



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ATIVIDADE BIOCONTROLADORA DE *Trichoderma* spp. E DE LEVEDURAS SOBRE *Diaporthe destruens*

THAÍS REGINA PINTINO DE ALMEIDA

**Recife – PE
2018**

THAÍS REGINA PINTINO DE ALMEIDA

**ATIVIDADE BIOCONTROLADORA DE *Trichoderma* spp. E DE LEVEDURAS
SOBRE *Diaporthe destruens***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador (a): Delson Laranjeira

Coorientadores: Marcos Paz Saraiva Câmara e Rejane Pereira Neves

**RECIFE-PE
FEVEREIRO - 2018**

**ATIVIDADE BIOCONTROLADORA DE *Trichoderma* spp. E DE LEVEDURAS
SOBRE *Diaporthe destruens***

THAÍS REGINA PINTINO DE ALMEIDA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 27/02/2018.

ORIENTADOR(A): _____
Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

EXAMINADORES: _____
Prof. Dra. Rejane Pereira Neves (UFPE)

Prof. Dra. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

**RECIFE-PE
FEVEREIRO - 2018**

A Deus, por iluminar meus caminhos e guiar meus passos e por estar comigo em todas as dificuldades, mostrando-me que cada obstáculo me fortaleceu nessa caminhada.

Aos meus pais, Roberto e Marinalva, por acreditarem em mim, mesmo quando eu não acreditava, por nunca me deixarem fraquejar, por todas as noites em claro estudando comigo e por sempre me incetivarem a ir atrás dos meus sonhos.

DEDICO

Ao meu namorado, Andrey Thyago, por todo apoio dado durante as etapas experimentais e por estar ao meu lado nos momentos bons ou ruins.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para o alcance deste degrau.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo cuidado, amparo, força, amor, direção, paciência e livramentos concedidos, permitindo minha existência e meu trajeto por esse caminho.

Aos meus pais, Roberto e Marinalva, pelos ensinamentos, amor, incentivo, apoio e confiança. Se eu cheguei até aqui, devo tudo a eles.

Ao meu orientador Dr. Delson Laranjeira aos meus Coorientadores Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara e Dra. Rejane Pereira Neves, pela orientação, paciência, compreensão, e por todos os ensinamentos repassados durante a minha permanência no Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia (UFRPE).

À Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE pelo apoio institucional e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pelas contribuições necessárias à minha formação.

Aos meus irmãos, Pedro, André e Simone pelo amor, apoio, incentivo e orações.

Ao meu namorado, Andrey Thyago que esteve ao meu lado em todos os momentos, pelo apoio, carinho e confiança e a toda sua família.

A todos os meus familiares que sempre demonstraram desejos positivos e torceram pelo meu sucesso.

Aos meus amigos Patrícia, Jhonatha, Felipe, Leonam, Tarciana, Marcelo, Tiago, Francisco Jorge e Mariana, por todo companheirismo e auxílio em todos os momentos e a todos os estagiários do LAFSOL, Jorge, Gabrielly, Julianne, Igor, Sérgio, Mateus, Odaísa, Letícia, por toda ajuda nos experimentos.

À Iwanne Coelho por todos os ensinamentos passados, pela atenção e por todo auxílio em todos os momentos.

À Maria Aparecida Pontes, Leirson Vasconcelos e Erivelton Gomes, ao Secretário de Agricultura de Belém de Maria, João Lyra, aos técnicos do IPA das cidades de Palmares, Belém de Maria e Lagoa dos Gatos, aos agricultores e a Adelmo (LAFSOL) pela contribuição com material vegetal utilizados neste trabalho.

À Maria do Carmo, Edivânia, Luís Coelho e Luís pela companhia durante os pelas palavras de fé durante os experimentos.

Aos funcionários Romildo de Darci, pela amizade, atenção e suporte durante o curso.

Então a nossa boca se encheu de riso, e a nossa língua, de júbilo; então, entre as nações se dizia: Grandes coisas o SENHOR tem feito por eles. Com efeito, grandes coisas fez o SENHOR por nós; por isso, estamos alegres.

Salmo 126.

Sumário

CAPÍTULO I.....	10
INTRODUÇÃO GERAL	11
1. IMPORTÂNCIA DA CULTURA DA BATATA-DOCE	11
2. MAL-DO-PÉ DA BATATA-DOCE.....	13
3. CONTROLE BIOLÓGICO	16
3.1. <i>Trichoderma</i> spp.	18
3.2. Leveduras.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
CAPÍTULO II	28
Atividades de biocontrole de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Diaporthe destruens</i>	28
RESUMO	29
ABSTRACT.....	30
INTRODUÇÃO.....	31
RESULTADOS.....	33
DISCUSSÕES.....	34
MATERIAL E MÉTODOS	34
CONCLUSÕES	40
AGRADECIMENTOS.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
ANEXO I – FIGURAS.....	44
ANEXO II – TABELAS.....	46
CAPÍTULO III.....	50
Potencial biocontrolador de <i>Candida orthopsilosis</i> e <i>Moesziomyces aphidis</i> sobre <i>Diaporthe destruens</i>	50
RESUMO	51
ABSTRACT.....	52
INTRODUÇÃO	53
MATERIAL E MÉTODOS	55
RESULTADOS.....	58
DISCUSSÃO.....	64
CONCLUSÕES	65
AGRADECIMENTOS.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
CONCLUSÕES GERAIS	73

