

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR



**INTERAÇÃO ANTAGÔNICA *Trichoderma stromaticum* -  
*Crinipellis pernicioso*: EFEITO DO CLIMA NO BIOCONTROLE  
DA VASSOURA-DE-BRUXA DO CACAUEIRO E  
DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES**

**LÍVIA SILVA SANTOS**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Agosto de 2005**

**LÍVIA SILVA SANTOS**

**INTERAÇÃO ANTAGÔNICA *Trichoderma stromaticum* - *Crinipellis pernicioso*: EFEITO DO CLIMA NO BIOCONTROLE DA VASSOURA-DE-BRUXA DO CACAUEIRO E DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Santa Cruz,  
como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em  
Genética e Biologia Molecular.

**LÍVIA SILVA SANTOS**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Agosto de 2005**

LÍVIA SILVA SANTOS

INTERAÇÃO ANTAGÔNICA *Trichoderma stromaticum* - *Crinipellis pernicioso*: EFEITO DO CLIMA NO BIOCONTROLE DA VASSOURA DE BRUXA DO CACAUEIRO E DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: \_\_\_\_ de agosto de 2005

Prof. Dra. Kátia Pimentel de Araújo Sgrillo  
(UESC)

Dr. Jorge Teodoro de Souza  
(CEPLAC)

Prof. Dr. Leandro Lopes Loguercio  
(UESC – Orientador)

## *DEDICATÓRIA*

A Deus, aos meus pais e às minhas irmãs que, nas alegrias e nas tristezas, lutaram comigo, oferecendo como verdadeiras armas a compreensão, o carinho e o respeito para a certeza de mais uma vitória digna em minha vida, dedico esta conquista.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pela suas palavras e ensinamentos inspiradores e pelo alívio dado nos momentos de angústia e aflição.

Aos meus pais pela grande luta e sofrimento do passado e pela motivação sempre presente para a minha formação acadêmica, formação essa que só aumentou o meu amor e respeito ao meu pilar maior, minha família.

A minha irmã Luciana pela sua graça e pelas palavras: “Faça o que gosta!”. A minha irmã Liviane pela sua personalidade forte e admirável.

A professora Dra. Ana Lúcia Cotias pelas oportunidades durante a graduação, pelos ensinamentos, pela sua credibilidade e, em especial, pelo seu reflexo de justiça e retidão, no qual inspiro-me profundamente para poder prosseguir sem baixar a cabeça.

Ao Prof. Dr. Leandro Lopes Loguercio pela orientação sempre presente, pelos ensinamentos, pela sincera amizade e, em especial, pela compreensão nas falhas e nos momentos difíceis impostas pela própria arte de se fazer ciência, ou melhor, de querer ser cientista.

Aos professores do programa pelos gratos momentos e ensinamentos.

Ao Prof. Nicolas Carels pela co-orientação nos trabalhos iniciais de bioinformática, e pela simpatia e incentivos.

À amiga Aitala Carvalho, companheira-irmã pela presença e por compartilhar, o projeto, as tristezas, alegrias, solidão e saudades, dores e conquistas.

Ao Carlos Leal Santos pelo grande suporte técnico nos trabalhos de campo, pela amizade, prestatividade e carinho. Ao amigo Rufino pela presença nos momentos de necessária descontração. Aos demais colegas de Mestrado, em especial, ao casal Rita e Charles que sempre mostraram-se solícitos e

amigos, ao colega Stênio Carvalho e ao Ramon Vidal pela amizade e pelo suporte em informática e a amiga Dahyana Santos pelo sorriso e mensagens otimistas e pelo auxílio inicial nas atividades do laboratório.

Ao Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza pelo grande prazer que me foi oportunizado nos trabalhos com microssatélites na CEPLAC, pela sua admirável gentileza e presteza e a Prof<sup>a</sup> Edna Dora sempre solícita e gentil para resolver questões administrativas na CEPLAC e pelos ensinamentos a respeito dos fungos. À Profa. Karina Gramacho pela orientação nas extrações de DNA e pelo espaço cedido em seu laboratório.

À Acassí Flores pelos momentos de entusiasmos e extrema paciência quando no auxílio e transferências de técnicas laboratoriais, pela amizade. A Lívia Lima, Ricardo e Elisa pelo auxílio e apoio.

Ao Dr. Alan Pomella pela co-orientação, pelo espaço disponibilizado na Almirante Cacau e ensinamentos vindos, muitas vezes, de forma inusitada.

Aos colegas da Almirante Cacau Iara, Agnaldo, Alício, Marcos, Lívia, Tony e Zoião pela assistência referente aos materiais necessários à realização de grande parte deste trabalho.

Ao USDA-ARS (U.S.A.), na figura do Dr. Ronald T. Collins, pelo financiamento da pesquisa, à FAPESB pela concessão da Bolsa e à UESC pela oportunidade da realização do curso.

Aos que acreditaram que era para mim possível e, aos que não acreditaram, mais ainda, pois fizeram ascender em meu coração um 'querer' bem maior.

## ÍNDICE

<b>EXTRATO</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1. <i>Theobroma cacao</i> L (cacaueiro) .....	3
2.2. A doença ‘vassoura-de-bruxa’ e seus métodos de controle .....	4
2.3. <i>Crinipellis pernicioso</i> : o agente causal da doença.....	6
2.4. Controle Biológico .....	7
2.5. Gênero <i>Trichoderma</i> .....	9
2.5.1. Aspectos gerais.....	9
2.5.2. Mecanismos de ação antagônica.....	11
2.6. Marcadores Microsatélites (SSR) .....	15
<b>3. CAPÍTULO I</b> .....	<b>17</b>
3.1. RESUMO .....	17
3.2. INTRODUÇÃO.....	18
3.3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	20
3.3.1. Isolados e condições de cultura .....	20
3.3.2. Preparação das vassouras de bruxa e inoculação com aplicação dos isolados de <i>T. stromaticum</i> .....	21
3.3.3. Coleta de dados dos parâmetros meteorológicos .....	21
3.3.4. Parâmetros biológicos relacionados ao biocontrole.....	22
3.3.5. Desenho experimental e análise estatística.....	23
3.4. RESULTADOS.....	25

3.4.1. Associação entre a variação de precipitação e parâmetros climáticos medidos acima do solo -----	25
3.4.2. Associação entre parâmetros climáticos e esporulação de <i>T. stromaticum</i> em experimentos de biocontrole no campo -----	27
3.4.2.1. Relevância da umidade de vassoura.....	27
3.4.2.2. Umidade relativa do ar (UR) e Temperatura.....	28
3.4.2.3. Radiação solar e velocidade do vento.....	30
3.4.3. Avaliação dos parâmetros climáticos e esporulação de <i>T. stromaticum</i> no solo -----	31
3.4.4. Análise da performance de biocontrole de <i>C. pernicioso</i> com base nos diferentes níveis do dossel e dos diferentes isolados de <i>T. stromaticum</i> -----	33
3.5. DISCUSSÃO -----	35
3.6. REFERÊNCIAS -----	45
<b>4. CAPÍTULO II -----</b>	<b>48</b>
4.1. RESUMO -----	48
4.2. INTRODUÇÃO-----	49
4.3. MATERIAIS E MÉTODOS -----	51
4.3.1. Obtenção dos isolados-----	51
4.3.2. Condições de crescimento dos isolados e extração de DNA-----	51
4.3.3. Desenho dos <i>primers</i> e nomenclatura dos microssatélites -----	52
4.3.4. Amplificação dos fragmentos pela reação de polimerização em cadeia (PCR) -----	53
4.3.5. Análise de polimorfismo por eletroforese em Poliacrilamida -----	53
4.4. RESULTADOS-----	54
4.4.1. Extração do DNA-----	54
4.4.2. Obtenção dos <i>primers</i> para amplificação das seqüências simples repetitivas (SSR)-----	55
4.4.3. Análise de polimorfismo em gel de poliacrilamida -----	57
4.5. DISCUSSÃO -----	58
4.6. REFERÊNCIAS -----	60
<b>5. CONCLUSÕES -----</b>	<b>63</b>
<b>6. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES -----</b>	<b>64</b>

## EXTRATO

SANTOS, Livia Silva, M. Sc. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Agosto de 2005. **Interação antagônica *Trichoderma stromaticum* - *Crinipellis pernicioso*: efeito do clima no biocontrole da vassoura de bruxa do cacauero e desenvolvimento de marcadores microssatélites.** Orientador: Leandro Lopes Loguercio. Co-orientador: Nicolas Carels. Colaboradores: Alan W. Vilela Pomella e Jorge Teodoro de Souza.

*Trichoderma stromaticum*, utilizando o micoparasitismo como seu principal mecanismo de ação, tem sido usado no controle biológico do principal fitopatógeno do cacauero (*Thebroma cacao* L.), o fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, agente causal da vassoura-de-bruxa. Através de dados morfológicos e moleculares, demonstrou-se que *T. stromaticum* apresenta isolados com alta variedade de atividade micoparásita. Estas variações intraespecíficas devem-se às diferentes respostas aos fatores ambientais e as variações genéticas em tais isolados podem ser a fonte primária para esta capacidade de responder diversificadamente. Neste trabalho, através do registro contínuo de diversos parâmetros meteorológicos por uma estação climatológica automática, durante experimentos de biocontrole, constatou-se que o efeito microclimático sobre a biologia do *T. stromaticum* pode estar relacionado a curtos períodos com padrões de variação específica e coordenada destes parâmetros, antecedendo os momentos de esporulação de *T. stromaticum*, indicador do resultado final de biocontrole de *C. pernicioso*. A importância da umidade e temperatura, interferência da radiação solar e precipitação na interação antagônica *Ts-Cp*, bem como efeitos específicos dos isolados e da

altura foram demonstrados. Além disso, uma caracterização parcial da variabilidade genética deste antagonista foi inferida através de marcadores moleculares do tipo Microsatélites (SSR), com o desenvolvimento inicial de 11 *loci* SSR para 10 isolados de *T. stromaticum* e tendo sido detectado polimorfismo em pelo menos um *locus*. O desenvolvimento de mais marcadores microsatélites será útil em estudos de populações de *T. stromaticum* e monitoramento de isolados mais eficientes aplicados a campo.

## ABSTRACT

SANTOS, Livia Silva, M. Sc. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, August 2005. **Antagonistic interaction *Trichoderma stromaticum* - *Crinipellis pernicioso*: climate effects in the biocontrol of cacao witches' broom and development of microsatellite markers.** Advisor: Leandro Lopes Loguercio. Co-advisor: Nicolas Carels. Colaborators: Alan W. Vilela Pomella and Jorge Teodoro de Souza.

*Trichoderma stromaticum*, using the mycoparasitism as its major mode of action, has been applied in the biological control of the major phytopathogen of cacao (*Thebroma cacao* L.), the fungus *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, the causal agent of the witches' broom. Based upon morphological and molecular data, it was demonstrated that *T. stromaticum* isolates show a great plasticity in their mycoparasitic action. These intraspecific variation is due to differential responses to environmental cues and the genetic variation among isolates may serve as the primary source of such capacity to respond in diverse ways. In this work, biocontrol experiments, set around an automated weather station adjusted to continuously evaluate various meteorological parameters, indicated that the microclimatic effects over the *T. stromaticum* biology may be chiefly related to short intervals of specific and coordinated patterns of variations in the weather factors that precedes the moments of *T. stromaticum* sporulation, a direct indicator of the final *C. pernicioso*-biocontrol outcome. The relevance of humidity and temperature, the important interference of the solar radiation and rainfall, as well as height- and isolate-specific effects were observed. In addition, a partial characterization of the genetic variability of this antagonist was studied through of Microsatellite (SSR) molecular

markers, with the initial development of 11 SSR *loci* for 10 *T. stromaticum* isolates. From this analysis, it was possible to identify polymorphisms in at least one *locus*. Further development of more SSR markers will be useful in populational studies of *T. stromaticum*, as well as in procedures to monitoring more efficient isolates applied in the field.

## 1. INTRODUÇÃO

O fruto do cacaueteiro (*Theobroma cacao L.*) contém uma polpa mucilagínosa que juntamente com sua semente, constitui a parte econômica do cultivo - indústria de polpa, chocolate e cosméticos. Esta cultura é prejudicada por diversas pragas e doenças, sendo a *vassoura de bruxa*, causada pelo fungo fitopatogénico *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer a mais séria enfermidade do cacaueteiro, a qual trouxe prejuízos econômicos em grande escala para a região produtora do Sul da Bahia.

Natural da Região Amazônica, essa doença ocorre em países da América do Sul e Ilhas do Caribe e teve o seu primeiro relato na região sul-baiana em 1989. As perdas, numa perspectiva mais dramática, já chegaram a 70-90%, causando danos sócio-econômicos e ambientais bastante acentuados.

O uso de agrotóxicos no controle desta doença pode causar contaminação e efeitos danosos a outros organismos. Assim, os altos custos ambientais e econômicos derivados do uso destes produtos resultou num esforço para o desenvolvimento de estratégias de controle integrado, associando diferentes métodos que incluem o controle químico, poda fitossanitária e o uso de cultivares resistentes. Mais recentemente, tem-se utilizado, em adição aos outros já citados, o método do Controle Biológico (CB) cujo objetivo primordial é a diminuição da quantidade de propágulos e indivíduos infectantes (patogénicos) por área, pela aplicação de outros organismos antagonistas. O CB é descrito como altamente

benéfico ao apresentar várias vantagens, tais como um impacto ambiental menor e maior segurança ao homem, além de sistemas de produção menos poluentes e maior seletividade do alvo a ser controlado.

O gênero *Trichoderma*, que produz enzimas hidrolíticas, antibióticos ou agentes inibidores do crescimento de fitopatógenos em sua atividade antagonista, possui um alto grau de adaptabilidade ecológica. Na região cacauqueira, o CB está em fase de experimentação com a utilização da espécie *Trichoderma stromaticum* que apresenta a sua alta capacidade recombinatória como responsável pela geração de indivíduos segregantes com eficácia variável. Tem sido demonstrado que alguns isolados do gênero *Trichoderma* podem não ser hábeis a campo quando uma faixa termal ou de umidade favorece o patógeno, deixando claro que o conhecimento destes dados, aliados a dados de outros parâmetros ambientais, constituem-se em necessidades relevantes para o sucesso do CB.

Este trabalho objetivou trazer informações que reflitam os possíveis requerimentos ambientais favoráveis à atividade antagônica de diversos isolados de *Trichoderma stromaticum* frente ao *Crinipellis pernicioso*. Além disso, com a utilização de marcadores moleculares microssatélites, procurou-se fornecer algumas elucidações a respeito da diversidade intra-específica presente nesta espécie que pode estar relacionada com a alta diversidade de respostas antagônica por diferentes isolados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Theobroma cacao* L (cacaueiro)

*Theobroma cacao* L (cacaueiro) é uma espécie vegetal originalmente pertencente à família Sterculiaceae (ALVES, 2002), tendo sido recentemente proposta sua reclassificação para a família Malvaceae. Esta espécie arborea foi considerada uma planta sagrada pelos Maias e Astecas, povos habitantes do pré-colombiano da América Central, sendo que suas amêndoas eram usadas no preparo da bebida “*chocahualt*” após infusão (BOWERS et al., 2001). A primeira citação botânica desta espécie foi feita por Charles de L'Écluse que o denominou de *Cacao fructus*. Em 1737, Linneaus classificou-o como pertencente ao gênero *Theobroma*, chamando-a de *Theobroma fructus*. Entretanto, este binômio foi parcialmente alterado, onde somente o segundo nome foi modificado ficando *Theobroma cacao* L que é a denominação atualmente utilizada pelos botânicos.

As proximidades dos rios Amazonas e Orinoco, na região da Floresta Amazônica, constituem-se no centro de origem do cacau brasileiro. Da região amazônica, o cacaueiro dispersou para diversas regiões de clima tropical. Na região sul do Estado da Bahia, o primeiro pé de cacau foi plantado no município de Canavieiras, em 1746, na fazenda ‘Cubículo’. Posteriormente, a cultura expandiu-se para o Município de Ilhéus, ainda em meados do século XVIII.

Diversas aplicações do cacaueiro justificam a sua importância no cenário mundial. As amêndoas têm sua polpa atualmente processada pelas indústrias de

sucos, sorvetes e bebidas alcoólicas. As sementes, utilizadas na indústria do chocolate, tiveram ampliada sua aplicabilidade com a indústria de cosméticos, onde a extração da gordura vegetal (‘manteiga de cacau’) serve de base para a elaboração destes produtos.

## **2.2. A doença ‘vassoura-de-bruxa’ e seus métodos de controle**

O cacauero normalmente é acometido por diversas pragas. A mais devastadora doença do cacauero atualmente é a ‘vassoura-de-bruxa’, incitada pelo fungo basidiomiceto hemibiotrófico *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer (BOWERS, et al., 2001; DIAS, 2001), sendo considerado um fator limitante ao cultivo na região Amazônica e no sul da Bahia.

As primeiras malformações causadas pelo *C. pernicioso* foram observadas em 1785, sendo dada a denominação de “lagartão” (GRIFFITH et al., 1994). Went, em 1904, apresenta um novo relato da ocorrência desta doença. Stahel (1915) no Suriname chamou esta doença de “krulloten”. Na França doença é conhecida como “balai de sorcière”, em países de língua espanhola é referida como “escoba de bruja” e “witches’ broom” nos países de língua inglesa (SILVA et al., 2002).

O primeiro município brasileiro que apresentou a doença foi Uruçuca, no Sul da Bahia, em 1989 (PEREIRA et al., 1989). Em seguida, ainda no Sul da Bahia, o município de Camacã registra a doença, que segundo trabalhos de Anderbrhan et al. (1999) e Pereira et al. (1996) provavelmente ocorreu por intervenção humana, através da distribuição de amêndoas contaminadas vindas da Região Amazônica. A doença disseminou-se rapidamente para todas as regiões produtoras do Estado da Bahia, provocando grande impacto social, econômico, ecológico e cultural na região, tais como aumento de desemprego, abandono de propriedades agrícolas e uso desenfreado de agrotóxicos. Embora tenha sido detectada em outras regiões, como no Estado do Espírito Santo e na região amazônica, nessas áreas, especialmente devido ao clima desfavorável, a doença não progrediu de forma tão devastadora como na região cacauera da Bahia (SILVA et al., 2002).

SILVA et al. (2002) trazem uma redescritção da doença, apontando que, embora ela já tenha sido detalhadamente descrita por Holliday (1952), Baker e Holliday (1957), Thorold (1975), Evans (1981), Rudgard (1989) e Tovar (1991), entre outros, diversos aspectos sintomatológicos em plântulas, mudas naturalmente infectadas, frutos e em plantas adultas resistentes ao *C. pernicioso* não haviam sido relatados. Como sintoma característico, ocorre a formação de brotos hipertrofiados, desenvolvimento excessivo nas regiões terminais da planta, aparecimento de ramificações com entre-nós curtos e folhas geralmente grandes, curvadas ou retorcidas, aparentando vassouras (LANA, 2004). Nas almofadas florais ocorre também formação de vassouras típicas e as flores infectadas podem dar origem a frutos de formatos modificados, como os “frutos morangos” e os “frutos cenouras” (SILVA et al., 2002; LANA, 2004). Os frutos provenientes de flores normais apresentam manchas amarelas ou escuras e são duros no seu interior, sendo em qualquer dos casos, apodrecidos e petrificados (SILVA et al., 2002; LANA, 2004).

As infecções causadas por *C. pernicioso* são assistêmicas, permitindo o seu controle por simples remoção das partes doentes. Este tipo de tratamento tem sido referido como controle cultural ou fitossanitário (COSTA; BASTOS, 2001). O controle químico aplicado à doença provocada pelo *C. pernicioso* é baseado na utilização de inúmeros compostos químicos, denominados de ‘agrotóxicos’ ou ‘agroquímicos’ (ALVES, 2002). Esta forma de controle, se não bem planejada, pode causar sérios impactos ambientais, uma vez que pode concorrer para a poluição do solo, subsolo e do próprio alimento. A seleção de genótipos resistentes tem sido denominada de controle genético e tem sido a mais econômica e a mais utilizada pelos produtores de cacau (LANA, 2004; ALVES, 2002). A indução na planta hospedeira de ‘resistência sistêmica adquirida’ (SAR) é outra forma de controle e consiste em ativar o sistema de defesa da planta antes que ocorra a interação patógeno-hospedeiro (LANA, 2004).

O Controle Biológico (CB) vem sendo utilizado como uma alternativa no controle desta doença através de interações específicas entre o fitopatógeno *C. pernicioso* e diversas espécies de fungo antagonistas do gênero *Trichoderma*

(BEZERRA et al, 2003; COSTA; BASTOS, 2001). Apesar de muitas espécies do gênero *Trichoderma* apresentarem grande potencial antagônico em relação ao fungo fitopatogênico *C. pernicioso*, a utilização da espécie *Trichoderma stromaticum* tem sido mais freqüente. Esta espécie vem sendo experimentalmente usada desde 1995 (COSTA; BASTOS, 2001; COSTA et al., 1996) e já foi incorporada como base para a produção do biofungicida ‘Tricovab’, desde 1996.

Mais recentemente, as recomendações para o controle do fungo *C. pernicioso* têm ocorrido dentro de uma perspectiva integrada, onde muitas informações advindas de diferentes fontes são geradas e devem ser utilizadas de forma harmoniosa, caso contrário, tendem a gerar conflitos.

