As medidas foram efetuadas em 50 repetições de cada tipo de esporo para cada isolado, através de lâminas observadas ao microscópio óptico (MO). Realizou-se a caracterização das colônias observando o formato e o tipo de micélio aéreo (LUZ et al., 2008; STAMPS et al., 1990; WATERHOUSE, 1963).

Caracterizaram-se morfologicamente três isolados de cultivos anuais, 14 de olerícolas, 13 de plantas ornamentais, oito de cultivos medicinais e nove de espécies frutíferas.

3.2.3.2 Caracterização fisiológica

3.2.3.2.1 Teste de temperaturas cardinais

Realizaram-se testes com os isolados de *Phytophthora* spp. nas seguintes temperaturas cardinais: mínima (5 °C), ótima (25 °C) e máxima (35 °C) para crescimento (ERWIN et al., 1983). Discos de micélio (5 mm de diâmetro) obtidos de colônias de *Phytophthora* com 7 dias de idade foram colocados no centro de placas de Petri contendo CA, com quatro repetições por isolado. As placas foram incubadas em B.O.D. a temperatura controlada por um período de 96 h. Foram feitas avaliações diárias através da aferição do comprimento e da largura das colônias. Após 24 h do término dos testes, avaliou-se a sobrevivência dos isolados que não cresceram às temperaturas de 5 e/ou 35 °C, com a transferência do disco de micélio de cada isolado para novas placas contendo CA e incubadas a 25 °C.

3.2.3.2.2 Técnica do Extrato de solo não estéril para obtenção de esporulação

Para as colônias típicas de *Phytophthora* que não esporularam em cultura pura, utilizou-se a técnica do extrato de solo não estéril (RIBEIRO, 1978), o micélio de colônias crescidas, após cinco dias em placas de Petri (6 cm de diâmetro) contendo meio líquido de cenoura, foi lavado com água destilada esterilizada, por duas vezes consecutivas, depois adicionou-se às placas quantidades suficientes para submergir o micélio de uma solução contendo 50 g de solo não estéril diluídos em 1 L de água destilada. O solo utilizado embora não estéril não continha propágulos de *Phytophthora*. A solução antes da aplicação às placas permaneceu 24 h de repouso e então foi filtrada com o auxílio de um filtro de papel. As placas

foram dispostas na bancada à 25 °C, sob iluminação contínua. Entre três a sete dias após a adição da solução foram preparadas lâminas com as culturas para a observação de esporângios.

3.2.3.3 Teste de compatibilidade sexual

Os isolados de *Phytophthora* foram pareados através do método de sanduíche (LUZ et al., 2008), com os isolados padrões (A1 e A2) de uma ou mais das seguintes espécies: *P. capsici* (156 e 229), *P. palmivora* (847 e 839) e *P. nicotianae* (1180 e 1187), fitopatógenos presentes em patossistemas no sudeste da Bahia, bem como os autopareamentos. Os sanduíches com discos de micélio (5 mm de diâmetro) de colônias aos sete dias de idade foram entremeados com discos de meio de cultura CA e montados em placas de Petri pequenas (6 cm de diâmetro), em quatro repetições. Todos os pareamentos foram incubados no escuro, à temperatura de 25 °C e, a leitura foi realizada, entre o quinto e o oitavo dia após a montagem dos sanduíches (dependendo do tempo de formação de oósporos para cada isolado), através da montagem de lâminas que continham somente os discos centrais. Os isolados que formaram oósporos com o padrão A1 foram classificados como A2, e vice-versa. Como testemunhas parearam-se os isolados padrões.

3.2.3.4 Caracterização molecular

3.2.3.4.1 Extração de DNA

Para extração do DNA genômico, os isolados foram cultivados por sete dias sob luz contínua em B.O.D. à temperatura de 24 °C. A massa micelial foi extraída e seca em papel toalha, sendo posteriormente estocada em tubos eppendorf e armazenada em freezer a temperatura de - 20 °C. Realizou-se a extração do DNA pelo método de Zolan e Pukilla (1986) com algumas modificações. A massa micelial de cada isolado foi macerada em nitrogênio líquido, com o auxílio de um pistilo até obter um pó bem fino. Foi transferido de 300 a 500 mg do macerado para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e adicionado imediatamente 800 µL de tampão de extração, formado por Tris-HCl 200mM, NaCl 5M 250 mM, EDTA (0,5 M) pH 8,0 25 mM, SDS 10%; β-Mercaptoetanol a 1% e misturado com o auxílio de um Vortex. Os tubos foram mantidos em banho-maria (70 °C) por 30 min, sendo agitados manualmente a cada 10 min e em seguida foi realizada a desproteíntização,

adicionando-se 700 μL de clorofórmio-álcool isoamílico, na proporção de 24:1. As amostras foram agitadas por suaves inversões por 10 min e centrifugadas a 14000 rpm, durante 10 min em temperatura de 4 °C. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos de 1,5 mL. Para a precipitação do DNA, foi adicionado ao sobrenadante NaCl 100 mM e isopropanol absoluto gelado. Os tubos foram mantidos a - 80 °C por 30 min e, a seguir, centrifugados a 14000 rpm, durante 10 min em temperatura de 4 °C. O sobrenadante de cada tubo foi vertido e o pellet foi lavado duas vezes com etanol 70% e seco em capela por 30 min. O DNA foi ressuspensionado em 100 μL de solução contendo água Milli-Q estéril e RNase, na concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e mantido em banho-maria a 37 °C por 30 min para dissolver. As amostras foram quantificadas em gel de agarose 0,8% onde foram visualizadas bandas de DNA genômico total, separadas por eletroforese, como indicadoras da integridade do DNA extraído. Após esse processo, uma alíquota das amostras de DNA de cada isolado foi diluída a 10 ng, para posterior utilização no seqüenciamento.

3.2.3.4.2 Seqüenciamento da região ITS

A identificação molecular dos isolados obtidos foi realizada usando os *primers* ITS 1 e ITS 4 e foi feito o seqüenciamento das regiões ITS 1 e ITS 2 (internal transcribed spacer) incluindo a subunidade 5.8 S do rRNA (WHITE et al., 1990). As amplificações foram realizadas em um volume total de 50 μL contendo 50 mM de KCl, 1,5 mM MgCl_2 , 200 mM de cada dNTP (Promega), 1,5 μL de cada primer (20 pmol), 10 μL de DNA genômico ($10\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), e 2.0 U de Taq DNA polimerase (Promega). Todas as reações foram feitas em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc). As amplificações consistiram de desnaturação inicial a 94 °C por 10 min, 10 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento de primers a 58 °C por 1 min, alongamento a 72 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 58 °C por 1 min, alongamento a 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR amplificados purificados utilizando a Exonuclease I (*Exo I*) para digerir excesso de primers e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) para degradar excesso de nucleotídeos provenientes da PCR. O seqüenciamento foi feito do produto de PCR obtido, utilizando BigDye Deoxy terminator sequencing kit (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante, em um volume total de 5 μL , contendo

0,5 µL de BigDye, 1 µL de tampão de seqüenciamento (5X), 2 pmol de primer e 30 ng de DNA. As reações de seqüenciamento foram feitas em termociclador PTC-100 e consistiram de 40 ciclos com desnaturação inicial a 94 °C por 1 min, anelamento a 60 °C por 1 min e extensão a 60 °C por 4 min. Após a reação de seqüenciamento, as amostras foram precipitadas com 20 µL de isopropanol 65% e a seguir permaneceram no escuro em temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente foram centrifugadas por 40 min a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida sobre papel toalha. Acrescentaram-se 100 µL de etanol 60% e centrifugou-se à mesma velocidade por 5 min. O etanol foi descartado e a placa foi centrifugada invertida sobre o papel toalha até 500 rpm para remover o excesso de etanol. Após secagem, à temperatura ambiente por 15 min, foi adicionado 10 µL de formamida a cada amostra e a placa colocada no termociclador para a desnaturação a 94 °C por 3 min. Após essa etapa, a placa foi levada ao Seqüenciador Automático de DNA, modelo ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer.

Para a análise do seqüenciamento utilizou-se o programa BioEdit versão 5.0.9 (HALL, 1999) para unir as seqüências. Os alinhamentos foram feitos com o programa clustal W versão 1.8 (THOMPSON et al., 1997) e o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) usado para comparar as seqüências de cada isolado com os presentes nos bancos de dados públicos.

3.2.4 Teste de patogenicidade

Os testes de patogenicidade foram feitos com o método de disco de micélio (CARVALHO et al., 2005). Discos obtidos de colônias crescidas em CA, após sete dias de idade, com o auxílio de um vazador de cortiça (5 mm de diâmetro) foram postos na superfície abaxial de folhas ou na epiderme de frutos, de modo que o micélio estivesse em contato com a superfície vegetal, totalizando 10 repetições por isolado. Os discos foram cobertos com chumaços de algodão umedecidos e as folhas e/ou frutos dispostos em caixas plásticas contendo espumas umedecidas ou em sacos plásticos borrifados internamente com água. A observação e o reisolamento das lesões foram realizados entre três e sete dias após as inoculações, a depender do hospedeiro.

3.2.5 Processamento de amostras em Microscopia Eletrônica de Varredura

Duas amostras foram obtidas de culturas puras de isolados de *Phytophthora* spp., após 8 dias de crescimento em CA à 25 °C. Retirou-se fragmentos das culturas puras do fitopatógeno, com cerca de 1 mm³ de tamanho e colocou-se sobre um pedaço de cera (de dentista) imerso numa gota de fixador, obtendo-se 5 a 6 repetições de cada amostra, que foram postas em frascos etiquetados contendo uma solução de gluteraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2 por 4 horas. Após isso, lavaram-se as amostras seis vezes consecutivas (com duração de 10 minutos para cada lavagem) em tampão cacodilato. Depois houve a pós-fixação em OsO₄ 1% em tampão cacodilato 0,1 M por 4 horas. Novamente as amostras foram lavadas seis vezes consecutivas com o tampão (em intervalos de 10 minutos por lavagem). Realizou-se a desidratação em banhos de série crescente de concentração de soluções de álcool 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, em intervalos consecutivos de 10 minutos, e por três vezes seguidas em álcool 100% a cada 20 minutos. Depois houve a desidratação em solução contendo álcool e acetona (3:1), álcool e acetona (1:1), álcool e acetona (1:3), em intervalos de 10 minutos, e por duas vezes consecutivas em acetona P. A, com duração de 15 minutos cada. Em seguida as amostras foram submetidas ao processo de Ponto crítico por cerca de 40 minutos e depois montadas em “Stubs”, com fita dupla face de carbono. Por último, as amostras foram metalizadas com deposição de uma fina camada de ouro com cerca de 20 nm de espessura, durante 80 s. As amostras foram analisadas através do microscópio eletrônico de varredura (MEV).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Isolados obtidos

Foram obtidos 81 isolados de *Phytophthora* spp., em coletas realizadas nos municípios de Itabuna, Ilhéus, Itacaré, Ituberá, Uruçuca e em Serra Grande, distrito da última cidade citada. A maioria dos isolados foram oriundos da rizosfera das espécies vegetais, principalmente de plantas medicinais (35) (Tabela 1). Dos tecidos vegetais coletados e isolados apenas oito amostras foram positivas para *Phytophthora*, sendo obtidos dois isolados (1180 e 1185) de folhas de *Dracaena baby* (*Dracaena sanderiana* Hort.) no município de Uruçuca, dois (1407 e 1408) de inflorescência de antúrio (*Anthurium andreanum* Lindl.) coletadas em um viveiro no

Tabela 1 – Número de isolados de *Phytophthora* spp. obtidos de diferentes cultivos em coletas realizadas no sul da Bahia.

Tipos de cultivos	Nº de coletas	Nº de isolados	Locais
Olerícolas	8	20	Itabuna Itacaré Ituberá
Cultivos anuais	10	3	Itabuna
Plantas ornamentais	11	14	Ilhéus Ituberá Uruçuca
Plantas medicinais	6	35	Itacaré Serra Grande

município de Ituberá e quatro de hortelã (*Mentha villosa* Hudson) sendo, dois de folhas (1363 e 1364), um de haste (1365) e um de raiz (1366). Os isolados de hortelã foram coletados em uma horta urbana no distrito de Serra Grande, onde os canteiros tinham todas as plantas com sintomas de murcha e lesões foliares.

Caracterizou-se morfofisiologicamente os seguintes isolados: de cultivos anuais, 1335, 1336 e 1337 obtidos na rizosfera de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no município de Itabuna-BA, de olerícolas (Tabela 2), de plantas ornamentais (Tabela 3), de cultivos medicinais (Tabela 4) e de espécies frutífera:

Tabela 2 – Isolados de *Phytophthora* spp. obtidos na rizosfera de cultivos de olerícolas, localizados em três municípios e em um distrito do sul da Bahia.

Locais	Isolados	Cultivos	
		Nome comum	Nome científico
Itabuna	1329**	Couve	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i>
	1176*, 1177**, 1178* 1330***, 1331***, 1332***, 1333**, 1334**	Berinjela Jiló	<i>Solanum melongena</i> L. <i>Solanum gilo</i> Raddi
Serra Grande	1405*, 1406***		
Itacaré	1187**	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
Ituberá	1358*	Agrião	<i>Rorippa nasturtium-aquaticum</i> (L.) Hayek
	1359**	Coentro	<i>Coriandrum sativum</i> L.
	1360**, 1362***	Espinafre	<i>Spinacea oleracea</i> L.
	1367**	Cebolinha	<i>Allium fistulosum</i> L.
	1368**, 1369**	Alface	<i>Lactuca sativa</i> L.

* Isolados selecionados para caracterização morfofisiológica e molecular;

** Isolados selecionados para caracterização morfofisiológica;

*** Isolados selecionados para caracterização molecular.

Tabela 3 – Isolados de *Phytophthora* spp. obtidos na rizosfera ou em tecidos de plantas ornamentais, localizados em três municípios do sul da Bahia.

Locais	Isolados	Cultivos		Fontes	
		Nome comum	Nome científico		
Ituberá	1108*	Bananeira ornamental	<i>Musa coccinea</i> Ander	Rizosfera	
	1407*, 1408*	Antúrio	<i>Anthurium andreanum</i> Lindl.	Inflorescência	
	1186*, 1409***, 1410**	Bastão do Imperador	<i>Etilingera elatior</i> (Jack) R.M.Smith	Rizosfera	
	Uruçuca	1179*, 1181**, 1182**, 1183*, 1184**, 1180**, 1185*	Dracena baby	<i>Dracaena sanderiana</i> Hort.	Folha
Ilhéus		1188**	Helicônia bihai	<i>Heliconia bihai</i> L. cv. Lobster Claw I	Rizosfera

* Isolados selecionados para caracterização morfofisiológica e molecular;

** Isolados selecionados para caracterização morfofisiológica;

*** Isolados selecionados para caracterização molecular.

Tabela 4 – Isolados de *Phytophthora* spp. obtidos em cultivos de plantas medicinais, localizados no município de Itacaré e no distrito de Serra Grande no sul da Bahia.

Locais	Isolados	Cultivos		Fontes
		Nome comum	Nome científico	
Itacaré	1107**	Manjeriçã	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Rizosfera
Serra Grande	1363*, 1364**	Hortelã	<i>Mentha villosa</i> Hudson	Folha
				Haste
	1365**, 1366*, 1375*, 1377***, 1381**, 1389***, 1390*, 1399***, 1403***, 1404***	Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Raiz
				Rizosfera

* Isolados selecionados para caracterização morfofisiológica e molecular;

** Isolados selecionados para caracterização morfofisiológica;

*** Isolados selecionados para caracterização molecular.

1189, 1190, 1191, 1192, 1193, 1194, 1195, 1196, 1197 obtidos na rizosfera de mamoeiro (*Carica papaya* L.) cultivado em uma horta no município de Itabuna-BA.

A caracterização molecular foi feita com os isolados listados nas Tabelas 2 - 4 que estão assinalados com um e três asteriscos, além dos isolados 1335 e 1337 de cultivos anuais.

Foram identificadas com base nas caracterizações morfológicas, fisiológicas e moleculares, quando necessário, cinco espécies de *Phytophthora* associadas à rizosfera ou a partes vegetais dos diferentes cultivos analisados. Dois isolados provenientes de inflorescência de antúrio foram identificados apenas ao nível de gênero. Houve predominância de *P. nicotianae*, sendo obtidos 52 isolados desta espécie.

Para facilitar a exposição dos resultados serão apresentados os dados por cada uma das espécies identificadas.

3.3.1.1 *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan

Esta espécie foi isolada dos seguintes cultivos: berinjela (3), tomateiro (1), dracena baby (7), agrião (1), coentro (1), espinafre (3), hortelã (4) e alecrim (30). Estando presente em Itabuna, Itacaré, Ituberá, Uruçuca e no distrito de Serra Grande.

Os isolados desta espécie analisados para a compatibilidade sexual apresentaram os dois tipos compatíveis, com predominância do tipo A2 (Tabela 5). Isolados do tipo de compatibilidade A1 foram encontrados somente no município de Uruçuca no cultivo de dracena baby.

Vinte e dois isolados de *P. nicotianae* foram caracterizados morfofisiologicamente (Tabela 5). Em culturas em meio cenoura ágar aos 10 dias de idade observou-se esporangióforos com ramificação irregular simples. Esporângios estavam presentes nas culturas de todos os 22 isolados com formato predominantemente limoniforme (Figura 1A e B), porém esporângios obpiriformes e ovóides também foram observados. As médias de comprimento e largura dos esporângios desses isolados variaram de $33,4 \pm 0,9 \times 24,7 \pm 0,6 \mu\text{m}$ (isolado 1381) a $51,1 \pm 0,9 \times 40,0 \pm 0,8 \mu\text{m}$ (isolado 1187). A relação comprimento/largura variou de 1,2:1 (1182, 1183 e 1185) a 1,4:1 (1178, 1184, 1375 e 1381).

As papilas destes isolados variaram em profundidade média de $4,8 \pm 0,1 \mu\text{m}$ (1381) a $7,9 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (1187), enquanto a média da abertura do poro apical teve variação de $6,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$ (1364 e 1390) a $9,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (1184).

Esta espécie não é caduca, ou seja, não apresenta esporângios decíduos. No entanto, esporadicamente podem ser vistos esporângios com pedicelos muito curtos.

Tabela 5 – Dimensões das estruturas assexuais (μm) e temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) limites para crescimento de isolados de *Phytophthora nicotianae* obtidos em diferentes cultivos localizados no sul da Bahia.