RESUMO GERAL

A ocorrência do Mal-do-pé da batata-doce, que tem como agente causal *Diaporthe destruens*, representa uma ameaça para toda a cadeia de produtiva da cultura, devido à dificuldade de manejo da doença, não havendo registro de fungicidas no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para manejo da doença. O controle biológico, utilizando *Trichoderma* spp. e leveduras, promissores agentes antagonistas, é uma solução eficiente e pode ser aplicada com o manejo da cultura. O trabalho teve como objetivo selecionar espécies de *Trichoderma* e de leveduras com potencial biocontrolador sobre *Diaporthe destruens*. Realizou-se o teste de patogenicidade com os isolados obtidos de ramas doentes, selecionando o mais agressivo para os estudos. Avaliou-se o antagonismo *in vitro* dos isolados de *Trichoderma* spp., através do pareamento de cultura e das leveduras por cultivo conjunto, difusão de compostos e produção de toxinas *Killer*. Para realização dos testes *in vivo*, as mudas de batata-doce, variedades Co-Roxa e Co-Branca, foram produzidas em casa de vegetação. Para os ensaios com *Trichoderma* spp., os tratamentos foram compostos de substrato infestado com os nove isolados do antagonista. Para os testes com as leveduras, as plantas foram aspergidas por uma suspensão de células dos 15 isolados selecionados *in vitro*. Em ambos os ensaios, a inoculação do patógeno foi realizada através de discos, em duas regiões distintas da planta. Foram obtidos 110 isolados fúngicos, nos quais 60 foram patogênicos, selecionando o isolado TH9 (*Diaporthe destruens*) para os ensaios. Dos 21 isolados de *Trichoderma* spp. obtidos para o estudo, nove obtiveram melhores resultados no pareamento e três foram mais eficientes no controle do patógeno *in vivo*, identificando-se duas espécies *T. longibrachiatum* (013) e *T. asperellum* (162 e 177). Das 52 leveduras testadas, 15 apresentaram 100% de inibição do crescimento micelial do patógeno na difusão de compostos. Nos ensaios de toxina *Killer*, houve diferença de intensidade do halo expressado pelas leveduras. Em ambas as variedades, quatro isolados foram eficientes na redução dos sintomas da doença *in vivo*, identificando-se duas espécies de leveduras *Moesziomyces aphidis* (LFB13 e LCB15) e *Candida orthopsilosis* (LFB22 e LFB25) potencialmente biocontroladoras. Este é o primeiro relato da redução dos sintomas do mal-do-pé da batata-doce pela ação antagônica de *Trichoderma* spp., *M. aphidis* e *C. orthopsilosis*, podendo esses antagonistas serem utilizados no manejo da doença.

Palavras-chaves: Antagonismo. Controle Biológico. *Diaporthe destruens*.

GENERAL ABSTRACT

The occurrence of foot rot caused by *Diaporthe destruens* compromises the productivity of sweet potato and poses a threat to the entire production chain of tuber, there are no fungicide registered in the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) for the management of this disease. Biological control, using *Trichoderma* spp. and yeast, promising antagonist agents, is an efficient solution and can be applied with the crop management. The study aimed to select species of *Trichoderma* and yeasts with biocontrol potential on *Diaporthe destruens*. The pathogenicity test was performed with the isolates obtained from diseased branches, selecting the most aggressive for the studies. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. was evaluated by pairing culture and yeast by pairing culture, compound diffusion and Killer toxin production. In the *in vivo* tests, sweet potato seedlings, Co-Roxa and Co-Branca varieties, were produced in a greenhouse. For the trials with *Trichoderma* spp. the treatments were composed of substrate infested with the nine isolates of the antagonist. For the yeast tests, the plants were sprayed by a cell suspension of the selected isolates *in vitro*. In both testes, the inoculation of the pathogen was carried out through disks, in two distinct regions of the plant. 110 fungal isolates were obtained, in which 60 were pathogenic, selecting the isolate TH9 (*Diaporthe destruens*) for the tests. Of the 21 isolates of *Trichoderma* spp. obtained in the study, nine obtained better results in the pairing and three were more efficient in controlling the pathogen *in vivo*, identifying two species *T. longibrachiatum* (013) and *T. asperellum* (162 and 177). Of the 52 yeasts tested, 15 showed 100% inhibition of the mycelial growth of the pathogen in the diffusion of compounds. In the Killer toxin assays, there was a difference in halo intensity expressed by yeasts. In both varieties, four isolates were efficient in reducing the symptoms of the disease *in vivo*, identifying two species of yeasts *Moesziomyces aphidis* (LFB13 and LCB15) and *Candida orthopsilosis* (LFB22 and LFB25) potentially antagonists. This is the first report of the reduction of the symptoms of foot rot of sweet potato by the antagonistic action of *Trichoderma* spp., *M. aphidis* and *C. orthopsilosis*. These antagonists can be used in the management of the disease.

Keywords: Antagonism. Biological control. *Diaporthe destruens*.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

ATIVIDADE BIOCONTROLADORA DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. E DE LEVEDURAS SOBRE *Diaporthe destruens*

INTRODUÇÃO GERAL

1. IMPORTÂNCIA DA CULTURA DA BATATA-DOCE

A batata doce (*Ipomoea batatas* L.) pertence à família Convolvulaceae e tem origem na América Central e do Sul. Há relatos de sua existência há mais de dez mil anos, tendo como base a análise de materiais vegetais encontrados em cavernas no Peru (EMBRAPA, 2008). É uma cultura produzida em 111 países, sendo 84% da produção na Ásia, 12,7% na África, 2,6% nas Américas, 0,6% na Oceania e 0,1% na Europa. A China é o maior produtor mundial (3.685.254 t) atingindo produtividade média de 23,1 t. ha⁻¹, sendo o Brasil o 19º produtor mundial (FAO, 2009).

O faturamento médio anual da cultura gira em torno de R\$ 326.000,00, com uma produção de 595.977 toneladas de batata-doce/ano (IBGE, 2016). De acordo com Palmieri; Rodrigues e Marcomini (2017), em 2016, São Paulo e Minas Gerais foram os estados com maiores produções de batata-doce, no Brasil, correspondendo a 57% do total, isso se deve à aplicação de novas tecnologias na produção da cultura, que era negligenciada por ser considerada rústica. O estado de Pernambuco está entre os dez maiores produtores do país, com uma produção média de 12.844 toneladas (IBGE, 2016).

Podendo ser utilizada na indústria alimentícia, na forma de farinhas, cozida ou na fabricação de doces, e na indústria energética, como matéria-prima na produção de biocombustíveis (Castro e Emygdio 2009), a batata-doce vem ganhando espaço entre os consumidores, sendo cultivada como cultura anual, devido ao armazenamento de reservas nutritivas. Fatores como rusticidade e adaptabilidade a diversas condições edafoclimáticas, entre elas a seca, fazem a cultura ser de fácil manutenção, sendo assim cultivada em todo território nacional (PEREIRA et al., 2014).

A planta possui caule herbáceo, de hábito prostrado, com ramificações de variáveis cores, tamanhos e pilosidades. As folhas são largas, com formato, cores e recortes variáveis, pecíolo longo, flores hermafroditas com fecundação cruzada, por conta da sua autoincompatibilidade e frutos do tipo cápsula deiscente com duas, três ou quatro sementes com 6 mm de diâmetro e cor castanho-clara, sendo o tempo entre a fertilização floral e a deiscência dos frutos de seis semanas. A batata-doce possui dois tipos de raiz: raiz de reserva, ou tuberosa, e raiz

absorvente. As raízes tuberosas são as de maior importância comercial e são originadas, desde o início do desenvolvimento da planta, nos nós, têm poucas raízes secundárias e são mais espessas, o que facilita sua identificação. Já as raízes absorventes se formam do meristema cambial, quer seja nos nós ou nos entrenós, são altamente ramificadas, tornando sua identificação mais fácil (NASCIMENTO, 2013).