### **2.3. *Crinipellis pernicioso*: o agente causal da doença**

O fungo patogênico causador da vassoura-de-bruxa do cacau é o *Crinipellis pernicioso*, basidiomiceto pertencente à divisão Eumycota, subdivisão Basidiomycotina, ordem Agaricales e família Tricholomataceae. Em 1915, Stahel denominou o patógeno de *Marasmius perniciosus* e, em 1942, Singer, revisando o gênero *Marasmius*, o renomeou de *Crinipellis pernicioso* (LANA, 2004). Reconhecido mundialmente como importante patógeno do cacau, o fungo *C. pernicioso* provavelmente co-evoluiu com o *Theobroma cacao* L, ambos endêmicos da Bacia Amazônica (GRIFFITH et al., 1994).

Os basidiósporos são os únicos propágulos infectivos de *C. pernicioso* (SILVA et al., 2002) e sua dispersão pelo vento, chuva ou pelo homem permite a disseminação do fungo para diferentes regiões (SILVA et al., 2002; ALVES, 2002). São unicelulares, hialinos, diminutos e com parede fina. São produzidos no interior das lamelas do píleo do basidiocarpo. A liberação noturna dos basidiósporos garante a sua sobrevivência por mais tempo, pois são sensíveis a radiação solar (ALVES, 2002).

Vassouras na superfície do solo produzem poucos basidiocarpos; fontes mais

altas permitem disseminação a maiores distâncias (ANDERBRHAN et al, 1993). Anderbrhan (1985) e Costa (1993) afirmam que as vassouras localizadas na copa são as principais fontes de inóculo e Niella (1997), em estudos sob condições climáticas típicas da Bahia, demonstra que os ‘casqueiros’ (restos de folhas, ramos e frutos secos depositados sobre o solo) também são importantes fontes de inóculo.

*C. pernicioso* é um organismo hemibiotrófico que apresenta períodos parasíticos e saprofíticos em seu ciclo de vida. Na fase biotrófica ou parasítica, o fungo cresce intercelularmente com hifas intumescidas, sem grampos de conexão e talo monocariótico. A partir do crescimento do patógeno entre as células do hospedeiro (cacaueiro), ocorre uma desordem fisiológica no hospedeiro, provavelmente como resultado de interferência no balanço hormonal, resultando em hiperplasia e hipertrofia de células (ALVES, 2002). Após o período de incubação, que dura em torno de quatro a seis semanas, *C. pernicioso* inicia a outra fase de seu ciclo de vida, a fase necrótica ou saprofítica, crescendo intracelularmente através de hifas mais delgadas (SILVA et al., 2002; ALVES, 2002), que culmina com a formação de vassouras que secam e morrem.

A partir da técnica molecular ERIC-PCR usada por Arruda et al. (2003), foi possível observar grande variabilidade intraespecífica entre isolados de *C. pernicioso*, de acordo com a sua origem geográfica e ainda de acordo com o seu hospedeiro.

## **2.4. Controle Biológico**

A agricultura moderna, baseada na monocultura ou pequeno número de culturas em grandes áreas, é um sistema em desequilíbrio que promove o surgimento de epidemias fitopatogênicas (REY et al., 2000). Para algumas doenças, o controle químico é muito efetivo, mas seu efeito é inespecífico, matando tanto o patógeno quanto outros organismos benéficos; além disso, pode ainda trazer riscos indesejáveis à saúde, a segurança e ao ambiente (MANCZINGER et al., 2002). Uma alternativa que tem sido largamente utilizada é o Controle Biológico (CB) que

utiliza os chamados agentes de controle biológico (ACBs) ou agentes de biocontrole (ABCs). Os ACBs usados contra fungos são chamados de ‘biofungicidas’.

Cook e Baker (1983) definiram CB como sendo a redução da quantidade de inóculo ou atividade produtora da doença de um patógeno, acompanhado pela introdução de um ou mais organismos naturais pelo homem. O CB estável não tem como objetivo eliminar por completo um organismo no ambiente, mas sim reduzir a sua habilidade em produzir e manter altos os níveis de inóculo e, portanto, de doença (HJELJORD; TRONSMO, 1998). O CB é mais especializado, pois usa microorganismos que atacam ou interagem com um patógeno específico.

O CB é fundamentado nas interações antagônicas entre os organismos e envolve mecanismos diversos que ainda não foram suficientemente elucidados, sendo as mais estudadas e caracterizadas as que ocorrem entre os fungos fitopatogênicos e seus antagonistas (CHET, 1990; HARAN et al., 1996). Estes mecanismos podem ocorrer por: **i)** competição, que reflete a luta pela disponibilidade de nutrientes, espaço, água ou luz; **ii)** antibiose, que se refere à ação de substâncias químicas liberadas pelo antagonista sem que haja a necessidade do contato físico e **iv)** micoparasitismo, que agrega a ação de enzimas hidrolíticas (quitinases, proteases, celulases, glucanases, lipases e outras) sobre a parede celular do hospedeiro, causando a utilização direta do conteúdo celular deste para a sobrevivência do micoparasita (HJELJORD; TRONSMO, 1998). O sinergismo entre estes mecanismos pode também ocorrer (ELAD, 2000). Whipps (2001) reforça que mecanismos de ação antagônica não são, necessariamente, mutuamente exclusivos e muitos modos de ação podem ser exibidos ao mesmo tempo por um simples agente de biocontrole.

## 2.5. Gênero *Trichoderma*

### 2.5.1. Aspectos gerais

Espécies do gênero *Trichoderma* têm sido investigadas como agentes de controle biológico (ACBs) por mais de 70 anos, mas só recentemente isolados têm sido comercialmente viáveis (HERMOSA et al., 2000). As espécies deste gênero de Deuteromicetos são cosmopolitas e tipicamente encontrados em solos ou em madeira em decomposição (SAMUELS et al., 1996; ESPOSITO; DA SILVA, 1998). Devido a seu grande potencial de aplicação do ponto de vista biotecnológico e industrial, o gênero *Trichoderma* é um dos fungos filamentosos mais estudados (SAMUELS et al., 1996). Um programa de pesquisa do exército americano, preocupado com a rápida deterioração do material que compunha as barracas de campanha do exército, em regiões tropicais, identificou o fungo *Trichoderma viride* QM6a, produtor de grande quantidade de enzimas celulíticas extracelulares, como o responsável pelo problema (CHAMBERGO, 2002). No entanto, pesquisas posteriores determinaram ser esta, na verdade, uma nova espécie a ser enquadrada no grupo, a qual foi denominada de *T. reesei*, em homenagem a um dos principais responsáveis pelo programa na época, Elwyn T. Reese (CHAMBERGO, 2002). Pesquisas sobre a biossíntese, estrutura e mecanismo de degradação da celulose e outros polissacarídeos por este fungo foram realizadas por Reese, em colaboração com Mary Mandels (REESE; MANDELS, 1989; GAMS; MEYER, 1998). As espécies de *Trichoderma*, ao atuarem tanto pela produção de metabólitos voláteis como de não-voláteis (CLAYDON et al., 1987; CAMPOROTA, 1985; RAI et al., 1980; DENNIS; WEBSTER, 1971 a, b e c), como também pelo hiperparasitismo (PAPAVIZAS, 1985; BARAK et al., 1985; VAJNA, 1985; CHET; ELAD, 1983; DENNIS; WEBSTER, 1971 a, b e c; BARNETT, 1963) e pela competição por nutrientes, espaço e oxigênio (CHET; ELAD, 1983), são consideradas eficientes antagonistas contra uma série de fungos fitopatogênicos. A produção de metabólitos tóxicos por espécies de *Trichoderma* foi primeiramente observada por

WEINDLING (1937), que determinou haver difusão do princípio letal em hifas jovens (MELO, 1991). As espécies de *Trichoderma* também produzem exoglucanases, endoglucanases, celobiasas e quitinases (RIDOUT et al., 1988; PAPAVIDAS, 1985; ELAD et al., 1982; LORITO et al., 1993; CHAMBERGO, 2002), tendo sido usadas em preparações comerciais para o controle biológico de fungos (BARCELLOS, 2002). Entre essas inúmeras preparações destacam-se o “Tricodex”, cujo agente ativo é o fungo *T. harzianum*, o “Binab-T” que corresponde a uma combinação de dois agentes ativos, o *T. harzianum* e o *T. polysporum* e o “Gliogard” que traz em sua composição o fungo *T. virens* (BARCELLOS, 2002). Os mecanismos de controle biológico podem ocorrer simultaneamente durante o processo de vida do antagonista (MELO, 1991). Apesar dos antibióticos apresentarem grande importância no antagonismo, a competição é um mecanismo essencial em condições naturais (MELO, 1991). As espécies de *Trichoderma* podem parasitar também estruturas de resistência como microescleródios (MELO, 1991; CHET; HENNIS, 1985). Os mais importantes agentes de controle biológico de fungos patogênicos de plantas estudados têm sido *Trichoderma virens* von Arx, Beih, *T. harzianum* Rifai e *T. viride* Pers. (HERMOSA, 2000).

Para Esposito e da Silva (1998) um melhor conhecimento da taxonomia, da definição de espécie, assim como estudos dos ciclos de vida, formas de reprodução e recombinação, estudos fisiológicos, bioquímicos dentre outros, tornam-se necessários para um melhor aproveitamento do potencial destes fungos nas diversas áreas de interesse. Kindermann et al (1998) realizou a primeira descrição filogenética baseada em análise de sequência da região ITS1 do rDNA e outros estudos de filogenia para as espécies da seção *T. Pachybasium*; Lieckfeldt et al. (1998) e mais tarde Dodd et al.(2000) estudaram as relações de diferentes espécies de *Hypocrea-Trichoderma*; as relações filogenéticas de espécies da seção *T. longibrachiatum* foram analisadas por Kuhls et al. (1997); Lieckfeldt et al. (1999) usaram ITS e dados morfológicos para distinguir as novas espécies de *T. asperellum*, Samuels et al. de *T. viride*, e para demonstrar a estreita relação entre

essas espécies, em 2000, Samuels et al. descreveram mais uma nova espécie, *T. stromaticum*, usado no biocontrole de *C. perniciososa*.

No ciclo de vida dos fungos, a forma sexuada é conhecida como teleomórfica e a forma assexuada como anamórfica. Como estas têm formas características diferentes, o teleomorfo e o anamorfo de uma mesma espécie, terão nomes diferentes (CHAVERRI et al., 2003; CHAMBERGO, 2002). Costa e Bastos (2001) e Bezerra et al., (2003), em seus estudos, identificaram o teleomorfo de *Trichoderma stromaticum*, denominando essa nova espécie de *Hypocrea stromatica*, a qual desenvolve-se bem em temperaturas entre 25°C e 28°C. Segundo Bezerra et al. (2003) a variabilidade genética intra-específica, como a observada entre os isolados de *T. stromaticum* e *H. stromatica*, é comumente detectada ao se utilizar marcadores RAPD e, como se poderia esperar, quando são analisados isolados de espécies diferentes, os valores de distâncias genéticas são muito mais altos. *Trichoderma stromaticum* foi relatado na literatura como *T. viride* ou *T. polysporum* (SANOGO, et al., 2002). Bezerra et al., (2003) afirma que o teleomorfo *H. stromatica* distribui-se geograficamente apenas na região cacauzeira do estado da Bahia, enquanto que o anamorfo *T. stromaticum* tem ocorrência também nos estados do Pará e Rondônia. Esta especialização geográfica juntamente com a especialização ao hospedeiro, como encontrada em *T. stromaticum*, já foi observada em outras espécies de *Trichoderma spp* (CHEVERRI et al., 2003).

### **2.5.2. Mecanismos de ação antagônica**

O micoparasitismo tem sido referido como o processo de antagonismo de maior complexidade pelo número de etapas de que é composto (HJELJORD; TRONSMO, 1998). A espécie micoparasita *Trichoderma harzianum* tem sido extensivamente usada no biocontrole de um grande número de fungos fitopatogênicos, e inúmeros estudos realizados com este fungo tem servido de base ou modelo para outras espécies de seu gênero, ou mesmo para outros gêneros de microorganismos antagonistas (HJELJORD; TRONSMO, 1998). Na espécie *T.*

*harzianum*, o micoparasitismo é complexo, envolvendo crescimento quimiotrópico deste sobre o seu hospedeiro, enrolamento das hifas ao redor do mesmo, formação de estruturas similares a apressórios, penetração do micélio e finalmente sua lise (HARAN et al., 1996). Contudo, cabe frisar que existem variações de comportamento antagônico entre uma espécie e outra. A seguir são discutidas essas etapas do micoparasitismo de forma mais detalhada.

Primariamente, a resposta antagônica entre *Trichoderma* e o fitopatógeno envolve o crescimento dirigido, provavelmente por quimiotropismo positivo, sobre a hifa susceptível do hospedeiro (CHET, 1990). O processo de detecção de seu hospedeiro a distância por *Trichoderma* foi verificado em 1981 por Chet et al., que percebeu também sua ramificação de forma atípica e crescimento sobre a sua presa. As bases bioquímicas deste fenômeno não são bem compreendidas, porém a resposta quimiotática é uma relação hospedeiro-parasito encontrada em outros sistemas (HARAN et al., 1996), presumivelmente como uma resposta do antagonista a um gradiente químico proveniente do hospedeiro. Assim, não foi detectado estímulos específicos, além de aminoácidos e açúcares simples (HARAN et al., 1996). O quimiotropismo, embora sugira conferir algumas vantagens ao antagonista, para Chet (1990) não é um evento essencial para o micoparasitismo.

Quando o micoparasita alcança o fungo susceptível, suas hifas se enrolam ao redor do eixo de crescimento do fungo, formando estruturas morfológicamente similares a apressórios, que provavelmente ajudam na penetração da parede celular do hospedeiro (CHET, 1990). O fenômeno do enrolamento e formação de apressórios têm sido registrado para outros micoparasitos. Dennis e Webster (1971a), usando fibras de celofane de um diâmetro similar a da hifa de *Pythium ultimum*, concluíram que o enrolamento de *Trichoderma* não é meramente um estímulo de superfície, pois a hifa nunca se enrolava ao redor da fibra. Isto levou a idéia de que havia uma base molecular para tal especificidade. Recentemente, tem sido examinado o possível papel das aglutininas no processo de reconhecimento que determina a especificidade da interação fungo-fungo (HJELJORD; TRONSMO, 1998). A união e reconhecimento entre o micoparasito e seu hospedeiro é essencial

para o êxito dos eventos subseqüentes. As lecitinas são proteínas unidas a carboidratos, ou glicoproteínas de origem não-imune, que aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados; foram descobertas em plantas e mais tarde em microorganismos. Estas moléculas estão freqüentemente associadas aos processos de interações entre a superfície celular e seu ambiente extracelular. Em *Rizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* foi demonstrado a presença de lecitinas sobre sua hifa, as quais são produzidas como componentes do polissacarídeo extracelular (ELAD et al., 1983). Para estes autores, a capacidade de diferentes isolados de *Trichoderma spp* para reconhecer e atacar *R. solani* e *S. rolfsii* está diretamente correlacionada com a aglutinação de conídios de *Trichoderma* pelas lecitinas presentes no patógeno. Em *T. harzianum*, essas glicoproteínas estimulam o enrolamento de sua hifa e a formação de estruturas similares a apressórios ao redor de superfícies inertes que mimetizem o fungo hospedeiro (ELAD et al., 1983; HARMAN et al., 1981). Elad et al. (1983) informa que quando o micoparasita cresce sobre fibras de *nylon*, cobertas com concanavalina A ou uma lecitina de *S. rolfsii*, a incidência de enrolamento e a formação de estruturas é significativamente mais alta do que quando cresce na presença de fibra não tratadas, sugerindo um papel importante das lecitinas na interação primária hospedeiro-micoparasita. O fenômeno que envolve a participação das lecitinas presentes na parede externa das hifas do fitopatógeno é dependente de  $Ca^{+2}$  e  $Mn^{+2}$ , bem como da presença de fucose e galactose, presentes nas paredes celulares de *T. harzianum* (ELAD et al., 1983).

Contudo, Cortes et al. (1998), estudando outra interação antagônica, mostrou que o sinal envolvido no disparo para a produção de enzimas hidrolíticas por *T. harzianum* durante a resposta micoparasítica é independente do reconhecimento mediado pela interação lecitina-carboidrato. A indução de genes dessas enzimas seria contato-independente, sendo que uma molécula produzida pelo hospedeiro serviu de sinal que disparou a expressão desses genes *in vivo*. Inbar e Chet (1995) descreveram a importância do 'reconhecimento' na indução de quitinases específicas pelo antagonista durante o micoparasitismo exercido por essa mesma espécie de *Trichoderma*. Estes autores observaram que Cicloheximida (inibidor de

síntese protéica) inibiu este fenômeno mediado pelo reconhecimento, indicando que a síntese *de novo* dessas enzimas ocorre em *Trichoderma*, durante diferentes estágios do parasitismo. Os dados de Inbar e Chet (1995) sugerem que a indução da expressão de enzimas quitinolíticas em *Trichoderma* é um evento inicial do processo micoparasítico, pois o uso de lecitina purificada, retirada do hospedeiro e depositada sobre fibras de nylon, foi capaz de induzir o aumento dessa atividade. Estes autores afirmam, assim, que o reconhecimento mediado pela interação lecitina-carboidrato é o primeiro passo na cascata de eventos que dispara a resposta micoparasítica em *Trichoderma*.

Após esses eventos de reconhecimento, aderência e lise, *Trichoderma* penetra na hifa hospedeira aparentemente pela degradação parcial da parede celular desta (ELAD, 1990). Com o uso de microscopia eletrônica, detectou-se sítios lisados e sinais de penetração em hifas de *R. solani* e *S. rolfsii* depois de removida a hifa de *Trichoderma* (ELAD et al., 1983). Uma vez que o micoparasita rompe a estrutura da parede celular, ocorre um desbalanço osmótico e finalmente a lise do hospedeiro (ELAD, 1990). A degradação da parede celular por enzimas líticas é a chave no processo micoparasítico (HARAN et al., 1996). Gómez et al. (1997) informam que o nível de enzimas hidrolíticas produzidas por *T. harzianum* difere em cada interação parasito-hospedeiro e está correlacionado com capacidade de cada isolado em controlar um patógeno específico. Para este autor, estas diferenças podem também explicar a variabilidade na atividade antagônica de outros isolados de *Trichoderma*. Subseqüentemente, em resposta à invasão, ocorre uma série de modificações citológicas tanto no antagonista como no hospedeiro. Assim, Benhamou e Chet (1997), baseando-se nas observações das alterações citológicas decorrentes da interação *T. harzianum*-*Pythium*, inferiu que o hospedeiro produz uma matriz, a qual tenta encapsular a hifa que o penetrou; ocorre ainda variação no conteúdo protoplasmático do hospedeiro e produção, depois da penetração, de novas enzimas extracelulares como lipases e proteases por *T. harzianum*. Além disso, a hifa do hospedeiro mostra uma rápida vacuolização, colapso e desintegração.

Segundo WOO et al., (2002) as interações entre fungos e bactérias podem desempenhar um grande papel em processos naturais de biocontrole, onde mecanismos de sinergismo podem ocorrer quando esses diferentes ACBs são aplicados juntos. A síntese paralela e sinergismo de enzimas hidrolíticas e antibióticos pode ter um importante papel na ação antagônica de *T. harzianum* contra fungos fitopatógenos. (LORITO et al., 1994).

## **2.6. Marcadores Microsatélites (SSR)**

Marcadores microsatélites, por serem altamente polimórficos e de fácil obtenção, têm sido uma ferramenta molecular muito utilizados em estudos ecológicos e genéticos. Os microsatélites, também denominados SSR (*Simple Sequence Repeats*) são formados por seqüências de uma a seis bases de comprimento, repetidas em tandem (JACOB et al., 1991), encontrados em alta frequência e com ampla distribuição nos genomas de eucariotos (TÓTH et al., 2000). A análise de locos microsatélites é realizada por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), desenvolvida em 1985 por K. B. Mullis e colaboradores. Esta tecnologia permite uma rápida e eficiente amplificação de regiões específicas do genoma. Mais precisamente, essa reação possibilita que uma região selecionada do genoma seja amplificada milhões de vezes, permitindo sua análise por técnicas rotineiras de eletroforese. Marcadores microsatélites utilizam iniciadores (*primers*) complementares (18 a 25 bases) às regiões que os flanqueiam. Por se tratarem de marcadores altamente polimórficos, são de grande utilidade em estudos de diversidade genética de populações, bem como em sistemática e taxonomia e no desenvolvimento de ferramentas de caracterização genética de indivíduos, cepas, variedades, genótipos, etc., também conhecida como *fingerprinting*.

A utilização de *T. stromaticum* em formulações comerciais com fins de biocontrole da vassoura-de-bruxa do cacauero remete-nos a dois importantes aspectos de pesquisa relacionados ao desenvolvimento e utilização prática dessa

estratégia. Primeiro, os estudos da variabilidade genética do antagonista presente na região e, por consequência, plasticidade fenotípica em termos de eficiência de biocontrole em condições de campo, são fundamentais para definições de isolados com melhores respostas combinadas aos fatores ambientais e ao fungo hospedeiro (HJELJORD; TRONSMO, 1998; LORITO, 1998). Segundo, a aplicação de um determinado isolado a campo para fins de biocontrole obriga-nos a dispor de capacidade técnica para acompanhá-lo e monitorá-lo, não somente para verificar seu estabelecimento no local, mas também visando avaliação de eventuais impactos no ambiente de sua utilização. Nesse sentido, a utilização de marcadores moleculares adequadamente descritivos (tais como os microssatélites) é ferramenta relevante, pois pode permitir tanto estudos mais aprofundados sobre a diversidade existente entre os assesos, quanto a distinção do(s) isolado(s) aplicado(s) em relação às demais populações existentes no local (HOOPEN et al., 2003).