N°	TC	Esporângios*					DC	TLC	
		CE	LE	C/L	PP	AP		MIN	MAX
1176	A2	41,3±1,0	33,0±0,7	1,3:1	4,8±0,2	7,6±0,2	29,9±0,7	> 5	> 35
1177	A2	47,1±0,6	35,3±0,4	1,3:1	5,5±0,2	8,5±0,2	28,9±0,9	> 5	> 35
1178	A2	45,8±1,2	33,4±0,7	1,4:1	6,2±0,2	8,6±0,3	29,5±0,8	> 5	> 35
1179	A1	42,4±0,9	31,6±0,7	1,3:1	5,7±0,2	7,4±0,3	26,3±0,5	> 5	> 35
1180	A1	38,2±0,9	29,0±0,6	1,3:1	5,3±0,2	7,5±0,2	23,4±0,9	> 5	> 35
1181	A1	39,5±1,2	31,3±0,9	1,3:1	5,6±0,2	7,9±0,2	26,0±0,9	> 5	> 35
1182	A1	39,7±1,2	32,6±0,9	1,2:1	4,9±0,2	7,5±0,2	25,8±0,9	> 5	> 35
1183	A1	37,5±0,9	30,8±0,8	1,2:1	5,3±0,2	8,2±0,2	21,8±0,9	> 5	> 35
1184	A1	44,0±1,0	32,5±0,6	1,4:1	6,5±0,2	9,7±0,2	25,8±0,9	> 5	> 35
1185	A1	41,1±0,6	34,0±0,5	1,2:1	5,7±0,2	8,8±0,2	25,5±0,8	> 5	> 35
1187	A2	51,1±0,9	40,0±0,8	1,3:1	7,9±0,2	9,6±0,2	31,2±1,1	> 5	> 35
1358	A2	39,3±0,3	30,3±0,4	1,3:1	6,3±0,1	7,4±0,1	25,4±0,8	> 5	> 35
1359	A2	40,6±0,7	31,4±0,5	1,3:1	6,1±0,2	7,5±0,1	26,3±0,7	> 5	> 35
1360	A2	48,1±0,6	33,9±0,4	1,3:1	6,3±0,2	6,7±0,1	31,3±0,9	> 5	> 35
1363	A2	39,5±1,2	30,7±0,8	1,3:1	6,8±0,3	7,3±0,2	24,2±0,6	> 5	> 35
1364	A2	34,0±0,9	25,6±0,6	1,3:1	5,8±0,2	6,5±0,1	27,8±1,0	> 5	> 35
1365	A2	46,7±0,8	35,7±0,6	1,3:1	7,6±0,3	7,3±0,1	25,1±0,8	> 5	> 35
1366	A2	39,7±0,6	30,4±0,5	1,3:1	6,1±0,2	7,2±0,2	27,0±0,8	> 5	> 35
1375	A2	46,1±1,1	32,9±0,8	1,4:1	6,7±0,1	6,8±0,1	29,0±0,9	> 5	> 35
1381	A2	33,4±0,9	24,7±0,6	1,4:1	4,8±0,1	6,8±0,1	19,9±0,6	> 5	> 35
1390	A2	41,0±1,1	31,8±0,8	1,3:1	6,2±0,2	6,5±0,1	25,1±0,7	> 5	> 35
1405	A2	43,9±0,6	33,4±0,4	1,3:1	6,9±0,2	7,8±0,1	27,9±0,8	> 5	> 35

* média de 50 observações \pm erro padrão

Legenda: TC (tipo de compatibilidade sexual); CE (comprimento dos esporângios); LE (largura dos esporângios); C/L (relação comprimento/largura dos esporângios); PP (profundidade das papilas); AP (abertura do poro apical); DC (diâmetro dos clamidósporos); TLC (temperatura limite para crescimento mínima (MIN) e máxima (MAX)).

Clamidósporos (Figura 1C), terminais e intercalares, estiveram presentes em todos os isolados analisados e o diâmetro médio variou de $19,9 \pm 0,6 \mu\text{m}$ (1381) a $31,3 \pm 0,9 \mu\text{m}$ (1360).

Alguns isolados apresentaram intumescimento de hifas dos tipos coralóides (Figura 1D), tubiformes, torulosos (Figura 1E), catenulados e angulares, porém, não se constitui uma característica marcante da espécie, pois surgem ocasionalmente no micélio.

Todos os isolados sobreviveram a incubação por quatro dias a temperatura de 5°C , embora não tenham apresentado crescimento. As culturas cresceram a 35°C e, a 25°C a variação do diâmetro das colônias foi de $5,6 \text{ cm}$ (1375 e 1180) a $7,4 \text{ cm}$ (1187).

As colônias foram predominantemente petalóides do tipo crisântemo (Figura 3A) (1358, 1360, 1363, 1364, 1365, 1366, 1381, 1405), estrelada (Figura 3B) (1177, 1178, 1180, 1184, 1187, 1359, 1375, 1390) e difusa (1176, 1179, 1181, 1182, 1183, 1185). O micélio aéreo das colônias variou de ralo (Figura 3C) (1179, 1180, 1181, 1182, 1183, 1184, 1185, 1187, 1365, 1405) a ligeiramente cotonoso (1176, 1177, 1178, 1358, 1359, 1360, 1363, 1364, 1366, 1375, 1381, 1390).

Todos os 22 isolados foram patogênicos aos seus respectivos cultivos de origem (exemplos: Figuras 4B e D), sendo facilmente re-isolados, após o término dos testes de patogenicidade.

O registro de *P. nicotianae* como patógeno de agrião, espinafre e hortelã é inédito. Há um relato de ocorrência de *P. nicotianae* em uma espécie de dracena (*Cordyline terminalis* Kunth.) no Havaí (TRUJILLO et al., 1975), mas este é o primeiro registro deste patógeno em dracena baby. A espécie *Mentha cardifolia* Opiz. é hospedeira deste fitopatógeno (KAOSIRI, 1984), mas não foi encontrado registro para *Mentha villosa*. A maioria dos isolados de *P. nicotianae* (35) foi obtida na rizosfera de alecrim, espécie já registrada como hospedeira conforme Wheeler e Boyle (1971), o coentro também é catalogado como hospedeiro deste fitopatógeno (TRINDADE et al., 2001). O tomateiro e a berinjela são conhecidos como hospedeiros de *P. nicotianae*, para o Brasil com registros de ocorrência em São Paulo (SIQUEIRA et al., 1985; VITTI et al., 1993). O relato para todos os oito cultivos é inédito para a Bahia.

3.3.1.2 *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler

Foram obtidos 17 isolados de *P. palmivora* da rizosfera de diferentes cultivos, 15 destes no município de Itabuna, provenientes de mamoeiro (9), de couve (1) e de jiló (5). Outros dois isolados foram provenientes do município de Ituberá na rizosfera de bananeira ornamental e outro no município de Itacaré na rizosfera de manjeriço. Destes 17 isolados, 14 foram classificados como pertencentes a esta espécie por critérios morfofisiológicos (Tabela 6), todos eles são do tipo compatível A1. As culturas foram observadas aos sete dias de cultivo em CA apresentando esporangióforo do tipo simpodial simples; esporângios com formato predominantemente elipsóides e ovóides (Figura 1F e H), com variação do comprimento médio de $39,4 \pm 0,7 \mu\text{m}$ (1334) a $53,1 \pm 1,5 \mu\text{m}$ (1195) e da largura de

Tabela 6 – Dimensões das estruturas assexuais (μm) e temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) limites para crescimento de isolados de *Phytophthora palmivora* obtidos em diferentes cultivos localizados no sul da Bahia.

N°	Esporângios*						DC	TLC	
	CE	LE	C/L	PP	AP	CP		MIN	MAX
1107	51,9 \pm 0,9	28,5 \pm 0,5	1,8:1	6,4 \pm 0,3	7,0 \pm 0,2	4,0 \pm 0,3	29,0 \pm 0,8	> 5	< 35
1108	50,3 \pm 1,0	26,9 \pm 0,4	1,9:1	6,9 \pm 0,2	8,1 \pm 0,3	3,1 \pm 0,2	27,9 \pm 0,6	> 5	< 35
1189	51,7 \pm 1,0	28,7 \pm 0,4	1,8:1	7,2 \pm 0,2	11,2 \pm 0,2	2,6 \pm 0,1	29,7 \pm 0,6	> 5	< 35
1190	39,6 \pm 0,9	24,2 \pm 0,4	1,6:1	5,1 \pm 0,1	9,0 \pm 0,2	3,1 \pm 0,1	30,5 \pm 0,6	> 5	< 35
1191	46,6 \pm 1,2	26,4 \pm 0,5	1,8:1	5,5 \pm 0,2	9,8 \pm 0,2	2,7 \pm 0,1	28,4 \pm 0,8	> 5	< 35
1192	43,7 \pm 1,1	24,8 \pm 0,6	1,8:1	6,6 \pm 0,2	10,6 \pm 0,3	3,5 \pm 0,2	24,4 \pm 0,7	> 5	< 35
1193	50,5 \pm 1,2	31,1 \pm 0,8	1,6:1	8,3 \pm 0,3	12,2 \pm 0,3	3,4 \pm 0,2	24,1 \pm 0,6	> 5	< 35
1194	47,6 \pm 0,9	27,5 \pm 0,5	1,7:1	6,7 \pm 0,2	10,9 \pm 0,3	2,9 \pm 0,1	30,4 \pm 0,5	> 5	< 35
1195	53,1 \pm 1,5	29,2 \pm 0,6	1,8:1	8,6 \pm 0,3	9,0 \pm 0,2	3,3 \pm 0,2	30,4 \pm 0,8	> 5	< 35
1196	43,3 \pm 1,0	26,1 \pm 0,6	1,7:1	5,7 \pm 0,2	9,1 \pm 0,2	3,0 \pm 0,2	27,7 \pm 0,8	> 5	< 35
1197	48,3 \pm 1,1	27,6 \pm 0,4	1,8:1	6,6 \pm 0,2	11,0 \pm 0,2	3,1 \pm 0,1	25,3 \pm 0,7	> 5	< 35
1329	40,2 \pm 0,8	23,8 \pm 0,4	1,7:1	6,4 \pm 0,2	8,0 \pm 0,2	2,6 \pm 0,1	29,9 \pm 0,4	> 5	< 35
1333	42,4 \pm 0,6	23,0 \pm 0,3	1,8:1	5,8 \pm 0,2	7,1 \pm 0,2	2,5 \pm 0,1	27,2 \pm 0,5	> 5	< 35
1334	39,4 \pm 0,7	23,8 \pm 0,4	1,7:1	6,1 \pm 0,2	7,2 \pm 0,2	2,1 \pm 0,1	26,0 \pm 0,7	> 5	< 35

* média de 50 observações \pm erro padrão

Legenda: TC (tipo de compatibilidade sexual); CE (comprimento dos esporângios); LE (largura dos esporângios); C/L (relação comprimento/largura dos esporângios); PP (profundidade das papilas); AP (abertura do poro apical); CP (comprimento do pedicelo); DC (diâmetro dos clamidósporos); TLC (temperatura limite para crescimento mínima (MIN) e máxima (MAX)).

A média da profundidade do poro apical variou entre 5,1 \pm 0,1 μm (1190) e 8,6 \pm 0,3 μm (1195) e a da abertura do poro de 7,0 \pm 0,2 μm (1107) a 12,2 \pm 0,3 μm (1193).

Phytophthora palmivora é uma espécie caduca. Todos os isolados caracterizados possuíam pedicelo curto, característico da espécie, variando entre 2,1 \pm 0,1 μm (1334) a 4,0 \pm 0,3 μm (1107).

Todas as culturas formaram clamidósporos (exemplo, Figura 1G), terminais e intercalares, com variação do diâmetro médio de 24,1 \pm 0,6 μm (1193) a 30,5 \pm 0,6 μm (1190).

Esporadicamente, foram observados intumescimentos de hifas dos tipos coralóides e tubiformes em algumas das culturas.

Nenhum dos isolados cresceu a 5 e a 35 $^{\circ}\text{C}$, mas sobreviveram a essas temperaturas. O diâmetro das colônias a 25 $^{\circ}\text{C}$ em meio cenoura ágar, após quatro dias de incubação, variou de 7,3 cm (1108) a 8,7 cm (1192). Entre os isolados houve a predominância de colônias petalóides do tipo crisântemo (Figura 3D e F), somente

o isolado 1108 formou colônia ligeiramente concêntrica (Figura 3E). O micélio aéreo das colônias variou de farináceo (1107, 1108, 1191, 1194, 1329, 1333 e 1334) a floculoso (1189, 1190, 1192, 1193, 1195, 1196, 1197).

Nos testes de patogenicidade realizados (exemplos: Figura 4E e F) verificou-se que todos os isolados foram patogênicos aos cultivos de onde foram obtidos e deles re-isolados.

Dos cultivos de onde os isolados de *P. palmivora* foram originados, somente o mamoeiro é hospedeiro deste fitopatógeno (LUZ et al., 2001). A espécie do gênero *Musa* (*M. textilis* Née) é hospedeira de *P. palmivora* (HERNANDEZ, 1919) citado por (ERWIN; RIBEIRO, 1996), porém, a bananeira ornamental (*Musa coccinea*) está sendo relatada pela primeira vez neste trabalho.

3.3.1.3 *Phytophthora cinnamomi* Rands

Foram obtidos seis isolados da espécie *P. cinnamomi*, na rizosfera dos seguintes cultivos: flores tropicais, de helicônia bihai I, no município de Ilhéus (1) e de bastão do imperador (2) em Ituberá; olerícolas, cebolinha (1) e alface (2) em Ituberá.

Dos cinco isolados caracterizados morfofisiologicamente (Tabela 7), um é do tipo compatível A1 (1188) e quatro são A2 (1367, 1368, 1369 e 1410).

Tabela 7 – Dimensões das estruturas assexuais (μm) e temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) limites para crescimento de isolados de *Phytophthora cinnamomi* obtidos em diferentes cultivos localizados no sul da Bahia.

N°	TC	Esporângios*				DC	TLC	
		CE	LE	C/L	AP		MIN	MAX
1188	A1	42,3 \pm 0,9	27,8 \pm 0,6	1,5:1	9,0 \pm 0,2	16,9 \pm 0,3	> 5	< 35
1367	A2	36,5 \pm 1,2	23,2 \pm 0,8	1,6:1	6,7 \pm 0,3	25,7 \pm 0,9	> 5	< 35
1368	A2	36,6 \pm 1,4	24,2 \pm 0,8	1,5:1	6,8 \pm 0,3	26,7 \pm 0,9	> 5	< 35
1369	A2	42,8 \pm 1,5	24,8 \pm 0,6	1,7:1	5,8 \pm 0,2	24,6 \pm 0,7	> 5	< 35
1410	A2	39,5 \pm 2,0	23,1 \pm 0,8	1,7:1	6,1 \pm 0,3	30,8 \pm 0,8	> 5	< 35

* média de 50 observações \pm erro padrão

Legenda: TC (tipo de compatibilidade sexual); CE (comprimento dos esporângios); LE (largura dos esporângios); C/L (relação comprimento/largura dos esporângios); AP (abertura do poro apical); DC (diâmetro dos clamidósporos); TLC (temperatura limite para crescimento mínima (MIN) e máxima (MAX)).

Não foram formados esporângios em culturas puras, com exceção do isolado 1188 que, quando cultivado em placas de Petri contendo água esterilizada,

apresentou alguns esporângios. Para visualizar estes propágulos nas cinco culturas utilizou-se solução de solo não esterilizada que foi adicionada sobre as mesmas. Cinco a sete dias após, houve a formação de esporângios, os quais eram predominantemente elipsóides e ovóides, com variação do comprimento médio de $36,5 \pm 1,2 \mu\text{m}$ (1367) a $42,8 \pm 1,5 \mu\text{m}$ (1369) e da largura de $23,1 \pm 0,8 \mu\text{m}$ (1410) a $27,8 \pm 0,6 \mu\text{m}$ (1188). A relação comprimento/largura variou de 1,5:1 (1188 e 1368) a 1,7:1 (1369 e 1410). Os esporângios dos isolados estudados eram não caducos e não papilados e apresentavam abertura do poro apical variando, em média, entre $5,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (1369) e $9,0 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (1188). Observou-se proliferação interna de esporângios (Figura 1I), e alguns dos quais eram constrictos no ponto médio.

Todos os isolados formaram clamidósporos (exemplo: Figura 1J) terminais e intercalares com variação do diâmetro médio de $16,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (1188) a $30,8 \pm 0,8 \mu\text{m}$ (1410).

A presença de intumescimento de hifas (Figura 1L) em culturas é uma das características marcantes da espécie, tendo sido observados tanto na microscopia óptica (MO) e como em microscopia eletrônica de varredura (MEV) (isolado 1188). Todos os isolados estudados formaram intumescimentos dos tipos esféricos e tubiformes, botriosos e torulosos (1367, 1368, 1369 e 1410), e coralóides (1367 e 1368). Nos isolados 1188 e 1410 observou-se intumescimento na base de alguns esporângios.

Os cinco isolados sobreviveram às temperaturas de 5 e 35 °C, embora não tenham apresentado crescimento. O diâmetro das colônias em CA cultivadas à 25 °C variou de 6,8 cm (1188) a 8,3 cm (1410), aos 4 dias de idade. Aos sete dias foi avaliado o tipo das colônias que se apresentaram estreladas (1368, 1410, Figura 3G), difusas (1367 e 1369) e petalóide tipo crisântemo para o isolado 1188 (Figura 3H). O micélio aéreo das colônias variou de floculoso (1188, 1367, 1368 e 1369) a cotonoso (1410).

Quando inoculados nos tecidos dos respectivos cultivos de origem os isolados causaram lesões (exemplos: Figura 3G, H e I), obtendo-se culturas puras a partir destas.

P. cinnamomi não é registrada como fitopatógeno de nenhum dos cultivos em que os isolados foram obtidos, porém a alface é hospedeira de *Phytophthora* spp. (LUZ, et al., 2001). A cebola (*Allium cepa* L.), hospedeira de *P. nicotianae* e de *P. cinnamomi* (KIMATI et al., 2005; LUZ et al., 2001), pertence ao mesmo gênero da

cebolinha, espécie em que obteve-se um isolado a partir da rizosfera no município de Ituberá. O presente fitopatógeno foi diagnosticado pela primeira vez na Bahia, em 2009, na rizosfera de *Parinari alvimii*, *Manilkara maxima* e *Harleyodendron unifoliolatum*, espécies endêmicas ao bioma Mata Atlântica sul baiana (MAGALHÃES, 2009).

3.3.1.4 *Phytophthora cinnamomi* var. *parvispora* Kröber e Marwitz

Três isolados obtidos da rizosfera de feijão-de-corda, no município de Itabuna-BA, apresentavam semelhança morfológica com *P. cinnamomi*, mas eram homotáticos (autoférteis) e por isso chamaram a atenção durante este estudo. Suas culturas foram caracterizadas por métodos morfológicos, fisiológicos e moleculares.

Os isolados apresentavam anterídeos anfígenos (Figura 2A), ou ocasionalmente paráginos, medindo entre $12,0 \pm 0,4 \times 13,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (1336) a $15,9 \pm 0,4 \times 15,3 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (1335) (Tabela 8). A variação da média do diâmetro dos oogônios foi de $25,1 \pm 0,6 \mu\text{m}$ (1335) a $26,9 \pm 0,5 \mu\text{m}$ (1337), enquanto, o diâmetro médio dos oósporos variou entre $22,3 \pm 0,5 \mu\text{m}$ (1335) e $24,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$ (1337).

Esporângios (Figura 2B) foram formados somente quando se adicionou solução de solo não esterilizada às culturas, sendo, predominantemente, elipsóides, ovóides e alguns distorcidos (1336 e 1337). A média do comprimento dos esporângios variou de $34,5 \pm 1,1 \mu\text{m}$ (1335) a $39,0 \pm 1,4 \mu\text{m}$ (1337) e para largura houve variação de $20,4 \pm 0,6 \mu\text{m}$ (1335) a $24,6 \pm 1,0 \mu\text{m}$ (1336). A relação comprimento/largura variou entre 1,5:1 (1336) e 1,7:1 (1335) (Tabela 8). Houve proliferação interna de esporangióforo e de esporângios (Figura 2C e D, respectivamente).

Os esporângios não são caducos e apresentam poro apical inconspícuo com média de abertura entre $7,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (1335 e 1337) a $7,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (1336). Todas as culturas apresentaram intumescimento de hifas dos tipos esféricos, tubiformes, coralóides e também sem forma definida. Raramente foram observados clamidósporos nas culturas.

Os três isolados não cresceram a temperatura de 5 °C, mas sobreviveram, e cresceram a 35 °C. O diâmetro das colônias em CA incubadas a 25 °C variou entre 8,1 cm (1335) e 8,4 cm (1336), após quatro dias. As colônias aos sete dias

Tabela 8 – Dimensões dos esporos sexuais, dos esporângios (μm) e temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) limites para crescimento de isolados de *Phytophthora cinnamomi* var. *parvispora* obtidos na rizosfera de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no município de Itabuna-BA.

N°	Oósporos*				Esporângios*				TLC	
	DO	DOO	CA	LA	CE	LE	C/L	AP	MIN	MAX
1335	25,1 \pm 0,6	22,3 \pm 0,5	15,9 \pm 0,4	15,3 \pm 0,2	34,5 \pm 1,1	20,4 \pm 0,6	1,7:1	7,1 \pm 0,2	> 5	> 35
1336	26,7 \pm 0,4	23,3 \pm 0,4	12,0 \pm 0,4	13,7 \pm 0,3	38,1 \pm 1,2	24,6 \pm 1,0	1,5:1	7,4 \pm 0,3	> 5	> 35
1337	26,9 \pm 0,5	24,0 \pm 0,5	15,4 \pm 0,5	15,6 \pm 0,3	39,0 \pm 1,4	24,0 \pm 0,6	1,6:1	7,1 \pm 0,2	> 5	> 35

* média de 50 observações \pm erro padrão

Legenda: DO (diâmetro dos oogônios); DOO (diâmetro dos oósporos); CA (comprimento dos anterídeos); LA (largura dos anterídeos); CE (comprimento dos esporângios); LE (largura dos esporângios); C/L (relação comprimento/largura dos esporângios); AP (abertura do poro apical); TLC (temperatura limite para crescimento mínima (MIN) e máxima (MAX)).

apresentaram forma petalóide do tipo crisântemo com micélio aéreo floculoso (exemplo, Figura 3I e J).