Por conta do desenvolvimento subterrâneo das túberas, os solos ideais para o cultivo de batata-doce são os mais leves (arenosos ou arenoargilosos), soltos, bem estruturados, de média fertilidade, bem drenados e com boa aeração, facilitando o desenvolvimento e crescimento lateral das raízes. Solos com essa textura, além de propiciar melhores condições para o desenvolvimento das túberas, facilitam a colheita, diminuindo assim os danos mecânicos causados no arranquio, reduzindo assim a incidência de patógenos (SOARES; MELO; MATIAS, 2002; EMBRAPA, 2006).

A propagação da planta é feita através de mudas, estacas, sementes ou cultura de tecidos. Dentre essas formas de propagação, as ramas são as mais utilizadas e mais recomendadas, pois, além de serem mais econômicas, preservam as características genéticas originais do material vegetal. O espaçamento adequado para a cultura varia de 80 a 100 cm entre leiras e de 25 a 40 cm entre plantas e 20-30 cm de altura, facilitam a drenagem, a aeração do solo, os tratamentos culturais e a colheita, e ajudam na conservação do solo. Os camalhões para plantio das mudas variam entre 20 e 30 cm, altura essa que facilita a drenagem e aeração do solo, os tratamentos culturais e a colheita (MARQUES, 2015).

Apesar de ser considerada uma cultura rústica, a adubação mineral é de extrema importância para se obter uma boa produtividade. Dentre os elementos mais requeridos pela cultura encontram-se o Potássio, Nitrogênio, Fósforo e Cálcio, em ordem decrescente de importância. Alguns dados relatam que para produção de 13 Mg.ha⁻¹ de raízes, a batata-doce extrai do solo, aproximadamente, 60 a 113 kg de Nitrogênio; 20 a 45,7 kg de Fósforo (P₂O₅); 100 a 236 kg de Potássio (K₂O); 31 a 35 kg de Cálcio (CaO) e 11 kg de Magnésio. Para a produção de 30 Mg.ha⁻¹ de raízes, a cultura extrai 129 kg de N; 50 kg de P₂O₅ e 25 kg de K₂O. Vale salientar que a extração de nutrientes varia de acordo com as características químico-físicas do solo, a cultivar, do clima e do ciclo da cultura. Produzida em sua maioria por pequenos agricultores, uma das mais comuns formas de adubação é a orgânica, através de esterco bovino, compostagem e, principalmente, cama de frango (MARQUES, 2015).

De acordo com Oliveira et al. (2000), os principais tratamentos culturais adotados para o manejo da cultura são capina e amontoa, com intuito de minimizar a densidade de plantas daninhas na área, diminuindo a competição das invasoras com as plantas cultivadas, principalmente até os

45 dias após o plantio, onde há maior competição por nutrientes e espaço. A produtividade da cultura, em certas ocasiões, pode ser reduzida, devido à ação de patógenos, dentre eles os radiculares. Por ser considerada uma cultura rústica, a batata-doce é produzida, em sua maioria, sob baixo nível tecnológico, sendo usado, no geral, irrigação, fertilizantes e agrotóxicos. A falta de tecnologia é um dos fatores que fazem com que a produtividade da cultura seja menor do que a obtida se a tecnologia fosse empregada corretamente. Outro fator que causa diminuição na produtividade é a incidência de doenças, dentre as principais doenças que afetam a cultura estão a murcha de fusarium, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas*, injúrias ocasionadas por nematóides, dentre eles *Meloidogyne* spp. e *Rotylenchus* spp. e o Mal-do-pé da batata-doce (PEREIRA; FERNANDES; PINHEIRO, 2011).

2. MAL-DO-PÉ DA BATATA-DOCE

Os patógenos radiculares, também conhecidos como habitantes do solo, afetam diretamente o produto comercial da cultura, as raízes tuberosas. Dentre as principais doenças que afetam a cultura esta o mal-do-pé da batata-doce, que tem como agente causal o fungo *Diaporthe destruens*. Espécies do gênero *Diaporthe* são conhecidamente importantes patógenos de culturas economicamente importantes, sejam elas grãos, árvores ou plantas ornamentais, sendo espécies com ampla gama de hospedeiros. O fungo *D. helianthi* é um exemplo de espécies do gênero que causam doenças em culturas economicamente importantes, que é o Girassol (*Helianthus annuus*), com perdas de até 40% na produtividade da cultura, na Europa. *D. neoviticola* e *D. vitimegaspora* são patógenos conhecidos por causarem manchas foliares na videira (*Vitis vinifera*). *D. foeniculina* e *D. sterilis* são responsáveis por causar cancro e queda dos frutos em plantas de abacate, em regiões tropicais e subtropicais (MASIREVIC; GULYA, 1992; THOMPSON et al., 2011; GUARNACCIA et al. 2016; GAO et al., 2017).

Os principais sintomas observados em doenças causadas por este gênero são manchas foliares, cancos, murchas e morte descendente. Altos níveis de infestação em cultivares suscetíveis, podem ocasionar perdas de até 80% na produtividade da batata-doce, principalmente em áreas onde não há rotação de cultura e o cultivo é intenso, deixando-as inviabilizadas para produção (PEREIRA; FERNANDES e PINHEIRO, 2011).

Inicialmente, Harter (1903) classificou o agente causal como *Plenodomus destruens*, porém, anos mais tarde, Boereme; Loerakker e Hamers (1996), através de análises morfológicas, reclassificaram como *Phomopsis destruens*, pois, de acordo com seus estudos, não há elementos suficientes que diferenciem o patógeno dos demais integrantes do gênero

Phomopsis. Em 2013, o artigo 59, que permitia a nomenclatura binomial para fungos pleiomórficos, foi retirado do Código Internacional de Nomenclatura de algas, fungos e plantas, sendo então atribuído para o fungo anamorfo e teleomorfo o mesmo nome (GOMES et al, 2013). Diante disso, Gao et al. (2017) reclassificaram alguns fungos do gênero *Phomopsis* como *Diaporthe*, tendo em vista a similaridade entre as regiões ITS, EF1- α , TUB2, CAL e HIST. Desta forma, o nome correto do agente causal do mal-do-pé da batata-doce é *D. destruens*.