No contexto de estudo atual de caracterização de coleções locais de isolados de *Trichoderma stromaticum* como antagonistas do agente causal da vassoura-de-bruxa do cacauero, entende-se que esta técnica apresenta excelente potencial de contribuir com o entendimento dessa diversidade regional, com estudos taxonômicos associados, ou ainda com *fingerprinting* para fins de monitoramento de aplicação a campo desses isolados como ACBs.

### 3. CAPÍTULO I

#### **Efeito integrado de fatores meteorológicos na esporulação de *Trichoderma stromaticum*, micoparasita do agente causal da doença vassoura-de-bruxa em cacau.**

(artigo submetido à publicação no periódico *Microbial Ecology*)

#### **3.1. RESUMO**

Apesar do sucesso em muitas circunstâncias, o uso em larga escala do controle biológico no campo é ainda limitado por inconsistências, principalmente causadas pela variação ambiental. Isto é principalmente verdadeiro para o patossistema envolvendo o cacau (*Theobroma cacao* L.) e a doença ‘vassoura-de-bruxa’, causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa* (Cp), em que a participação do micoparasita *Trichoderma stromaticum* (Ts) como agente de controle biológico (ACB) tem sido intensivamente estudada. Usando uma abordagem analítica integrada, a interferência simultânea de diferentes fatores meteorológicos na biologia de Ts foi avaliada sob condições de campo típicas da cultura de cacau em plantações tropicais sombreadas na Região Sul da Bahia. Experimentos de biocontrole foram estabelecidos em torno de uma estação meteorológica automática, instalada para

registrar continuamente diferentes parâmetros meteorológicos, tais como temperaturas e umidades do ar, solo e vassouras, bem como precipitação, radiação solar e velocidade do vento. Vassouras de cacau inoculadas com *Ts* e sensores da estação foram colocadas acima e abaixo da copa do cacaeiro, e sobre o solo. Os resultados demonstraram claramente que o efeito microclimático sobre a biologia do ACB está relacionado a curtos períodos de variação específica e coordenada dos fatores meteorológicos antecedendo os momentos de produção de conídios (esporulação) por *Ts*, que, por sua vez, determina o resultado final de biocontrole de *Cp*. Além da importância já bem reconhecida da umidade e temperatura, os dados também sugerem uma relevante interferência da radiação solar e precipitação na interação antagônica *Ts-Cp*, bem como efeitos específicos dos isolados e da altura. A aplicação potencial desses conhecimentos no desenvolvimento de esquemas de aplicação a campo de ACBs com custos mais eficientes, bem como de estratégias para o manejo ambientalmente sustentável da doença são discutidos.

**Palavras-chave:** fatores meteorológicos - *Theobroma cacao* - controle biológico - *Crinipellis pernicioso* - interação antagônica - cabruca

### 3.2. INTRODUÇÃO

O uso de agentes de controle biológico (ACBs) do gênero *Trichoderma* demonstra ser muito eficiente sobre um grande espectro de doenças de plantas, como consequência de sua ocorrência cosmopolita, diversidade genética e ecológica, especificidade ao hospedeiro e variados mecanismos antagônicos, tais como competição, antibiose e micoparasitismo, muitos ocorrendo de forma sinérgica (revisado por BENITEZ et al., 2004; KUBICEK et al., 2001; HJELJORD; TRONSMO, 1998; HOWELL, 1998; LORITO, 1998).

Um isolado específico de *Trichoderma sp*, encontrado na região amazônica do estado do Pará, foi introduzido em meados da década de 90, na Região Sul da

Bahia, para servir de base em uma formulação ('TRICOVAB<sup>®</sup>' - CEPLAC) apropriada para o biocontrole do *Cp* (COSTA et al., 1996) e foi usado desde então, sem uma identificação taxonômica mais precisa àquela época (BASTOS, 1996; COSTA et al., 1996); posteriormente, este isolado foi recentemente descrito e identificado como uma nova espécie - *Trichoderma stromaticum* Samuels & Pardo-Schultheiss (SAMUELS et al., 2000), que age como um micoparasita específico do *Cp* (BASTOS, 1996).

Estudos atuais indicaram que *T. stromaticum* (*Ts*) é de ocorrência natural e ampla na Região Sul da Bahia, revelando a existência de dois grandes grupos genéticos (SOUZA et al., 2005). Apesar de que diferenças *in vitro* para isolados de *Ts* correlacionaram com as diferenças genéticas (SOUZA et al., 2005), as diferenças fenotípicas não foram sustentadas pelos estudos de campo, pois uma alta plasticidade de biocontrole foi observada, principalmente determinada por um notável efeito da variação nas condições ambientais (climáticas) durante os experimentos. Isto corrobora com o fato conhecido de que dados biológicos obtidos *in vitro* para ACBs não podem ser extrapolados diretamente para condições de campo em grande escala (ELAD, 2003; HERMOSA et al., 2000).

Estudos sobre o efeito de certos fatores meteorológicos (físicos) afetando a sobrevivência, crescimento, reprodução, abundância e ação de biocontrole de ACBs em condições controladas de laboratório ou em condições de campo (KREDICS et al., 2000, 2004; HOOPEN et al., 2003; SANOGO et al., 2002; DIK; ELAD, 1999), apesar de úteis, fornecem informações limitadas, pois somente avaliam efeitos sob condições discretas e controladas, que raramente ocorrem no campo, ou apenas identificam os limites climáticos dentro dos quais o fungo pode viver ou apresentar atividade de biocontrole. Além disso, embora precipitações sejam reconhecidas como um fator relevante afetando o biocontrole de *Cp* por *Ts* no campo por interferir na umidade de vassouras (SANOGO et al., 2002), somente isto não é suficiente para explicar todo o processo de variação no campo encontrado entre isolados de *Ts* pertencentes a um mesmo grupo genético (Alan Pomella et al., dados não publicados).

Este trabalho objetivou analisar os efeitos meteorológicos sobre a atividade de biocontrole de isolados de *Ts*. Experimentos de campo sob condições típicas de cultivo de cacau foram arranjados em volta de uma estação meteorológica computadorizada que continuamente mediu e registrou automaticamente os diferentes parâmetros climáticos do local. Observou-se que a ação coordenada de diferentes fatores meteorológicos cria padrões microclimáticos específicos que determinam a esporulação em isolados de *Ts*, fenômeno estreitamente relacionado à eficiência de biocontrole *Cp*. A relevância destas análises em futuros estudos epidemiológicos, construção de modelos matemáticos dinâmicos e descritivos do sistema, e recomendações de manejo são discutidos.

### **3.3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.3.1. Isolados e condições de cultura**

Cinco isolados de *Trichoderma stromaticum* (*Ts*) rotulados como ALF '56', '64', '323', '639' e '643' foram gentilmente cedidos pela empresa Almirante Cacau Ltda. (Itajuípe-BA, Brazil) para serem usados neste estudo. Pequenos discos de papel-filtro de 0.25 cm<sup>2</sup>, contendo esporos previamente crescidos e armazenados (DHINGRA; SINCLAIR, 1985) de cada isolado, foram colocados para crescer em placas de Petri contendo meio batata-dextrose-agar (BDA), a temperatura ambiente (~25°C) por 14 dias até a esporulação. Os conídios (esporos) formados foram coletados das margens da massa micelial e depois suspensos em água destilada e esterilizada, tendo sua concentração ajustada para 1 x 10<sup>7</sup> conídio.mL<sup>-1</sup> antes de serem aplicados sobre as vassouras de bruxa secas (fragmentos de ramos do cacaueiro colonizados pelo *Crinipellis pernicioso*)

### **3.3.2. Preparação das vassouras de bruxa e inoculação com aplicação dos isolados de *T. stromaticum***

Vassouras secas de aproximadamente 25 cm de comprimento, medindo meio centímetro em diâmetro, foram coletadas de plantas localizadas em áreas tipicamente infestadas por *C. perniciosa* (*Cp*) e foram testadas para a presença do micélio branco do fitopatógeno e também para esporulação de *Ts*, por incubação em câmara úmida. Para esses testes, segmentos de 2 cm de comprimento foram cortados das extremidades da cada uma dessas vassouras e colocados em sacos plásticos com papel filtro totalmente umedecido, e incubados a temperatura ambiente por 7-10 dias. Somente vassouras que apresentaram presença de *Cp* e ausência de *Ts* foram usadas nos experimentos de campo. As vassouras foram padronizadas para um comprimento de 20 cm e, de um extremo ao outro, foram borrifadas com esporos em suspensão dos correspondentes isolados de *Ts*, na concentração padrão definida acima.

### **3.3.3. Coleta de dados dos parâmetros meteorológicos**

O comportamento de biocontrole de *Cp* dos cinco isolados de *Ts* foi avaliado através de dois experimentos conduzidos em uma área típica de cultura de cacau da Região Sul da Bahia, ao redor de uma estação climatológica ‘CR23X’ (Campbell Scientific™, Logan, Utah) ajustada para medir diferentes parâmetros microclimáticos (físicos) continua e simultaneamente. Vassoureiros especiais foram desenhados e construídos na plantação de cacau para acomodar apropriadamente a análise de biocontrole (nas mesmas alturas em que os sensores da estação foram colocados), por meio de cabides contendo as vassouras tratadas com *Ts* (Figura 1). Os parâmetros registrados a cada 15 min foram: (i) ‘precipitação pluviométrica’ com um sensor situado a 5,5 m, (ii) ‘umidade da vassoura’ e ‘temperatura do ar’ com quatro sensores situados na serrapilheira (camada de folhas mortas do cacau depositada sobre o solo e contendo elevada microfauna de

decompositores), a 1,0, 2,5 e 5,5 m de altura, (iii) ‘umidade relativa do ar’ e ‘radiação solar’ com sensores a 1,0, 2,5 e 5,5 m, (iv) ‘velocidade do vento’ com sensores à 1,0 e 5,5 m, e (v) ‘temperatura do solo’ e ‘umidade do solo’ com sensores situados em uma profundidade de 5 cm. Para as análises e gráficos apresentados para os parâmetros testados (Figuras 2 a 6), somente registros de dois momentos no dia foram considerados, isto é, as medidas de 4:00 e 16:00 h, correspondendo aos pontos de ‘noite’ e ‘dia’. Os períodos experimentais no campo ocorreram entre 13/set a 17/nov de 2004, para o primeiro experimento, e para o segundo período, estendeu-se de 08/dez/2004 a 08/mar/2005, em um total de 67 e 91 dias, respectivamente.

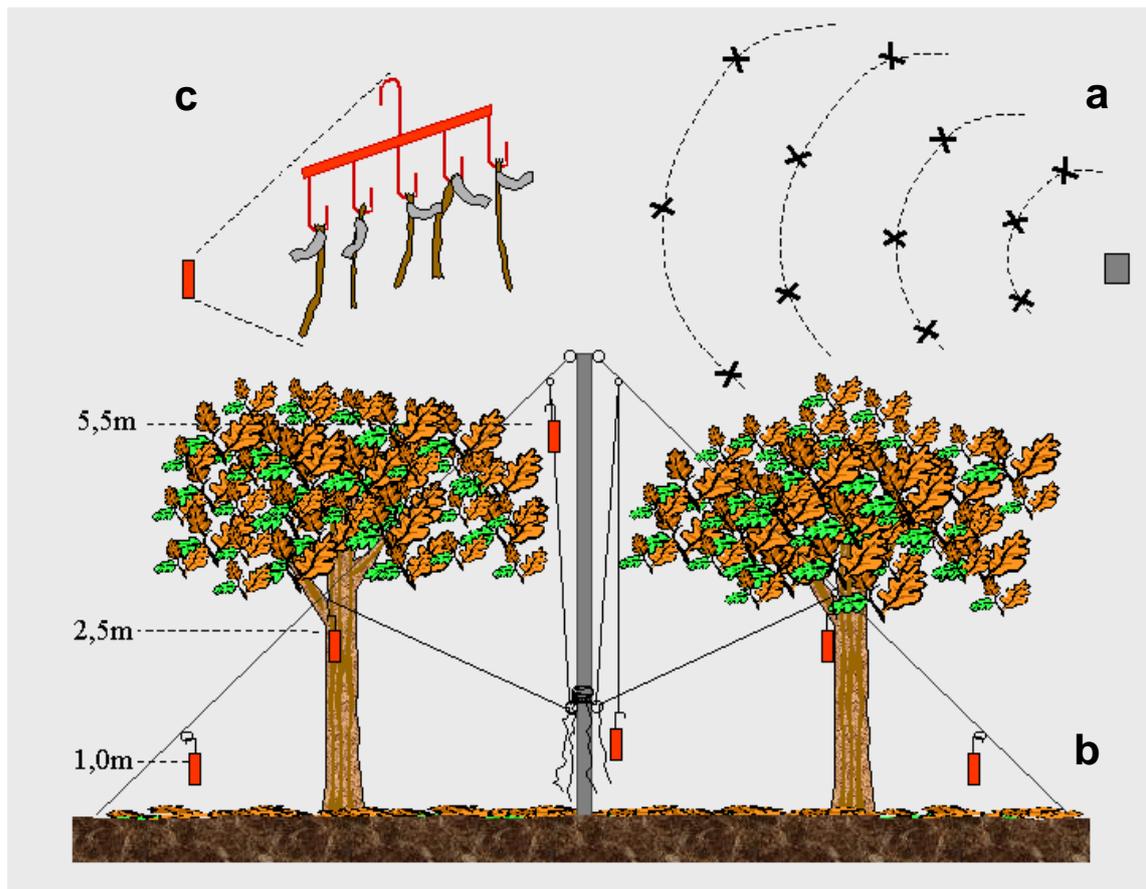
#### **3.3.4. Parâmetros biológicos relacionados ao biocontrole**

O primeiro parâmetro considerado foi a ‘esporulação de *Ts*’, que foi avaliada como a porcentagem acumulada de vassouras esporuladas por tratamento, ao final de cada experimento de campo. Imediatamente após a esporulação ser identificada e registrada para uma dada vassoura, esta foi levada para outro vassoureiro separado e mantida na mesma altura para prevenir contaminação cruzada das outras vassouras no mesmo cabide de tratamento ou entre cabides (ver desenho experimental abaixo). Após o período experimental no campo, todas as vassouras esporuladas e não esporuladas foram removidas para o laboratório, cortadas em quatro partes iguais por vassoura e colocadas para incubação em câmara úmida à temperatura ambiente por 7-10 dias (ver acima) para verificar o outro parâmetro, isto é, ‘presença residual de *Cp*’, após os tratamentos de biocontrole. Considerando que a intensidade da infecção por *Cp* (severidade) pode ser inferida pela porção do espaço total da vassoura ocupado pelos micélios do fungo, este ‘resíduo de *Cp*’ foi avaliado tanto pelas porcentagens de vassouras (incidência) como pelas porcentagens de partes da vassoura (severidade) mostrando o micélio branco de *Cp*. Esporulação de *Ts* foi também utilizada como uma referência para as análises dos parâmetros climáticos afetando o processo de biocontrole, sendo que para este propósito foi

usado o número absoluto total de vassouras esporuladas na área por altura nas datas determinadas, considerando todos os isolados juntos. Todas as vassouras na área experimental foram checadas individualmente a cada 2-3 dias, da data em que foram inoculadas com *Ts* e penduradas nos cabides dos vassoueiros, até o final do experimento, com registro das datas e vassouras nas quais as esporulações foram detectadas, sendo essas vassouras transferidas para o outro vassoueiro (ver acima).

### **3.3.5. Desenho experimental e análise estatística**

Os dois experimentos foram conduzidos em um delineamento em blocos completos casualizados, com quatro blocos (réplicas), estabelecidos como arcos de circunferência ao redor da estação meteorológica, sobre as quais os vassoueiros foram situados (Figura 1a). A distância da primeira circunferência (bloco) em relação à estação e entre as circunferências foram de 6 m, de modo que o quarto e último bloco localizou-se num raio de 24 m da estação. Este arranjo dos blocos foi baseado na premissa de que as medições meteorológicas representam aquilo que ocorre em uma área circular dentro de um raio de 30 m em torno da estação. Cada bloco (réplica) continha cinco isolados de *Ts* mais o controle sem inoculação, nas quatro alturas (ver acima), em um total de 24 tratamentos.



**Figura 1.** Ilustração esquemática do delineamento experimental e dos vassoueiros especiais construídos para permitir a colocação das vassouras tratadas com *T. stromaticum* a diferentes alturas do dossel do cacaueteiro. (a) Croqui da área experimental, mostrando a posição da estação climatológica (quadrado cinza) em relação aos blocos (arcos de circunferências pontilhadas) sobre os quais foram colocados os vassoueiros (cruzes pretas); (b) vassoueiro com cabides (pequenos retângulos verticais com gancho na parte superior) (c) Ampliação dos cabides, detalhando seu formato e as vassouras tratadas (verticais, uma em cada gancho), nele penduradas e individualmente etiquetadas.

A unidade experimental para cada tratamento ‘isolado-altura’ consistiu de cinco vassouras de 20-cm cada que, após inoculação com *Ts*, foram penduradas em um cabide apropriado (Figura 1c) e colocadas na altura correspondente (Figura 1b). Com este desenho, 480 vassouras foram colocadas na área experimental. Os parâmetros biológicos de ‘esporulação de *Ts*’ e ‘presença residual de *Cp*’ foram medidos como uma porcentagem de vassouras marcadas como positivas em cada uma das unidades experimentais de cinco vassouras. As análises estatísticas foram realizadas para cada experimento e, considerando que os dados foram consistentes entre eles, somente os resultados de um dos experimentos foram apresentados (ver

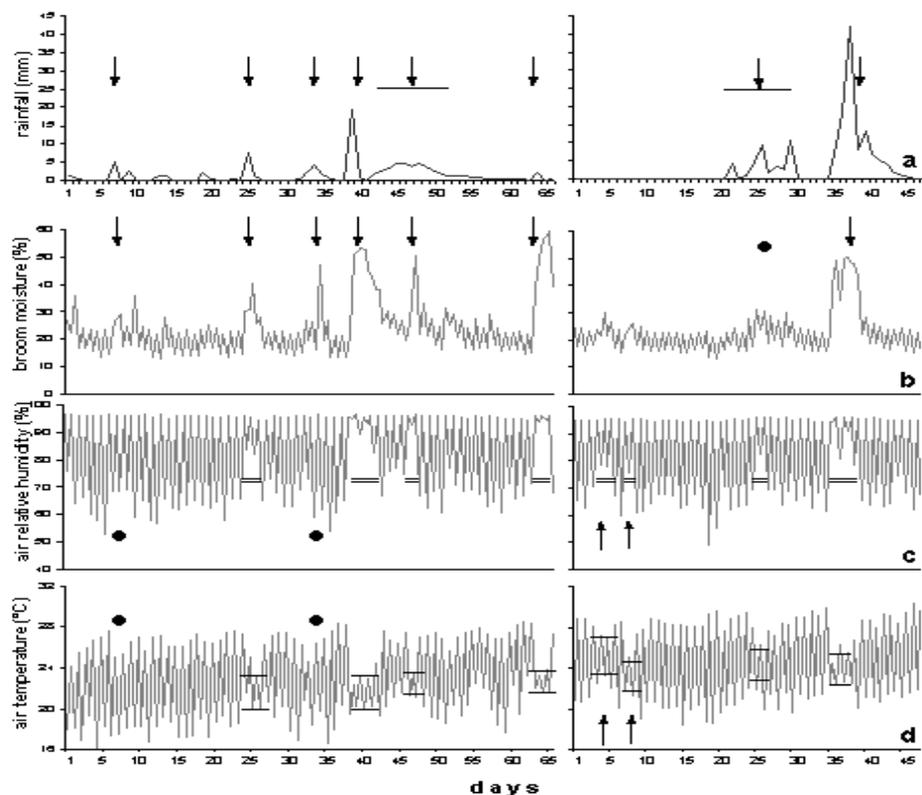
Tabela 1 e Figura 7). Uma Análise de Variância (ANOVA) foi realizada com os dados percentuais transformados pela raiz quadrada de 'x + 1'; as variáveis avaliadas foram blocos, isolados de  $T_s$ , níveis do dossel (alturas) e suas interações, sendo que a significância estatística foi analisada pelo teste de Tukey, usando o programa 'SAEG' (Universidade Federal de Viçosa-MG). Quando os níveis de presença residual de  $C_p$  foram comparados entre vassouras esporuladas e não esporuladas, todos os isolados foram considerados em conjunto, para todas as alturas (ver Tabela 1). Similarmente, quando os níveis de esporulação foram comparados entre isolados, e considerando que as diferenças entre os isolados foram consistentes dentro das alturas, as médias de todos os blocos e alturas por isolado foram usadas (ver Figura 7).

### **3.4. RESULTADOS**

#### **3.4.1. Associação entre a variação de precipitação e parâmetros climáticos medidos acima do solo**

Para o perfil de precipitação foram consideradas as leituras acumuladas do dia, enquanto que para os outros parâmetros, as leituras das 4:00 e 16:00 h, correspondendo a valores representativos da 'noite' e do 'dia', foram plotados no gráfico. Observou-se que o perfil das precipitações (Figura 2a) determinou essencialmente a variação de outros três parâmetros climáticos (Figuras 2b a 2d), de tal modo que aqueles períodos de chuvas de maior intensidade e, ou mais prolongadas (Figura 2a - setas para baixo) tenderam a definir altos níveis de umidade de vassoura (Figura 2b - setas) e de umidade relativa (UR) do ar (Figura 2c - linhas duplas) por um período mais longo. Além disso, essas condições de chuva também levaram ao decréscimo da amplitude de variação na temperatura do ar para os limites de 2 - 6 °C durante o dia (Figura 2d - linhas curtas paralelas). Entretanto, estas associações não foram absolutas, pois esses padrões não ocorreram

em todas as circunstâncias; existiram alguns períodos em que (i) alta e prolongada umidade de vassoura e UR, bem como menor variação de temperatura, também ocorreram na ausência de precipitação (Figuras 2c e 2d - setas para cima), e (ii) comportamentos fora do padrão nos três parâmetros, ocorreram durante as precipitações, de uma forma independente entre eles (Figura 2 - círculos negros).