Os isolados foram patogênicos à vagens de feijão-de-corda (exemplo, Figura 4J), culturas puras dos mesmos foram re-isoladas após o final dos testes.

Através da caracterização morfofisiológica foram detectadas diferenças entre estes isolados e aqueles de *P. cinnamomi* aqui estudados, porém, foram insuficientes para identificar o patógeno. Através da análise filogenética realizada após o sequenciamento das regiões ITS do DNA desses patógenos foi possível identificá-los como *P. cinnamomi* var. *parvispora*. Esta espécie foi descrita em 1993 (KRÖBER; MARWITZ, 1993), na Alemanha, como patógeno de uma planta ornamental (*Beaucarnea* sp.). Não foram encontrados outros relatos da ocorrência desta espécie.

3.3.1.5 *Phytophthora* sp.

Dois dos 81 isolados, provenientes da inflorescência de antúrio (1407 e 1408), coletados no município de Ituberá, apresentaram características morfofisiológicas divergentes de todos os demais. As culturas são heterotáticas e formaram oósporos quando pareadas com o isolado 847, padrão do tipo de compatibilidade A1 da espécie *P. palmivora*, e em quantidades mínimas com os padrões A1 das espécies *P. capsici* e *P. nicotianae*. Através de análises morfofisiológicas nas duas culturas observou-se esporangióforo irregular simples; esporângios predominantemente ovóides (Figura 2E e F), e em menor quantidade, distorcidos. As médias de comprimento e da largura variaram de 46,9 \pm 1,1 x 30,0 \pm 0,7 μm (1408) a 51,0 \pm 1,2

x $31,7 \pm 0,7 \mu\text{m}$ (1407). A relação comprimento/largura foi de 1,6:1 para esporângios formados pelos dois isolados.

Os esporângios eram não caducos, papilados ou semi-papilados, as papilas quando presentes variaram em profundidade média de $5,0 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (1408) a $6,0 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (1407), enquanto a média da abertura do poro apical teve variação de $6,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (1407) a $7,3 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (1408). Os isolados apresentaram intumescimento de hifas dos tipos coralóide e toruloso (Figura 2H), somente o isolado 1407 formou hifas intumescidas do tipo tubiforme. No entanto, a formação de hifas intumescidas não é característica marcante nestas culturas.

As duas culturas formaram clamidósporos (exemplo, Figura 2G), terminais e intercalares, com variação da média do diâmetro de $21,7 \pm 0,8 \mu\text{m}$ (1408) a $24,3 \pm 0,6 \mu\text{m}$ (1407).

Nenhum dos isolados cresceu quando foram incubados a 5 e 35 °C, mas sobreviveram quando mantidos por quatro dias a estas temperaturas. A 25 °C o diâmetro médio das colônias aos quatro dias de idade variou de 6,9 cm (1407) a 7,3 cm (1408). Aos sete dias as colônias foram do tipo estrelada com micélio aéreo floculoso (exemplo, Figura 3L), principalmente nos contornos que dão forma a colônia.

Os isolados foram patogênicos em testes realizados com inflorescência de antúrio (exemplo, Figura 4L) e re-isolados a partir dos tecidos infectados.

Através da análise morfofisiológica de ambas as culturas observou-se que estes isolados não apresentam semelhança com nenhuma das espécies que freqüentemente ocorrem no Brasil.

3.3.1.6 *Phytophthora bisheria* Abad, Abad e Louws

O isolado 1186 obtido da rizosfera de bastão do imperador, no município de Ituberá-BA, foi identificado como *P. bisheria*, espécie homotática, cujas culturas puras formam oósporos com anterídeos paráginos (Figura I). Estes esporos formam-se em grupos localizados em diferentes partes do micélio (Figura J). Foi possível visualizar oósporos e esporângios em culturas puras tanto em MO como ao MEV.

O diâmetro médio dos oogônios e dos oósporos foi de $22,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$ e $21,1 \pm 0,3 \mu\text{m}$, respectivamente, com dimensões médias dos anterídeos de $7,7 \pm 0,2 \times 7,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$.

Os esporângios (Figura 2L e M) foram predominantemente ovóides, elipsóides e em menor número obpiriformes e distorcidos, com média de $55,6 \pm 1,2 \times 34,9 \pm 0,6 \mu\text{m}$. A relação comprimento/largura foi de 1,6:1. Observou-se esporângios não caducos, papilados com médias da profundidade e abertura do poro apical de $5,7 \pm 0,2 \times 9,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$, respectivamente.

Clamidósporos formados pelo isolado 1186 apresentaram diâmetro médio de $32,3 \pm 0,5 \mu\text{m}$.

O isolado sobreviveu quando incubado às temperaturas de 5 e 35 °C, embora não tenha apresentado crescimento. O diâmetro médio da colônia crescida a 25 °C foi de 7,3 cm, após 4 dias de incubação. A colônia apresentou formato petalóide do tipo rosácea com micélio aéreo floculoso no centro e nas bordas (Figura 3M).

Inoculações em folhas de bastão do imperador comprovaram a patogenicidade deste isolado (Figura 4M). A partir das lesões nos tecidos das folhas, ele foi re-isolado.

Phytophthora bisheria foi descrita recentemente infectando diferentes hospedeiros: morango no norte da Califórnia (EUA), roseira nos Países Baixos e framboesa na Austrália (ABAD et al., 2008). Este é o primeiro relato da ocorrência desta espécie no Brasil.

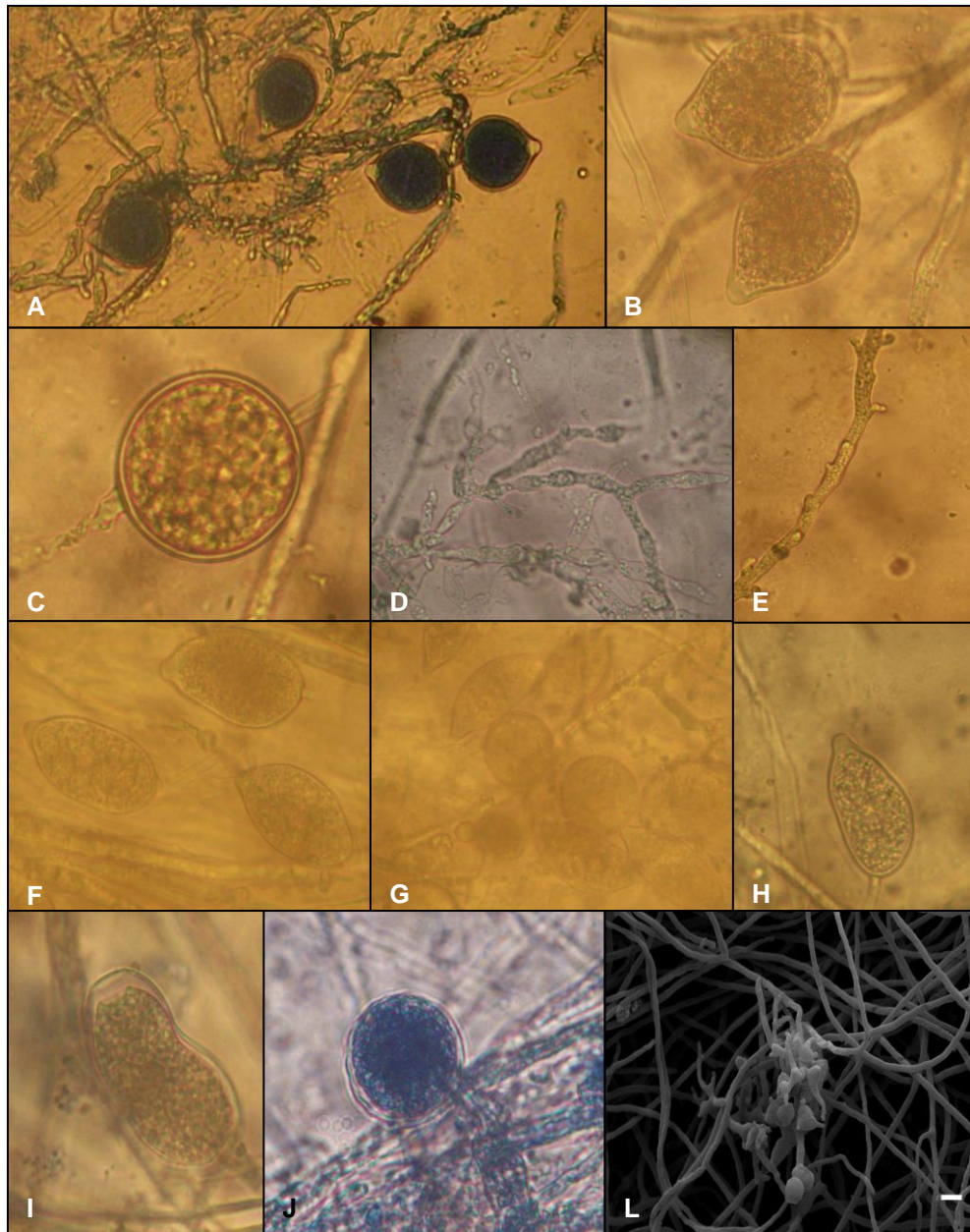


Figura 1 – Estruturas assexuadas dos isolados de *P. nicotianae*: esporângios, 1185 (A) e 1366 (B), clamidósporo intercalar, 1365 (C), intumescimento de hifa coralóide, 1363 (D) e toruloso, 1390 (E); de *P. palmivora*: esporângios, 1107 (F) e 1333 (H), esporângios e clamidósporos, 1108 (G); de *P. cinnamomi*: proliferação interna de esporângio, 1367 (I), clamidósporo (J) e intumescimento de hifas (L) (MEV), 1188, demais fotografias são visualizações em MO.

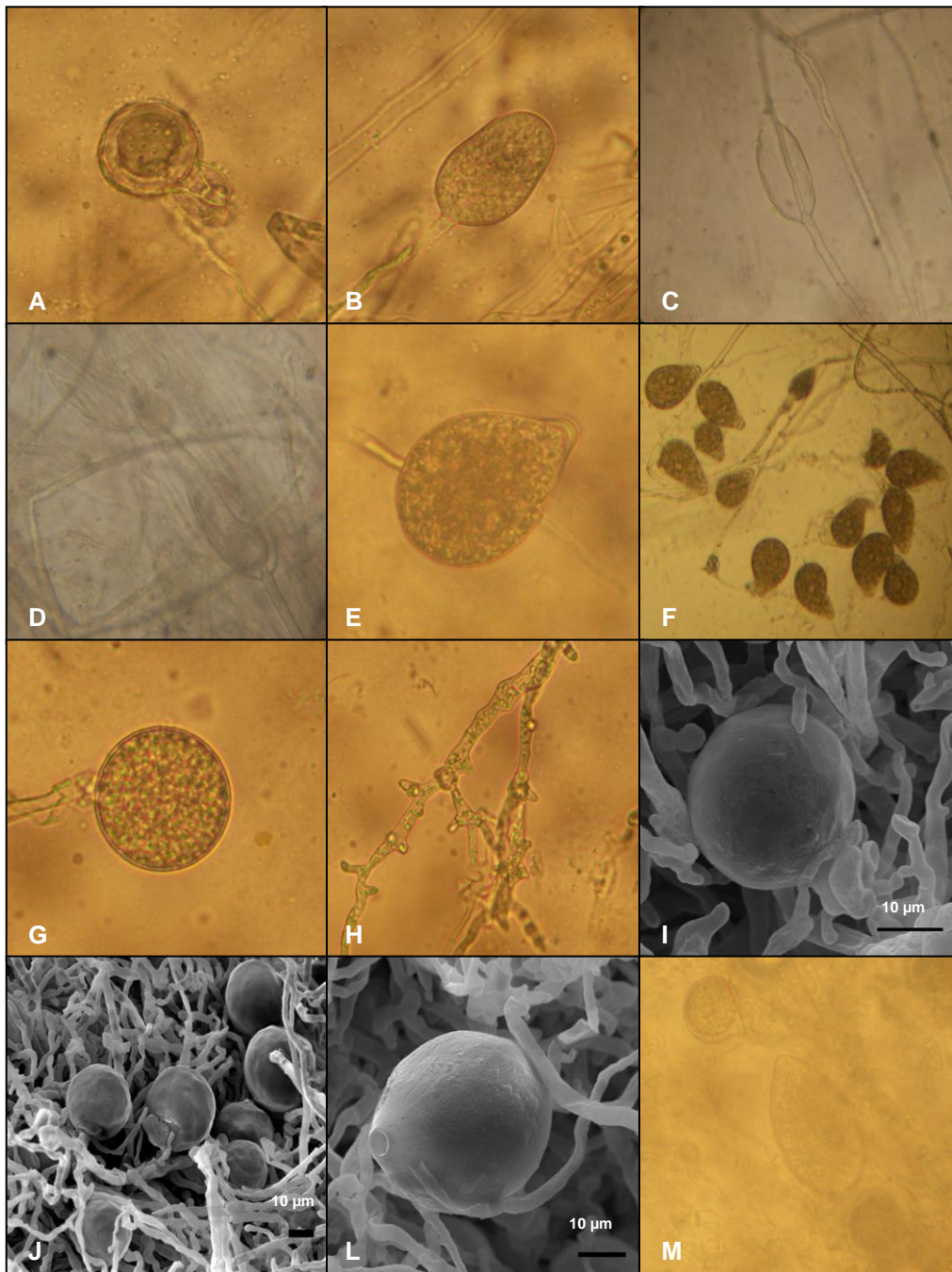


Figura 2 – Estruturas sexuais e/ou assexuais de *P. cinnamomi* var. *parvispora*: oósporo com anterídeo anfígeno e esporângio, 1337 (A e B, respectivamente), proliferação interna de esporângióforo e de esporângio, 1336 (C e D, respectivamente); de *Phytophthora* sp.: esporângio intercalar, 1407 (E), esporângios, clamidósporo terminal e intumescimento de hifas torulosos, 1408 (F, G e H, respectivamente); de *P. bisheria*: oósporos com anterídeo parágino (I, J e M) e esporângios, 1186 (L e M). I, J e L são visualizações ao MEV, as demais em MO.

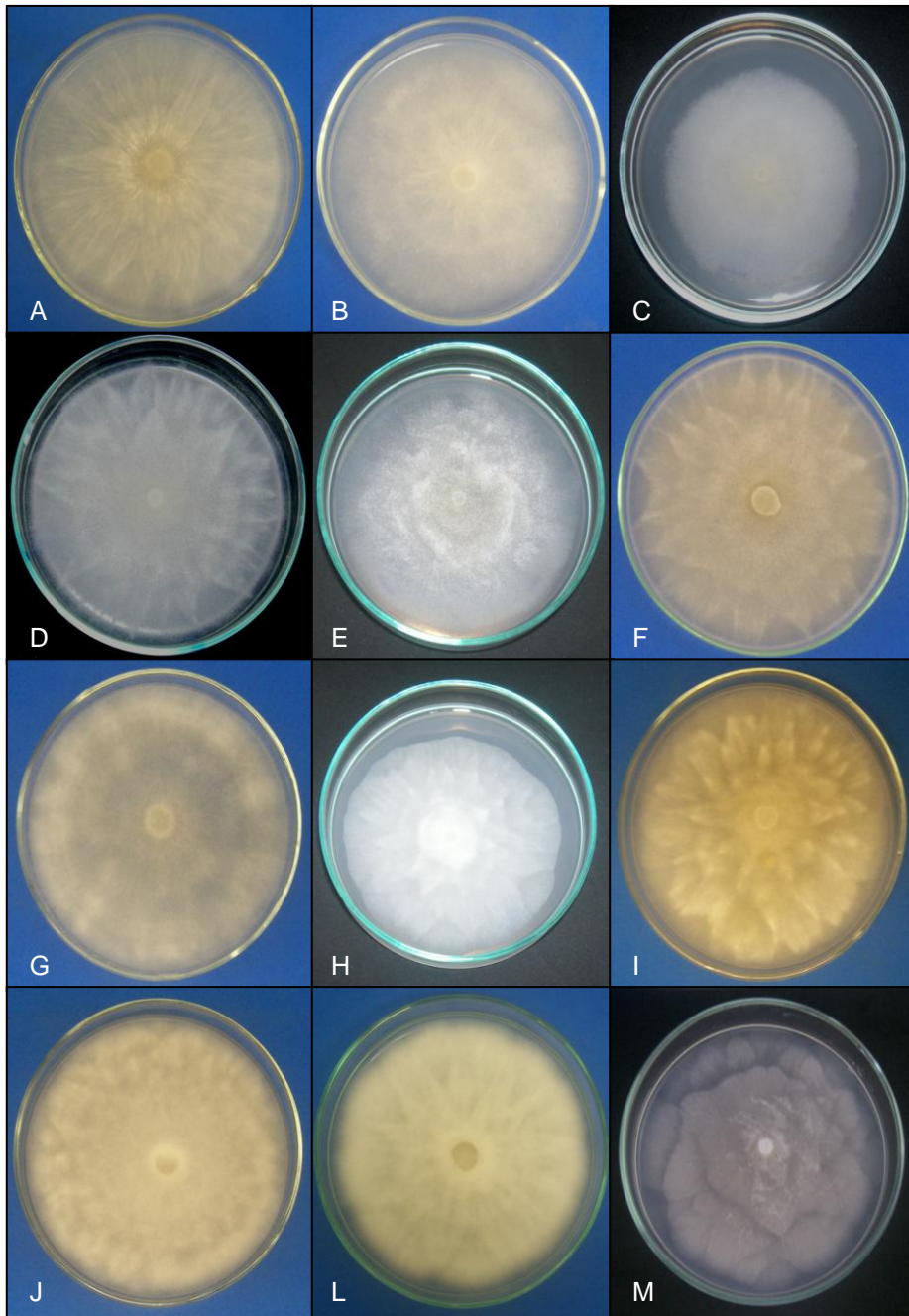


Figura 3 - Aspecto das colônias dos isolados de *P. nicotianae*: 1360 (A); 1375 (B); 1182 (C); de *P. palmivora*: 1107 (D), 1108 (E), 1329 (F); de *P. cinnamomi*: 1410 (G), 1188 (H); de *P. cinnamomi* var. *parvispora*: 1336 (I), 1337 (J); de *Phytophthora* sp.: 1407 (L) e de *P. bisheria*: 1186 (M), crescidas em meio de cultura cenoura ágar, aos sete dias de idade.



Figura 4 – Infecção natural causada por *P. nicotianae* em folhas de dracena baby (A) e em planta de hortelã (C) e respectivos testes de patogenicidade com os isolados 1180 (B) e 1366 (D). Lesões causadas, em testes *in vitro*, por isolados de *P. palmivora* em frutos de mamoeiro, 1189 (E) e de jiló, 1333 (F); de *P. cinnamomi* em folha de helicônia bihai I, 1188 (G), de cebolinha, 1367 (H) e de alface, 1369 (I); de *P. cinnamomi* var. *parvispora* em vagem de feijão-de-corda, 1335 (J); de *Phytophthora* sp. em inflorescência de antúrio, 1408 (L); de *P. bisheria* em folha de bastão do imperador, 1186 (M).