A classificação do gênero *Diaporthe* é baseada em dados morfológicos e, principalmente, em filogenia molecular, sendo mais estudadas as sequências das regiões ITS do DNA ribossomal e sequência parcial do gene que codifica o Fator de Elongação (EF1- α). Diante desses dados, os isolados desse gênero se agruparam por regiões geográficas (REHNER; UECKER, 1994). A espécie *D. destruens* é caracterizada por picnídios escuros, produzidos de forma isolada ou agrupada, com rostro alongado. Os conídios são unicelulares, oblongos, medindo $6 - 10 \times 3 - 4 \mu\text{m}$. Ocasionalmente, pode produzir clamidósporos pigmentados isolados ou agregados. Temperaturas entre 21 a 32°C e elevada umidade relativa do ar, são características que favorecem a germinação, o crescimento e o desenvolvimento do patógeno.

D. destruens pode afetar a cultura em todas as fases de desenvolvimento, desde o semeio até as túberas no armazenamento, pois os conídios são capazes de sobreviverem nas túberas armazenadas, podendo infectar as mudas após o plantio. A sobrevivência de *D. destruens* se dá por meio de restos de cultura, plantas hospedeiras da família Convolvulaceae e através de estruturas de resistência (clamidósporos), podendo permanecer no solo por até três anos (PEREIRA; FERNANDES e PINHEIRO, 2011). Apesar de sobreviver em plantas hospedeiras alternativas, *D. destruens* mostra-se patogênico apenas a espécies da família *Convolvulaceae*. Alguns estudos mostram que a adubação orgânica, amplamente utilizada na agricultura familiar, pode potencializar a ação do patógeno, acentuando a severidade da doença (PEREIRA; FERNANDES e PINHEIRO, 2011).

Inicialmente o fungo causa um cancro, de coloração castanha a preta, na base da haste das plantas. Após os sintomas iniciais é possível observar a murcha da planta, seguida pelo amarelecimento das folhas e morte da planta. Em níveis altos de infestação, a doença pode causar destruição do sistema radicular das plantas, impedindo a formação de raízes tuberosas, parte de principal valor econômico. As lesões da haste podem atingir de 10 a 20 cm acima da linha do solo e se estenderem até as raízes, com podridão total destas. O patógeno cresce abaixo da periderme de raízes novas e provoca uma podridão seca e escura, que continua a

progredir lentamente durante o armazenamento, tornando-as inúteis para o consumo. Nas regiões afetadas do caule, com o desenvolvimento dos sintomas aparecem pontuações pretas, denominadas picnídios, que são estruturas de reprodução do patógeno. Os sintomas no campo são visualizados em formas de reboleira e tendem a evoluir durante o armazenamento, danificando parcialmente as raízes tuberosas e inviabilizando seu uso na produção de mudas (PEREIRA et al., 2014).

O patógeno é disseminado, principalmente, através de material propagativo infectado. Isso se deve ao fato da principal forma de propagação da cultura ser através de ramos oriundas de outras áreas. Ventos acompanhados de chuva, insetos o ser humano são outras formas de disseminação da doença a longas distâncias. Máquinas agrícolas, ferramentas contaminadas e a movimentação do solo através do uso dos implementos, também são formas de disseminação do patógeno, a curta distância (PEREIRA; FERNANDES e PINHEIRO, 2011).

O manejo da doença é feito principalmente através do controle cultural e genético. O controle cultural visa evitar a entrada ou erradicar o patógeno, proteger o hospedeiro, induzir a resistência ao patógeno, além da realização do tratamento prévio de partes infectadas da planta. Essas são as principais medidas de manejo adotadas na redução da severidade da doença (SILVA; MELO, 2013). Uma das medidas de controle mais empregadas no manejo da doença é a aquisição de mudas sadias, tendo em vista que a principal forma de disseminação da doença a longas distâncias é através de mudas infectadas.

Recomenda-se a remoção de restos culturais e de plantas voluntárias com o intuito de diminuir a densidade de inóculo na área. Outra técnica de manejo empregada é a rotação de culturas, porém esta técnica está começando a entrar em desuso, pois se torna inviável ao agricultor a substituição da cultura por outras de menor expressividade econômica. Além disso, a rotação de cultura não é de extrema eficiência, pois há relatos que o patógenos pode permanecer no solo por até três anos, por meio de estruturas de resistência, denominadas clamidósporos. A adubação orgânica é uma prática que precisa ser monitorada, pois o nitrogênio encontrado no adubo favorece o desenvolvimento do patógeno (MARQUES, 2015).

Sendo um dos mais importantes avanços tecnológicos da agricultura, o controle genético é o preferido por alguns produtores, pois, em alguns casos, torna-se mais barato e de utilização mais fácil. É o mais eficiente método de controle empregado no manejo do mal-do-pé da batata-doce, tendo a cultivar Princesa como uma das que apresentam reação de resistência (CAVALCANTI; COELHO e PEREZ, 2002). Entretanto, Pereira; Fernandes e Pinheiro (2011) identificaram que a resistência da cultivar Princesa é parcial. Diante disso, cultivares

lançadas pela EMBRAPA foram submetidas a testes de reação de genótipos ao patógeno, sendo identificadas como as mais resistentes a CNPH – 1221 e CNPH – 1216, indicando que a resistência pode ser vencida pelo patógeno ao decorrer do tempo. Porém, nem todas as variedades ditas resistentes, se adaptam bem a todas as regiões produtoras, sendo esse o maior problema encontrado nas cidades produtoras do estado de Pernambuco. As variedades fornecidas para a região são extremamente suscetíveis ao patógeno, tendo a doença, devastado grande parte da plantação.

No Brasil, de acordo com o site do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), ainda não há produtos químicos registrados para o manejo do mal-do-pé da batata-doce, dificultando o controle (AGROFIT, 2018). Diante da dificuldade no manejo da doença em grandes áreas e do impacto econômico ocasionado pelo patógeno, é necessário o estudos de outros métodos de controle, dentre eles o controle biológico. Este controle pode ser conceituado, de uma forma mais abrangente, como a “redução da soma do inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem” (COOK; BAKER, 1983). Estes autores ainda afirmam que crescimento, virulência e agressividade, além de outros caracteres atribuídos ao patógeno, ou processos que determinam infecção, desenvolvimento e surgimento de sintomas são atividades determinantes de doenças.

3. CONTROLE BIOLÓGICO

De acordo com Bettiol et al. (2008a), os organismos envolvidos no controle biológico são indivíduos ou populações avirulentas ou hipovirulentas pertencentes a essas espécies patogênicas, além de plantas manipuladas para adquirirem resistências aos patógenos. Diante disso, o controle biológico é acompanhado por práticas culturais, com intuito de obter condições favoráveis para o bom desenvolvimento do antagonista.