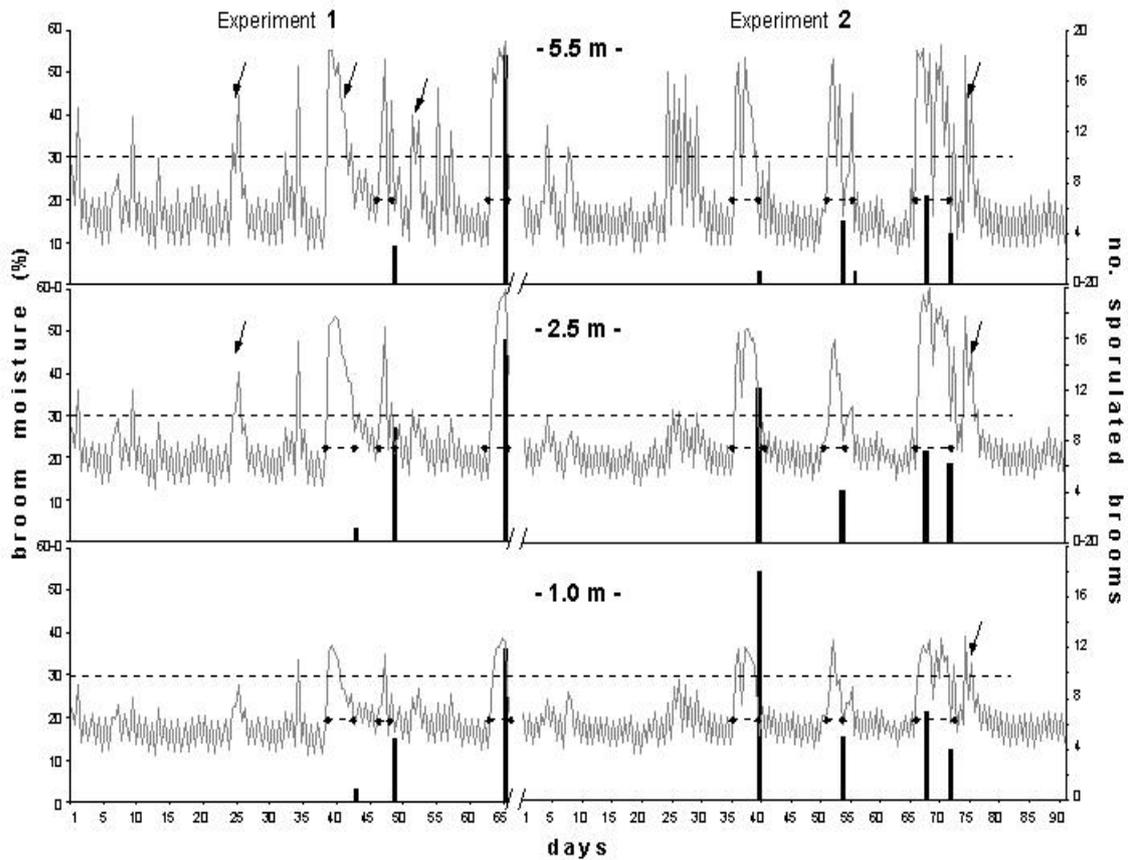


**Figura 2.** Variação na precipitação pluviométrica (a), umidade de vassouras (b), umidade relativa do ar (c) e temperatura do ar (d), durante dois períodos não consecutivos de condições típicas de trópico úmido do sudeste da Bahia. Para cada dia, foram plotadas as leituras das 4:00 e 16:00 h para todos os parâmetros, exceto para 'chuvas', em que foi utilizado o acumulado diário (em 'mm'). Intervalos curtos com chuvas (a) e umidade de vassoura (b) mais intensas ou mais prolongadas estão indicados por setas; intervalos com umidade relativa do ar maiores e mais duradouras são mostrados por linhas duplas (c); intervalos nos quais a amplitude de variação na temperatura do ar foi igual ou menor do que 4 °C são indicados por linhas paralelas (d). Círculos pretos e setas para cima indicam discrepâncias entre chuva e os outros parâmetros, de forma contrária ao que é indicado pelas setas para baixo em (a) e (b).

### **3.4.2. Associação entre parâmetros climáticos e esporulação de *T. stromaticum* em experimentos de biocontrole no campo**

#### *3.4.2.1. Relevância da umidade de vassoura*

Para confirmar a relevância da umidade de vassoura na determinação da esporulação de *Ts* no campo, a variação nesse parâmetro físico foi avaliada em todos os três níveis aéreos do dossel em relação aos dias em que a esporulação de *Ts* foi detectada (Figura 3). Apesar de que cinco diferentes isolados de *Ts* foram aplicados e testados nestes experimentos, as barras nos gráficos correspondem à soma total de suas esporulações em cada dia, pois se considerou como apropriado e suficiente assumir que a variação dos parâmetros microclimáticos ocorreram da mesma forma para todos os isolados, devido ao delineamento experimental adotado em torno da estação (ver Métodos). O resultados das análises indicaram clara tendência para as esporulações ocorrerem sempre após *curtos intervalos* de um a três dias em que o nível de umidade das vassouras era mantido alto (acima de 30%) e sem grandes variações (Figura 3 - linhas pontilhadas destacadas por pontos pretos). Além disso, diferenças nas quantidades e padrões de umidade de vassoura de acordo com a altura no dossel foram observadas, tal que não somente o *pico máximo* de umidade, mas também a *amplitude* entre as leituras das 4:00 e 16:00 h, tenderam a ser maiores acima (5,5 m) do que abaixo (2,5 e 1,0 m) da copa do cacauero. Por outro lado, verificou-se também que nenhuma esporulação foi detectada em um pequeno período em que as condições de umidade padrão descritas acima foram encontradas (Figura 3 - seta).

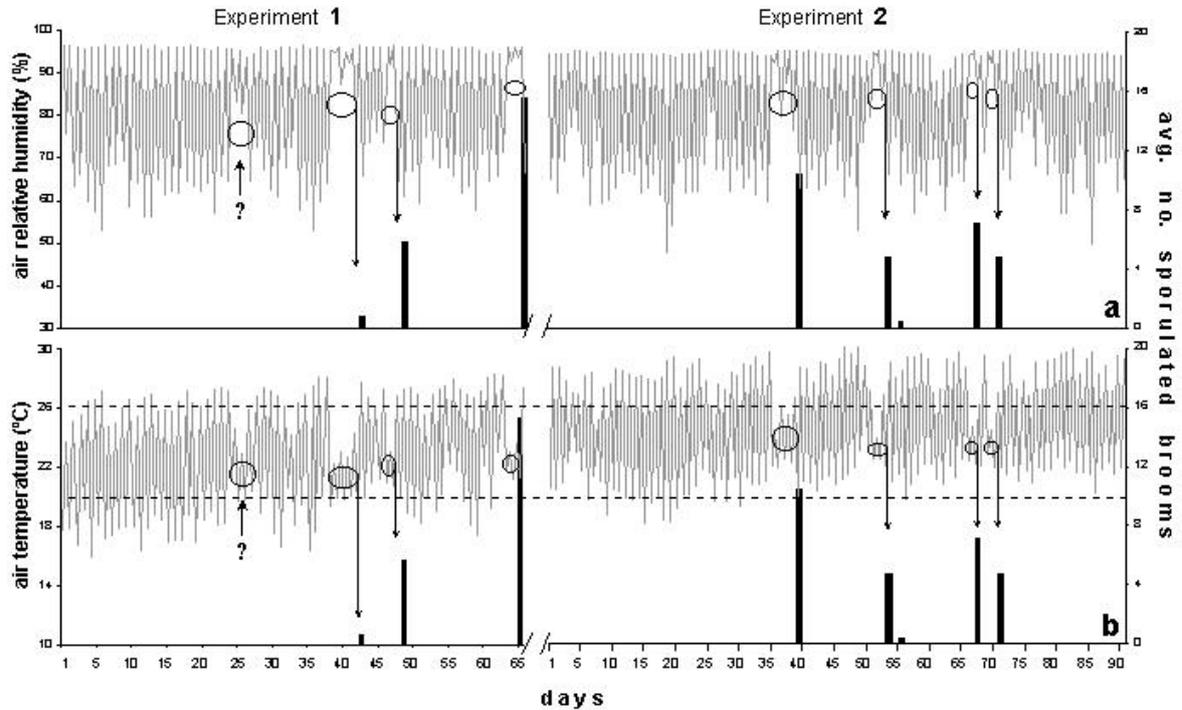


**Figura 3.** Variação na umidade de vassouras em três alturas acima do solo em relação às esporulações de *Ts* durante os dois períodos experimentais. As alturas (em 'm') nas quais as vassouras tratadas foram alocadas estão indicadas no topo-centro de cada gráfico. O número total de vassouras esporuladas na área (isolados tomados em conjunto) em cada dia está representado por barras verticais, correspondendo ao eixo dos yy do lado direito. Para ambos os experimentos, intervalos curtos de 1 a 3 dias com maior quantidade e duração de umidade das vassouras estão indicados (i) por linhas pontilhadas delimitadas por pontos, quando precedendo os eventos de esporulação de *Ts*, e (ii) por setas, em outros momentos.

#### 3.4.2.2. Umidade relativa do ar (UR) e Temperatura

Os efeitos da umidade relativa do ar (UR) e temperatura também foram avaliados. Considerando que esses parâmetros não apresentaram diferenças significantes entre os três níveis do dossel acima do solo, a média das leituras dessas três alturas em cada dia foram usadas para o perfil mostrado nos gráficos. Os níveis de esporulação (barras) usados como referência nos gráficos foram também a média daqueles encontrados a 1,0 e 2,5 m (abaixo da copa), onde foram maiores e muito

menos variáveis quando comparados às esporulações ao nível de 5,5 m (desconsideradas neste caso).



**Figura 4.** Variação na umidade relativa (UR) do ar (a) e temperatura do ar (b) em relação à esporulação de *Ts*. As barras verticais representam os valores médios de esporulação total das duas alturas abaixo da copa, referindo-se ao eixo dos yy do lado direito do gráfico. Intervalos curtos de 1 a 3 dias com maiores níveis e duração de UR (a), e com menores variações diárias de temperatura são indicados por círculos, ovais e setas para baixo; ponto de interrogação indica intervalo curto de 1 a 3 dias que *não* precedeu esporulação; linhas pontilhadas paralelas delimitam a faixa de temperatura predominante para os períodos de 1 a 3 dias de menor amplitude de variação.

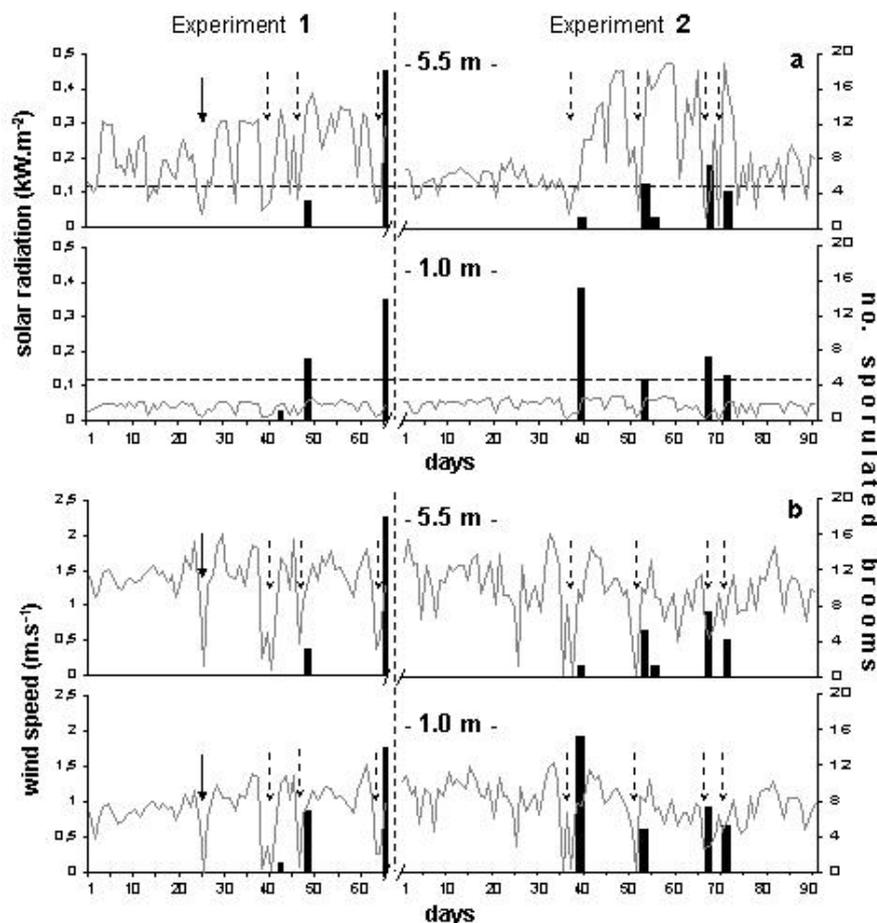
Como apresentado na Figura 4, tornou-se evidente que, em períodos curtos anteriores à esporulação, a UR do ar permanece próxima ao valor máximo, com uma menor variação diária, durante um período mínimo de 1,5 dias (Figura 4a – círculos e ovais com setas para baixo). Do mesmo modo, estes curtos períodos de altos níveis de UR do ar corresponderam a uma *amplitude de temperatura* menor, em que a variação entre os extremos ocorreram dentro de um limite máximo de 6 °C, com muitas dessas variações sendo menor do que 2 °C, e ocorrendo entre

valores de temperatura de 20 e 25 °C (Figura 4b - linhas pontilhadas paralelas). Observou-se também uma pequena discrepância entre esporulação e os parâmetros aéreos analisados, onde variações de temperatura e UR que ajustam-se aos limites descritos acima não antecederam a esporulação de *Ts* (Figura 4 - interrogação).

#### 3.4.2.3. *Radiação solar e velocidade do vento*

Somente as leituras das 16:00 h foram usadas nestas análises, visto que obviamente não existe radiação solar de madrugada (4:00 h), e a velocidade do vento foi nula ou negligente para a vasta maioria dos dias inclusos nos períodos avaliados (Figura 5). Uma diferença marcante na magnitude da radiação solar foi observada quando comparados os níveis acima (5,5m) e abaixo (2,5 e 1,0 m) da copa, mas praticamente nenhuma diferença foi encontrada entre 2,5 e 1,0 m sob a copa (dados não mostrados), motivo pelo qual somente os resultados das leituras de radiação e esporulação para a altura de 1,0 m foram apresentados.

Visto que se considera ocorrer ‘dia de sol pleno’ quando o nível de radiação solar excede o valor de 0,12 KW.m<sup>-2</sup> (conforme definido pelo *World Meteorological Organization* - WMO), tal condição nunca ocorreu abaixo da copa (Figura 5a - nível ‘1,0 m’). Por outro lado, as diferenças na velocidade do vento acima e abaixo da copa foram muito menores, mostrando um comportamento similar nessas alturas durante os períodos experimentais. As observações das mudanças nesses dois parâmetros revelaram que, imediatamente antes dos momentos de esporulação, ocorreram claros decréscimos na intensidade de radiação e velocidade do vento (Figura 5 - setas pontilhadas).

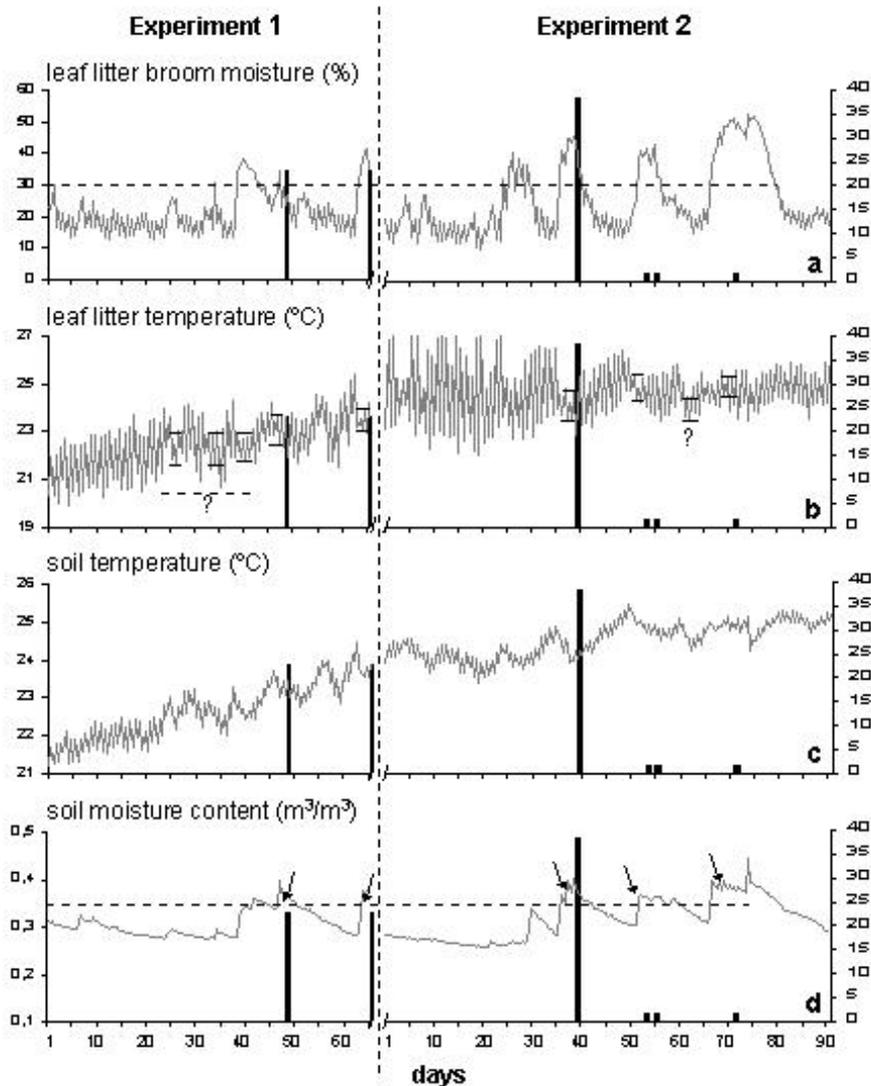


**Figura 5.** Variação na radiação solar (a) e velocidade do vento (b) em relação à esporulação de *Ts* (barras verticais, eixo dos yy à direita). O total de vassouras esporuladas observado na área foi plotado para as alturas de 5,5 m (acima da copa) e 1,0 m (abaixo). Tanto os resultados climáticos quanto os de esporulação foram muito semelhantes entre as alturas de 2,5 e 1,0 m (não mostrado). Setas pontilhadas indicam o decréscimo na intensidade de radiação e da velocidade do vento imediatamente antes dos eventos de esporulação. Seta com linha sólida à esquerda identifica padrões favoráveis de radiação e velocidade do vento que não precederam nenhuma esporulação. Linhas horizontais pontilhadas indicam o limite mínimo de 0,12 KW.m<sup>-2</sup> para 'dia de sol pleno'.

### 3.4.3. Avaliação dos parâmetros climáticos e esporulação de *T. stromaticum* no solo

O nível total de esporulação de *Ts* foi maior no solo; entretanto, isto ocorreu de forma irregular, visto que momentos de esporulação muito baixa foram também observados (Figura 6 - experimento 2). É interessante notar que um gradual aumento nas temperaturas da serrapilheira e no solo, foi observado durante o experimento 1, seguido por estabilização em níveis mais altos durante o

experimento 2 (Figuras 6b e 6c), ao passo que o aumento na umidade de vassouras ou do solo (Figuras 6a e 6d) foram essencialmente determinados pelo padrão de precipitação pluviométrica (Figura 2), com a provável contribuição das variações de radiação solar e de velocidade do vento nesses períodos (Figura 5).



**Figura 6.** Variação nos parâmetros de umidade de vassoura (a) e temperatura (b) na serrapilheira, bem como temperatura (c) e conteúdo de umidade (d) do solo, em relação à esporulação de *Ts* (barras verticais). O número total de vassouras esporuladas na área nos tratamentos de solo aparece repetido em cada um dos quatro gráficos. Travessões paralelos indicam os intervalos curtos de mínima variação diária na temperatura (b), sendo os indicados pelos pontos de interrogação aqueles que não antecederam esporulações; setas para baixo indicam conteúdo de umidade do solo acima do limite observado de  $0,34 \text{ m}^3/\text{m}^3$  para esporulação de *T. stromaticum*, indicado pela linha pontilhada horizontal.

Um padrão microclimático específico antecedendo os eventos de esporulação sobre o solo foi observado, o qual foi caracterizado por (i) um *aumento* na intensidade e duração da umidade da vassoura, por pelo menos dois dias (Figura 6a), do mesmo modo e padrão que para as vassouras acima do solo (Figura 3), e (ii) temperatura da serrapilheira caracterizada por estar numa faixa estreita de variação (menor que 2°C) durante o dia (Figura 6b), de modo semelhante ao padrão observado para a temperatura do ar (Figura 4). Notou-se de forma interessante que a esporulação de *Ts* no solo foi apropriadamente indicada por um padrão específico na umidade do solo, que é um conteúdo mínimo de umidade de 0.34 m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup> no dia antes da esporulação (Figura 6d – linha pontilhada e setas). Por outro lado, nenhum padrão específico foi observado para temperatura do solo em relação à esporulação (Figura 6c).