3.3.1.7 Caracterização molecular

O alinhamento das seqüências resultantes da região ITS do DNA ribossômico de 28 isolados (1108, 1176, 1178, 1179, 1183, 1185, 1186, 1330, 1331, 1332, 1335, 1337, 1358, 1362, 1363, 1366, 1375, 1377, 1389, 1390, 1399, 1403, 1404, 1405, 1406, 1407, 1408, 1409) de *Phytophthora* spp. obtidos de tecidos ou da rizosfera de plantas infectadas apresentou 705-pb. O filograma mostrou nítida diferenciação de cinco grupos, de acordo com comparações feitas com seqüências dos bancos de dados públicos (Figura 5). Os isolados de *P. cinnamomi* formaram dois subgrupos. O primeiro contendo os isolados de feijão-de-corda (1335 e 1337) e dois isolados do banco de dados identificados como *P. cinnamomi* var. *parvispora* (GQ38826.1 e GU460376.1); o segundo formado pelo isolado de *P. cinnamomi* do banco de dados (FJ801612.1), o isolado 1327 de abacateiro, utilizado como padrão da espécie e o isolado 1409 de bastão do imperador. Os isolados de *P. palmivora* (1108, 1330, 1331 e 1332) agruparam-se todos juntos com 100% de identidade com as seqüências dos bancos de dados públicos para esta espécie (GU993909.1 e GU111664.1). Os isolados 1407 e 1408 de antúrio apresentaram 100% de identidade entre si, porém as seqüências de espécies disponíveis no banco de dados mais próximas filogeneticamente a estes isolados foram *P. capsici* e *P. citrophthora*. O isolado 1186 de bastão do imperador agrupou-se filogeneticamente com duas seqüências dos acessos de nº GU259076.1 e DQ298447.1 de *P. bisheria*. No último grupo encontram-se 18 isolados de *P. nicotianae* que apresentaram 100% de identidade entre si e com duas seqüências de acessos desta espécie disponíveis nos bancos de dados públicos (AJ854295.1 e GU111682.1).

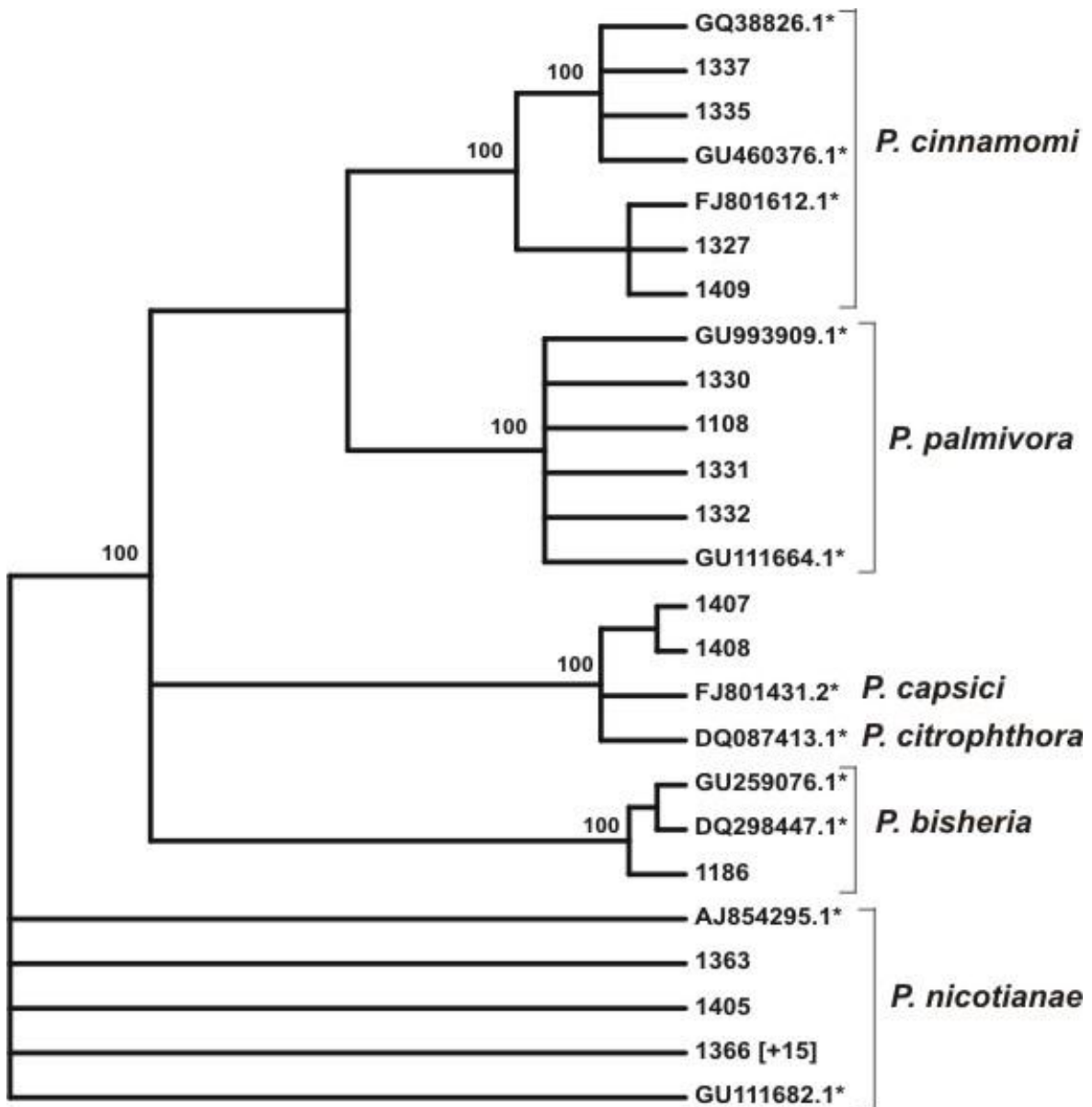


Figura 5 – Cladograma dos isolados de *Phytophthora* coletados na região sul da Bahia baseada em 705-pb de nucleotídeos alinhados da região ITS do rDNA, 135 dos quais informativos para o método de Máxima Parcimônia. O cladograma foi construído utilizando-se o PAUP com o método de Máxima Parcimônia. Os valores apresentados nas ramificações correspondem aos valores de bootstrap com base em 500 repetições. A árvore é não enraizada e sem escala. Sequências marcadas com asterisco foram obtidas dos bancos de dados públicos.

3.4 DISCUSSÃO

Este trabalho abrangeu a coleta de tecidos e de solo da rizosfera de plantas de ciclo anual, olerícolas, ornamentais, medicinais e frutíferas, passíveis de estarem infectadas com *Phytophthora* spp.; o isolamento e a identificação através de caracteres morfofisiológicos e moleculares; e a comprovação pelo postulado de Koch da patogenicidade dos isolados obtidos à seus hospedeiros de origem. As 17 coletas foram realizadas em assentamentos rurais e propriedades direcionadas à agricultura familiar, tendo em vista o aumento da diversidade agrícola na região sul da Bahia e a necessidade de assistência aos pequenos produtores e assentados que praticam a agricultura familiar, cujo número cresceu nos últimos anos em função tanto da crise da lavoura cacaueteira, como dos programas governamentais de apoio a esta atividade agrícola.

As coletas foram realizadas em oito municípios e um distrito da região que concentravam o maior número de assentamentos e propriedades com agricultura familiar. Isolados de *Phytophthora* foram obtidos em cinco desses municípios e no distrito de serra Grande (Uruçuca). Nas propriedades visitadas nos municípios de Camamu, Nilo Peçanha e Una, não foram detectados colônias destes patógenos quer seja nas amostras de material vegetal ou no solo. As primeiras coletas realizadas foram infrutíferas, mas a partir de agosto de 2008, amostras positivas foram obtidas, totalizando 24 isolados, provenientes de diversos cultivos no ano de 2008. Nas coletas de 2009, principalmente nos três primeiros meses do ano, o maior número de isolamentos de *Phytophthora* foi registrado (57).

Os períodos em que maior número de isolados foram obtidos corresponderam àqueles em que a umidade relativa do ar estava alta, em torno de 90%, em agosto e setembro de 2008, em função da temperatura estar mais amena e entre janeiro a março de 2009, em decorrência de chuvas freqüentes (Ceplac, boletim meteorológico). Isto era mais ou menos esperado, pois, *Phytophthora* spp., como os demais oomicotas, são microorganismos altamente beneficiados pela presença de água livre na superfície das plantas suscetíveis ou no solo, possibilitando a liberação dos zoósporos, principais propágulos infectivos, que nadam livremente e penetram com facilidade nos hospedeiros (WESTE, 1983). A chuva é também um dos

principais agentes de disseminação dos esporos desses patógenos (LUZ; SILVA, 2001).

De todos os tipos de cultivos amostrados foram obtidos isolados de *Phytophthora* spp. (Tabela 1), demonstrando que estes fitopatógenos realmente são polívoros. Maior número de isolados (35) foi obtido de plantas medicinais, embora apenas de manjeriço, hortelã e alecrim, deste último principalmente (Tabela 4). As olerícolas (Tabela 2) vieram em segundo lugar (20), sendo o grupo onde maior diversidade de espécies cultivadas com a rizosfera infestada foi observado (couve, berinjela, jiló, tomate, agrião, coentro, espinafre, cebolinha e alface). Em terceiro lugar em número de isolamentos positivos colocaram-se as plantas ornamentais (14), *Phytophthora* spp. tendo sido isoladas de bananeira ornamental, antúrio, bastão do imperador, dracena baby e heliconia (Tabela 3). Entre os cultivos anuais pesquisados (mandioca, abacaxi e feijão-de-corda), apenas na rizosfera de plantas deste último o patógeno estava presente.

A maioria dos isolados (aproximadamente 90%) foi obtida da rizosfera dos cultivos amostrados, o que vem corroborar com Luz e Matsuoka (2001) sobre o ciclo das doenças causadas por *Phytophthora* ter na sua maioria início e fim no solo. As espécies de *Phytophthora* são adaptadas ao solo, devido à formação de propágulos como clamidósporos e oósporos que permitem a sobrevivência do patógeno às condições adversas do meio. Em condições favoráveis a disseminação do patógeno ocorre através dos zoósporos, e os processos infectivos sucedem-se rapidamente.

Algumas espécies, como por exemplo, *P. cinnamomi*, possuem capacidade saprofítica, podendo sobreviver no solo, na ausência de plantas hospedeiras, até oito anos, na forma de clamidósporos e, em raízes infectadas, no mínimo por 15 anos (PICCININ et al., 2005).

Conforme Luz e Silva (2001) o solo e as raízes são considerados as principais reservas de inóculo para o desencadeamento de epidemias de podridão-parda e outras doenças do cacauzeiro causadas por *Phytophthora*.

A ocorrência de *Phytophthora* no solo também pode estar relacionada à presença de plantas espontâneas, nativas, que permitem a sobrevivência do fungo nos cultivos agrícolas mal manejados, poucas pesquisas existem sobre hospedeiros que não possuem importância econômica, a não ser quando se constituem em riscos epidemiológicos, como é o caso de plantas nativas que são suscetíveis a *P. cinnamomi*, nas florestas da Austrália, onde este patógeno causa danos

devastadores. O conhecimento das espécies nativas suscetíveis é uma forma de controlar o avanço do patógeno nas florestas australianas (GILES et al, 2007).

Deve ser levado em consideração também para explicar a presença de *Phytophthora* spp. em solo da rizosfera que plantios anteriores podem ter sido infectados permanecendo no solo propágulos do patógeno associados aos restos culturais ou, também que tenham sido carreados pela água da chuva ou por respingos da irrigação de plantas contaminadas para o solo.

A maioria dos isolados (64,2%) encontrados neste trabalho pertence à espécie *P. nicotianae* (Tabela 5) a qual possui o maior número de hospedeiros no Brasil (31) (LUZ, 2006) entre os principais podem ser citados os citros, a acácia-negra e o abacaxizeiro. Esta espécie é adaptada ao solo e causa diferentes doenças como gomose, podridões de raízes e tombamento de mudas, podendo disseminar-se facilmente através de clamidósporos, presentes nas partículas de solo ou associados a restos de cultura. Ela foi primeiramente diagnosticada na região cacauera da Bahia causando danos em folha-da-costa (*Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken), no município de Itajuípe (LUZ, comunicação pessoal), espécie já anteriormente assinalada como sua hospedeira na Índia (RAO et al., 1962). Com o presente trabalho foram registrados oito novos cultivos (berinjela, tomateiro, dracena baby, agrião, coentro, espinafre, hortelã e alecrim) como hospedeiros desta espécie no estado da Bahia e na região.

Phytophthora palmivora, espécie freqüentemente diagnosticada em inspeções fitossanitárias realizadas no sul da Bahia, causando doenças no cacauero (podridão-parda), na seringueira (requeima e queda-anormal-das-folhas), no mamoeiro (podridão-do-pé e dos frutos) e na pupunheira (podridão-do-estipe), foi a segunda espécie em número de isolados (17) registrada neste trabalho (Tabela 6). Essa espécie, que também é polífaga e cosmopolita, coincidentemente, também é a segunda em número de hospedeiros já assinalados no Brasil (LUZ, 2006) possuindo outros hospedeiros cultivados na região. De acordo com esta pesquisa, a espécie ganhou mais um hospedeiro, a bananeira ornamental, que ainda não havia sido mencionada entre os hospedeiros conhecidos da espécie (ERWIN; RIBEIRO, 1996) enquanto para a região e para o Brasil outros três novos cultivos (couve, jiló e manjeriço) mostraram-se suscetíveis a *P. palmivora*.

Seis dos isolados obtidos pertencem a *P. cinnamomi* (Tabela 7), espécie que possui mais de 1.000 hospedeiras no mundo (GALLEGLY; HONG, 2008) e causa

doenças em diferentes cultivos no Brasil, como o abacateiro (*Persea americana* Mill.) e o abacaxizeiro (KIMATI et al., 2005), ambos cultivados no sul da Bahia. No entanto, a ocorrência de *P. cinnamomi* na região cacauzeira é recente, tendo sido encontrada na rizosfera de plantas endêmicas da Mata Atlântica (MAGALHÃES, 2009). Os assinalamentos feitos no presente trabalho são os primeiros da ocorrência de *P. cinnamomi* na rizosfera de cultivos agrícolas de bastão do imperador, helicônia, cebolinha e alface, na região.

Não existiam relatos da ocorrência de *P. cinnamomi* var. *parvispora* e *P. bisheria* no Brasil. A espécie *P. bisheria* foi descrita recentemente, no ano de 2008, por Abad et al. (2008). O feijão-de-corda, cultivo no qual obteve-se os isolados de *P. cinnamomi* var. *parvispora*, assim como o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) são hospedeiro de *P. nicotianae* (RAO et al., 1962), porém, o registro destas espécies nestes hospedeiros é inédito, bem como destas espécies no Brasil.

O antúrio, planta ornamental da qual se obtiveram dois isolados de uma espécie que não foi possível identificar através dos recursos taxonômicos utilizados neste trabalho, e, portanto, mencionada apenas como *Phytophthora* sp., é hospedeiro de *P. citrophthora*, fitopatógeno que foi diagnosticado causando danos em folhas e inflorescências de antúrio, no município de Ituberá-BA (PAIM et al., 2006). Os isolados ora obtidos guardam semelhança com os daquela espécie, bem como com os de *P. capsici*, espécies das quais estão filogeneticamente próximos (Figura 5), no entanto, não podem ser classificados como tal por divergirem em diversos outros aspectos morfológicos. Segundo alguns autores, análises de isoenzimas e seqüências ITS demonstraram similaridades entre *P. capsici* e *P. citrophthora* do cacauzeiro (APPIAH et al., 2004; FOSTER et al., 1995; ORTIZ-GARCIA, 1996), fato que também foi constatado por Paim (2005).

Comparando-se as dimensões das estruturas dos isolados de *P. nicotianae* obtidos (Tabela 5) com as apresentadas nas chaves de identificação do gênero *Phytophthora*, verificou-se que as medidas de comprimento e largura dos esporângios de todos os isolados estão de acordo com as chaves de Waterhouse (1956, 1963) (25 - 50 x 20 - 40 μm), enquadrando-se nos valores estabelecidos por Stamps et al. (1990) (45 - 75 μm), estando próximas das apresentadas por Gallegly e Hong (2008) (45 x 37 μm). A relação comprimento/largura dos esporângios também confere com a chave de Waterhouse (1963). A média do diâmetro dos clamidósporos da maioria dos isolados de *P. nicotianae* está próxima da média

citada por Gallegly e Hong (2008) (30 μm) e todos os isolados se enquadram nos limites estabelecidos por Waterhouse (1963) (20 - 60 μm) e Stamps et al. (1990) (< 25 - > 35 μm).

Das 14 culturas de *P. palmivora* caracterizadas (Tabela 6), cinco (1107, 1108, 1189, 1193 e 1195) apresentam média de comprimento dos esporângios inseridas nos limites estabelecidos por Waterhouse (1963) (50 - 60 μm) e oito culturas (1107, 1108, 1189, 1191, 1193, 1194 e 1195) nos limites propostos por Stamps et al. (1990) (45 - 75 μm), enquadrando-se todos os isolados no intervalo apresentado por Gallegly e Hong (2008) (35 - 60). Para largura dos esporângios, apenas a média do isolado 1193 enquadra-se no limite estabelecido por Waterhouse (1963) (31 - 35 μm), mas de modo geral, as médias de todos os isolados encontram-se dentro ou bem próximas do intervalo de variação apresentado por Holliday (1980) (40 - 60 x 25 - 35 μm). Os valores da relação C/L de todos os isolados, enquadram-se nos valores propostos por Waterhouse (1963) e Holliday (1980). Com relação às médias do diâmetro dos clamidósporos de *P. palmivora*, os valores estão dentro ou próximos dos intervalos estabelecidos por Waterhouse (1963) (30 - 35 μm) e por Holliday (1980) (32 - 42 μm), bem como da média apresentada por Gallegly e Hong (2008) (33 μm), e também dos limites preconizados por Stamps et al. (1990) (< 25 - > 35 μm).

As médias das dimensões dos cinco isolados de *Phytophthora cinnamomi* (Tabela 7) foram comparadas com outras disponíveis na literatura, estando os valores médios de comprimento dos esporângios de três isolados (1188, 1369 e 1410) dentro do intervalo (38 - 84 μm) estabelecido por Waterhouse (1956, 1963) e outros dois (1367 e 1368) bem próximos desse, sendo, porém, inferiores aos limites (45 - 75; > 75 μm) estabelecidos por Stamps et al. (1990). No entanto, a largura média dos esporângios dos isolados obtidos neste trabalho está abaixo do limite (27 - 39 μm) apresentado por Waterhouse (1956, 1963), com exceção do isolado 1188 (27,8 \pm 0,6 μm). As dimensões (comprimento e largura) dos esporângios dos isolados aqui caracterizados encontram-se abaixo das médias propostas na chave de Gallegly e Hong (2008) (60 x 34; 85 x 35 μm), mas estão inseridas nos limites propostos por Royle e Hickman (1964) (27,2 - 114,4 x 22,9 - 64,3 μm). Os valores de diâmetro médio dos clamidósporos dos isolados identificados como *P. cinnamomi* encontram-se próximo do limite estabelecido por Waterhouse (1956, 1963) (31 - 50 μm), com exceção do isolado 1188 (16,9 \pm 0,3 μm), mas os cinco isolados

caracterizados enquadram-se no intervalo proposto por Stamps et al. (1990) (< 25 - > 35 μm) para este caráter taxonômico.

Para a espécie *P. cinnamomi* var. *parvispora* observou-se que os diâmetros médios dos oogônios e oósporos pertencentes aos isolados obtidos (Tabela 8) são inferiores às médias apresentadas por Gallegly e Hong (2008) (42 e 40 μm , respectivamente), porém enquadram-se nos limites propostos por Kröber e Marwitz (1993) (23,0 - 41,0; 22,0 - 36,0 μm , respectivamente). Comparando-se as dimensões dos anterídios dos isolados 1335, 1336 e 1337 com a da descrição constante na chave de Gallegly e Hong (2008) (24 x 14 μm), verificou-se que os isolados do Brasil apresentaram em média anterídios menores em comprimento e mais largos. Já as médias de comprimento e largura dos esporângios dos três isolados classificados como desta espécie, (Tabela 8), enquadram-se no limite estabelecido por Gallegly e Hong (2008) (37,4 - 56,0 x 28,9 - 40,8 μm), com exceção do isolado 1335 que apresentou média bem próxima do valor mínimo (34,5 \pm 1,1 μm) bem como aos valores apresentados por Kröber e Marwitz (1993) (14,0 - 83,0 x 13,0 - 43,0 μm).