Os principais mecanismos utilizados pelo agente biocontrolador são: Antibiose, competição, parasitismo e predação, produção de enzimas líticas, hipovirulência e/ou indução de defesa do hospedeiro. Na antibiose, os biocontroladores produzem toxinas microbianas que podem, em baixas concentrações, envenenar ou matar outros microorganismos. A maioria destes microorganismos produz e segrega um ou mais compostos com atividade antibiótica. Em alguns casos, os antibióticos produzidos mostraram ser particularmente eficazes na supressão de patógenos de plantas e das doenças que causam (PAL; MCSPADDEN GARDENER, 2006). Um exemplo de antagonismo através da produção de antibióticos é a

produção de gliotoxinas por *Trichoderma virens*, controlando *Rhizoctonia solani* (WILHITE et al., 2001).

Muitas evidências indiretas sugerem que a competição entre agentes patogênicos e não patogênicos para recursos nutricionais é importante para limitar a incidência e gravidade da doença. Em geral, os agentes patogênicos do solo, como espécies de *Fusarium* e *Pythium* que infectam através do contato micelial, são mais suscetíveis à concorrência de outros micróbios associados ao solo e à planta do que os agentes patogênicos que germinam diretamente nas superfícies das plantas. A competição por nutrientes entre *T. harzianum* e *Sclerotinia sclerotiorum* foi demonstrada por Silva et al (2016) em ensaios de emergência de plântulas de soja inoculadas com o patógeno. Outro exemplo foi mostrado por Magallon-Andalon et al. (2012) em que *Candida famata* e *Rhodotorulla mucilaginosa* controlaram *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão papaya, através dos mecanismos de competição e parasitismo.

Diversos microorganismos secretam e excretam outros metabólitos, que podem interferir no crescimento e / ou atividades do patógeno. Muitos produzem e liberam enzimas líticas que podem hidrolisar uma ampla variedade de compostos poliméricos, incluindo quitina, proteínas, celulose, hemicelulose e DNA (PAL; MCSPADDEN GARDENER, 2006). A expressão e a secreção destas enzimas por diferentes microorganismos podem resultar na supressão direta das atividades dos fitopatógenos. Por exemplo, o controle de *Sclerotium rolfsii* por *Serratia marcescens* pareceu ser mediado pela expressão de quitinase (ORDENTLICH; ELAD; CHET, 1988).

No parasitismo, o agente biocontrolador ataca diretamente o patógeno, matando-o ou destruindo os seus propágulos. Existem vários fungos parasitas de patógenos de plantas, incluindo aqueles que atacam escleródios (por exemplo, *Coniothyrium minitans*) enquanto outros atacam hifas vivas (por exemplo, *Pythium oligandrum* e *Trichoderma* spp.). Diferentemente do parasitismo, a predação é mais geral e o patógeno não específico, fornecendo níveis menos previsíveis de controle da doença. Alguns antagonistas exibem comportamento predatório sob condições limitantes de nutrientes. Contudo, tal atividade geralmente não é expressa sob condições típicas de crescimento. Por exemplo, algumas espécies de *Trichoderma* produzem uma gama de enzimas que são dirigidas contra as paredes celulares dos fungos. No entanto, quando a casca fresca é usada em compostos, *Trichoderma* spp. não atacam diretamente o patógeno da planta, *Rhizoctonia solani*. Mas na casca em decomposição, a concentração de celulose prontamente disponível diminui e isso ativa os genes da quitinase de *Trichoderma* spp., que por sua vez produzem quitinase para parasitar *R. Solani* (BENHAMOU; CHET, 1997).

Hipovirulência é redução da capacidade de produção de doenças pelo patógeno. O fenômeno controlou a praga da castanha em muitos lugares (MILGROOM; CORTESI 2004). A indução das defesas do hospedeiro pode ser de natureza local e / ou sistêmica, dependendo do tipo, fonte e quantidade de estímulos. Recentemente, os fitopatologistas começaram a caracterizar os determinantes e as vias de resistência induzida estimuladas por agentes de controle biológico e outros micróbios não patogênicos (PAL; MCSPADDEN GARDENER, 2006).

A primeira dessas vias, denominada resistência sistêmica adquirida (RSA), é mediada pelo ácido salicílico (AS), um composto que é frequentemente produzido após a infecção por patógenos e normalmente leva à expressão de proteínas relacionadas à patogênese (PR). Estas proteínas PR incluem uma variedade de enzimas, algumas das quais podem actuar directamente para lisar as células invasoras, reforçar os limites da parede celular para resistir a infecções ou induzir a morte celular localizada. Um segundo fenótipo, primeiro referido como resistência sistêmica induzida (RSI), é mediado pelo ácido jasmónico (AJ) e / ou etileno, que são produzidos após aplicações de algumas rizobactérias não patogênicas. Um número substancial de produtos microbianos foi identificado como eliciador das defesas do hospedeiro, indicando que as mesmas provavelmente são estimuladas continuamente ao longo do ciclo de vida de uma planta, como é o caso das xilanases produzidas por *Trichoderma* spp. (NUMBERGER et al., 2004).

Dentre os antagonistas mais eficientes, encontram-se os fungos do gênero *Trichoderma* e as leveduras. Estes fungos têm grande importância no controle biológico devido à variedade de mecanismos utilizados na interação antagônica com o patógeno.

3.1. *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma* spp. compreende fungos de vida livre, com reprodução assexuada e sexuada, sendo mais amplamente encontrados em solos de regiões de clima temperado e tropical. Sua fase teleomorfa é o gênero *Hypocrea*, frequentemente encontrado colonizando madeira. Algumas linhagens não têm ciclo sexual conhecido, sendo então classificados na subdivisão Sodariomycetes. Os sodariomicetos são fungos caracterizados pela produção de conídios a partir de células conidiógenas, podendo ou não estar contidas em estruturas especializadas, ou por fragmentação do talo micelial (MACHADO et al., 2012).

A primeira publicação sobre o uso de *Trichoderma* como agente biocontrolador de doenças de plantas, no Brasil, ocorreu com a descrição da inativação do vírus do mosaico do fumo (TMV) por filtrados da cultura de *Trichoderma* sp., realizada por Foster (1950). No

referido estudo, o filtrado da cultura de *Trichoderma* sp. reduziu a capacidade infectiva do vírus em até 90%, realizando-se a avaliação através do número de lesões locais em folhas de *Nicotina glutinosa*. O grande interesse por esse gênero de fungo se dá por sua ampla distribuição em todos os ambientes terrestres, podendo colonizar solos, substratos e raízes de diversas culturas. Além disso, esse gênero é capaz de produzir um grande número de substâncias, incluindo enzimas degradadoras da parede celular de fungos, antibióticos e outros compostos que interferem no crescimento e na defesa das plantas (MACHADO et al., 2012).