#### **3.4.4. Análise da performance de biocontrole de *C. pernicios*a com base nos diferentes níveis do dossel e dos diferentes isolados de *T. stromaticum***

Os resultados, sustentados por análises estatísticas, claramente indicaram que a esporulação de *Ts* no campo é um parâmetro adequado para avaliar o processo de biocontrole, ao menos para os cinco isolados usados neste estudo (Tabela 1). Nas vassouras em que o *Ts* aplicado **não** esporulou durante a incubação no campo, houve um alto nível de presença residual de *Cp* entre 93% e 99% (Tabela 1). Por outro lado, tomando-se o grupo das vassouras em que o *Ts* esporulou, uma queda acentuada na incidência residual de *Cp* foi observada para todas as alturas, situando-se entre 6 a 28%. Além disso, os resultados também apontam para um efeito da altura do dossel, visto que uma correlação inversa significativa foi encontrada entre aumento total de vassouras esporuladas e o decréscimo na altura das vassouras (coeficiente de correlação  $R = -0.9302$ ); acima da copa (5,5 m) o total de esporulação foi de 16.3%, aumentando uniformemente para 39.2% sobre o solo (Tabela 1).

**Tabela 1:** Porcentagens de esporulações de *T. stromaticum* no campo e presença residual de *C. pernicioso*, avaliado por incubação em câmara úmida após experimento de campo, de acordo com a altura no dossel.

alturas do dossel <sup>1</sup>	%	presença residual de <i>Cp</i> (%)		
		vassouras <sup>2</sup>	incidência <sup>3</sup>	severidade <sup>4</sup>
<b>5,5 m</b> (104 vassouras)				
esporuladas	16.3		17.6	8.8
não esporuladas	83.7		98.9	98.9
<b>2,5 m</b> (108 vassouras)				
esporuladas	26.8		27.6	13.8
não esporuladas	73.2		98.7	98.7
<b>1,0 m</b> (112 vassouras)				
esporuladas	30.4		5.9	4.4
não esporuladas	69.6		93.6	93.6
<b>solo</b> (102 vassouras)				
esporuladas	39.2		10.0	5.0
não esporuladas	60.8		93.5	93.5

<sup>1</sup> O total de vassouras proveniente da área experimental, para cada altura, que foi usado nos experimentos de câmara úmida aparece entre parêntesis; as categorias 'esporuladas' e 'não-esporuladas' correspondem às vassouras com e sem *Ts* detectado no campo.

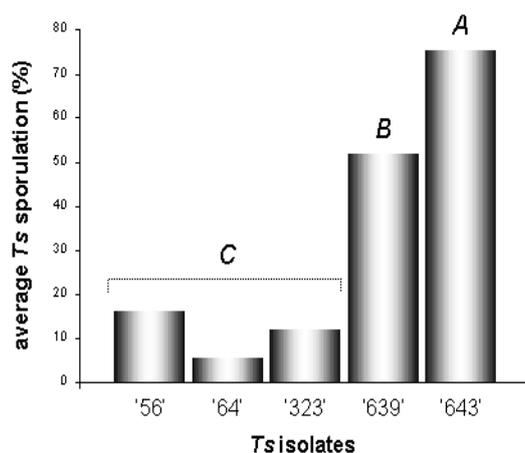
<sup>2</sup> Os resultados da ANOVA mostraram diferença muito significativa na esporulação de *Ts* e na incidência residual de *Cp* entre as alturas (valores F de 4,840 e 4,804, respectivamente;  $P < 0.001$ ).

<sup>3</sup> Calculada para cada uma das 2 categorias de esporulação de *Ts* (indicadas na coluna da esquerda) como sendo o 'nº de vassouras com *Cp* residual' / 'total de vassouras na categoria' x 100. Os resultados da ANOVA mostraram diferenças estatisticamente muito significativas na incidência residual de *Cp* entre as vassouras esporuladas e não esporuladas ( $F = 80,904$ ;  $P < 0,001$ ).

<sup>4</sup> Calculada para cada categoria de esporulação de *Ts* como sendo o 'nº de pedaços de vassouras com *Cp* residual' / 'total de pedaços de vassouras na categoria' x 100. Os valores iguais de incidência e severidade de *Cp* apresentados para vassouras não esporuladas em todas as alturas está indicando que a severidade foi de 100% entre as vassouras com presença residual de *Cp*.

Os resultados de esporulação no campo (Figura 7) demonstraram (i) que os isolados foram diferentes entre si, com '643' e '639' esporulando significativamente mais do que os outros, e (ii) que a resposta biológica para os fatores microclimáticos é, de fato, isolado-específica. É importante mencionar que, apesar da existência de um efeito de posição no dossel sobre a esporulação (Tabela 1), o padrão de diferenças na esporulação entre isolados foram consistentes em todas as alturas, razão pela qual apresentamos o total de esporulação por isolado na área experimental (Figura 7). Além disso, o comportamento dos isolados no campo do

primeiro para o segundo experimento foram reproduzíveis. Estes resultados sugerem uma resposta específica de isolados individuais de *Ts* aos padrões de variação nos parâmetros meteorológicos, de uma forma diferente daquelas que ocorrem quando os parâmetros físicos testados são constantes, como acontece durante experimentos *in vitro*.



**Figura 7.** Esporulação de cinco isolados de *Ts* a campo sob condições ambientais típicas de cultivo de cacau no sudeste da Bahia. Os resultados representam a percentagem média de esporulação de cada isolado nas quatro alturas do dossel testadas (ver Tabela 1), com quatro repetições para cada altura (ver Métodos). O tratamento controle (incubação das vassouras nas mesmas condições, mas sem aplicação de *Ts*) não apresentou esporulação. O isolado '64' é a base para o produto comercial de biocontrole 'TRICOVAB<sup>®</sup>' (ver Introdução). Barras com diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas em esporulação entre os isolados, como indicado pelo teste de Tukey ( $P < 0,001$ ).

### 3.5. DISCUSSÃO

Tem sido reconhecido mundialmente que o uso em grande escala de agentes de controle biológico (ACBs) em culturas comerciais é ainda limitado devido a uma indesejável inconsistência da atividade de biocontrole, bastante influenciada pelos efeitos de variações bióticas e abióticas imprevisíveis no ambiente (BENITEZ et al., 2004; ASSANTE et al., 2004; ELAD, 2003). Assim, um conhecimento mais profundo sobre como estes fatores abióticos relacionados ao clima interferem com a ação dos ACBs pode ajudar no estabelecimento de estratégias mais eficientes e de

melhor custo para o controle biológico de doenças de plantas, sob uma perspectiva de manejo integrado (KREDICS et al., 2003; HOOPEN et al., 2003; KRAUSS; SOBERANIS, 2002). Neste trabalho, uma análise integradora foi aplicada para dissecar, sob condições de campo, interferências específicas e combinadas de diferentes parâmetros microclimáticos sobre a ação de biocontrole de isolados de *Trichoderma stromaticum* (*Ts*) contra o agente causal da vassoura-de-bruxa do cacauero, o fungo *Crinipellis pernicioso* (*Cp*). Como discutido a seguir, o conjunto de evidências apresentado está permitindo demonstrar que, de fato, é a ação simultânea e coordenada de diversos fatores meteorológicos que criam uma condição microclimática específica que, em última análise, determina o efeito fenotípico dos agentes de biocontrole (ACBs). Esta interpretação dos resultados e observações está em concordância com a idéia de que células microbianas, sujeitas a múltiplos fatores, não podem ter os efeitos e interações recíprocas das variáveis individuais avaliadas de maneira independente (SINIGAGLIA et al., 1998). Para nosso conhecimento, este é o primeiro relato deste gênero e espera-se que a lógica dos métodos e informações apresentadas sejam úteis para estudos em outros sistemas.

Relatos prévios sobre a interferência dos fatores físicos nos sistemas de biocontrole apontam para um papel mais relevante da temperatura e umidade em determinar fenótipos fúngicos e suas interações antagonistas com insetos (BIDOCHKA et al., 2002) e fungos patogênicos (HOOPEN et al., 2003; KREDICS et al., 2000; 2004; DIK; ELAD, 1999). No caso específico de *Ts*, trabalhos anteriores indicaram que o conteúdo de umidade de vassoura correlacionou-se significativamente com os totais de chuvas e temperatura máxima diária, mas não com a média da umidade relativa do ar (UR) nem com as temperaturas mínimas diárias (SANOGO et al., 2002). Os resultados observados neste trabalho, estenderam essas observações, confirmando a importância da variante ‘chuva’ na modulação da umidade da vassoura, temperatura e UR do ar, pois esses parâmetros estiveram associados à precipitação em muitos momentos, durante o período analisado (Figura 2). Entretanto, como houve discrepâncias em relação aos padrões

observados, a interferência de outros fatores climáticos, tais como radiação solar e direção do vento (Figura 5), na modulação final desses parâmetros tiveram que ser consideradas. Normalmente, a chuva é consequência do aumento do nível de umidade no ar, até o ponto de saturação em que ocorre condensação e precipitação, que, por sua vez, causa decréscimo da UR (VATTAY; HARNOS, 1994); é bem possível que, em certas ocasiões, a ação combinada de outros fatores no microambiente do experimento de campo, especialmente radiação solar global, temperatura e movimentos do ar (TUBELIS; NASCIMENTO, 1984), possam ter prevenido a precipitação de água, permitindo a manutenção da umidade do ar em altos níveis, ou, ao contrário, causando a condensação e chuva, reduzindo drasticamente a umidade do ar local. Outra possibilidade é que nem todos os tipos e intensidades de chuva fornecem o mesmo padrão de partição da água precipitada através do dossel do cacau, em termos de ‘queda direta’, ‘escorrimento pelo caule’ e ‘perdas por interceptação’ (MIRANDA, 1994), gerando, portanto, formas alternativas de variação na umidade e, por isso, distintas interações com a temperatura. De qualquer modo, uma análise detalhada da ação dos parâmetros meteorológicos registrados, incluindo mais leituras além dos dois limites de ‘dia’ e ‘noite’ deste trabalho, certamente é necessária para ajudar a compreender melhor essas aparentes discrepâncias de associação com chuva.

Sobrevivência, crescimento, reprodução, abundância e comportamento geral de biocontrole estão entre os parâmetros biológicos fúngicos que demonstraram responder a fatores ambientais (KREDICS et al., 2000; 2004; HOOPEN et al., 2003; SANOGO et al., 2002; DIK; ELAD, 1999). Em nosso sistema de estudo, a produção de conídios de *Ts* sobre as vassouras (esporulação) provou ser um adequado parâmetro para as análises, não somente por representar o fechamento do ciclo de vida, e assim, uma medida da adaptação de um isolado, mas também porque ele serve como um indicador direto da atividade de biocontrole sobre *Cp* (Tabela 1 - ver adiante). Estudos prévios *in vitro* indicaram que umidade de vassoura abaixo de 30% impede a esporulação de *Ts*, sugerindo um papel chave para este parâmetro (SANOGO et al., 2002). Uma observação detalhada da variação

de umidade de vassoura em todas as três alturas confirma esses resultados, pois a esporulação de *Ts* ocorreu sempre após curtos períodos (1 a 3 dias) nos quais a umidade de vassoura esteve acima daquele nível (Figura 3). Contudo, o fato de se ter também observado padrões de variação de umidade favoráveis que não foram seguidos por esporulação remete-nos à necessidade de explicações alternativas. Por exemplo, variações específicas encontradas para todos os fatores climáticos estudados podem ter criado uma interferência integrada e específica na biologia do antagonista (BENITEZ et al., 2004) de forma que algumas delas não foram capazes de disparar a esporulação. Com uma análise mais aprofundada destas variações, utilizando-se mais do que duas leituras diárias da estação, espera-se descobrir potenciais padrões alternativos de interferência do clima na biologia do *Ts* e, assim, um melhor entendimento do processo como um todo.

Algumas limitações reconhecidas para o uso de *Trichoderma spp* como biofungicida vêm do fato de que a maioria dos isolados são termicamente mesofílicos e não apropriadamente tolerantes a altos potenciais osmóticos, causado pelas condições ambientais extremas (KREDICS et al., 2003), razão pela qual procedeu-se com a análise dos efeitos da temperatura e UR do ar nos isolados sob estudo. Esta análise foi ainda motivada pela conexão encontrada entre seus padrões de variação e aqueles de chuva e umidade da vassoura (Figura 2). Os comportamentos da temperatura e UR do ar foram muito semelhantes acima e abaixo da copa (dados não mostrados), sugerindo fortemente que a turbulência do ar e seu movimento em todas as direções na plantação de cacau resulta em homogeneização dos valores destes dois parâmetros no perfil do dossel; isso indicaria que estas avaliações em diferentes alturas são desnecessárias. Além disso, como as diferenças na esporulação foram estatisticamente significativas entre as alturas da copa (Tabela 1), a modulação em outros parâmetros climáticos (Figuras 3, 5 e 6) parecem ser tão importantes quanto à variação na umidade e temperatura do ar. Tomados em conjunto, os resultados sugerem que, provavelmente, o que impede uma esporulação mais freqüente e sem interrupção nas condições do campo é a *alta variação diária* na temperatura do ar (faixas de variação diária de 5°C a

12°C entre os valores diurnos e noturnos) e UR (faixas de variação de 20% a 50% entre 4:00 e 16:00 h), de modo que a esporulação de *Ts* é disparada essencialmente quando esta variação é reduzida a faixas estreitas de alta umidade em torno de 90% e temperaturas ao redor de 24°C (Figura 4). Isto está em perfeita concordância com dados prévios em que experimentos *in vitro* e de campo definiram basicamente os valores de temperatura e umidade para esporulação de *Ts* como sendo 20 - 30°C e UR acima de 75% (SANOGO et al., 2002); todavia, nossos resultados expandiram essas observações ao mostrar que os determinantes *de fato* para esporulação de *Ts* não são somente os limites naturais de umidade de vassoura, temperatura e umidade do ar nos quais o fungo pode operar metabolicamente (Figuras 3 e 4), mas principalmente a *forma* e *magnitude* em que esses parâmetros meteorológicos variam no campo.

Considerando as poucas, mas relevantes discrepâncias encontradas entre os padrões de variação de umidade da vassoura, temperatura e UR do ar em relação à precipitação pluviométrica e à esporulação de *Ts* (Figuras 2, 3 e 4), as variações em dois outros parâmetros - radiação solar e direção do vento - pôde ajudar a explicar essas ocorrências 'fora de padrão' (Figura 5). Radiação solar está conectada à velocidade do vento pela elevação na temperatura (aquecimento), a qual gera um decréscimo localizado na pressão atmosférica e, portanto, o estabelecimento de gradientes que induzem o movimento do ar a partir de outras áreas de alta pressão (TUBELIS; NASCIMENTO, 1984). Assim, não é inesperado que ambos os parâmetros variem coordenadamente em muitas circunstâncias. A partir dos dados da Figura 5, ficou evidente que o decréscimo coordenado na intensidade de radiação e velocidade do vento muito provavelmente contribuiu para explicar a manutenção das umidades de vassoura e relativa do ar em níveis *maiores*, bem como para *diminuir a amplitude* de variação diária na temperatura do ar, durante os curtos intervalos pré-esporulação (Figuras 3 e 4). Foi marcante o fato de que, para todos os eventos de esporulação, a intensidade de radiação caiu abaixo do limite de 0.12-KW.m<sup>2</sup> para 'dia de sol pleno' (Figura 5a). Isso fortemente sugere que as condições microclimáticas para esporulação de *Ts* são difíceis de serem atendidas sob sol

pleno, implicando que a presença de nuvens seria necessária. Além disso, pôde ser observado que condições de sol pleno nunca ocorreram nas alturas de 1,0 e 2,5 m (Figura 5a), sugerindo portanto que a *variação* na radiação solar abaixo da copa parece não ser um parâmetro de interferência relevante a ser medido; é mais provável que a influência da radiação solar esteja relacionada às mudanças de temperatura (aquecimento) e umidade relativa do ar (secamento) *sobre a copa*, que seriam, então, rápida e totalmente homogeneizados pela turbulência do ar, como já discutido (Figura 4). Obviamente, para as vassouras colocadas acima da copa, a radiação solar passa a ser um fator climático bastante relevante para esporulação de *Ts* (Figura 5a), não apenas devido aos seus efeitos diretos sobre, e interconectados com, outros elementos meteorológicos relacionados (TUBELIS; NASCIMENTO, 1984), mas também devido à sua potencial pressão de seleção sobre isolados de *Trichoderma* mais tolerantes à radiação solar direta (HOOPEN et al., 2003).

Um estudo sistemático realizado por Sanogo et al. (2002), confirmado neste trabalho, indicou que vassouras inoculadas com *Ts* e postas sobre o solo (na camada de folhas mortas que compõe a ‘serrapilheira’) são usualmente mais extensivamente esporuladas do que acima do solo. Considerando que (i) a amplitude de variação diária na temperatura da serrapilheira foi no geral menor do que no ar (Figura 6b), (ii) a temperatura no solo oscilou na maior parte do tempo ao redor da faixa mais favorável à esporulação de *Ts* (isto é, entre 22 e 26 °C - Figura 6c), (iii) a amplitude de variação diária na umidade da vassoura tende a se reduzir linearmente com o decréscimo em altura (Figuras 3 e 6a), e (iv) os ambientes do solo e da serrapilheira exercem uma importante interferência nas camadas de umidade e temperatura imediatamente acima da superfície (onde as vassouras do solo localizaram-se), é razoável assumir que todas essas condições são mais apropriadas para a biologia de *Ts*, explicando, assim, os altos níveis de esporulação sobre o solo. É importante apontar que padrões específicos pré-esporulação identificados para umidade de vassoura (Figura 6a) e temperatura (Figura 6b) na serrapilheira não são diferentes em essência daqueles correspondentes aos parâmetros aéreos (comparar com as Figuras 3 e 4b). Além disso, apesar de a amplitude total de variação na temperatura

da serrapilheira ter sido intermediária entre as temperaturas do ar e do solo, as mesmas faixas estreitas de intervalo pré-esporulação (incluindo as ‘fora de padrão’) puderam ser detectados. Desses resultados, podemos sustentar que a colocação de sensores de umidade da vassoura e temperatura do ar em somente uma das alturas pode ser suficiente para a proposta de monitoramento dos efeitos desses parâmetros meteorológicos sobre os mecanismos biológicos de *Ts*. Neste sentido, sensores de temperatura do ar, localizados acima do solo seriam preferenciais, pois assim os padrões de variação pré-esporulação podem ser imediatamente distinguidos devido ao maior contraste entre eles e as variações diárias maiores (Figuras 3b e 5b); por outro lado, sensores de umidade de vassouras colocados na serrapilheira mostraram um perfil mais estável para os períodos de umidade acima de 30%, servindo, portanto, como um melhor indicador dos padrões pré-esporulação.

A modulação da temperatura do solo foi avaliada nesse estudo, não apenas porque se esperava que mostrasse, no geral, uma faixa de variação muito mais estreita aos 5 cm de profundidade, mas também porque o solo pode servir como fonte de calor à noite para as camadas de ar bem próximas da superfície (TUBELIS; NASCIMENTO, 1984). A primeira situação foi claramente confirmada, pois a variação de temperatura do solo em condições tropicais típicas de plantação de cacau mostrou uma variação de amplitude diária bem menor e mais consistente (dentro de uma faixa de somente 0,5 °C) quando comparada à variação da temperatura do ar (entre 2°C a 12°C - Figura 4). Essa variação diária bastante pequena na temperatura do solo é provavelmente consequência tanto da radiação solar sempre de baixa intensidade atingindo o solo (Figura 5), devido ao sombreamento da copa, quanto da transferência ineficiente de calor do ar para o solo pelos gradientes de temperatura formados (Figuras 4 e 6). Interessantemente, é marcante a associação encontrada entre esporulação no solo e conteúdo mínimo de umidade do solo de 0,34 m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>, que, até o momento, foi o único parâmetro que não apresentou comportamentos ‘fora da tendência’ (Figura 6d). O fato de que o conteúdo de umidade do solo não foi estritamente associado com o padrão de chuvas apresentado na Figura 2 pode ser explicado por distintas formas de partição

da chuva através do dossel do cacau; já foi previamente demonstrado que diferentes percentagens de 'perdas por interceptação', 'queda direta' e 'escorrimento pelo caule' podem ocorrer após diferentes tipos e intensidades de chuvas (MIRANDA, 1994), o que, por sua vez, pode alterar o teor de umidade do solo, que é o depósito líquido da água da chuva.