O isolado de *P. bisheria* (1186) apresentou diâmetro médio dos oogônios e oósporos um pouco inferior aos valores encontrados por Abad et al. (2008) (24 - 46 μm ; 25 - 31 μm , respectivamente), porém, a largura média dos anterídios está inserida no limite proposto pelos autores (7 - 11 μm), o mesmo ocorrendo para as dimensões dos esporângios (42 - 72 x 24 - 36 μm). Os autores que descreveram a espécie (ABAD et al., 2008), não observaram formação de clamidósporos, ao contrário do que foi observado no isolado 1186 de bastão do imperador obtido em Ituberá.

Na região existem isolados de *P. nicotianae* e de *P. cinnamomi* dos tipos compatíveis A1 e A2. Verificou-se a presença de isolados A1 de *P. nicotianae* no município de Uruçuca e os demais isolados tipo A2 nos municípios de Itabuna, Itacaré, Ituberá e no distrito de Serra Grande. Cinco isolados de *P. cinnamomi* tipo A2 foram encontrados em Ituberá e um do tipo A1 em Ilhéus. Embora os isolados das referidas espécies que possuem compatibilidade divergente foram encontrados em municípios distintos, deve-se evitar o transporte de mudas dessas plantas de um para outro município para tentar impedir que isolados de ambos os tipos compatíveis ocorram em um mesmo local, porque este fato poderá proporcionar a ocorrência de recombinações genéticas e formação de híbridos intra ou interespecíficos entre indivíduos geneticamente compatíveis (LUZ; MATSUOKA, 2001). Estes novos

indivíduos poderão desenvolver maior adaptabilidade ao ambiente, resistência a fungicidas e maior agressividade ao hospedeiro.

Com relação à compatibilidade interespecífica, foi detectada a presença de isolados de *P. nicotianae* do tipo compatível A2 (provenientes da rizosfera de berinjela) e de *P. palmivora* do tipo A1 (obtidos da rizosfera de mamoeiro e de olerícolas) no município de Itabuna. Em Ituberá obteve-se isolados de *P. nicotianae* (a partir da rizosfera de olerícolas) e de *P. cinnamomi* (a partir da rizosfera de olerícolas e de bastão do imperador) do tipo compatível A2 e um isolado de *P. palmivora* do tipo A1 (rizosfera de bananeira ornamental). No município de Itacaré isolou-se *P. nicotianae*, da rizosfera de tomateiro, sendo este isolado do tipo A2 e o isolado de *P. palmivora*, da rizosfera de manjeriço, é do tipo compatível A1. A presença de isolados dos dois tipos compatíveis, embora estes pertençam a espécies distintas, em uma mesma área possibilita a formação de híbridos interespecíficos, mas nem sempre os oósporos formados entre os talos são férteis.

Híbridos interespecíficos são relativamente freqüentes no gênero *Phytophthora*, tendo em alguns casos ganhado o status de espécie, quando se estabilizam, como é o caso de *P. alni* Brasier et al. (BRASIER et al., 2004).

O uso de técnicas moleculares na identificação de *Phytophthora* spp. ampliou-se nas últimas décadas (FORSTER et al., 2000) justamente devido a grande variabilidade observada entre os critérios morfobiométricos utilizados nas chaves tradicionais (NEWHOOK et al., 1978; STAMPS et al., 1990; WATERHOUSE, 1963). Os trabalhos de Cook et al. (2000); Martin e Tooley (2003) e Kroon et al. (2004), foram decisivos para a valorização do seqüenciamento de genes nucleares e mitocondriais como importantes ferramentas na taxonomia do gênero. A mais nova chave de *Phytophthora* contempla dados morfofisiológicos e moleculares (GALLEGLY; HONG, 2008).

Neste estudo a caracterização molecular através do seqüenciamento da região ITS do rDNA confirmou a identificação baseada em dados morfobiométricos e fisiológicos realizados para os isolados de *P. palmivora*, *P. nicotianae* e *P. cinnamomi*, também a dos isolados de feijão-de-corda que eram semelhantes a *P. cinnamomi*, mas sua descrição batia com a variedade *parvispora* desta espécie e assim a análise molecular permitiu a sua identificação. Como a espécie *P. bisheria* é relativamente nova (ABAD et al., 2008), a análise molecular foi decisiva para a

identificação do isolado obtido de bastão do imperador em Ituberá. Esta última espécie não consta em nenhuma chave do gênero.

Observou-se com base nos dados moleculares (Figura 5) baixa diversidade genética entre os 18 isolados de *P. nicotianae* seqüenciados para a região ITS do rDNA, pois, entre eles, estavam isolados obtidos de diversos municípios (Itabuna, Itacaré, Uruçuca, Ituberá e no distrito de Serra Grande) e de diversos hospedeiros [alecrim (7), hortelã (2), dracena baby (3), berinjela (2), agrião (1) e espinafre (1)]. Estes 16 isolados apresentaram 100% de identidade entre si. Não houveram discrepâncias também quanto aos dados morfobiométricos e todos os isolados desta espécie cresceram a 35 °C.

Entre as espécies encontradas, *Phytophthora nicotianae* está presente em todos os municípios em que houve amostras positivas para *Phytophthora* e em diferentes cultivos: olerícolas, plantas ornamentais e medicinais. A presença dessa espécie e de outras como *P. palmivora* e *P. cinnamomi* em diferentes áreas cultivadas representa um risco às atividades agrícolas devido ao hábito polífago destes patógenos (ERWIN; RIBEIRO, 1996), por isso é necessária a adoção de práticas agrícolas como a rotação de culturas, a adubação orgânica, drenagem de solo, quando necessário, entre outras, para minimizar ou inibir o surgimento de doenças causadas por estes fitopatógenos.

Os registros da ocorrência de *P. cinnamomi* var. *parvispora* e *P. bisheria* na região cacaueira ampliaram a lista de espécies de fitopatógenos do gênero *Phytophthora* presentes no país, estas espécies são homotáticas, produzem oósporos sem a presença de outros talos, apresentam desse modo vantagem porque esses esporos possuem paredes grossas que lhes proporcionam a sobrevivência às condições adversas do ambiente, garantindo assim a permanência do patógeno por vários ciclos de cultivo.

As análise das características morfofisiológicas e moleculares, baseadas no sequenciamento da região ITS não permitiram a identificação dos isolados 1407 e 1408 obtidos de antúrio (Tabela 3, Figura 5) sendo necessário o sequenciamento de maior número de genes para complementar os estudos filogenéticos que possam levar à identificação deste patógeno em nível de espécie.

Os relatos de *Phytophthora* spp. em diferentes cultivos instalados em pequenas propriedades rurais localizadas em municípios do sul da Bahia indicam a necessidade de assistência técnica aos pequenos produtores para evitar perdas e

danos causados por espécies de *Phytophthora* e por outros fitopatógenos que possam estar a elas associados.

CAPÍTULO 2

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES BIOCONTROLADORES DE *Phytophthora* spp. NO SUL DA BAHIA.

RESUMO

Diversos fitopatógenos do gênero *Phytophthora* afetam espécies de importância econômica e ambiental no sul da Bahia, em busca de métodos de controle de doenças eficientes e menos prejudiciais ao ecossistema, este trabalho teve os seguintes objetivos: i) Isolar, identificar e selecionar possíveis agentes biocontroladores em propriedades agrícolas localizadas no sul da Bahia; ii) Realizar testes *in vitro* entre os possíveis BCAs isolados e espécies do gênero *Phytophthora* patogênicas a cultivos existentes na região. Coletaram-se amostras vegetais e de solo em áreas que apresentavam plantas com sintomas de doenças. Através de métodos diretos e indiretos espécies fúngicas foram isoladas e identificadas por critérios morfofisiológicos. Os isolados com potencial para biocontrole foram confrontados *in vitro* com isolados de *P. nicotiane* (3), *P. palmivora* (2), *P. bisheria* (1) e de *P. cinnamomi* (1), os raios médios das culturas confrontadas ou não foram comparados através do programa SAS pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) e avaliaram-se os confrontos quanto ao tipo de reação antagônica. Quatro isolados de *Trichoderma* foram obtidos e identificados como: *T. harzianum* (2), *T. virens* (1), *T. atroviride* (1) e

um como *Clonostachys compactiuscula*. Todos os agentes reduziram significativamente o raio médio das colônias dos fitopatógenos e demonstraram antagonismo as quatro espécies de *Phytophthora*, através da competição por interferência. Nos confrontos entre *Trichoderma* spp. e *Phytophthora* spp. verificou-se substituição, impasse ou entrelaçamento de hifas, além de hiperparasitismo. O isolado de *C. compactiuscula* exerceu antibiose às colônias de *Phytophthora*. Ensaio futuros em condições controladas e campo serão necessários para comprovar o potencial dos BCAs.

Palavras-chave: Controle biológico; micoparasitas; taxonomia.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Phytophthora* spp. BIOCONTROL AGENTS IN SOUTH OF BAHIA.

ABSTRACT

Several pathogens of the genus *Phytophthora* affect species of economic and environmental importance in south Bahia. In search of diseases control methods more efficient and less harmful to the ecosystem, this study was proposed with two objectives: i) To isolate, identify and select potential biocontrol agents in farms located in south Bahia; ii) to perform *in vitro* tests among the possible BCAs isolated and species of *Phytophthora* pathogenic to crops in the region. Samples were collected from soil and plants showing disease symptoms. Fungal species were isolated through direct and indirect methods and identified by morphophysiological criteria. The isolates with biocontrol potential were confronted *in vitro* with isolates of *P. nicotianae* (3), *P. palmivora* (2), *P. bisheria* (1) and *P. cinnamomi* (1), and the average radius of the confronted cultures and controls were compared by Tukey test ($P < 0.05$) using the SAS program. The type of antagonistic reaction of each confront was also evaluated. Four isolates of *Trichoderma* were obtained and identified as *T. harzianum* (2), *T. virens* (1), *T. atroviride* (1) and one as *Clonostachys compactiuscula*. All biocontrol agents reduced significantly the average radius of the pathogens colonies and showed antagonism to the four species of *Phytophthora* by substitution, deadlock, intertwining of hyphae, and hyperparasitism. The *C. compactiuscula* isolate showed antibiosis to the colonies of *Phytophthora*. Future

tests under greenhouse and field conditions will be necessary to demonstrate the potential of these BCAs.

Keywords: Biological control; micoparasites; taxonomy.

4.1 INTRODUÇÃO

Espécies de *Phytophthora* são bastante conhecidas como patógenos de cultivos agrícolas e de algumas espécies florestais (REESER et al., 2007). Esses fitopatógenos estão amplamente disseminados em áreas tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, causando perdas significativas em diversos cultivos como citros (*Citrus* spp.), mamoeiro (*Carica papaya* L.), cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) (LUZ et al., 2001).

Phytophthora spp. produzem diferentes propágulos infectivos como esporângios, zoósporos, clamidósporos e oósporos, estes dois últimos esporos podem permanecer viáveis no solo por anos e dar início a novo ciclo da doença quando as condições ambientais são favoráveis, além disso muitas espécies de *Phytophthora* são polífagas (ERWIN; RIBEIRO, 1996), devido a esses e outros fatores o controle de doenças causadas por estes fitopatógenos torna-se difícil.

Entre as medidas de controle mais utilizadas contra as fitomoléstias provocadas por *Phytophthora* spp. pode-se citar o uso de fungicidas, o plantio em solos bem drenados, a utilização de cultivares ou porta-enxertos resistentes, a poda fitossanitária, dentre outras medidas (KIMATI et al., 2005). O uso de fungicidas, apesar de apresentar eficiência em alguns casos, pode gerar graves impactos no ecossistema, provocar o surgimento de populações do patógeno resistentes ao produto químico, oferecer riscos a saúde humana (SCHUMANN; D' ARCY, 2006), e aumentar os custos de produção.

Diversas pesquisas tem sido realizadas em busca de métodos que possam substituir ou serem utilizados de forma integrada ao controle químico, visando à implantação de uma agricultura sustentável, a qual o controle biológico é um componente essencial (STEYAERT et al., 2004). Esse tipo de controle pode ser exercido através do uso de agentes biocontroladores (BCAs), microrganismos como fungos, bactérias, vírus e nematóides, que interagem com os fitopatógenos através

de um ou mais dos seguintes mecanismos: indução de resistência, proteção cruzada e antagonismo, sendo este último subdividido em antibiose, competição, hiperparasitismo, predação e hipovirulência (BETTIOL; GHINI, 1995; BLUM, 2006).

Entre os diferentes BCAs, destacam-se espécies de *Trichoderma* e *Clonostachys*, formas anamórficas de *Hypocrea* e de *Bionectria* (Filo Ascomycota), respectivamente (ALEXOPULOS et al., 1996; SCHROERS, 2001). Esses micoparasitas tem sido muito utilizados em experimentos que visam encontrar medidas de controle menos agressivas ao meio ambiente (KRAUSS; SOBERANIS, 2001; TONDJE et al., 2007). Produtos formulados a partir desses microrganismos são comercializados, principalmente no exterior, e alguns desses biofungicidas são específicos para o controle de oomicetos, dos gêneros *Pythium* e *Phytophthora*.

Na região sul da Bahia estão presentes diferentes patossistemas envolvendo *Phytophthora* spp. e espécies vegetais de importância econômica como o mamoeiro, o cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.), a seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg) e a pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth), além de outras culturas mais recentes como a do antúrio (*Anthurium andreanum* Lindl.) já apresentam problemas com *P. citrophthora* (PAIM et al., 2006) e tantos outros potenciais hospedeiros, também sendo cultivados aliam-se a isto as condições ambientais favoráveis a proliferação de doenças, umidade relativa do ar elevada, chuvas frequentes e temperaturas médias anuais nunca inferiores a 20 °C . Por tudo isso é essencial o presente trabalho que teve como objetivos: i) Isolar, identificar e selecionar possíveis agentes biocontroladores em propriedades agrícolas localizadas no sul da Bahia; ii) Realizar testes *in vitro* entre os possíveis BCAs isolados e espécies do gênero *Phytophthora* patogênicas a cultivos existentes na região.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Isolamento dos possíveis agentes biocontroladores

4.2.1.1 Coleta das amostras

Amostras de tecidos vegetais e de solo de onde foram isolados fitopatógenos do gênero *Phytophthora* foram coletadas nos municípios de Itabuna e Uruçuca, em

2008 em propriedades agrícolas dedicadas à agricultura familiar. As amostras foram processadas em laboratório para isolamento utilizando-se dois métodos.

4.2.1.2 Método de isolamento direto

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

4.2.1.3 Método de isolamento indireto

Micoparasitas foram obtidos de forma indireta através da técnica de placa pré-colonizada descrita por Krauss et al. (1998). Repicou-se o isolado de *Phytophthora citrophthora* (521), obtido de antúrio em Ituberá-BA, para placas contendo meio de cultura BDA acidificado, após a colônia do isolado abranger toda a placa colocou-se as possíveis fontes de antagonistas (grânulos de solo obtido nos locais de coleta de *Phytophthora*) nas áreas mais novas da colônia, em quatro pontos equidistantes (repetições) por placa. O método exige que exista um bom contato entre as possíveis fontes de antagonistas e o micélio do patógeno hospedeiro, mas as fontes não devem entrar em contato direto com o meio de cultura. A avaliação foi realizada entre três a seis dias após a colocação das fontes de antagonistas. A distinção entre micoparasitas e hospedeiros foi feita através do microscópio óptico (MO) e da visualização “a olho nu” das colônias, por meio de aspectos importantes como a coloração do micélio aéreo. Também foram purificadas culturas dos fungos que cresceram ou não junto das colônias de *Phytophthora* obtidas das amostras vegetais isoladas.

4.2.2 Identificação dos possíveis antagonistas

4.2.2.1 Análise das colônias e mensurações de estruturas fúngicas

Foram observados a coloração, o formato e o crescimento das colônias dos micoparasitas, características importantes para a identificação. Preparou-se lâminas, com a adição de água ou lactofucsina ácida, a partir das colônias crescidas em BDA, com idade entre sete a 10 dias, e as lâminas foram visualizadas ao microscópio

óptico para verificação das hifas e de outras características marcantes dos conidióforos e dos conídios. Foram mensuradas ao microscópio óptico as estruturas necessárias para a identificação através das chaves taxonômicas de acordo com o gênero do fungo isolado como possível agente biocontrolador (BCA). Cada característica taxonômica foi aferida em 25 ou 50 estruturas/isolado.

4.2.2.2 Teste de temperaturas

Placas de Petri com meio de cultura BDA e/ou Corn meal ágar contendo discos de micélio (5 mm de diâmetro) dos isolados foram mantidas em incubadoras B.O.D. a diferentes temperaturas (25; 27; 30; 33; 35; 40 °C, à depender do gênero fúngico) por um período de 72 h a 168 h. Realizaram-se avaliações diárias aferindo o raio das colônias com o auxílio de uma régua milimetrada.

4.2.3 Confrontos *in vitro*

4.2.3.1 Confrontos entre *Phytophthora* e BCAs (método 1)

Sete isolados de *Phytophthora* spp. (Tabela 1) e quatro BCAs foram confrontados entre si, repicando-os para placas de Petri contendo meio de cultura cenoura-ágar (CA). Após sete dias foram retirados discos de micélio com 5 mm de diâmetro das colônias tanto dos patógenos quanto dos possíveis BCAs. Os discos de *Phytophthora* spp. foram postos a 1,5 cm de distância da margem de placas contendo CA e 48 h após, adicionou-se os discos de micélio dos BCAs ao lado oposto das placas. Cada confronto foi repetido quatro vezes e culturas puras dos isolados de *Phytophthora* e dos BCAs foram utilizadas como testemunhas. As placas permaneceram em uma bancada à temperatura de 25 °C. Realizaram-se as leituras 24, 48 e 72 h após a montagem dos confrontos, aferindo-se o raio (da metade do disco de micélio até a borda da colônia em direção ao centro das placas) de todas as colônias, inclusive das testemunhas, observando-se também as reações antagônicas entre os fitopatógenos e os possíveis agentes biocontroladores segundo a classificação de Moore-Landecker (1996). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$), através do programa SAS.

Tabela 1 – Isolados de *Phytophthora* spp., obtidos de diferentes cultivos em municípios do sul da Bahia, utilizados em confrontos *in vitro* com agentes biocontroladores.

Locais	Isolados	Espécie	Nome científico / nome comum	Fontes
Itacaré	1107	<i>P. palmivora</i>	<i>Ocimum basilicum</i> / Manjeriçã	Rizosfera
	1187	<i>P. nicotianae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i> / Tomate	
Ituberá	1108	<i>P. palmivora</i>	<i>Musa coccinea</i> / Bananeira ornamental <i>Etlingera elatior</i> / Bastão do Imperador	
	1186	<i>P. bisheria</i>		
Itabuna	1178	<i>P. nicotianae</i>	<i>Solanum melongena</i> / Berinjela	
Ilhéus	1188	<i>P. cinnamomi</i>	<i>Heliconia bihai</i> / Helicônia bihai	
Uruçuca	1180	<i>P. nicotianae</i>	<i>Dracaena sanderiana</i> / Dracena baby	Folha

4.2.3.2 Confrontos entre *Phytophthora* e BCAs (métodos 2)

Realizou-se confrontos entre isolados de *Phytophthora* spp. (Tabela 1) e um dos BCAs isolados neste trabalho, que apresentava crescimento lento. Discos de micélio (5 mm de diâmetro) dos isolados foram obtidos a partir de colônias com sete dias de idade crescidas em CA. Inicialmente colocou-se os discos de micélio do BCA a 1,5 cm de distância da margem de cada uma das placas contendo CA, oito dias após, adicionou-se discos de micélio dos respectivos isolados de *Phytophthora*, no lado oposto das placas. Utilizou-se quatro repetições por confronto e as testemunhas consistiram das culturas puras dos isolados de *Phytophthora* e do BCA. As placas permaneceram em uma bancada à temperatura de 25 ± 1 °C. As leituras foram realizadas 24, 48, 60 e 72 h após a montagem do confronto, aferindo-se o raio (como descrito no item 2.2.3.1) de todas as colônias, inclusive das testemunhas, observou-se também as reações antagônicas entre os fitopatógenos e os possíveis agentes biocontroladores segundo a classificação de Moore-Landecker (1996) e os dados foram analisados através do programa SAS e os diâmetros médios das culturas comparados pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.2.4 Processamento de amostras em Microscopia Eletrônica de Varredura

Após o final dos testes *in vitro* entre *Phytophthora* e BCAs selecionou-se oito confrontos distintos para obtenção de amostras a serem analisadas no microscópio eletrônico de varredura. Retirou-se fragmentos com cerca de 1 mm³ de tamanho, entre a área de encontro das hifas de *Phytophthora* e do BCA e colocou-se esses

sobre um pedaço de cera (de dentista) imerso numa gota de fixador, obtendo-se 5 a 6 repetições de cada amostra, que foram postas em frascos etiquetados contendo uma solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2 por 4 horas. Após isso, lavaram-se as amostras seis vezes consecutivas (com duração de 10 minutos para cada lavagem) em tampão cacodilato. Depois houve a pós-fixação em OsO₄ 1% em tampão cacodilato 0,1 M por 4 horas. Novamente as amostras foram lavadas seis vezes consecutivas com o tampão (em intervalos de 10 minutos por lavagem). Realizou-se a desidratação em banhos de série crescente de concentração de soluções de álcool 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, em intervalos consecutivos de 10 minutos, e por três vezes seguidas em álcool 100% a cada 20 minutos. Depois houve a desidratação em solução contendo álcool e acetona (3:1), álcool e acetona (1:1), álcool e acetona (1:3), em intervalos de 10 minutos, e por duas vezes consecutivas em acetona P. A, com duração de 15 minutos cada. Em seguida as amostras foram submetidas ao processo de Ponto crítico por cerca de 40 minutos e depois montadas em “Stubs”, com fita dupla face de carbono. Por último, as amostras foram metalizadas com deposição de uma fina camada de ouro com cerca de 20 nm de espessura, durante 80 s. As amostras foram analisadas através do microscópio eletrônico de varredura (MEV).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Caracterização morfofisiológica dos isolados obtidos

Ao final das coletas realizadas no ano de 2008 foram isolados cinco possíveis agentes biocontroladores (BCAs) (Tabela 2), três no município de Itabuna, obtidos da rizosfera de olerícolas através do método indireto (grânulos de solo) e outros dois

Tabela 2 – Relação dos isolados obtidos como possíveis agentes de biocontrole e as respectivas fontes de onde provieram.