Para Santos et al. (2012), os principais mecanismos de controle utilizados por *Trichoderma* spp são: antibiose, competição, parasitismo, hipovirulência, predação ou indução de defesa do hospedeiro. Estes autores confirmaram em seus estudos a ação antibiótica de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa*. Osorio-Hernandez et al. (2011), relataram a produção de gliotoxinas, viridina, tricondermin, furanona e 6-pentil-pirona, metabolitos não voláteis em isolados de *T. asperellum* e *T. hamatum*, inibindo o crescimento de *Phytophthora capsici*.

No que diz respeito à competição, Silva et al. (2016) comprovaram que houve competição por nutrientes entre isolados de *T. harzianum* e *Sclerotinia sclerotiorum*, sendo o agente biocontrolador capaz de colonizar sementes e raízes de plantas de soja. Segundo Stefanello et al. (2017), *T. harzianum*, em condições de plantio convencional, aumentou a massa de raízes por planta de mandioca, acarretando no incremento da produtividade da cultura, em comparação à área infestada por *Phytophthora* spp., sem o tratamento com o *T. harzianum*. Chagas et al. (2017) concluíram que uso de *T. asperellum* apresentou resultados positivos no acúmulo de biomassa para as culturas da soja, feijão-caupi, arroz e milho, comprovando a promoção de crescimento das plantas. Alguns estudos mostram que isolados de *Trichoderma artroviride* foram eficientes biocontroladores de *Diaporthe thea* em testes *in vitro*, através da produção de metabólitos e do parasitismo (ANITA; PONMURUGAN, 2011).

No mercado, estão disponíveis vários tipos de formulações, tais como: pó-molhável; grânulos dispersíveis; suspensão concentrada; óleo emulsionável; grãos colonizados e esporos secos. As principais espécies do agente de biocontrole comercializadas são *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. stromaticum* e *T. viride*, porém nem todas as formulações têm identificação da espécie. Diversos produtos à base de *Trichoderma* spp. são comercializados no Brasil, tais como: Trichodermil SC 1306 (*T. harzianum*), no controle de *S. sclerotiorum* e *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*; Trichodermax EC (*T. asperellum*) no controle de *R. solani* e *F. solani* f. sp. *glycines* (ABCBio, 2016). A aplicação de *Trichoderma* pode ser realizada de diversas maneiras, entre elas, diretamente no solo, na parte aérea das plantas, em substratos para a

produção de mudas, em sementes ou outros materiais de propagação vegetal, em resíduos de culturas ou outros substratos orgânicos, em frutos ou, ainda, nas plantas utilizadas na rotação de culturas (BETTIOL et al., 2012).

3.2. Leveduras

Outros microorganismos com potencial biocontrolador são as leveduras por apresentarem mecanismos antagônicos, tais como: micoparasitismo, produção de substâncias antibióticas e/ou degradadoras da parede celular do patógeno, competição por espaço e nutrientes, além da indução de resistência, por alguns isolados (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000). As leveduras, ou fungos leveduriformes, diferem-se dos fungos filamentosos por possuírem um talo predominantemente unicelular, sem corpos de frutificação e pela reprodução assexuada ser através da divisão binária (KURTZMAN; FELL, 1988). Várias são as características que fazem das leveduras promissoras agentes de controle biológico, tais como sua facilidade de produção e manutenção *in vitro*; fácil adaptação nutricional; alta capacidade de proliferação; boa capacidade colonizadora (ROBIGLIO et al., 2011).

As leveduras podem habitar o filoplano epifítica ou endofiticamente, sendo amplamente encontradas em cascas de frutos, superfície das folhas, flores, tecidos necróticos, solo e na rizosfera. São capazes de competir por nutrientes, colonizar ferimentos, induzir resistência em plantas, produzir antibióticos, além de promoverem ação micoparasítica, sendo considerada um eficiente agente biocontrolador (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000; VIANA et al., 2012). Terao et al. (2017) demonstraram a eficiência na combinação de métodos físicos e de isolados de leveduras, no controle do bolor verde em laranjas, que tem como agente causal *Penicillium digitatum*. Zhang et al. (2017) também comprovaram que a combinação entre métodos físicos e produtos à base de leveduras no controle biológico de doenças fúngicas de plantas é eficiente.

A competição por nutrientes está diretamente associada às rápidas capacidades de reprodução e assimilação de nutrientes no meio em que as leveduras se encontram, tornando-se um dos mecanismos mais importantes utilizados por estes microrganismos, sendo, por este motivo, um dos mais estudados. Di Francesco et al. (2017a) concluíram que *Aureobasidium pullulans* é capaz de competir por nutrientes e espaço com *Monilinia laxa*, desempenhando um papel importante no manejo da podridão marrom em pêssegos e nectarinas. A indução de resistência de plantas de tomate a *P. infestans* por *A. pullulans*, através da produção de glucanase, foi demonstrada por Di Francesco et al. (2017b).

A produção de antibióticos pelas leveduras desempenha um papel fundamental no controle biológico de fitopatógenos, porém não há relatos minuciosos sobre a composição desses antibióticos, ficando restrito a poucos estudos. A espécie *Candida oleophila*, devido à produção de β -glucanases, é a base do produto comercial “Aspire”, utilizado para o controle biológico de podridões pós-colheita de citros e de frutas como maçã e pêra. Tal levedura é capaz de produzir várias enzimas degradativas da parede celular de *P. digitatum*, incluindo-se exo- β -1,3-glucanases, quitinases e proteases (BAR-SHIMON et al., 2004).

Buxdorf; Rahat e Levy (2013) mostraram a indução de resistência em plantas por *Moesziomyces aphidis*, através do aumento da produção de etileno pelas plantas. Barda et al. (2015) comprovaram que o aumento da produção de ácido salicílico em plantas de tomate, causado por *M. aphidis*, foi responsável pela indução de resistência das plantas a *Clavibacter michiganensis*. Aylward et al. (2017) classificaram algumas espécies de *Candida* como biocontroladoras. El-Ghaouth et al. (2000) mostraram que *Candida saitoana* tem um potencial bicontrolador a *Phomopsis citri* (*Diaporthe citri*) em combinação com glicoquitosana, devido a sua capacidade de colonização da superfície do fruto.

Outro fator que contribui para o controle biológico realizado por leveduras é a produção de toxinas *killer*, que são proteínas ou glicoproteínas excretadas, sendo as leveduras que as produzem ou excretam, imunes as suas próprias toxinas, porém sensíveis às toxinas excretadas por outros isolados (POLONELLI; MORACE, 1986; BUSSEY, 1990). No crescimento inicial microbiano, as toxinas *Killer* podem significar um importante fator de concorrência para as leveduras, podendo impedir o desenvolvimento de outros microorganismos (STOLL et al., 2005).