Visto que todas as análises descreveram um perfil temporal dos parâmetros microclimáticos, usando a esporulação de *Ts* como referência biológica em nosso sistema de biocontrole, foi necessário demonstrar sua direta ligação com o controle do fitopatógeno-alvo. Com os resultados apresentados na Tabela 1, fornecemos evidências para a validação de todas as análises microclimáticas descritas (Figuras 3 a 6), no sentido de que os efeitos dos parâmetros físicos sobre esporulação de *Ts* realmente serve como uma maneira direta para avaliar a interação entre fatores meteorológicos e a atividade de biocontrole dos ACBs. Desse modo, o efeito estatisticamente significativo da posição no dossel (altura) no sistema de interação antagônica aqui estudado não seria surpresa (Tabela 1), pois a maioria dos parâmetros analisados também mostraram distintos comportamentos entre as diferentes alturas. Neste ponto, vale a pena uma análise mais atenta da interação genótipo-ambiente. Até o momento, as tendências identificadas para interferência do microclima na esporulação de *Ts* considerou os cinco isolados em conjunto (Figuras 3 a 6), baseado em duas premissas razoáveis: (i) a variação dos parâmetros de microclima ocorreu de uma mesma forma para todos os isolados, devido ao delineamento experimental adotado ao redor da estação climatológica (ver Métodos), e (ii) as interpretações e conclusões sobre os dados de interação biologia-clima poderiam ser generalizadas. Assim, a existência de respostas específicas por isolado à variação meteorológica seria o indicativo de diferenças na interação genótipo-ambiente afetando o fenótipo. De fato, este foi o caso aqui, visto que os cinco isolados testados pertencem a dois distintos grupos genéticos (SOUZA et al., 2005), e dois deles demonstraram uma atividade de biocontrole significativamente maior do que os outros (Figura 7). Tomados em conjunto, esses resultados reforçam um novo paradigma sobre as forças determinantes da estrutura e dinâmica de

populações de fungos (BIDOCHKA et al., 2002): a adaptação a distintos habitats (ambientes) seria mais relevante como critério de escrutínio e identificação de melhores ACBs do que a simples adaptação diferencial aos organismos hospedeiros.

Conforme mencionado acima, os resultados aqui apresentados demonstram que, no campo, a atividade apropriada dos ACBs não é essencialmente dependente de valores absolutos dos parâmetros meteorológicos relacionados, mas sim de menores faixas de variações diárias (modulação entre as leituras do 'dia' e da 'noite'), que provavelmente condicionam um sustentado metabolismo e fisiologia por períodos mais longos. Tomando todas as avaliações climáticas juntas, percebeu-se claramente que o menor nível de esporulação de *Ts* acima da copa (a 5,5 m - Tabela 1) foi devido a uma muito maior variação diária nas condições microclimáticas nesta posição, provavelmente dirigida pelo efeito combinado da radiação solar e precipitação, numa condição que é marcadamente distinta abaixo da copa e sobre o solo. Considerando que a radiação solar acima da copa na verdade interferiria com o microclima em toda a plantação (ver acima), pode-se sugerir um novo paradigma para estudos dos efeitos do clima: ao invés de concentrar a análise de fatores físicos na umidade e temperatura, uma observação sistemática dos padrões de variação na radiação solar e na precipitação pluviométrica (em escalas locais, regionais e globais) forneceria indicadores mais previsíveis e gerenciáveis para o manejo de controle de doenças. As vantagens de se usar tal controle climático em estratégias de manejo integrado de pragas e doenças, com base em sistemas de suporte decisório, tem sido salientada (ELAD 2003; DIK; ELAD, 1999). Esquemas de aplicação no campo de ACBs de melhor relação eficiência-custo podem ser alcançados quando for considerada a ocorrência de microclimas mais favoráveis; por exemplo, o uso de menos químicos quando o clima é limitante para ACBs é tido como uma estratégia efetiva para permitir consistência de biocontrole, seja no filoplano ou no solo (HJELJORD; TRONSMO, 1998).

A partir dos resultados apresentados aqui, algumas perspectivas podem ser levantadas. Primeiro, o conhecimento sobre os padrões de interferência do clima nos diferentes ACBs pode ser combinado com outros requerimentos biológicos

específicos, não somente para estabelecer formulações mais eficientes, mas também para definir mais apropriadamente os melhores momentos de aplicação no campo, em termos de estação do ano e frequência. Obviamente, o isolado usado deve ser distinguível de outras populações presentes na área, para o quê marcadores moleculares ou bioquímicos podem ser empregados (HOOPEN et al., 2003; PUNJA; UTKHEDE, 2003; ver Capítulo II). Segundo, procedimentos de escrutínio por isolados de melhor desempenho de biocontrole no campo podem ser associados à análise sistemática das variações meteorológicas locais, de modo que a interpretação dos resultados seria mais precisa. Essa abordagem, supostamente, ajudaria a reduzir a já citada inconsistência de uso do controle biológico em larga escala, não apenas por revelar aspectos desconhecidos da susceptibilidade do ACB à influência ambiental que pode redirecionar decisões de manejo, mas também por permitir sua integração com calendários de aplicação de fungicidas químicos, de acordo com requerimentos ecológicos (ELAD, 2003). Por último, esforços de pesquisa e investimento no desenvolvimento de alternativas biotecnológicas (KREDICS et al., 2004; BAINTON et al., 2004) para o controle de doenças (ou insetos) poderão enfocar novos e criativos atributos para os ACBs, evitando assim frequentes sobreposições com opções naturais, pré-existentes e mais econômicas que podem ser similarmente eficientes no manejo de pragas; um entendimento mais detalhado das influências climáticas na biologia de organismos úteis ajudaria muito nessas tomadas de decisão.

De fato, com base na gama de informações aqui apresentadas, bem como nos resultados de pesquisa em andamento, nosso grupo já iniciou uma linha de investigação em modelagem matemática e simulação, com objetivo de fornecer uma descrição dinâmica e integrada do sistema 'cacau - *C. pernicioso* - *T. stromaticum* - ambiente' que, espera-se, seja útil no desenvolvimento de estratégias inovadoras, ambientalmente sustentáveis, eficientes e de baixo custo para o manejo da cultura. Espera-se que o trabalho apresentado tenha fornecido informações e idéias úteis para o desenvolvimento de esquemas mais consistentes e ambientalmente sustentáveis para o uso do controle biológico em grande escala, em um manejo

integrado de doença, não somente para o cacauero e vassoura-de-bruxa, mas também para outras espécies, ambientes e sistemas de produção agrícola.

### 3.6. REFERÊNCIAS

- ANDEBHRAN, T., FIGUEIRA, A. YAMADA, M. M., CASCARDO, J., FURTEK, D. B. (1999) Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 105: 167-175.
- ASSANTE, G.; MAFFI, D.; SARACCHI, M.; FARINA, G.; MORICCA, S.; RAGAZZI, A. (2004) Histological studies on the mycoparasitism of *Cladosporium tenuissimum* on urediniospores of *Uromyces appendiculatus*. *Mycological Research* 108: 170-182.
- BAINTON, N.J.; LYNCH, J.M.; NASEBY, D.; WAY, J.A. (2004) Survival and ecological fitness of *Pseudomonas fluorescens* genetically engineered with dual biocontrol mechanisms. *Microbial Ecology* 48: 349-357.
- BASTOS, C.N. (1996) Mycoparasitic nature of the antagonism between *Trichoderma viride* and *Crinipellis pernicioso*. *Fitopatologia Brasileira* 21: 50-54.
- BENITEZ, T.; RINCON, A.M.; LIMON, M.C.; CODON, A.C. (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.
- BIDOCHKA, M.J.; MENZIES, F.V.; KAMP, A.M. (2002) Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. *Archives of Microbiology* 178: 531-537.
- COSTA, J.C.B.; BEZERRA, J.L.; CAZORLA, I.M. (1996) Controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacueiro na Bahia com *Trichoderma polysporum*. *Fitopatologia Brasileira* 21 (Suppl): 397.
- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. (1985) *Basic Plant Pathology Methods*. Boca Raton: CRC Press. 355p.
- DIK, A.J.; ELAD, Y. (1999) Comparison of antagonists of *Botrytis cinerea* in greenhouse-grown cucumber and tomato under different climatic conditions. *European Journal of Plant Pathology* 105: 123-137.
- DONALD, P.F. (2004) Biodiversity impacts of some agricultural commodity production systems. *Conservation Biology* 18: 17-37.

ELAD, Y. (2003) Biocontrol of foliar pathogens: mechanisms and application. *Communications in Agriculture and Applied Biological Sciences* 68: 17-24.

HERMOSA M.R.; GRONDONA I.; ITURRIAGA E.A.; DIAZ-MINGUEZ J.M.; CASTRO C.; MONTE E.; GARCIA-ACHA I. (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1890-1898.

HJELJORD, L., TRONSMO, A. (1998) *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. *In: Trichoderma and Gliocladium – enzymes, biological control and commercial applications* (Harman, G.E. & Kubicek, C.P., eds). London: Taylor & Francis, vol 2, p. 131-151.

HOOPEN, G.M.; REES, R.; AISA, P.; STIRRUP, T.; KRAUSS, U. (2003) Population dynamics of epiphytic mycoparasites of the genera *Clonostachys* and *Fusarium* for the biocontrol of black pod (*Phytophthora palmivora*) and moniliasis (*Moniliophthora roreri*) on cocoa (*Theobroma cacao*). *Mycological Research* 107: 587-596.

HOWELL, C.R. (1998) The role of antibiosis in biocontrol. *In: Trichoderma and Gliocladium – enzymes, biological control and commercial applications* (Harman, G.E. & Kubicek, C.P., eds). London: Taylor & Francis, vol 2, p. 173-184.

JOHNS, N.D. (1999) Conservation in Brazil's chocolate forest: the unlikely persistence of the traditional cocoa agroecosystem. *Environmental Management* 23: 31-47.

KRAUSS, U.; SOBERANIS, W. (2002) Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. *Biological Control* 24: 82-89.

KREDICS, L.; ANTAL, Z.; MANCZINGER, L. (2000) Influence of water potential on growth, enzyme secretion and *in vitro* enzyme activities of *Trichoderma harzianum* at different temperatures. *Current Microbiology* 40: 310-314.

KREDICS, L.; ANTAL, Z.; MANCZINGER, L.; SZEKERES, A.; KEVEI, F.; NAGY, E. (2003) Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology and Biotechnology* 41: 37-42.

KREDICS, L.; MANCZINGER, L.; ANTAL, Z.; PENZES, Z.; SZEKERES, A.; KEVEI, F.; NAGY, E. (2004) *In vitro* water activity and pH dependence of mycelial growth and extracellular enzyme activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Journal of Applied Microbiology* 96: 491-8.

KUBICEK, C.P.; MACH, R.L.; PETERBAUER, C.K.; LORITO, M. (2001) *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *Journal of Plant Pathology* 83: 11-23 (special issue).

LOPES, V.L.; MONTEIRO, W.R.; PIRES, J.L.; DA ROCHA, J.B.; PINTO, L.R.M. (2003) On farm selection for witches' broom resistance in Bahia, Brazil - a historical

retrospective. *In: 14th International Cocoa Research Conference - Towards a sustainable cocoa economy: what strategies to this end?* Accra: COPAL. vol 2, p. 1001-1006.

LORITO, M. (1998) Chitinolytic enzymes and their genes. *In: Trichoderma and Gliocladium – enzymes, biological control and commercial applications* (Harman, G.E. & Kubicek, C.P., eds). London: Taylor & Francis, vol 2, p. 73-99.

MIRANDA, R.A.C. (1994) Partitioning of rainfall in a cocoa (*Theobroma cacao* Lour.) plantation. *Hydrological Processes* 8: 351-358.

PEREIRA, J.L.; ALMEIDA, L.C.C; SANTOS, S.M. (1996) Witches' broom disease of cocoa in Bahia: attempts at eradication and containment. *Croop Protection* 15: 743-752.

PUNJA, Z.K.; UTKHEDE, R.S. (2003) Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology* 21: 400-407.

PURDY, L.H.; SCHMIDT, R.A. (1996) Status of cacao witches' broom: Biology, epidemiology, and management. *Annual Reviews in Phytopathology* 34: 573-594.

SAMUELS, G. J.; PARDO-SCHULTHEISS, R.; HEBBAR, P. K.; LUMSDEN, R. D.; BASTOS, C. N.; COSTA, J. C.; BEZERRA, J. L. (2000) *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycological Research* 104: 760-64.

SANOGO, S.; POMELLA, A.; HEBBAR, P.K.; BAILEY, B.; COSTA, J.C.B.; SAMUELS, G.J.; LUMSDEN, R.D. (2002) Production and Germination of Conidia of *Trichoderma stromaticum*, a Mycoparasite of *Crinipellis pernicioso* on Cacao. *Phytopathology* 92: 1032-1037.

SINIGAGLIA, M.; CORBO, M.R.; CICCARONE, C. (1998) Influence of temperature, pH and water activity on "in vitro" inhibition of *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling by yeasts. *Microbiological Research* 153: 137-143.

SOUZA, J. T.; POMELLA, A. W. V.; BOWERS, J.; PIROVANI, C. P.; LOGUERCIO, L. L.; HEBBAR, P. (2005) Genetic and biological diversity of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the cacao witches' broom pathogen. *Phytopathology* (in press).

TUBELIS, A.; NASCIMENTO, F.J.L. (1984) Meteorologia descritiva - fundamentos e aplicações brasileiras. São Paulo: Nobel, 374 p.

VATTAY, G.; HARNOS, A. (1994) Scaling behavior in daily air humidity fluctuations. *Physical Review Letters* 73: 768-771.

## 4. CAPÍTULO II

**Desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Trichoderma stromaticum* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae), antagonista ao agente causal da 'vassoura-de-bruxa' do cacauero.**

(Artigo a ser submetido)

### 4.1. RESUMO

*Trichoderma stromaticum* é um fungo ascomiceto antagonista utilizado no controle da vassoura-de-bruxa do cacauero, doença causada pelo fungo basidiomiceto *Crinipellis perniciosa*. Este trabalho descreve as etapas para o desenvolvimento e caracterização de 11 *loci* microssatélites amplificados a partir do DNA extraído de 10 isolados representativos da diversidade genética de *T. stromaticum*, pertencentes a dois grupos genéticos distintos. Dos 11 *loci* testados, oito pares de *primers* produziram fragmentos específicos e com o tamanho esperado e de boa qualidade em temperatura de anelamento de 58 °C; os três restantes produziram amplificação com temperatura de anelamento de 45 °C. Uma primeira análise de polimorfismo em gel de poliacrilamida 5% foi realizada com seis dos 11 *primers*, revelando que apenas o *locus* microssatélite MTs2 mostrou-se claramente

polimórfico, quando testado contra os dez isolados de *T. stromaticum*. Os resultados sugerem que a análise dos demais *loci* e o uso de mais isolados poderão identificar um conjunto de marcadores microssatélites que ajudarão nos estudos das propriedades genótípicas e de relações entre os isolados de *T. stromaticum*.

**Palavras-chave:** marcadores - microssatélites (SSR) - *Trichoderma stromaticum* – biocontrole - *C. perniciosa*.

## 4.2. INTRODUÇÃO

O gênero *Trichoderma* é considerado como o ‘anamorfo’ de *Hypocrea* e diversas de suas espécies são famosas mundialmente por serem excelentes agentes de controle biológico (CHAVERRI et al., 2001). *Trichoderma stromaticum* Samuels & Pardo-Schultheiss, espécie antagonista a *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, tem sido usado experimentalmente com bons resultados no controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero (*Theobroma cacao* L.) (COSTA; BASTOS, 2001; BEZERRA et al., 2003). Samuels et al. (2000) descreveu esta espécie a partir de culturas levadas da Bahia e provenientes dos estados do Pará e Rondônia (BEZERRA et al., 2003), mas não mencionou a existência do seu ‘teleomorfo’, isto é, a fase sexuada do seu ciclo reprodutivo. No entanto, Bezerra et al. (2003) demonstrou a conexão entre *T. stromaticum* e a *Hypocrea* sp., ou seja, o seu teleomorfo, com base em dados morfológicos e moleculares, denominando esta fase teleomórfica de *Hypocrea stromatica* sp. nov. Assim, a existência de uma fase sexuada no ciclo reprodutivo deste fungo assegura um mecanismo relevante de formação de variabilidade genética nas populações naturais.

Estudos recentes revelaram existir abundância de isolados nativos de *T. stromaticum* pertencentes a dois grupos genéticos distintos (SOUZA et al., 2005), bem como ampla plasticidade fenotípica entre esses isolados no biocontrole de *C. perniciosa* (A.W.V. Pomella, dados não publicados). Potencialmente, qualquer espécie viva pode ser estudadas eficientemente por marcadores moleculares,

principalmente os baseados em polimorfismos do DNA, (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). Este tipo de marcador têm sido utilizados com sucesso em diferentes estudos genéticos das espécies de *Trichoderma* (COSTA et al., 2003). Marcadores baseados na PCR (*polymerase-chain reaction*), tais como RAPD, AFLP, STR e microssatélites, são os mais utilizados (ZUCOLOTO, 2003). Trabalhos com marcadores RAPD (COSTA et al., 2003; QI et al., 1996), ITS (revisado em KUBICEK et al., 2002) e mais recentemente com AFLP (SOUZA et al., 2005) já foram utilizados com sucesso na elucidação das diferenças genéticas (diversidade) existentes entre as espécies de *Trichoderma* spp e entre isolados de uma mesma espécie (incluindo *T. stromaticum*). Os Microssatélites (ou *simple-sequence repeats* - **SSR**) são repetições em tandem do DNA de um a seis pares de bases (MAKOVA et al., 2000; ZANE, 2001) e, por possuírem alto teor informativo (REZENDE, 2004), têm sido utilizados em estudos de genética de populações, genética *forense* e mapeamento gênico por ligação (MAKOVA et al., 2000). , tendo sido bastante efetivos em estudos de diversidade em populações de vários microrganismos, como por exemplo *Beaveria bassiana*, fungo ascomiceto e agente de controle biológico de insetos-pragas (REHNER; BUCKLEY, 2003), e *Ceratocystis fimbriata*, fungo patogênico de plantas que tem devastado diversas culturas economicamente importantes (STEIMEL, 2004).

Seqüências de DNA SSR de tamanhos diferentes representam alelos, pois a variação no comprimento do produto amplificado é função do número de unidades de seqüências repetidas (REZENDE, 2004; ZUCOLOTO, 2003; ZANE, 2001). Quando estas seqüências básicas se repetem mais de seis vezes, os microssatélites são altamente polimórficos (WEBER, 1990). O principal mecanismo responsável pela geração de variantes em tamanho é o erro de pareamento causado pelo escorregamento da DNA polimerase na fita molde (ZUCOLOTO, 2003; REZENDE, 2004; ZANE, 2001). Além disso, a deficiência na reparação dos erros de duplicação aumenta a instabilidade dos microssatélites (DRUMMOND et al., 1995). Por ser normalmente flanqueado por segmentos de DNA únicos e

conservados, é possível definir *primers* que amplifiquem especificamente um único loco de microssatélites (REZENDE, 2004).

Apesar de existirem importantes informações preliminares sobre a diversidade genética de *T. stromaticum* (SOUZA et al., 2005), dados dessa natureza são ainda necessários, principalmente quanto ao potencial de diferenciação rápida e eficiente de indivíduos (isolados) dentro de cada grupo. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites que poderão enriquecer e facilitar os estudos sobre a diversidade genética entre os diversos isolados nesta espécie, bem como permitir a definição de estratégias moleculares para *fingerprinting* de isolados, visando monitoramento daqueles aplicados a campo em controle biológico.

### **4.3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.3.1. Obtenção dos isolados**

Os isolados de *T. stromaticum* (*Ts*) utilizados neste estudo foram referidos recentemente como pertencentes a dois grupos genéticos distintos (I e II, SOUZA et al., 2005). Dez isolados foram utilizados, sendo cinco deles classificados como ‘grupo I’ (isolados 643, 639, 679, 663 e 662) e cinco como ‘grupo II’ (isolados 323, 64, 56, 657 e 1227). Estes isolados foram gentilmente cedidos pela instituição de pesquisa Fazenda Experimental Almirante Cacau, situada no município de Itajuípe-BA.

#### **4.3.2. Condições de crescimento dos isolados e extração de DNA**

O micélio para a extração de DNA foi obtido através de crescimento dos 10 isolados de *Ts* por 10 dias, em erlenmeyers de 1 L, contendo 300 mL de meio líquido TLE, sob agitação contínua de 120 rpm e temperatura constante de 25 °C.

As hifas foram coletadas por filtração, através de papel filtro comum sobre um funil Buchner. Procedeu-se com a retirada do excesso de meio de cultura por leve lavagem com água destilada e, em seguida, os micélios foram colocados para liofilização. A extração de DNA foi realizada utilizando-se o protocolo de Reader e Broda (1985), otimizado para este fim em relação a *Trichoderma*. O pélete final de DNA foi ressuscitado em 100µL de uma solução de RNase 40 µg.mL<sup>-1</sup> em água destilada e deionizada estéril (água DDE), própria para PCR. A qualidade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% e sua quantificação foi estimada por comparação visual com quantidades conhecidas do padrão de peso molecular aplicadas no gel. As concentrações do DNA foram ajustadas para 10 picomoles.µL<sup>-1</sup> para todos os isolados.

#### **4.3.3. Desenho dos *primers* e nomenclatura dos microssatélites**

Os pares de oligonucleotídeos (*primers*) diretos (F) e reversos (R) foram definidos a partir de seqüências genômicas de *Ts*, previamente obtidas e gentilmente cedidas pelo Dr. Jorge Teodoro de Souza. Potenciais regiões contendo marcadores SSR foram identificadas e serviram de base para o desenho de 11 pares de *primers*, utilizando-se o programa 'Primer3' de acesso livre via internet ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). Para a definição dos *primers* (óligos), utilizou-se os seguintes critérios: (i) inexistência de bases redundantes, (ii) distância mínima de 50 nucleotídeos entre as SSR, (iii) tamanhos entre 18 e 24 nucleotídeos, sem seqüências repetitivas internas ao óligo, (iv) porcentagem de CG entre 50 e 55%, preferencialmente, (v) presença de preferencialmente um C ou G na extremidade 5' (ajustes manuais posteriores foram feitos na extremidade 3' para tentar aumentar a presença de CGs), e (vi) temperaturas de anelamento entre 45 e 65°C, com diferença de 3 a 4°C entre os *primers* F e R do par, permitindo a sua utilização na mesma reação com baixa ou nenhuma auto-hibridização ou hibridização entre si. Para a nomenclatura dos *primers* utilizaram-se três letras e um número. A primeira letra (M) corresponde à

'microsatélite' e as duas letras subsequentes (Ts) equivalem às iniciais de *Trichoderma stromaticum*. O número diferencia os pares de *primers* entre si. Desta forma, os marcadores microsatélites utilizados neste estudo foram MTs2, MTs3, MTs4, MTs5, MTs5-1, MTs6, MTs7, MTs8, MTs9, MTs10, MTs11.