Locais	Isolados	Cultivos		Fontes
		Nome comum	Nome científico	
Itabuna	164	Quiabeiro	<i>Abelmoschus esculentus</i> (L.) Moench	Rizosfera
	167	Aboboreira	<i>Cucurbita moschata</i> Duch	
	168			
Uruçuca	171	Antúrio	<i>Anthurium andreanum</i> Lindl.	Folha
	174	Abacaxizeiro	<i>Anonas comosus</i> L.	Folha

isolados no município de Uruçuca: o 174 isolado de folha de abacaxizeiro, através do método direto e o 171 isolado diretamente de folhas de antúrio em meio de cultura BDA acidificado. Os isolados foram identificados por critérios morfofisiológicos como pertencentes aos gêneros *Trichoderma* (164, 167, 168 e 171) e *Clonostachys* (174). Nos próximos itens será descrita a caracterização morfofisiológica dos isolados.

4.3.1.1 *Trichoderma harzianum* Rifai

Entre os isolados obtidos, dois foram classificados como *T. harzianum* (164 e 167). Estas culturas apresentaram conidióforo pouco definido (Figura 1A e C), ramificando-se geralmente duas a três vezes em um formato piramidal, com longas ramificações próximas da base da haste principal, possuindo ramificações em direção a extremidade, com as ramificações secundárias e terciárias surgindo em ampla angulação (SAMUELS et al., 2006).

As fiálides eram ampuliformes com variação da média do comprimento de $6,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (168) a $7,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$ (164) (Tabela 3). O ponto médio das fiálides variou entre $2,9 \pm 0,0 \mu\text{m}$ (164) e $3,0 \pm 0,0 \mu\text{m}$ (168). A largura média da base dessas estruturas variou de $1,9 \pm 0,0 \mu\text{m}$ (164) a $2,0 \pm 0,0 \mu\text{m}$ (168). Houve variação da razão comprimento/largura das fiálides de 2,2:1 (168) a 2,6:1 (164).

As culturas formaram conídios verde-claros, lisos (Figura 1B e D), variando de subglobosos a elipsoidais para o isolado 164 e de subglobosos a globosos e elipsoidais no isolado 168. As dimensões dos conídios variaram de $3,1 \pm 0,1 \times 2,7 \pm 0,0$ (168) μm a $3,5 \pm 0,1 \times 3,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$ (164), a relação comprimento/largura foi de 1,2:1.

Ambos isolados formaram clamidósporos solitários (exemplo: Figura 1D), terminais e intercalares, globosos e subglobosos. O diâmetro médio dos clamidósporos variou de $7,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (164) a $8,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (168).

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

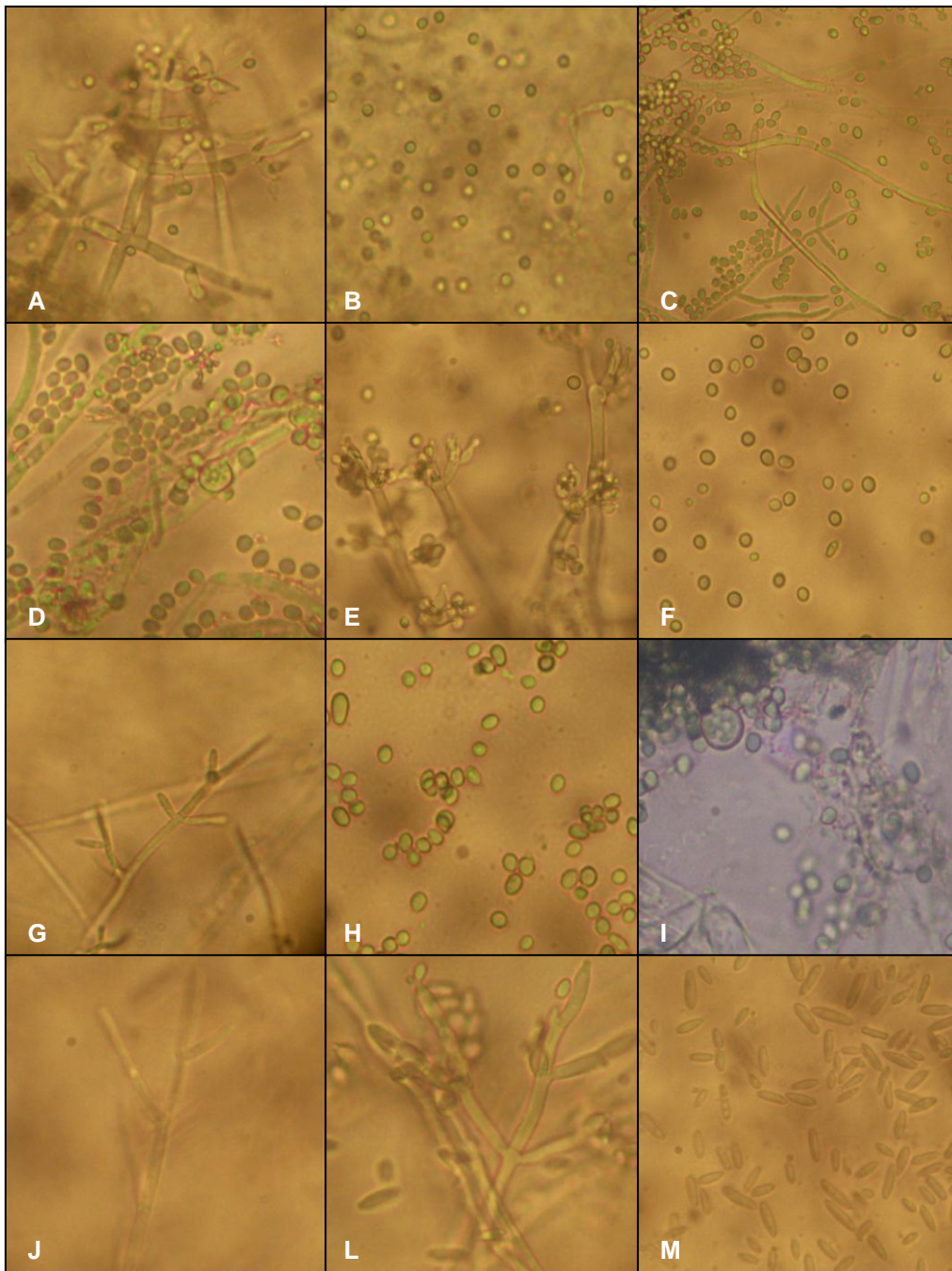


Figura 1 - Conidióforos e conídios, respectivamente, dos isolados de *Trichoderma harzianum*, 164 (A, B) e 168 (C); de *T. virens*, 167 (E, F); de *T. atroviride*, 171 (G, H). Clamidósporos e conídios dos isolados 168 (D) e 171 (I). Conidióforo primário (J), secundário (L) e conídios (M) do isolado de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

4.3.1.2 *Trichoderma virens* (Miller, Giddens e Foster) Arx

Culturas puras do isolado 167, *T. virens*, apresentaram conidióforo do tipo gliocladium (Figura E) (SAMUELS et al., 2006) e fiálides lageniformes a ampuliformes com dimensões médias de $8,7 \pm 0,3 \times 3,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$, possuindo largura média da base de $2,0 \pm 0,0 \mu\text{m}$ e relação comprimento/largura de 2,7:1.

Os conídios do isolado 167 são verde-claros, lisos (Figura 1F), subglobosos a elipsoidais, $4,2 \pm 0,1 \times 3,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$, com relação comprimento/largura de 1,9:1 (Tabela 3).

Houve a formação de clamidósporos solitários, terminais e intercalares, globosos a subglobosos, com diâmetro médio de $7,7 \mu\text{m} \pm 0,2$.

Colônias do isolado de *T. virens* incubadas a 30 e 35 °C apresentaram os respectivos raios médios: 4,4 e 2,7 cm. Não houve crescimento micelial a temperatura de 40 °C, mas verificou-se a sobrevivência do isolado após o final do teste.

4.3.1.3 *Trichoderma atroviride* P. Karst.

Culturas puras do isolado 171, pertencente a espécie *T. atroviride*, formaram conidióforo com ramificações pareadas (Figura 1G) e cada uma destas terminando em grupos de fiálides lageniformes.

As médias das dimensões das fiálides foram de $8,4 \pm 0,3 \times 2,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$, com largura média da base de $1,9 \pm 0,0 \mu\text{m}$ e relação comprimento/largura de 3,2:1.

As culturas formaram conídios verde-claros, lisos (Figura 1H), predominantemente subglobosos, e ocasionalmente elipsóides a ovóides, apresentando as seguintes médias de dimensões $3,7 \pm 0,1 \times 3,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$, com relação comprimento/largura de 1,2:1 (Tabela 3).

Os clamidósporos formados pelo isolado 171 (Figura 1I) são terminais e intercalares, com diâmetro médio de $7,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$.

O raio médio das colônias foi de 4,3 cm à 30 °C e de 0,6 cm, quando o isolado foi incubado à 35 °C, não se verificando crescimento micelial a 40 °C, embora as colônias tenham sobrevivido a esta temperatura.

Verificou-se odor forte e doce de côco nas colônias (SAMUELS et al., <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>) deste isolado, crescidas em meio de cultura BDA e em Corn meal dextrose agar, esta também é uma característica importante na taxonomia desta espécie.

Tabela 3 – Dimensões das estruturas (μm) e raio médio das colônias (em cm) de isolados de *Trichoderma* spp. quando cultivadas à 30 e 35 °C.

N°	Fiálides*				Conídios**			DC**	R	
	CF	PMF	BF	CF/PMF	CC	LC	CC/LC		30	35
164	7,5±0,1	2,9±0,0	1,9±0,0	2,6:1	3,5±0,1	3,0±0,1	1,2:1	7,7±0,2	4,3	2,2
167	8,7±0,3	3,3±0,1	2,0±0,0	2,7:1	4,2±0,1	3,6±0,1	1,9:1	7,7±0,2	4,4	2,7
168	6,7±0,2	3,0±0,0	2,0±0,0	2,2:1	3,1±0,1	2,7±0,0	1,2:1	8,4±0,2	4,4	2,5
171	8,4±0,3	2,6±0,1	1,9±0,0	3,2:1	3,7±0,1	3,1±0,1	1,2:1	7,4±0,1	4,3	0,6

* média de 25 observações \pm erro padrão

** média de 50 observações \pm erro padrão

Legenda: CF (comprimento das fiálides); PMF (ponto médio das fiálides); BF (base das fiálides); CF/PMF (relação comprimento/ponto médio das fiálides); CC (comprimento dos conídios); LC (largura dos conídios); CC/LC (relação comprimento/largura dos conídios); DC (diâmetro dos clamidósporos); R (raio das colônias).

4.3.1.4 *Clonostachys compactiuscula* (Saccardo) Hawksworth e Gams

Obteve-se um isolado de *C. compactiuscula* (174), apresentando conidióforos dimórficos, sendo raros os conidióforos primários (Figura 1J), do tipo Verticillium, os quais são mononematosos, monoverticilados ou polivericilados (SCHROERS, 2001). Fiálides retas, cilíndricas, $14,6 \pm 0,5 \times 2,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$, com largura média da base de $2,1 \pm 0,0 \mu\text{m}$.

Conidióforos secundários (Figura 1L) com penicílos freqüentemente ramificados, bi a quadri-verticilados. Fiálides, $11,2 \pm 0,4 \times 3,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$, com largura média da base de $1,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$. Conídios hialinos (Figura 1M), quase retos, elipsóides a cilíndricos, possuindo um hilo lateral, $9,0 \pm 0,5 \times 2,4 \pm 0,0 \mu\text{m}$.

Não houve crescimento micelial dos isolados, em meio BDA e Corn meal ágar, após sete dias de incubação a 35 °C. A temperatura limite máxima para crescimento foi de 33 °C.

4.3.2 Confrontos *in vitro* entre isolados de *Phytophthora* spp. e BCAs

4.3.2.1 *Phytophthora* spp. x *Trichoderma* spp.

Nos confrontos realizados entre os sete isolados de *Phytophthora* spp. e os de *Trichoderma* spp. observou-se interações antagônicas, ocorrendo a competição por interferência (um organismo interfere na atividade de outro) e o hiperparasitismo. Em decorrência da competição houve substituição, impasse ou entrelaçamento de hifas

(Figura 2A, B e C, respectivamente) segundo a classificação de Moore-landecker (1996). Também foi observado que os isolados de *Trichoderma* spp. penetraram e colonizaram propágulos de *Phytophthora* spp. (relação hiperparasítica) (Figura E - G).

Nos testes *in vitro* realizados entre os BCAs e o isolado de *P. palmivora* (1107), obtido na rizosfera de manjeriço, observou-se que após 72 h do confronto o raio médio das colônias de *Phytophthora* confrontadas (RMC), diferiu estatisticamente do raio médio da testemunha (cultura pura de 1107) (Tabela 4). O confronto 1107x167, apresentou o menor RMC (3,53 cm) e não diferiu estatisticamente do confronto 1107x164, sendo que, o raio médio das colônias deste último tratamento não diferiu pelo Teste de Tukey a 5% dos confrontos: 1107x171; 1107x168, a variação da percentagem (%) de inibição do crescimento das colônias de *Phytophthora* (% ICP) foi de 13,64% (168) a 19,77% (167).

Em confrontos entre os BCAs e o isolado 1108, *P. palmivora* proveniente da rizosfera de bananeira ornamental, verificou-se que não houve diferença significativa, pelo Teste de Tukey a 5%, entre o raio médio das colônias de *Phytophthora* confrontadas pelos diferentes BCAs, mas todos esses diferiram da testemunha, ou seja todos inibiram o patógeno e as percentagens de inibição em relação ao crescimento das colônias solteiras do isolado 1108 variaram de 12,56% (164) a 20,10% (167 e 171). O RMC variou de 3,18 cm (1108x167; 1108x171) a 3,48 cm (1108x164).

Não houve diferença significativa entre o raio médio das colônias do isolado de *P. nicotianae* (1178), proveniente da rizosfera de berinjela, em confronto com os BCAs. O raio médio de todas as colônias do isolado 1178 confrontadas diferiu estatisticamente do raio da cultura pura do mesmo isolado. O RMC variou de 3,13 cm (1178x167) a 3,35 cm (1178x164). As percentagens de inibição variaram de 15,40% (164) a 20,96% (167).

O raio médio de todas as colônias de *P. nicotianae* (isolado 1180), obtido de folhas de dracena baby, confrontadas com *Trichoderma* spp. diferiu do raio médio das culturas puras do fitopatógeno, não houve diferença significativa entre os RMC para os confrontos com os diferentes BCAs, estes variaram de 3,08 cm (1180x168) a 3,21 cm (1180x171) (Tabela 4). As ICP % variaram 22,28% (171) a 25,42% (168).

Nos confrontos entre o isolado de *P. bisheria* (1186), obtido na rizosfera de

Tabela 4 – Raio médio (cm) das colônias de isolados de *Phytophthora* spp., após 72 h, crescendo em CA em cultura pura (Test) ou confrontadas com isolados de *Trichoderma* spp. (BCAs).

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

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

bastão do imperador, e os BCAs, observou-se que os valores do raio médio das colônias do isolado 1186 confrontadas não diferiram entre si, embora tenham diferido estatisticamente da testemunha. O RMC variou de 2,85 cm (1186x167) a 3,20 cm (1186x164, 1186x168). Houve variação das ICP % de 23,63% (164 e 168) a 31,98% (167).

Nos testes entre *P. nicotianae* (isolado 1187), proveniente da rizosfera de tomateiro, e os BCAs, todos os valores do RMC diferiram do raio da cultura pura de *P. nicotianae* e as ICP % variaram de 18,37% (164) a 24,04% (167). O raio médio das colônias do isolado 1187 confrontadas com os BCAs: 167, 171 e 168 não diferiram entre si, também não houve diferença significativa entre o raio dos dois últimos tratamentos citados e o raio médio obtido no confronto 1187x164. A variação do RMC foi de 3,35 cm (1187x167) a 3,60 cm (1187x164).

Nos confrontos entre o isolado de *P. cinnamomi* (1188), obtido na rizosfera de helicônia bihai I, verificou-se que o raio médio das colônias do isolado 1188 confrontadas com os BCAs diferiram do raio médio das culturas puras do fitopatógeno e não diferiram entre si (Tabela 4). O RMC variou de 2,73 cm (1188x164) a 2,80 cm (1188x167), e as ICP % variaram de 19,77% (167) a 21,78% (164).

4.3.2.2 *Phytophthora* spp. x *Clonostachys compactiuscula*

Em confrontos realizados entre os isolados de *Phytophthora* spp. (Tabela 1) e o de *Clonostachys compactiuscula* (174) houve competição por interferência através de antibiose (Figura H - J), com *C. compactiuscula* liberando no meio de cultura antibiótico que inibiu em parte o crescimento das colônias de *Phytophthora* spp.

impedindo o contato entre os isolados confrontados. A inibição do crescimento micelial foi maior na área da colônia do fitopatógeno mais próxima do BCA.

Os raios médios das colônias dos isolados de *P. palmivora* (1107 e 1108), *P. nicotianae* (1178, 1180 e 1187), *P. bisheria* (1186) e *P. cinnamomi* (1188) confrontadas com o isolado de *C. compactiuscula* (174) diferiram estatisticamente das testemunhas (culturas puras dos isolados de *Phytophthora*) e não diferiram entre si pelo Teste de Tukey a 5% (Tabela 5). Os raios médios das culturas de *Phytophthora* spp. variaram de 1,80 cm (1108) a 2,43 cm (1178). As porcentagens de inibição foram da magnitude de de 45,85 (1107) e 54,43% (1108) para os isolados de *P. palmivora*, de 38,17 (1178) a 45,75% (1187) para os isolados de *P. nicotianae*, de 43,90% o isolado de *P. bisheria* (1186) e de 39,30% para o isolado de *P. cinnamomi* (1188).

Tabela 5 – Raio médio (cm), obtido após 96 h, das colônias de isolados de *Phytophthora* spp. crescidas em cultura pura (Test) ou confrontadas com o isolado de *Clonostachys compactiuscula* (174).