O primeiro relato de toxina *Killer* em leveduras foi realizado por Bevan e Makower (1963) em leveduras do gênero *Saccharomyces*. Após esse relato, 11 gêneros de leveduras foram identificados como produtoras de toxinas *killer*: *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Williopsis* e *Zygosaccharomyces*, indicando que o fenômeno *killer* ocorre em vários gêneros de leveduras (CASTORIA et al., 2003; RAU et al., 2005). Perez et al. (2017) selecionaram isolados de leveduras produtores de toxina *Killer*, os quais demonstraram eficiência no controle de *P. digitatum* em limões armazenados.

Alguns produtos que contêm leveduras como princípio ativo, a exemplo do Aspire®, já são registrados mundialmente e vêm obtendo êxito no biocontrole. CandiFruit®, Shemer®, BoniProtect®, Yield Plus®, Aspire® e Blossom Protect™ são exemplos de outros produtos

consumidos em diversos países (BETTIOL *et al*, 2012). Ainda não há relatos de produtos à base de leveduras registrados no Brasil (ABCBio, 2016).

Mesmo sendo considerados importantes antagonistas, não foram observados trabalhos utilizando *Trichoderma* spp. nem leveduras como agentes biocontroladores de *Diaporthe destruens*, tornando-se necessária a realização de pesquisas para avaliação da atividade biocontroladora de *Trichoderma* spp. e leveduras sobre *D. destruens*, *in vitro* e *in vivo*, bem como o desenvolvimento de metodologias de aplicação eficientes.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo selecionar isolados de *Trichoderma* spp e leveduras, isoladas de folhas e caule da batata-doce, bem como *D. destruens*, avaliar o potencial biocontrolador destes antagonistas e identificá-los molecularmente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE CONTROLE BIOLÓGICO (ABCBio). Biodefensivos registrados. Disponível em: < <http://www.abcbio.org.br/biodefensivos-registrados/>> Acesso em: 10 mar, 2018.
- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. **Consulta de Praga/Doença**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons!/ap_praga_detalhe_cons?p_id_cultura_praga=5835> Acesso em: 10 mar, 2018.
- AYLWARD, J.; STEENKAMP, E. T.; DREYER, L. L.; ROETS, F.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. A plant pathology perspective of fungal genome sequencing. **IMA FUNGUS**. v. 8, nº1, p. 1–15. 2017.
- BARDA, O.; SHALEV, O.; ALSTER, S.; BUxDORF, K.; GAFNI, A.; LEVY, M. *Pseudozyma aphidis* Induces Salicylic-Acid-Independent Resistance to *Clavibacter michiganensis* in Tomato Plants. **Plant Disease**. v. 99. nº 5, p. 621 – 626. 2015.
- BAR-SHIMON, M.; YEHUDA, H.; COHEN, L.; WEISS, B.; KOBESHNIKOV, A.; DAUS, A.; GOLDWAY, M.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Current Genetics**, New York. v. 45, nº. 3, p. 140-148. 2004.
- BENHAMOU, N.; CHET, I. Cellular and molecular mechanisms involved in the intersection between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. **Appl. Environmental Microbiology**. v. 63. p. 2095–2099. 1997.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.) **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente, v.1, p.7-14, 2008a.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Trichoderma in Brazil: history, research, commercialization and perspectives**. IOBC wprs Bulletin . 2008b.

- BETTIOL, W.; GHINI, R.; MORANDI, M.A.B.; STADNIK, M.J.; KRAUS, U.; STEFANOVA, M. & PRADO, A.M.C. **Controle biológico de doenças de plantas na América Latina**. In: Alves, S.B. & Lopes, R.B. (Eds.) *Controle Microbiano de Pragas na América Latina – Avanços e desafios*. Piracicaba. FEALQ, p. 303-331, 2008b.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; PAULA JÚNIOR, T. J. V.; CORRÊA, E. B.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J. L. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**– Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. (Documento 88) p.155. 2012.
- BEVAN, E. A. & MAKOWER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. **Proceedings of the Eleventh International Congress of Genetics I**. v. 203. 1963.
- BUSSEY, H. Genetic and molecular approaches to synthesis and action of the yeast “killer toxin”. **Experientia, Basel**. v. 46, n° 2, p. 193-200, 1990.
- BUXDORF, K.; RAHAT, I.; LEVY, M. *Pseudozyma aphidis* induces ethyleneindependent resistance in plants. **Plant Signaling & Behavior**. v. 8. n°11, p. 26273. 2013.
- CASTORIA, R.; CAPUTO, L.; DE CURTIS, F.; DE CICCIO, V. Resistance of Postharvest Biocontrol Yeasts to Oxidative Stress: A Possible New Mechanism of Action. **Phytopathology**. St. Paul, v. 93, n° 5, p. 564-572, 2003.
- CASTRO, L.A.S; EMYGDIO, B.M. **Batata-doce para produção de biocombustível**. Infobibos. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_4/BatataDoce/index.htm>. 2009. Acesso em: 20/1/2018
- CAVALCANTI, L. S.; COÊLHO, R. S. B.; PEREZ, J. O. Reação de cultivares de batata-doce à podridão-do-pé, em condições de campo. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.32, n°4, p.699-701. 2002
- CHAGAS, L. F. B.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; SOARES, L. P.; FIDELIS, R. R.. *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS. v. 4, n° 3, p. 97-102, 2017.
- COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: APS, p. 539, 1983.
- DI FRANCESCO, A.; UGOLINI, L.; D'AQUINO, S.; PAGNOTTA, E.; MARI, M. Biocontrol of *Monilinia laxa* by *Aureobasidium pullulans* strains: Insights on competition for nutrients and space. **International Journal of Food Microbiology**. v. 248, p. 32–38, 2017a.
- DI FRANCESCO, A.; FILIPPO MILELLA, F.; MARIA, M.; ROBERTI, R. A preliminary investigation into *Aureobasidium pullulans* as a potential biocontrol agent against *Phytophthora infestans* of tomato. **Biological Control**. v. 114, p. 144–149, 2017.
- EL-GHAOUTH, A.; SMILANICK, J. L.; BROWN, G. E.; WISNIEWSKI, M.; WILSON, C. L. Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. **Plant Disease**. v, 84 n, 3. p. 243 – 248, 2000.

EL-TARABILY, K. A.; SILVASITHAMPARAM, K.; Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plants growth promoters. **Mycoscience**, Tokyo. v. 47, p. 25-35, 2006.

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. FAOSTAT, 2009. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Acesso em 16/12/2017.

FOSTER, R. Inativação do vírus do mosaico comum do fumo pelo filtrado de culturas de *Trichoderma* sp. **Bragantia**. v. 10, p.139-148, 1950.