#### **4.3.4. Amplificação dos fragmentos pela reação de polimerização em cadeia (PCR)**

Os pares de *primers* descritos acima foram sintetizados pela empresa *Bioneer*<sup>TM</sup>. Seguindo-se as informações do fabricante para cada *primer*, foi adicionada água DDE para a constituição dos estoques de modo que a concentração final para todos foi de 100 picomoles. $\mu\text{L}^{-1}$ . Para amplificação via PCR, foi obtido um volume final de 20  $\mu\text{L}$  para cada reação através da mistura de 2,0  $\mu\text{L}$  de Tampão 10X, 2,0  $\mu\text{L}$  de dNTPs (a 2,5 mM cada), 1,2  $\mu\text{L}$  de Cloreto de Magnésio (a 50 mM), 0,5  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (a 10 pmoles.  $\mu\text{L}^{-1}$  cada), 0,4  $\mu\text{L}$  de Taq *polimerase* (a 5 U.  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 1,5  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA (a 10 pmoles.  $\mu\text{L}^{-1}$ ) e o restante 11,9  $\mu\text{L}$  de água DDE. Estas reações foram submetidas a uma desnaturação inicial em uma temperatura de 94°C por 2 min, seguida por 10 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 s, anelamento dos primers a 58°C por 45 s (decrecendo 1°C a cada ciclo sucessivo) e alongamento a 72°C por 1 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 s, anelamento dos primers a 48°C por 45 s e alongamento a 72°C por 2 min. Alíquotas de 3  $\mu\text{L}$  de cada reação foram analisadas por fotografia digitalizada obtida após eletroforese em gel de agarose 0,8% e coloração com brometo de etídio.

#### **4.3.5. Análise de polimorfismo por eletroforese em Poliacrilamida**

As amostras foram submetidas a gel de poliacrilamida 5% com 0,5 mm de espessura para a detecção de polimorfismo entre os isolados. Utilizou-se o sistema eletroforético "Seq Gen GT" (BioRad<sup>®</sup>) de 38 x 50 cm e 'pente' para 60 amostras. Foram utilizados 420,4 g de uréia, 3 g de bisacrilamida, 60 g de acrilamida e TBE

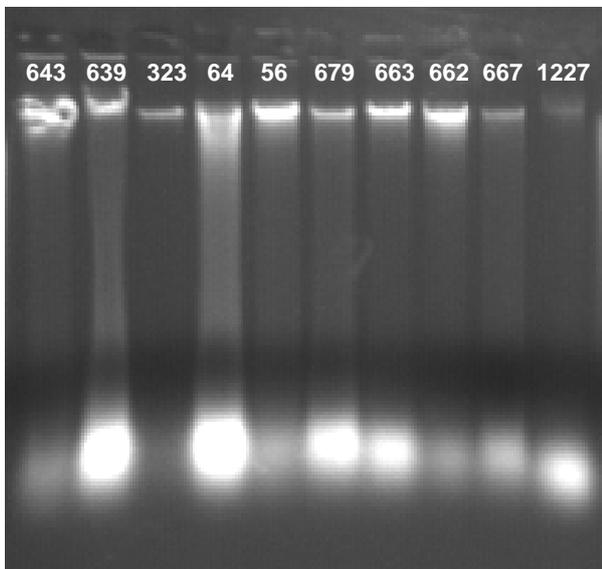
1x até completar o volume de 1 L para preparar a solução matriz dos géis. Esta solução foi filtrada e armazenada em frascos envoltos com papel alumínio para proteção contra a luz. As placas utilizadas foram limpas com etanol 95%, sendo que na placa maior foi aplicada 2 mL de 'REPEL' e na menor foi aplicada uma menor quantidade de solução 'BIND' (ambos da Amersham Biosciences®), visando assegurar a permanência do gel na placa menor quando as placas fossem separadas após a eletroforese. O gel foi preparado com a adição de 120 µL de TEMED e 800 µL de persulfato de amônia 10% em 120 mL de solução matriz. Para cada 20 µL de produto de amplificação de DNA foi adicionado 10 µL de tampão de amostra (SAMBROOK et al., 1989) para eletroforese, contendo formamida a 95 %. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 min. Após pré-corrída do gel por 1-2 h a uma potencia de 80 W, as amostras foram aplicadas sob potência constante de 80 W por aproximadamente 3 h. O método para revelação dos géis foi seguido de acordo com o protocolo proposto por Creste et al (2001) que utiliza nitrato de prata. Dos 11 marcadores microssatélites testados foram escolhidos para análise os que apresentaram melhores resultados nas amplificações (ver Figura 3): MTs11, MTs7, MTs2, MTs3, MTs5 e MTs4.

#### **4.4. RESULTADOS**

##### **4.4.1. Extração do DNA**

A eletroforese em gel de agarose 8% demonstrou que a metodologia empregada para extração do DNA dos isolados usados foi satisfatória, como mostra a Figura 1. A razoável integridade dos DNAs é evidenciada pela presença de uma banda única de alto peso molecular para todas as amostras, com pouco 'rastros'. Considerando a intensidade da banda em relação aos rastros correspondentes, os menores rendimentos de extração, isto é, as menores concentrações de DNA obtidas corresponderam às extrações dos isolados 1227, 667 e 323, nessa ordem, enquanto

as maiores quantidades ocorreram para os isolados 643, 662 e 56. De um modo geral, observou-se uma quantidade ainda relevante de RNA residual (degradado) nas amostras, como se observa na parte inferior do gel (Figura 1).



**Figura 1** – Resultado da extração do DNA de 10 isolados de *Trichoderma stromaticum* (indicados na parte superior) em gel de agarose 8%.

#### **4.4.2. Obtenção dos *primers* para amplificação das seqüências simples repetitivas (SSR)**

A aplicação do programa ‘Primer3’ permitiu o desenho de 13 pares de *primers* para amplificar os primeiros marcadores microssatélites (SSR) dessa espécie. Destes, 11 pares de oligonucleotídeos foram efetivamente utilizados, cujas características principais dos mesmos (seqüências dos *primers*, temperaturas de anelamento, tamanho esperado do produto e conteúdo de GC), bem como dos SSR correspondentes, são sumarizadas na Tabela 1. Os resultados revelaram (i) existir microssatélites complexos com seqüências tri-, penta- and hexa-nucleotídeos alinhadas lado a lado, (ii) existir predominância de seqüências repetitivas contendo tri-nucleotídeos, (iii) presença predominante de ‘C’s e ‘G’s associados com ‘A’s, (iv) temperaturas de anelamento calculadas entre 50,3 e 54,4 °C, e (v) tamanho

médio de fragmentos amplificados de 145 pb, com mínimo de 84 e máximo de 180 pb.

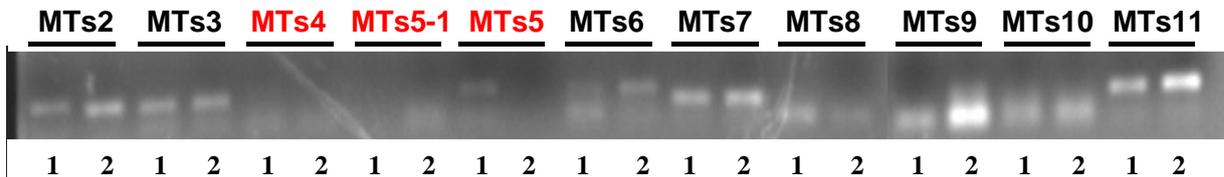
**Tabela 1** – Parâmetros dos microssatélites de *Trichoderma stromaticum*.<sup>1</sup>

<i>Locus</i> ( <i>marcador</i> )	<b>SSRs</b> ( <i>motif</i> )	<i>primers</i> (5'-3')	<b>Tm</b> (°C)	<b>produto</b> (bp)	<b>GC</b> (%)
MTs2	(CG)9	F: ACTTGCCCCCTCTCTTTGAC R: CCCACCACAGCTCCTACT	54,4 52,3	180	55,0 63,2
MTs3	(GTG)7	F: CGGCGACGAAGATGATATTT R: CCGTGATTTGTCCTCCTCAT	54,0 53,5	161	45,0 50,0
MTs4	GAGCAA(GAG)6 (GAGCAA)5	F: GCCTTGCTAGCAGAAGCAC R: GTTAGGCGGTGTCCTGTTG	52,5 52,6	145	57,3 57,9
MTs5	(CTC)7	F: TTCTTCGAGCCCAGCTCTAC R: AACAGGAGGAGGCACAACAG	53,5 53,8	123	55,0 55,0
MTs6	(CCAC)7(CAA)3 AAA (CAA)2 CAG(CAA)6	F: CACACACGCGTATCTCCTC R: GCCTCTGGTTGGTGGTTAC	50,8 51,4	180	57,9 57,9
MTs5 -1	(CCA)7(CAA)3 AAA (CAA)9	F: CTGTTGTGCCTCCTCCTGTT R: AGTGAGGAGCAGTGGTAGGG	53,8 52,9	84	55,0 60,0
MTs7	(TTC)9 (TT)2	F: CCTTAGCAGCAACAACACCA R: AGGCGAGGTTGGTGAATATG	50,3 53,7	136	52,6 50,0
MTs8	ACAC(CAACAC)3(CAA) 2 CCACA	F: CTGCAGAATTCGCCCTTCTA R: GTATAGCGGCCGTTGAGAAA	54,4 54,3	121	50,0 50,0
MTs9	(AGC)6 AGGCGCAA (CAG)3 (CAA)3(CAG)3 (CAA)5 (CAG)5	F: CTGCAGAATTCGCCCTTCTA R: CTGCTTCTGTGCCTGTTGTG	54,4 53,9	172	50,0 55,0
MTs10	TGG (TTGCTG)5 (CTG)6 TTGCTG	F: GTTAGGCGGTGTCCTGTTGT R: GCCTTGCTAGCAGAAGCACT	52,6 52,5	145	57,0 57,9
MTs11	(GCA)7	F: TTCAACGGTGACCAGACGTA R: CAGCATTCTGGCTGCTGTAG	53,5 53,3	151	50,9 55,0

<sup>1</sup> **F** – *primer* Direto; **R** – *primer* Reverso; **Tm** – Temperatura calculada de anelamento dos *primers*; **c %** - Porcentagem de G e C dentro da seqüência do *primer*; **produto (bp)** - Tamanho esperado do produto em pares de bases.

A partir da Figura 2 é possível verificar que dos 11 *primers* desenhados, apenas aqueles referentes aos marcadores MTs4, MTs5 e MTs5-1 não apresentaram boas ampliações à temperatura de anelamento de 58°C. Os outros oito pares de *primers* produziram fragmentos específicos, com o tamanho esperado e de boa qualidade nesta referida temperatura. Foi também testada alteração na temperatura de anelamento para os três *primers* não amplificados, conseguindo-se amplificação

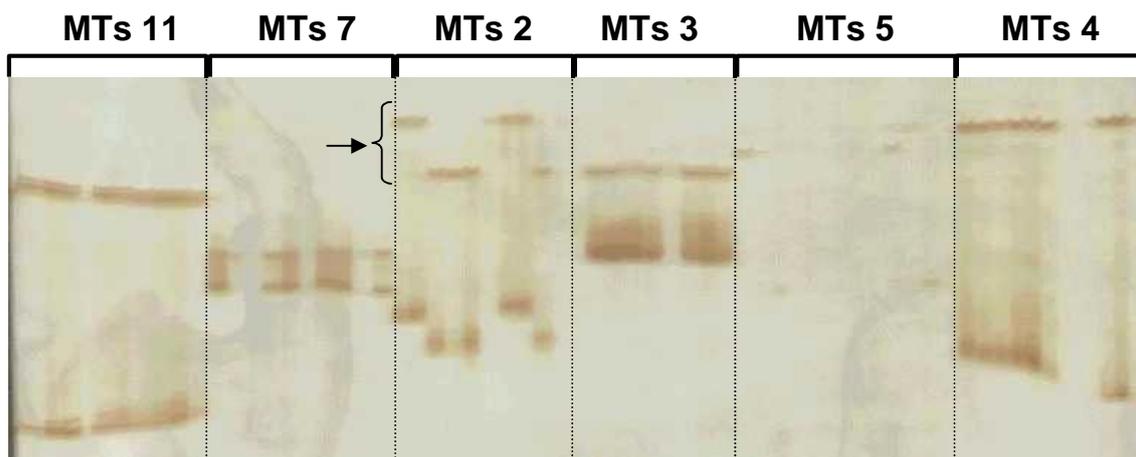
para o MTs4 e MTs5 (dados n. Ainda os *primers* MTs2, MTs3 e MTs11 sugerem uma pequena diferença de migração das bandas, indicando um potencial polimorfismo a ser investigado com maior resolução em gel de poliacrilamida 5%.



**Figura 2** – Resultado das ampliações via PCR dos marcadores microssatélites para a espécie *T. stromaticum* (MTs) em gel de agarose 0,8%. Para cada par de *primers*, foram utilizadas amostras de DNA de dois isolados, 56 (grupo II) e 662 (grupo I), indicados na parte inferior da foto por '1' e '2', respectivamente. Na parte superior são descritos os pares de *primers* utilizados nas ampliações. O destaque em vermelho ressalta os microssatélites para os quais não se obteve boa amplificação à temperatura de anelamento de 58°C, mas sim a uma temperatura de anelamento menor (ver texto)

#### 4.4.3. Análise de polimorfismo em gel de poliacrilamida

Utilizando-se primeiramente seis *loci* (MTs11, MTs7, MTs2, MTs3, MTs5 e MTs4) amplificados por PCR e aplicados em gel desnaturante de poliacrilamida 5%, os resultados mostraram apenas um *locus* nitidamente polimórfico, o MTs 2, cuja variação de tamanho nos fragmentos aparece indicada por setas (Figura 3). Assim, um mínimo de dois alelos foi identificado nesta pequena população de isolados, sendo o variante de maior tamanho encontrado nos isolados 643, 639, 679, 663, 662, todos pertencentes ao grupo genético I de *Ts* (SOUZA et al., 2005). As variações de tamanho aparentes para os *primers* MTs11 e MTs4 são resultados de distorções da ‘linha de frente’ de migração dos fragmentos no gel, ocorrida durante a eletroforese.



**Figura 3** – Análise de polimorfismo dos marcadores microssatélites para a espécie *T. stromaticum* (MTs) em gel desnaturante de poliacrilamida 5%, corado com nitrato de prata. Para cada par de *primers*, indicados na parte superior do gel, foram amplificados DNA dos 10 isolados sob estudo, aplicados sempre na mesma ordem da esquerda para a direita, conforme segue: 643, 639, 323, 64, 56, 679, 663, 662, 657, 1227 (exceto para o MTs 4, em que o isolado 657 não foi aplicado).

#### 4.5. DISCUSSÃO

Considerando que as condições ambientais são determinantes durante os processos e nos resultados dos diversos mecanismos de ação antagônica de muitos organismos, a seleção correta de um ACB (agente de controle biológico) é tão igualmente importante quanto à exatidão na caracterização de isolados com potencial de biocontrole (HERMOSA et al., 2000). Resultados de sucesso têm sido obtidos com o uso de polimorfismo do DNA para caracterização e diferenciação de muitos isolados de várias espécies de *Trichoderma* (SAMUELS et al., 2002; HERMOSA et al., 2000). Neste trabalho foi possível demonstrar a viabilidade da metodologia de desenvolvimento de marcadores microssatélites (SSRs) em *Trichoderma stromaticum* (*Ts*), a partir de seqüências genômicas conhecidas, apesar do número reduzido de isolados testados.

Considerando que marcadores microssatélites são baseados em amplificação de DNA por reação de polimerização em cadeia (PCR), era necessário primeiramente estabelecer um método suficientemente adequado para a obtenção

dos DNAs-molde. Os resultados obtidos com a metodologia de extração utilizada sugerem que os perfis de rendimento de DNA e de presença de RNA residual foram específicos para cada isolado e não estão relacionados entre si (Figura 1). Tais diferenças isolado-específicas são provavelmente explicadas pelas diferenças de estado fisiológico dos isolados no momento da extração, relacionadas tanto às diferenças genéticas entre eles quanto às distintas interações desses genótipos com o meio externo (temperatura, aeração, pH, tempo de cultura, etc.).

Paralelamente, os *loci* microssatélites identificados por inspeção visual de seqüências pré-caracterizadas de *Ts* (SOUZA et al., dados não publicados) permitiram o desenho de *primers* flanqueadores e foram, em sua maioria, amplificados com sucesso para os isolados examinados (Figura 2). Dessa forma, considerou-se bem sucedidas tanto a extração de DNA quanto a definição dos *primers* e protocolo de amplificação por PCR. No teste preliminar de amplificação analisado em gel de agarose 0,8% foi possível detectar alguns potenciais polimorfismos em alguns *loci*, mesmo utilizando somente dois isolados. A utilização de mais isolados e a aplicação da técnica de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida permitiu a confirmação inequívoca desses polimorfismos para o MTs2, inclusive demonstrando a existência de, no mínimo, dois alelos distintos (Figura 3). Como os isolados identificados como possuindo o variante de maior tamanho pertencem todos ao grupo genético I de *Ts* (SOUZA et al., 2005), sugere-se que tal marcador é capaz de distinguir ambos os grupos.

A continuidade do estudo aqui apresentado traz a perspectiva de se ampliar o número de marcadores polimórficos em *Ts*, o que será altamente benéfico na investigação de estruturas de populações e suas ecologias. Neste sentido, a utilização de marcadores SSR deverá corroborar trabalhos anteriores onde a existência de diversidade biológica e genética dentro da espécie *Ts* foi confirmada, tanto por marcadores do tipo RAPD (BEZERRA et al., 2003; COSTA et al., 2003), quanto por marcadores AFLP, (SOUZA, et al., 2005). O desenvolvimento de marcadores microssatélites iniciados com esse trabalho tem o potencial de aumentar a precisão nos estudos das propriedades genotípicas e de relações entre os isolados

de *Ts* podendo, eventualmente, também ser utilizado como um método de separação de isolados em sub-grupos. Outra possibilidade de aplicação será no estabelecimento de *fingerprinting* genético de isolados específicos, necessário para o acompanhamento inequívoco dos mesmos a campo, após aplicações visando controle biológico (HERMOSA et al., 2000), considerando as populações naturais da mesma espécie do ACB existentes no local (HOOPEN et al., 2003). Isto não somente será imprescindível para fins de monitoramento de riscos à segurança ambiental, mas também será útil quanto a aspectos relacionados à propriedade intelectual e uso de patentes.

#### 4.6. REFERÊNCIAS

BEZERRA J. L.; COSTA J. C.; BASTOS C. N.; FALEIRO F. G. *Hypocrea stromatica* sp. nov. teleomorfo de *Trichoderma stromaticum*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, p. 408-412, 2003.

CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J.; STEWART, E. L. *Hypocrea virens* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. *Mycologia*, v. 93, p.1113-1124, 2001.

COSTA, J.C.B; BASTOS, C.N. Controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero. In: **Anais da VII Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos**, Bento Gonçalves, RS. pp. 45-51. 2001.

COSTA, J.C.B.; FALEIRO, F.G.; FALEIRO, A.S.G.; BEZERRA, J.L.; BEZERRA, K.M.T.; DANTAS NETO, A.; MENEZES, P.V.S. Diversidade genética de isolados de *Trichoderma spp.* e *Hypocrea stromatica* da região cacauera do Brasil. In: 14a Conferência Internacional de Pesquisas do Cacau, 2003.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A.V.O. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 19, p. 229-306, 2001.

DRUMMOND, J. T.; LI, G.; LONGLEY, M. J.; MODRICH, P. Isolation of hMSH20-P160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science*, v. 268, p. 1909-1912, 1995.

FERREIRA, M. E.; GRAHAPOGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Editora Embrapa, 3ª Edição, p. 40-53, 1995.

HJELJORD, L.; TRONSMO, A. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: Harman, G.E. & Kubicek, C.P.(eds.) ***Trichoderma and Gliocladium - enzymes, biological control and commercial applications***. London, Taylor & Francis, vol 2, p. 131-151, 1998

HOOPEN, G.M.; REES, R.; AISA, P.; STIRRUP, T.; KRAUSS, U. Population dynamics of epiphytic mycoparasites of the genera *Clonostachys* and *Fusarium* for the biocontrol of black pod (*Phytophthora palmivora*) and moniliasis (*Moniliophthora roreri*) on cocoa (*Theobroma cacao*). *Mycological Research*, v. 107, p. 587-596, 2003

KUBICEK, C. P.; MACH, R. L.; PETERBAUER, C. K.; LORITO, M. 2002. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *Journal of Plant Pathology*, v.83, p.11-23 (special issue).

MACÊDO, J. N. A. Caracterização Funcional do Indutor de necrose de *Crinipellis pernicioso* em *Theobroma cacao* L. (Dissertação de Mestrado), Ilhéus-Bahia: UESC, 54 p. 2004.