Tratamentos	Isolados de <i>Phytophthora</i>						
	1107	1108	1178	1180	1186	1187	1188
Test	4,34a*	3,95a	3,93a	3,73a	3,85a	4,24a	3,13a
174	2,35b	1,80b	2,43b	2,23b	2,16b	2,30b	1,90b

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

4.3.3 Histopatologia da interação *Phytophthora* spp. e *Trichoderma* spp. utilizando microscopia eletrônica de varredura

Na impossibilidade de realizar as observações ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) de todos os confrontos realizados foram escolhidos oito, envolvendo os isolados de *P. palmivora* (1107 e 1108), *P. nicotianae* (1178, 1180 e 1187), de *P. bisheria* (1186) e de *P. cinnamomi* (1188) e os quatro isolados de *Trichoderma*. Os confrontos analisados foram: 1107x167; 1108x164; 1108x171; 1178x 167; 1180x167; 1187x167; 1188x171, todos tendo apresentado competição entre as culturas confrontadas. Ao MEV foi visualizado o enrolamento das hifas de *Trichoderma* spp. sobre as das quatro espécies de *Phytophthora* (Figura 2C e D) e também o entrelaçamento de esporângios de *P. palmivora* pelos isolados 167 e 164 (Figura 2F e G). Isto comprova o hiperparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora* spp.

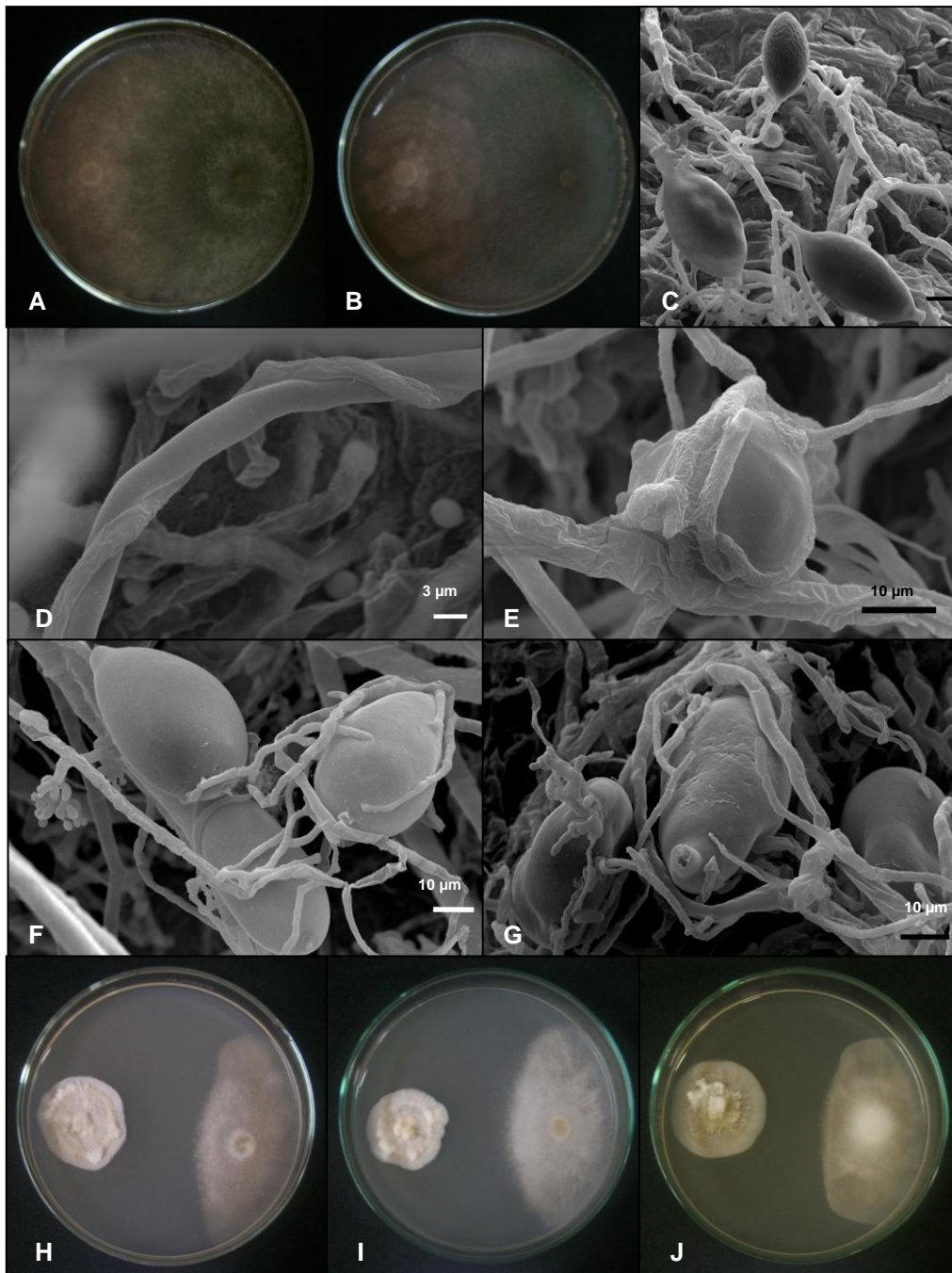


Figura 2 - Confrontos entre isolados de *Phytophthora* spp. e de *Trichoderma* spp. (A - G), substituição, 1107x167 (A); impasse, 1186x171 (B); entrelaçamento de hifas, 1108x164 (C) e 1187x167 (D); hiperparasitismo de *Trichoderma* em propágulos de *Phytophthora* spp., 1186x168 (E), 1107x167 (F), 1108x164 (G). Confrontos entre isolados de *Phytophthora* spp. e de *Clonostachys compactiuscula*, antibiose (H - J), 1108x174, 1180x174 e 1188x174, respectivamente. C, D, E, F e G são visualizações ao MEV, as demais em MO.

Legenda dos isolados de *Phytophthora*: 1107, 1108 – *P. palmivora*; 1180 e 1187 – *P. nicotianae*; 1186 – *P. bisheria*; 1188 – *P. cinnamomi*.

Legenda dos BCAs: 164 e 168 – *Trichoderma harzianum*; 167 – *T. virens*; 171 – *T. atroviride*; 174 – *Clonostachys compactiuscula*.

4.4 DISCUSSÃO

No presente trabalho foram isolados, caracterizados morfofisiologicamente e identificados possíveis BCAs de plantas com sintomas de infecção por *Phytophthora* spp. ou do solo das rizosfera destas, em propriedades que praticam agricultura familiar e estes BCAs foram confrontados com isolados de *P. palmivora* (1107 e 1108), *P. nicotianae* (1178, 1180 e 1187), *P. bisheria* (1186) e *P. cinnamomi* (1188) para testar seu potencial no controle biológico destes patógenos.

Cinco BCAs foram obtidos, sendo do gênero *Trichoderma*, pertencendo a três espécies: *T. harzianum* (164 e 168), *T. virens* (167) e *T. atroviride* (171) e um (174) da espécie *Clonostachys compactiuscula*.

Os isolados de *Trichoderma* foram identificados através da chave interativa de Samuels et al. (<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>) e por isso a caracterização foi baseada nos principais caracteres taxonômicos para identificar espécies deste gênero: forma dos conidióforos, forma e dimensões das fiálides e dos conídios, cor e ornamentação dos esporos, presença e diâmetro dos clamidósporos, presença de odor e raio médio de crescimento das colônias a 30, 35 e 40 °C.

As dimensões médias dos isolados 164 e 168 (*T. harzianum*) enquandram-se nos limites estabelecidos por Samuels et al. (<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>); Samuels et al., (2006), somente a relação comprimento/largura e o comprimento médio das fiálides do isolado 164 foi superior ao valor máximo definido na chave interativa (2,1:1-2,2:1; 6,5-6,7 µm, respectivamente). As médias das estruturas dos isolados de *T. virens* (167) e de *T. atroviride* (171) (Tabela 3) estão inseridas nos intervalos definidos nas duas descrições.

As dimensões médias das estruturas do isolado de *C. compactiuscula* (174) estão de acordo com os valores encontrados por Schroers (2001) e Samuels et al. (2006), somente o comprimento médio das fiálides do conidióforo primário encontra-se abaixo do limite mínimo estabelecido pelo primeiro autor (17 µm). O isolado 174 cresceu a 33 °C, temperatura um pouco superior ao limite estabelecido para a espécie (30 °C). No entanto, as demais características taxonômicas suportam a sua classificação nesta espécie.

Como os BCAs foram obtidos em diferentes cultivos a partir do solo ou diretamente dos tecidos vegetais, isto pode favorecer o sucesso destes agentes no controle de doenças. De acordo com Blum (2006) um antagonista tem mais chance de se adaptar a um determinado local (solo, semente, fruto, raízes ou folhas) se o mesmo tiver sido coletado em condições semelhantes. Em todos os locais de coleta as plantas apresentavam sintomas típicos de doenças e os isolados 164, 168 e 167 são provenientes de uma área agrícola onde se obteve isolados de *Phytophthora*. Nos confrontos *in vitro*, todos os BCAs apresentaram atividade antagônica aos isolados de *Phytophthora*. Verificou-se hiperparasitismo e competição entre os isolados de *Trichoderma* spp. e as culturas dos fitopatógenos, através de impasse (isolado 171), substituição ou entrelaçamento de hifas (todos). Em ambos os casos houve o contato micelial entre as culturas confrontadas. As colônias de *Phytophthora* quando confrontadas com os isolados 164 e 168 de *T. harzianum* apresentaram mudança de coloração de branco para amareladas na área de substituição. Isto indica que os isolados desta espécie liberam no meio de cultura algum pigmento que provoca esta mudança. Samuels et al. (<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptios/keys/TrichodermaIndex.cfm>), mencionam esta característica da espécie em sua chave interativa. No entanto, a natureza e propriedades destes pigmentos ainda são desconhecidas.

De acordo com Moore-Landecker (1996), o contato entre o micoparasita e o hospedeiro pode ser pela produção de apressório ou de ramificações em forma de gancho. A morte do hospedeiro também pode ser induzida pela difusão de toxinas produzidas pelo micoparasita, os dois modos de ação são utilizados por *Trichoderma* spp. que podem matar o hospedeiro pelo contato externo, mas algumas vezes podem penetrar na célula hospedeira. De acordo com Erwin et al. (1983), a lise hifal de *Phytophthora* devido a ação de fungos de solo é rápida, no caso de *Trichoderma* spp. existe o contato e o enrolamento do parasita em torno da hifa do hospedeiro, antes da penetração, como observado nos confrontos *in vitro* realizados (Figura 2C e D).

Espécies de *Trichoderma* produzem enzimas hidrolíticas (β -1,3-glucanase e quitinase) que são responsáveis por romper a parede do hospedeiro, além disso, *Trichoderma* spp. produzem metabólitos voláteis (incluindo etileno e acetona) e antibióticos (difundíveis) (MOORE-LANDECKER, 1996), tendo como exemplo, *T. atroviride* que produz o antibiótico antifúngico 6-pentil-a-pirona, composto que

proporciona o odor doce de côco, característico da espécie (DODD et al., 2003), como observado em culturas do isolado 171.

Nos testes realizados, os BCAs do gênero *Trichoderma* demonstraram bastante agressividade ao fitopatógeno hospedeiro. Todos os isolados de *Trichoderma* interferiram no crescimento micelial das colônias de *Phytophthora*, inibindo o crescimento dos mesmos, tendo variado esta inibição de 12,56 (isolado 164 sobre o isolado 1108 de *P. palmivora*) a 31,98% (isolado 167 sobre o isolado 1186 de *P. bisheria*), o que pode ser visualizado pela diminuição significativa do raio das colônias dos fitopatógenos em comparação com as culturas puras dos mesmos (Tabela 4).

Ao microscópio eletrônico de varredura comprovou-se o hiperparasitismo dos isolados de *Trichoderma* sobre *P. palmivora*, *P. nicotianae*, *P. bisheria* e *P. cinnamomi*, as espécies com eles confrontadas que foram observadas. Particularmente notou-se a extrema agressividade dos isolados de *T. harzianum* (164), *T. virens* (167) e *T. atroviride* (171) quando confrontados com os isolados 1107 (de manjeriçao) e 1108 (de bananeira ornamental), ambos de *P. palmivora*. Como esta espécie produz esporângios com rapidez e em grande quantidade, foi possível visualizar o efeito das hifas de *Trichoderma* spp. parasitando os mesmos, parecendo já haver penetrando-os.

O isolado de *Clonostachys compactiuscula* (174) exerceu antagonismo a todos os isolados de *Phytophthora*, através de antibiose com a produção de antibiótico capaz de interferir no crescimento micelial dos fitopatógenos, sem que houvesse o contato entre as colônias confrontadas (Figura 2H - J). Verificou-se a diminuição do raio médio das colônias de *Phytophthora* spp. em confronto com o isolado 174 em comparação com a testemunha, pelo teste de Tukey a 5% (Tabela 5).

Trichoderma spp. e *Clonostachys* spp. são utilizados em vários experimentos, sob condições controladas e/ou em campo como estratégias de controle mais sustentáveis para várias doenças causadas por *Phytophthora* ou por outros fitopatógenos (CLARKSON et al., 2006; DEBERDT et al., 2008; KRAUSS et al., 1998; KRAUSS; SOBERANIS, 2001).

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

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

A presença de *Trichoderma* spp. e de *Clonostachys compactiuscula* nos cultivos agrícolas indica que naturalmente estes BCAs devem estar agindo no controle biológico de fitopatógenos nas áreas onde foram encontrados e demonstraram o potencial deste tipo de controle se for utilizado por meio de práticas adequadas e em condições favoráveis à disseminação e o estabelecimento dos micoparasitas presentes no agroecossistema, minimizando assim os impactos ambientais e os custos de produção, principalmente em agricultura familiar, tipo de propriedade usada neste estudo para obtenção dos isolados de *Phytophthora*.

É importante que as pesquisas sobre a utilização dos BCAs obtidos no controle biológico de *Phytophthora* spp. prossigam, pois, poderá vir a ser uma importante contribuição ao combate destes fitopatógenos estimular-se a proliferação dos micoparasitas nas propriedades onde foram encontrados o que ajudará os produtores rurais de baixa renda a produzirem mais sem a contaminação do ambiente e sem custos adicionais. Será necessário ainda testar se estes micoparasitas não possuem ação deletéria a outros seres vivos.

5 CONCLUSÕES GERAIS

1. Em cinco (Itabuna, Ilhéus, Itacaré, Ituberá, Uruçuca) dos oito municípios e também no distrito de Serra Grande onde foram feitas coletas, *Phytophthora* spp. estavam presentes associadas a rizosfera de plantas ou infectando-as;
2. Constatou-se *Phytophthora* em todos os tipos de cultivos pesquisados: anuais, olerícolas, ornamentais e medicinais comprovando a característica polífaga da maioria das espécies do gênero;
3. A maioria dos isolados (90,1 %) de *Phytophthora* spp. foram obtidos da rizosfera dos cultivos, demonstrando a importância do solo e das raízes como fontes de inóculo destes patógenos;
4. Através da caracterização morfofisiológica e/ou molecular foram identificados isolados de *Phytophthora nicotianae* (52), *P. palmivora* (17), *P. cinnamomi* (6), *P. cinnamomi* var. *parvispora* (3) e *P. bisheria* (1) obtidos em diferentes cultivos presentes em municípios do sul da Bahia;
5. Relatou-se pela primeira vez a presença dos fitopatógenos: *P. cinnamomi* var. *parvispora* e *P. bisheria* no Brasil; em hospedeiros também não assinalados, feijão-de-corda e bastão do imperador, respectivamente;
6. Todas as espécies isoladas foram patogênicas aos seus respectivos cultivos de origem e re-isoladas das lesões provocadas;

7. O registro de ocorrência de *P. nicotianae* infectando plantas de agrião, espinafre, hortelã e dracena baby é inédito; bem como de *P. palmivora* como patógeno de couve e bananeira ornamental;
8. Embora *P. cinnamomi* tenha mais de 1.000 espécies hospedeiras já relatadas, registrou-se pela primeira vez esta espécie como patógeno de helicônia bihai I, bastão do imperador, cebolinha e alface;
9. Não foi possível identificar, apenas pelas características morfofisiológicas e pelo sequenciamento do DNA da região ITS, os dois isolados de *Phytophthora* obtidos de inflorescência de antúrio no município de Ituberá. Outros genes necessitam ser seqüenciados para classificar taxonomicamente esta espécie;
10. A ocorrência de isolados dos tipos compatíveis A1 e A2, pertencentes às espécies *P. nicotianae* e *P. cinnamomi* em municípios distintos, na região sul da Bahia, constitui um risco pela possibilidade de formação de híbridos mais agressivos e adaptados ao ambiente;
11. O sequenciamento de fragmentos de genes da região ITS do DNA contribuiu para a identificação de *P. bisheria* e de *P. cinnamomi* var. *parvispora*, comprovando esta ferramenta molecular como importante na confirmação e identificação de espécies de *Phytophthora*;
12. Foram isolados em Itabuna e Uruçuca cinco possíveis agentes biocontroladores e identificados como: *Trichoderma harzianum* (2), *T. virens* (1), *T. atroviride* (1) e *Clonostachys compactiuscula* (1);
13. Todos cinco BCAs demonstraram antagonismo a isolados de *Phytophthora* spp. nos testes *in vitro* por mecanismos de competição. Havendo impasse, substituição ou entrelaçamento de hifas nos confrontos envolvendo *Trichoderma* spp. e os fitopatógenos;

14. Nos confrontos entre os isolados de *Phytophthora* spp. e o isolado de *C. compactiuscula*, verificou-se antibiose, embora não haja inibido totalmente o crescimento das colônias dos fitopatógenos;
15. Através do MEV foi possível observar o hiperparasitismo de *T. harzianum*, *T. virens* e *T. atroviride* sobre isolados de *P. palmivora*, *P. nicotianae*, *P. cinnamomi* e *P. bisheria*;
16. É necessário continuar as pesquisas com os BCAs isolados e identificados para que possam ser utilizados no controle de *Phytophthora* spp. na região, favorecendo a sua multiplicação nas propriedades onde foram identificados;
17. Este trabalho trouxe importante contribuição à agricultura familiar na região abrindo perspectivas de novas pesquisas para o controle de *Phytophthora* spp. que possam ajudar os produtores rurais da região.

REFERÊNCIAS

ABAD, Z. G.; ABAD, J. A.; COFFEY, M. D.; OUDEMANS, P. V.; MAN IN 'T VELD, W. A.; GRUYTER, H. de; CUNNINGTON, J.; LOUWS, F. J. *Phytophthora bisheria* sp. nov., a new species identified in isolates from the Rosaceous raspberry, rose and strawberry in three continents. **Mycologia**, v. 100, n. 1, jan./feb. 2008. p. 99-110.

ALBUQUERQUE, P. S. B.; BASTOS, C. N.; LUZ, E. D. M. N.; SILVA, S. D. V. M. Doenças do cacaueteiro (*Theobroma cacao*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2. p. 154-156.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory micology**. 4. ed. New York: John Wiley e Sons, Inc., 1996. 869 p.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, sep. 1997. p. 3389-3402.

APPIAH, A. A.; FLOOD, J.; ARCHER, S. A.; BRIDGE, P. D. Molecular analysis of the major *Phytophthora* species on coca. **Plant Pathology**, v. 53, n. 2, apr. 2004. p. 209-219.

BALÇI, Y.; HALMSCHLAGER, E. *Phytophthora* species in oak ecosystems in Turkey and their association with declining oak trees. **Plant Pathology**, v. 52, n. 6, dec. 2003. p. 694-702.

BEALES, P. A.; SCHLENZIG, A.; INMAN, A. J. First report of ramorum bud and leaf blight (*Phytophthora ramorum*) on *Syringa vulgaris* in the UK. **Plant Pathology**, v. 53, n. 4, aug. 2004. p. 525.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1. 919 p.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1. p. 718.

BLUM, L. E. B. Controle biológico de fitopatógenos. In: BLUM, L. E. B.; CARES, J. E.; UESUGI, C. H. **Fitopatologia**: o estudo das doenças de plantas. 1. ed. Brasília: Otimismo, 2006. p. 196-205.

BRASIER, C. M.; KIRK, S. A.; DELCAN, J.; COOKE, D. E. L.; JUNG, T.; MAN IN 'T VELD, W. A. *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on *Alnus* trees. **Mycological Research**, v. 108, n.10, oct. 2004. p. 1172-1184.