MAKOVA, K. D.; NEKRUTENKO, A.; BAKER, R. J. Evolution of Microsatellite Alleles in Four Species of Mice (Genus *Apodemus*). *Journal of Molecular Evolution*, v. 51, p. 166-172, 2000.

QI, T.; OSPINA-GIRALDO, M.D.; ROMAINE, C.P.; SCHLAGNHAUFER, B.; XI, C.; HUFF, D. & ROYSE, D.J. Genetic analysis of the *Trichoderma* spp. Associated with the green mold epidemic in mushrooms. *Phytopathology*, v. 86, p. S89, 1996.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, v. 1, p. 17-20, 1985.

REHNER, S. A.; BUCKLEY, E. P. Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Molecular Ecology Notes*, v. 3, p. 409-411, 2003.

REZENDE, V. F. Análise genética da resistência foliar em milho. Tese doutorado. Piracicaba: Escola Sup de Agric. Luís Queiroz. 103p. 2004

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2<sup>a</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMUELS, G. J.; PARDO-SCHULTHEIS, R.; HEBBAR, K. P.; LUMSDEN, R. D.; BASTOS, C.N.; COSTA, J. C.; BEZERRA, J. L. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches' broom pathogen. *Mycological Research*, v.104, p.760-764, 2000.

SOUZA, J. T., POMELLA, A. W. V., BOWERS, J., PIROVANI, C. P., LOGUERCIO, L. L., HEBBAR, P. 2005. Genetic and Biological Diversity of *Trichoderma stromaticum*, a Mycoparasite of the Cacao Witches' Broom Pathogen. *Phytopathology* (in press) 2005.

STEIMEL, J.; ENGELBRECHT, C. J. B.; HARRINGTON, T. C. Development and characterization of microsatellite markers for the fungus *Ceratocystis fimbriata*. *Molecular Ecology Notes*, v. 4, p. 215-218, 2004.

WEBER, J.L. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*, v. 7, p. 524-530, 1990.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, v. 11, p. 1-16, 2002.

ZUCOLOTO, R. B. Desenvolvimento de sequências de DNA microssatélite para estudo de populações remanescentes de jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman Latirostris*), da região central do Estado de São Paulo. (Tese de Doutorado). Piracicaba-SP: Centro de Energia Nuclear na Agricultura (USP), 118 p., 2003.

## 5. CONCLUSÕES

- A esporulação de *T. stromaticum* é modulada pela ação coordenada dos diversos parâmetros meteorológicos.
- A umidade de vassoura, embora relevante, não é o único parâmetro determinante do efeito biológico dos ACBs.
- Existe clara tendência para a produção de conídio (esporulação) ocorrer sempre após *curtos intervalos* de um a três dias em que o nível de umidade é alto (acima de 30%) e conservado assim sem maiores variações.
- Há tendência de a variação diária de temperatura entre dia e noite, nesses curtos intervalos que antecedem a esporulação, ser na maioria das vezes de 2 °C.
- Há interferência da variação na radiação solar e na velocidade do vento no processo de esporulação de *Ts*, de acordo com os padrões apresentados nos curtos intervalos de um a três dias que antecedem esse evento.
- Os padrões de variação específicos antecedendo os eventos de esporulação sobre o solo, principalmente em termos de umidade e temperatura, são semelhantes aos registrados para as medições ao ar.
- A esporulação de *Ts* sobre vassouras no campo pode ser um adequado indicador para a performance de biocontrole de *Crinipellis perniciosa*.
- Ocorre um efeito de posição no dossel (altura) sobre a esporulação de *Ts*, provavelmente devido às diferenças encontradas nos fatores climáticos avaliados.
- Há uma resposta individual específica de isolados de *Ts* aos padrões de variação meteorológica.
- A metodologia empregada para o desenvolvimento de marcadores microssatélites a partir de seqüências genômicas de *Ts* previamente caracterizadas permitiu a identificação desses marcadores e análise de polimorfismos entre isolados.

## 6. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

ALVES, S. A. M. Epidemiologia da vassoura-de-bruxa [*Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer] em cacauzeiros enxertados em Uruçuca, Bahia. (**Dissertação de Mestrado**). Piracicaba-SP: Escola Superior de Agronomia Luís de Queiroz, 70p, 2002.

AMORIM, L. Disseminação. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos.**, 3 ed. São Paulo. Ceres, cap. 14, p.268-294, 1995.

ANDERBRHAN, T. Epidemiologia da vassoura-de-bruxa. Belém. CEPLAC/CEPEC, p.314-321, 1982 (Informe técnico).

ANDERBRHAN, T. Studies on the epidemiology and control of witches' broom disease of cocoa in the Brazilian Amazon. In: **International cocoa research conference IX**. Cocoa Producer's Alliance., Lomé, p. 395-402, 1985.

ANDERBRHAN, T.; HAMMERSTONE, J. F.; ROMANCZYK, L. J., FURTEK, D. B. Sensitivity of *Crinipellis perniciosa* to procyanidins from *Theobroma cacao* L. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.46, p.339-348, 1995.

ANDERBRHAN, T.; MADDISON, A. C.; ARIAS, R.; MAFFIA, L. A. Disease gradients of *Crinipellis perniciosa*. In: Rudgard, S. A.; Andebrhan, T.; Maddison, A.C. (eds). **Disease management in cocoa: Comparative epidemiology of witches' broom disease**. London, UK, Chapman & Hall. p. 157–164, 1993.

ANDERBRHAN, T. Rain water as factor in the dissemination of basidiospores of *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer within cacao trees. In: **International Cocoa Research Conference X**. Cocoa Producers Alliance, Lagos, p.367-369, 1987.

ANDERBRHAN, T.; FIGUEIRA, A.; YAMADA, M.M.; CASCARDO, J.; FURTEK, D.B. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis perniciosa*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p.1667-1675, 1999.

- ANDERBRHAN, T.; FURTEK, D. B. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis perniciosus* isolates from different hosts. **Plant Pathology**, v. 43, p.1020-1027, 1994.
- ARRUDA, M. C. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; MILLER, R. N. G.; RESENDE, M. L. V.; FELIPE, M. S. S. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis perniciosus* in different geographic origins and hosts. **Mycological Research**, v.107, n.1, p.25-37, 2003.
- BAKER, R. E. D.; HOLLIDAY, P. Witches' broom disease of cacao (*Marasmius perniciosus* Stahel). Commonwealth Mycological Institute, Richmond. (**Phytopathology Paper**, 2), 42p., 1957.
- BARAK, R.; ELAD, Y.; MIRELMAN, D.; CHET, I. Lectins: a possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, v.75, p.458-462, 1985.
- BARCELLOS, F. G. Caracterização genética e citológica da recombinação somática em *Trichoderma pseudokoningii*. **Tese de Doutorado**, Piracicaba-SP: Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, 92p., 2002.
- BARNETT, H.L. The nature of mycoparasitism by fungi. **Annual Review of Microbiology**, v.17, p.1-14, 1963.
- BENHAMOU, N.; CHET, I. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction among *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.2095-2099, 1997.
- BEZERRA, J. L.; COSTA, J. C.; BASTOS, C. N.; FALEIRO, F. G. *Hypocrea stromatica* sp. nov. teleomorfo de *Trichoderma stromaticum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.408-412, 2003.
- BOWERS, J. H.; BAILEY, B. A.; HEBBAR, P. K.; SANOGO, S.; LUMSDEN, R. D. The impact of plant diseases on world chocolate production. Online. **Plant Health Progress** doi:10.1094/PHP-2001-0709-01-RV, 2001.
- CAMPOROTA, P. Antagonism *in vitro* of *Trichoderma* spp. vis-a-vis *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Agronomie**, v.5. p.613-620, 1985.
- CHAMBERGO, F. S. Elucidação do destino metabólico de glicose no fungo filamentoso *Trichoderma reesei* por análise EST (Expressed Sequence Tags) e "microarrays" de cDNA. **Tese Doutorado**, São Paulo: Instituto de Química da USP, 108p., 2002.
- CHAMBERGO, F. S.; BONACCORSI, E.; FERREIRA, A.; RAMOS, A.; FERREIRA JR, R.; ABRAHÃO-NETO, J.; FARAH, J.; EL-DORRY, H.

Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using EST analysis and cDNA microarrays. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n.16, p. 13983-13988, 2002.

CHAVERRI, P.; CASTLEBURY, L. A.; OVERTON, B. E.; SAMUELS, G. J. *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. **Mycologia**, v.95, p.1100-1140, 2003.

CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J.; STEWART, E. L. *Hypocrea virens* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. **Mycologia**, v.93, p.1113-1124, 2001.

CHET, I. Mycoparasitism - recognition, physiology and ecology. *In*: Baker RR, Dunn PE, (eds). **New directions in biological control: Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases**. New York: Alan R. Liss, p.725-733, 1990.

CHET, I.; ELAD, Y. Mechanism of mycoparasitism. *In*: **Les antagonismes microbiens. Mode d'action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes**. Colloques de L'I.N.R.A., v.18, p.35-40, 1983.

CHET, I.; HENIS, Y. Effect of catechol and disodium EDTA on melanin content of hyphal and sclerotial walls of *Sclerotium rolfsii* Sacc. and the role of melanin in the susceptibility of these walls to beta 1,3 glucanase and chitinase. **Soil Biology & Biochemistry**, v.1, p.31-38, 1985.

CHET, I.; HARMAN, G. E.; BAKER, R.. *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. **Microbial Ecology**, v.7, p.28-29, 1981.

CLAYDON, N.; ALLAN, M.L.; HANSON, J.R.; AVENT, G.A. Antigungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.88, p.503-513, 1987.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens**. APS Press, St. Paul, 539p, 1983.

CORTES, C.; GUTIERREZ, A.; OLMEDO, V.; INBAR, J.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by a diffusible factor. **Molecular and General Genetics**, v.260, p.218-225, 1998.

COSTA, J. C. B. Progresso da vassoura-de-bruxa em órgãos vegetativos do cacauzeiro em Altamira e Tomé-Açu, PA. **Dissertação**. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa. 122p., 1993.

COSTA, J.C.B.; BASTOS, C.N. Controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero. *In: Anais da VII Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos*, Bento Gonçalves, RS. pp. 45-51, 2001.

COSTA, J.C.B.; BEZERRA, J.L.; CAZORLA, I.M. Controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero na Bahia com *Trichoderma polysporum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.21 (Suppl), p.397, 1996.

COSTA, J.C.B.; FALEIRO, F.G.; FALEIRO, A.S.G.; BEZERRA, J.L.; BEZERRA, K.M.T.; DANTAS NETO, A.; MENEZES, P.V.S. Diversidade genética de isolados de *Trichoderma spp.* e *Hypocrea stromatica* da região cacauera do Brasil. *In: International Cocoa Research Conference XIV*, Accra: COPAL, 2003.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I - Production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v.57, p.25-39, 1971a

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II - Production of volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v.57, p.41-48, 1971b.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III - Hyphal interaction. **Transactions of the British Mycological Society**, v.57, p.368-369, 1971c.

DIAS, L. A. S. **Melhoramento genético do cacauero**. Editora folha de Viçosa Ltda. 578 p., 2001.

DODD, S. L.; CROWHURST, R. N.; RODRIGO, A. G.; SAMUELS, G. J.; HILL, R. A.; STEWART, A. Examination of *Trichoderma* phylogenies derived from ribosomal DNA sequence data. **Mycological Research**, v.104, p.23-34, 2000.

ELAD, Y. (Editorial Review) Reasons for the delay in development of biological control of foliar pathogens. **Phytoparasitica**, v.18, p.99-105, 1990.

ELAD, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. **Crop Protection**, v.19, p.709-714, 2000.

ELAD, Y.; BARAK, R.; CHET, I. Possible role of lectins in mycoparasitism. **Journal Bacteriology**, v.154, n.3, p.1431-5, 1983.

ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.28, p.719-725, 1982.

ESPOSITO, E.; da SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critical Reviews in Microbiology**, v.24, n.2, p.89-98, 1998

EVANS, H. C. Witches' broom disease – a case study. **Cocoa Growers Bulletin**, v.32, p.5-19, 1981.

GAMS W.; MEYER W. What exactly is *Trichoderma harzianum*? **Mycologia**, v.90, p.904-915, 1998.

GÓMEZ, I.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates. **Molecular and General Genetics**, v. 256, p.127-135, 1997.

GRIFFITH, G. W.; BRAVO-VELASQUEZ, E.; WILSON, F. J.; LEWIS, D. M.; HEDGER, J. N. Autoecology and evolution of the witches' broom pathogen (*Crinipellis pernicioso*) of cocoa. In: Blakeman, J. P.; Williamson, B., (eds) **The Ecology of Plant Pathogens**, CAB Internacional, Wallingford, U.K., p.245-246, 1994.

GRIFFITH, W. G.; NICHOLSON, J.; NENNINGER, A.; BIRCH, R. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. **New Zealand Journal of Botany**, vol.41, p.423-435, 2003.

GRONDONA, I, HERMOSA, M. R.; TEJADA, M.; GOMIS M. D.; MATEOS P. F.; BRIDGE, P. D.; MONTE, E.; GARCÍA-ACHA, I. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.3189-3198, 1997.

HARAN, S.; SCHICKLER, H. CHET, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, v.142, p.2321-2331, 1996.

HARMAN, G.E.; CHET, I; BAKER, R. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biocontrol agent. **Phytopathology**, v.71, p.569-572, 1981.

HERMOSA, M.R.; GRONDONA, I.; ITURRIAGA, E.A.; DIAZ-MINGUEZ, J.M.; CASTRO C.; MONTE E.; GARCIA-ACHA I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma spp.* **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.1890-1898, 2000.

HJELJORD, L.; TRONSMO, A. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: Harman, G.E. & Kubicek, C.P.(eds.) **Trichoderma and Gliocladium – enzymes, biological control and commercial applications**. London, Taylor & Francis, vol 2, p. 131-151, 1998.

HOLLIDAY, P. Witches' broom disease of cacao (*Marasmius perniciosus* Stahel). London, H. M. **Stationery Office**, (Colonial, 286), 8p., 1952.

HOOPEN, G.M.; REES, R.; AISA, P.; STIRRUP, T.; KRAUSS, U. Population dynamics of epiphytic mycoparasites of the genera *Clonostachys* and *Fusarium* for the biocontrol of black pod (*Phytophthora palmivora*) and moniliasis (*Moniliophthora roreri*) on cocoa (*Theobroma cacao*). **Mycological Research**, v.107, p.587-596, 2003.

INBAR, J.; CHET, I. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, v.141, p.2823-9, 1995.

JACOB, H.J.; LINDPAINTNER, K.; LINCOLN, S.E.; KUSUMI, K.; BUNKER, R.K.; MAO, Y.P.; GANTEN, D.; DZAU, V.J.; LANDER, E.S; Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell**, v.67, p.213-24, 1991.

KINDERMANN, J.; EL-AYOUTI, Y.; SAMUELS, G. J.; KUBICEK, C. P. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster. **Fungal Genetics and Biology**, v.24, p. 298-309, 1998.

KUHLS, K.; LIECKFELDT, E.; SAMUELS, G. J.; BÖRNER, T.; MEYER, W.; KUBICEK, C. P. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. **Mycologia**, v.89, p.442-460, 1997.

LANA, T. G. Caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis perniciosus*. **Tese de Doutorado**, Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, 106p., 2004.

LIECKFELDT, E.; SAMUELS G. J.; NIRENBERG H. I.; PETRINI, O. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: Is it one or two species? **Applied Environmental Microbiology**, v.65, p.2418-2428, 1999.

LIECKFELDT, E.; SAMUELS, G.J.; BÖRNER, T.; GAMS, W. *Trichoderma koningii*: Neotypification and *Hypocrea* teleomorph. **Canadian Journal of Botany**, v.76, p.1507-1522, 1998.

LORITO, M. HAYES; C. K. DI PIETRO, A.; WOO, S. L.; HARMAN, G. E.; Purification, characterization and synergistic activity of a glucan 1,3- $\beta$ glucosidase and an N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v.84, p.398-405, 1994.

LORITO, M., HARMAN, G. E., HAYES, C. K., BROADWAY, R. M., TRONSMO, A., WOO, S. L., DI PIETRO, A. chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. **Phytopathology**, v.83, p. 302-307, 1993.

LORITO, M.; PETERBAUER, C.; HAYES, C. K.; HARMAN, G. E. Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. **Microbiology**. v.140, p.623-9, 1994.

LUZ, E. D. M. N.; BEZERRA, J. L.; RESENDE, M. L. V.; OLIVEIRA, M. L. Doenças do cacauero. In: Vale, F. X. R. do; Zambolim, L. (eds.). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa: UFV, cap.13, p. 611-655, 1997.

MANCZINGER, L.; ANTAL, Z.; KREDICS L. Ecophysiology and breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains (a review). **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v.49, n.1, p.1-14, 2002.

MELO, I.S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. (ed.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPDA, p.135-156, 1991.

MÜLLER, E.; AEBI, B.; WEBSTER, J. Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma*. V. *Hypocrea psychrophila* sp. nov. **Transactions of British Mycological Society**, v.58, p.1-4, 1972.

NIELLA, G. R. Esporulação de *Crinipellis pernicioso* em frutos e sementes de cacau (*Theobroma cacao* L.) no sudeste da Bahia. **Agrotrópica**, v.3, p. 135-140, 1997.

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocadium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 23, p. 23-54, 1985.

PEREIRA, J. L.; RAM, A.; FIGUEREDO, J. M. de; ALMEIDA, L. C. C. de. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotrópica**, v.1, p. 79-81, 1989.

PEREIRA, J. L. A.; DE ALMEIDA, L. C. C.; SANTOS, S. M. Witches' broom disease of cocoa in Bahia: attempts at eradication and containment. **Crop Protection**, v. 15, n.10, p.743-752, 1996.

RAI, B.; SINGH, V.T.; SINGH, D.B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. **Plant and Soil**, v.57, p.131-135, 1980.

REESE, E.; MANDELS, M. Rolling with the times: production and applications of *Trichoderma reesei* cellulase. **Annual Reports of Fermentative Processes**, v.7, p. 1-20, 1989.

REY, M.; JARANA, D. J.; RINCON, M. A.; LIMON, C. M. A.; BENITEZ, T. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. Universidad de Sevilla y Depto. de Genética. Facultad de Biología. Espanha. **Revista Iberoamericana de Micología**, p.31-36, 2000.

RIDOUT, C.J.; COLEY-SMITH, J.R.; LYNCH, J.M. Fractionation of extracellular enzymes from mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.10, p.180-187, 1988.

RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, v.116, p.1-56, 1969.

RUDGARD, S. A. Detailed description of symptoms of witches' broom disease of cocoa caused by *Crinipellis pernicioso*. **Cocoa Growers Bulletin**, n.41, 32p., 1989.

SAMUELS, G.J.; LODGE, D.J. Three species of *Hypocrea* with stipitate stromata and *Trichoderma* anamorphs. **Mycologia**, v.88, p. 302-315, 1996.

SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; GAMS, W.; CASTLEBURY, L. A.; PETRINI, O. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, v.4, p.146-168, 2002.

SAMUELS, G. J.; PARDO-SCHULTHEIS, R.; HEBBAR, K. P.; LUMSDEN, R. D.; BASTOS, C.N.; COSTA, J. C.; BEZERRA, J. L. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches' broom pathogen. **Mycological Research**, v.104, p.760-764, 2000.

SANOGO, S.; POMELLA, A.; HEBBAR, P.K.; BAILEY, B.; COSTA, J.C.B.; SAMUELS, G.J.; LUMSDEN, R.D. Production and Germination of Conidia of *Trichoderma stromaticum*, a Mycoparasite of *Crinipellis pernicioso* on Cacao. **Phytopathology**, v.92, p.1032-1037, 2002.

SILVA, M. S.; LUZ, N. E.; DE ALMEIDA, C. A.; GRAMACHO, P. K.; BEZERRA, L. J. Redescricao da sintomatologia causada por *Crinipellis pernicioso* em cacauero. **Agrotrópica**, v. 14, n. 1, p.1-28, 2002.

STAHEL, G. *Marasmius perniciosus* nov. species. Departamento van den Landbonw in Surinam. **Bulletin**, v. 33, p.1-26., 1915.

THOROLD, C. A. Witches' broom disease. In: Thorold, C. A. (ed.). **Disease of cocoa**. Oxford. Claredon Press. p.11-31, 1975.

TÓTH, G., GÁSPARI, Z., JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, v. 10, p. 967-81. 2000.

TOVAR, G. La escoba de bruja del cacao [ *Crinipellis pernicioso* (Stahel)]: descripción de sistemas de la enfermedad. **Agronomia Colombiana**, v.8, n.1, p. 227-239, 1991.

VAJNA, L. Mutual parasitism between *Trichoderma hamatum* and *Trichoderma pseudokoningii*. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.113, p.300-303, 1985.

WEINDLING, R. Isolation of toxic substances from the culture filtrates of *Trichoderma* and *Gliocladium*. **Phytopathology**, v.27, p.1175-1177, 1937.

WENT, F. A. F. Krulloten en versteende vruchten van de cacao in Suriname. Amsterdam. **Verhandelingen der K. akademie van wetenschappen 2 Sect. 10** 1-40, 1904.

WHIPPS, J. M. Microbial Interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal Experimental of Botany**, v.52, p.487-511, 2001.

WOO, S.; FOGLIANO, V.; SCALA, F.; LORITO, M. Synergism between fungal enzymes and bacterial antibiotics may enhance biocontrol. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.81, n.1-4, p.353-6, 2002.