CAMPELLO, A. M. F. L.; LUZ, E. D. M. N. Etiologia da podridão-parda nos estados da Bahia e Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, n. 3. 1981. p. 313-321.

CARVALHO, A. de O. de; SOARES, D. J.; BARRETO, R. W.; CARMO, M. G. F. do. Podridão de Frutos de Jiló Causada por *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, jul./ago. 2005. p. 435.

CERNY, K.; STRNADOVA, V.; GREGOROVA, B.; HOLUB, V.; TOMSOVSKY, M.; MRAZKOVA, M.; GABRIELOVA, S. *Phytophthora cactorum* causing bleeding canker of common beech, horse chestnut, and white poplar in the Czech Republic. **Plant Pathology**, v. 58, n. 2, apr. 2009. p. 394.

CERQUEIRA, A. O.; LUZ, E. D. M. N.; SOUZA, J. T. de. First record of *Phytophthora tropicalis* causing leaf blight and fruit rot on breadfruit in Brazil. **Plant Pathology**, v. 55, n. 2, apr. 2006. p. 296.

CLARKSON, J. P.; SCRUBY, A.; MEAD, A.; WRIGHT, C.; SMITH, B.; WHIPPS, J. M. Integrated control of *Allium* white rot with *Trichoderma viride*, tebuconazole and composted onion waste. **Plant Pathology**, v. 55, n. 3, jun. 2006. p. 375-386.

COOKE, D. E. L.; KENNEDY, D. M.; GUY, D. C.; RUSSELL, J.; UNKLE, S. E.; DUNCAN, J. M. Relatedness of group I species of *Phytophthora* as assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs) and sequences of ribosomal DNA. **Mycological Research**, v. 100, n. 3, mar. 1996. p. 297-303.

DEBERDT, P.; MFEGUE, C. V.; TONDJE, P. R.; BON, M. C.; DUCAMP, M.; HURARD, C.; BEGOUDE, B. A. D.; NDOUMBE-NKENG, M.; HEBBAR, P. K.; CILAS, C. Impact of environmental factors, chemical fungicide and biological control on

cacao pod production dynamics and black pod disease (*Phytophthora megakarya*) in Cameroon. **Biological Control**, v. 44, n. 2, feb. 2008. p. 149-159.

DENMAN, S.; KIRK, S. A.; BRASIER, C. M.; HUGHES, K. J. D.; GRIFFIN, R.; HOBODON, E.; WEBBER, J. F. Foliar infection of sweet chestnut (*Castanea sativa*) by *Phytophthora ramorum* in the UK. **Plant Pathology**, v. 54, n. 4, aug. 2005. p. 581.

DODD, S. L.; LIECKFELDT, E.; SAMUELS, G. J. *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. **Mycologia**, v. 95, n. 1, jan./feb. 2003. p. 27-40.

DURÁN, A; GRYZENHOUT, M.; SLIPPERS, B.; AHUMADA, R.; ROTELLA, A.; FLORES, F.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. *Phytophthora pinifolia* sp. nov. associated with a serious needle disease of *Pinus radiata* in Chile. **Plant Pathology**, v. 57, n. 4, aug. 2008. p. 715-727.

ERWIN, D. C.; BARTNICKI-GARCIA, S.; TSAO, P. H. (Eds). **Phytophthora Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology**. St. Paul, Minnesota: APS Press, 1983. 392 p.

ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. **Phytophthora diseases worldwide**. 1 ed. St. Paul, Minnesota: APS Press, 1996. 561 p.

FALEIRO, F. G.; LUZ, E. D. M. N.; CERQUEIRA, A. O.; ROCHA, C. S. S.; DANTAS NETO, A.; FLORES, A. B.; BAHIA, R. C. S.; FALEIRO, A. S. G. Caracterização e diversidade genética de isolados de *Phytophthora* spp. do cacauero com base em marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, mai./jun. 2004. p. 303-306.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. dos; MATUSOKA, K.; BEZERRA, J. L. (Eds.). **Doenças Causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. p. 283-342.

FISCHER, I. H.; MARTINS, M. C.; LOURENÇO, S. A.; ABREU, F. M. de. Ocorrência de *Phytophthora parasitica* em Lírio da Paz no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, nov./dez. 2004. p. 690.

FORSTER, H.; LEARN, G.; COFFEY, M. D. Towards a better understanding of the evolutionary history of species of the genus *Phytophthora* using isozymes. DNA

RFLPs and ribosomal spacer sequences. In: European Association for Potato Research Conference: *Phytophthora infestans* 150, 1995, Dublin. **Proceedings...**Dublin: Boole Press, 1995. p. 42-52.

FORSTER, H.; CUMMINGS, M. P.; COFFEY, M. D. Phylogenetic relationships of *Phytophthora* species based on ribosomal ITS 1 DNA sequence analysis with emphasis on Waterhouse group V and VI. **Mycological Research**, v. 104, n. 9, 2000. p. 1055-1061.

GALLEGLY, M. E.; HONG, C. **Phytophthora: Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints**. St. Paul, Minnesota: APS Press, 2008. 158 p.

GASPAROTTO, L.; SANTOS, A. F. dos; PEREIRA, J. C. R.; FERREIRA, F. A. **Doenças da seringueira no Brasil**. Brasília: Embrapa-SPI; Manaus: Embrapa-CPPA, 1997. 168 p.

GILES, E.; ST, J. H.; VEAR, K.; O'GARA, E.; WILLIAMS, N.; O'BRIEN, P. A. Detection, diagnosis and mapping of native areas infested by *Phytophthora* species in western Australia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. S45-S46, 2007. Suplemento.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, 1999. p. 95-98.

HOLLIDAY, P. **Fungus Diseases of Tropical Crops**. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1980. 607 p.

KANMWISCHER, M. E.; MITCHELL, D. J. The influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco. **Phytopathology**, v. 68, n. 12, 1978. p. 1760-1765.

KAOSIRI, T. Phytophthora blight of kitchen mint. **J. Thai Phytopathol. Soc.**, v. 4, 1984. p. 204-208.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2. 663 p.

KRAUSS, U.; BIDWELL, R.; INCE, J. Isolation and Preliminary Evaluation of Mycoparasites as Biocontrol Agents of Crown Rot of Banana. **Biological Control**, v. 13, n. 2, out. 1998. p. 111-119.

KRAUSS, U.; SOBERANIS, W. Biocontrol of Cocoa Pod Diseases with Mycoparasite Mixtures. **Biological Control**, v. 22, n. 2, out. 2001. p. 149-158.

KRÖBER, H.; MARWITZ, R. *Phytophthora tentaculata* sp. nov. und *Phytophthora cinnamomi* var. *parvispora* var. nov., zwei neue Pilz von Zierpflanzen in Deutschland (*Phytophthora tentaculata* sp. nov. and *Phytophthora cinnamomi* var. *parvispora* var. nov., two new fungi from ornamental plants in Germany. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 100, 1993. p. 250-258.

KROON, L. P. N. M.; BAKKER, F. T.; VAN DEN BOSCH, G. B. M.; BONANTS, P. J. M.; FLIER, W. G. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 8, aug. 2004. p. 766-782.

LOBÃO, D. E.; VALERI, S. V.; LOBÃO, E. S. P.; CURVELO, K.; SETENTA, W. C. Conservação de espécies arbóreas em sags cacau-cabruca. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS AGROFLORESTAIS, 7., 2009, Brasília. **Resumos...** Brasília, 2009. 4 p.

LÓPEZ-HERRERA, C. J.; PÉREZ-JIMÉNEZ, R. M.; ZEA-BONILLA, T. First Report of *Phytophthora cactorum* Causing Fruit Rot on Avocado in Spain. **Plant Disease**, v. 89, n. 12, dec. 2005. p.1363.

LUZ, E. D. M. N. O gênero *Phytophthora* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. S80-S81, ago. 2006. Suplemento.

LUZ, E. D. M. N.; MATSUOKA, K. *Phytophthora*: fungo, protista ou chromista? In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. p. 1-14.

LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. 754 p.

LUZ, E. D. M. N.; SILVA, S. D. V. M. Podridão-parda dos frutos, cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacauzeiro. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. p. 203.

LUZ, E. D. M. N.; SILVA, S. D. V. M.; BEZERRA, J. L.; SOUZA, J. T. de; SANTOS, A. F. dos. **Glossário ilustrado de *Phytophthora***: técnicas especiais para o estudo de Oomicetos. Itabuna: FAPESB/CEPLAC, 2008. 204 p.

MAGALHÃES, D. M. A. **Diversidade de fungos na serrapilheira e de *Phytophthora* na rizosfera de plantas da Mata Atlântica no Sul da Bahia**. 2009. 139 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2009.

MARTIN, F. N.; TOOLEY, P. W. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. **Mycologia**, v. 95, n. 2, mar./apr. 2003. p. 269-284.

MATOS, A. P. de; SANTOS FILHO, H. P. Podridão-das-raízes e podridão-do-olho do abacaxizeiro. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. p. 54-62.

MAY-DE MIO, L. L.; GHINI, R.; KIMATI, H. Solarização para controle de *Phytophthora parasitica* em mudas de citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 3, mai./jun. 2002. p. 254-258.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1996. 574 p.

MYERS, N.; MITTERMIER, R. A.; MITTERMIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, n. 6772, feb. 2000. p. 853-858.

NEWHOOK, F. J.; WATERHOUSE, G. M.; STAMPS, D. J. Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. **Mycological Papers**, Kew, n. 143, 1978. 20 p.

OLIVEIRA, A. A. R.; BARBOSA, C. J.; SANTOS FILHO, H. P.; MEISSNER FILHO, P. E. Doenças e seu controle. In: SANCHES, N. F.; DANTAS, J. L. L. **O cultivo do mamão**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 1999. p. 49-50.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. **Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil**. 1. ed. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC/SEFIT, 2005. 132 p.

ORTIZ-GARCIA, C. F. **Estude de la diversité génétique de populations de *Phytophthora* pathogènes du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) et du cocotier (*Cocos nucifera* L.)**. 1996. 85 f. PhD Thesis - Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 1996.

PAIM, M. C. A. **Diversidade genética e patogenicidade de *Phytophthora citrophthora* e *P. palmivora***. 2005. 98 f. Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - BA, 2005.

PAIM, M. C. A.; LUZ, E. D. M. N.; SOUZA, J. T. de; CERQUEIRA, A. O.; LOPES, J. R. M. *Phytophthora citrophthora* as a pathogen of *Anturium andreanum* in Bahia, Brazil. **Australasian plant pathology**, v. 35, n. 2, 2006. p. 275-277.

PICCININ, E.; PASCHOLATI, S. F.; DI PIERO, R. M. Doenças do abacateiro (*Persea americana*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2. p. 253-255.

POLTRONIERI, L. S.; ALBUQUERQUE, F. C.; TRINDADE, D. R.; DUARTE, M. L. R.; BENCHIMOL, R. L. Podridão mole das raízes de mandioca. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. p. 433-454.

RAO, V. G.; DESAI, M. K.; KULKARNI, N. B. A new *Phytophthora* fruit rot of *Annona squamosa* from India. **Plant Disease Reporter**, v. 46, n. 12, dec. 1962. p. 874-876.

REESER, P. W.; HANSEN, E. M.; SUTTON, W. *Phytophthora siskiyouensis*, a new species from soil, water, myrtlewood (*Umbellularia californica*) and tanoak (*Lithocarpus densiflorus*) in southwestern Oregon. **Mycologia**, v. 99, n. 5, sep./oct. 2007. p. 639-643.

REIS, A.; RIBEIRO, F. H. S.; MIZUBUTI, E. S. G. Caracterização de isolados de *Phytophthora infestans* do Distrito Federal e de Goiás. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, mai./jun. 2006. p. 270-276.

RIBEIRO, O. K. **A source book of the genus *Phytophthora***. Vaduz: J. Cramer, 1978. 417 p.

ROBIN, C.; CAPRON, G.; DESPREZ-LOUSTAU, M. L. Root infection by *Phytophthora cinnamomi* in seedlings of three oak species. **Plant Pathology**, v. 50, n. 6, dec. 2001. p. 708-716.

ROYLE, D. J.; HICKMAN, C. J. Observations on *Phytophthora cinnamomi*. **Canadian Journal of Botany**. v. 42, 1964. p. 311-318.

SAMUELS, G. J.; CHAVERRI, P.; FARR, D. F.; MCCRAY, E. B. **Trichoderma Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA**. Disponível em: < <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>>. Acesso em: 2 jun. 2010.

SAMUELS, G. J.; ROSSMAN, A. Y.; CHAVERRI, P.; OVERTON, B. E.; PÖLDMAN, K. **Hypocreales of the Southeastern United States: An Identification Guide**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2006. 145 p.

SANTANA, S. O.; SANTOS, R. D.; GOMES, I. A.; JESUS, R. M.; ARAUJO, Q. R.; MENDONÇA, J. R.; CALDERANO, S. B.; FONTES, A. F. F. **Solos da Região Sudeste da Bahia** - Atualização da legenda de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação. Ilhéus: CEPLAC; Rio de Janeiro: Embrapa Solos. 2002. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 16, p. 18.

SANTOS, A. F. dos. Gomose de *Phytophthora* da Acácia-negra. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. p. 67-90.

SANTOS, A. F. dos; LUZ, E. D. M. N. Distribuição de *Phytophthora nicotianae* e *P. boehmeriae* nas plantações brasileiras de acácia-negra. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, jul./ago. 2006. p. 398-400.

SANTOS, A. F. dos; LUZ, E. D. M. N.; FINATO, P. D.; TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B. Primeiro relato da podridão do estipe da pupunheira, causada por *Phytophthora palmivora*, no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, nov./dez. 2004. p. 680-682.

SANTOS, A. F. dos; PEREIRA, J. C. R.; ALVES, F. A. Doenças da copa da seringueira. In: FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: SIF, 1989. p. 314-325.

SCHENA, L.; DUNCAN, J. M.; COOKE, D. E. L. Development and application of a PCR-based 'molecular tool box' for the identification of *Phytophthora* species

damaging forests and natural ecosystems. **Plant Pathology**, v. 57, n. 1, apr. 2008. p. 64-75.

SCHROERS, H-J. A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. **Studies in Mycology**, v. 46, 2001. 215 p.

SCHUMANN, G. L.; D' ARCY, C. J. **Essential Plant Pathology**. St. Paul: APS Press, 2006. 338 p.

SILVA, A. M. S.; ARAÚJO, J. S. de; CARMO, M. G. F. do. Doenças de plantas ornamentais causadas por *Phytophthora*. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. p. 590-604.

SILVA, L. F. da; CARVALHO-FILHO, R.; MELO, A. O. de. Solos e aptidão agrícola da região cacauzeira da Bahia. In: **Diagnóstico Sócio Econômico da Região Cacauzeira**. Ilhéus: IICA/CEPLAC, 1975. v. 2. 175 p.

SILVA, G. S.; DOIHARA, I. P. Uma técnica para obter abundante esporulação de *Phytophthora palmivora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, set./out. 2003. p. 568.

SILVEIRA, V. D. **Micologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995. 336 p.

SIQUEIRA, C. B.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; CORDEIRO, C. M. T. **Índice de doenças de hortaliças no Brasil: Bactérias e fungos**. Brasília: EMBRAPA/CNPQ, 1985. v.2, 89 p.

STAMPS, D. J.; WATERHOUSE, G. M.; NEWHOOK, F. J.; HALL, G. S. Revised tabular key to the genus *Phytophthora*. **Mycological Papers**, Wallingford, n. 162, 1990. 28 p.

STEYAERT, J. M.; STEWART, A.; JASPERS, M. V.; CARPENTER, M.; RIDGWAY, H. J. Co-expression of two genes, a chitinase (*chit42*) and proteinase (*prb1*), implicated in mycoparasitism by *Trichoderma hamatum*. **Mycologia**, v. 96, n. 6, nov./dec. 2004. p. 1245-1252.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence

alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, dec.1997. p. 4876-4882.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J.; FERRERIRA, M. R.; GARCIA JÚNIOR, O. Ação de acibenzolar-s-methyl isolado e em mistura com fungicidas no controle da requeima da batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, jul./set. 2005. p. 749-753.

TONDJE, P. R.; ROBERTS, D. P.; BON, M. C.; WIDMER, T.; SAMUELS, G. J.; ISMAIEL, A.; BEGOUDE, A. D.; TCHANA, T.; NYEMB-TSHOMB, E.; NDOUMBE-NKENG, M.; BATEMAN, R.; FONTEM, D.; HEBBAR, K. P. Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. **Biological Control**, v. 43, n. 2, nov. 2007. p. 202-212.

TRINDADE, D. R.; POLTRONIERI, L. S.; BENCHIMOL, R. L. Requeima e podridão do coleto em guaranazeiro (*Paulinea cupana* var. *sorbilis*). In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. p. 369-377.

TRUJILLO, E. E.; ALVAREZ, A. M.; SWINDALE, D. N. Phytophthora leaf spot of Ti. **Plant Disease Reporter**, v. 59, n. 5, may. 1975. p. 452-453.

VIANA, F. M. P.; FREIRE, F. C. O.; ARAÚJO, J. R. G.; PESSOA, M. N. G. Influência da Variedade da Copa na Incidência da Gomose-de-Phytophthora em Porta-Enxerto de Limoeiro 'Cravo' no Estado do Piauí. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, jan./fev. 2004. p. 103.

VITTI, A. J.; KOCH, P. S.; DELLA VECCHIA, P. T.; MAY, L. L. Ocorrência da podridão "olho de veado", causada por *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* em frutos de tomate no estado de São Paulo e resposta de cultivares do tipo indústria e Santa Cruz à inoculações pelo método do fermento em frutos destacados. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 4, dez. 1993. p. 566.

WATERHOUSE, G. M. Key to species of *Phytophthora* de Bary. **Mycological Papers**, Kew, n. 92, 1963. 22 p.

WATERHOUSE, G. M. The Genus *Phytophthora*: Diagnoses (or descriptions) and figures from the original papers. **Commonwealth Mycological Institute Miscellaneous Publication**, Kew, n. 12, 1956. 120 p.

WERRES, S.; MARWITZ, R.; MAN IN 'T VELD, W. A.; DE COCK, A. W. A. M.; BONANTS, P. J. M.; DE WEERDT, M.; THEMANN, K.; ILIEVA, E.; BAAYEN, R. P.

Phytophthora ramorum sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. **Mycological Research**, v. 105, n. 10, oct. 2001. p. 1155-1165.

WESTE, G. Population dynamics and survival of *Phytophthora*. In: ERWIN, D. C.; BARTNICKI-GARCIA, S.; TSAO, P. H. (Eds). ***Phytophthora Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology***. St. Paul, Minnesota: APS Press, 1983. p. 237-257.

WHEELER, J. E.; BOYLE, A. M. Identification of four *Phytophthora* isolates previously unreported from Arizona. **Phytopathology**, v. 61, oct. 1971. p. 1293-1296.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.). **PCR Protocols : a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

ZHANG, J. Z.; LI, J.; XU, T. First report of *Phytophthora nicotianae* causing blight of *Dendrobium candidum* candidum in Zhejiang province, China. **Plant Pathology**, v. 57, n. 2, 2008. p. 370.

ZOLAN, M. E.; PUKILLA, P. J. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 6, n. 1, jan. 1986. p. 195-200.

ANEXO 1

COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA – CEPLAC/CEPEC/PHYTO LAB**PERFIL DA PROPRIEDADE RURAL**

Data: _____

Nome e localização da propriedade rural: _____

Profissional responsável pelo questionário: _____

QUESTIONÁRIO1) Nome do proprietário ou responsável pela propriedade rural:
_____2) Qual a área da propriedade:

3) Tipos de adubos e produtos utilizados no controle de doenças, pragas e plantas invasoras:

 Químicos Orgânicos AmbosObservações: _____
_____4) Quais as plantas cultivadas atualmente?

_____5) Qual era o uso da terra anteriormente?

6) Na propriedade é realizado o diagnóstico de doenças de plantas?

 Sim NãoObservações: _____

7) Na propriedade existem?

 Áreas com mata nativa Áreas de Capoeira

8) Situação climática nos últimos 30 dias:

Temperatura: Elevada para a época Normal Baixa para a épocaPluviosidade: Elevada para a época Normal Baixa para a época

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)