GAO, Y.; LIU, F.; DUAN, W.; CROUS, P. W.; CAI, L. *Diaporthe* is paraphyletic. **IMA FUNGUS**. v. 8. N° 1, p. 153–187, 2017.

GOMES, R. R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, S. I. R.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J. Z. CROUS, P. W. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**. v. 31, 2013.

GUARNACCIA, V.; VITALE, A.; CIRVILLERI, G.; AIELLO, D.; SUSCA, A.; EPIFANI, F.; PERRONE, G.; POLIZZI, G. Characterisation and pathogenicity of fungal species associated with branch cankers and stem-end rot of avocado in Italy. **European Journal of Plant Pathology**. v. 146, p. 963–976, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**. 2016. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>. Acessado em: 04/02/2017.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. The Yeasts, a taxonomic study. **Elsevier Science Publishers**. 4. Ed. Amsterdam, v. 2, p. 1088, 1988.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C.F.; ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**. v.35, nº1, cap. 26. p. 274-288, 2012.

MAGALLON-ANDALON, C. G.; LUNA-SOLANO, G.; RAGAZZO-SANCHEZ, J. A.; CALDERON-SANTOYO, M. Parasitism and Substrate Competitions Effect of Antagonistic Yeasts for Biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya (*Carica papaya* L.) var Maradol. **Mexican Journal of Scientific Research**. v. 1, nº. 1, , p. 2-9, 2012.

MARQUES, K. R. Reação genótipos de batata-doce à isolados locais de *Plenodomus destruens* Harter, agente causal do mal-do-pé. **Dissertação (Mestrado)** Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. Gurupi-TO. 54 f, 2015.

MASIREVIC, S.; GULYA, T. *Sclerotinia* and *Phomopsis*—two devastating sunflower pathogens. **Field Crops e search**. v. 30, p.271–300, 1992.

MICHEREFF, S J. **Fundamentos de Fitopatologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, p. 150, 2001.

MILGROOM, M. G.; CORTESI, P. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. **Annual Revision of Phytopathology**. v. 42. p. 311-338, 2004.

- NASCIMENTO, S. M. C. Nutrição mineral e produtividade da batata-doce biofortificada em função de doses de fósforo e potássio. **Tese (doutorado)** - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, XIX, 51 p; Jaboticabal, 2013.
- NUMBERGER, T.; BRUNNER, F.; KEMMERLING, B.; PIATER, L. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. **Immunological Revision**. v. 198. p. 249-266, 2004.
- OLIVEIRA, A.C.B.; SEDIYAMA, M.A.N.; SEDIYAMA, T.; CRUZ, C.D. Avaliação da divergência genética em batata-doce por procedimentos multivariados. **Acta Scientiarum**. v. 22, n° 4, p. 895-900, 2000.
- ORDENTLICH, A.; ELAD, Y.; CHET, I. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in the biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**. v. 78. p. 84-88, 1988.
- OSORIO-HERNÁNDEZ, E.; HERNÁNDEZ-CASTILLO, F.D.; GALLEGOS-MORALES, G.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; CASTILLO-REYES, F. In-vitro behavior of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora capsici* Leonian. **African Journal of Agricultural Research**. v. 6, p. 4594-4600, 2011.
- PAL, K. K.; B. MCSPADDEN GARDENER. Biological Control of Plant Pathogens. **The Plant Health Instructor**. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02, 2006.
- PALMIERI, F. G.; RODRIGUES, G. G.; MARCOMINI, L. R. S. Pequenos mercados, grandes oportunidades; Boas opções para diversificar a produção. **HortiFruti Brasil**. v. 171, p. 8 – 10. ISSN 1981 – 1837, 2017.
- PEREIRA, R. B.; AMARO, G. B.; RIBEIRO, M. C. V.; PINHEIRO, J. B. **Reação de genótipos de batata-doce ao mal-do-pé (*Plenodomus destruens*)**. Boletim Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Hortaliças. ISSN 1677-2229; p. 122, 2014.
- PEREIRA, R. B.; FERNANDES, F. R.; PINHEIRO, J. B. **Recomendações para manejo da podridão-do-pé em batata-doce**. Comunicado técnico / Embrapa Hortaliças. ISSN 1414.9850, 2011.
- PEREZ, M. F.; IBARRECHE, J. P.; ISAS, A. S.; SEPULVED, M.; RAMALLO, J.; DIBA, J. R. Antagonistic yeasts for the biological control of *Penicillium digitatum* on lemons stored under export conditions. **Biological Control**. v. 115, p. 135–140, 2017.
- POLONELLI, L.; MORACE, G. Reevaluation of the yeast killer phenomenon. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC. v. 24, n° 5, p. 866-869, 1986.
- RAU, U.; NGUYEN, L. A.; SCHULZ, S.; WRAY, V.; NIMTZ, M.; ROEPER, H. et al. Formation and analysis of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Heidelberg, v. 66, n° 5, p. 551- 559, 2005.
- REHNER, S. A.; UECKER, F. A. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. **Canadian Journal of Botany**. v. 72. p. 1666–1674, 1994.

ROBIGLIO, A.; SOSA, M. C.; LUTZ, M. C.; LOPES, C. A.; SANGORRÍN, M. P. Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature. **International Journal of Food Microbiology**. v. 147, n.º. 1, p. 211-216, 2011.

SANTOS, C. C.; OLIVEIRA, F. A; SANTOS, M. S. ; TALAMINI, V.; FERREIRA, J. M. S.; SANTOS, F. J. Influência de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa*. **SCIENTIA PLENA**. v. 8,n.º. 4, p. 1-5, 2012.

SILVA, E. K. C.; MELO, L. G. L. Manejo de doenças de plantas: um enfoque agroecológico. **Revista Educamazônia** - Educação Sociedade e Meio Ambiente, LAPESAM/GISREA/UFAM/CNPq/EDUA. v, 10, N.º, p. 143-157– ISSN 2318-8766 – Versão digital, 2013.

SILVA, F. F.; CASTRO, E. M.; MOREIRA, S. I.; FERREIRA, T. C.; LIMA, A. E.; ALVES, E. Emergência e análise ultraestrutural de plântulas de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* sob efeito da aplicação de *Trichoderma harzianum*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu. v. 43, n. 1, p. 41-45, 2016.

SILVA, J. B. C.; LOPES, C. A.; MAGALHÃES, J. S. EMBRAPA. **Cultura da batata doce**. Sistemas de Produção, Embrapa Hortaliças. v. 6. ISSN 1678-880X (Versão Eletrônica). 2008. Disponível em <<http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/batata doce/index.htm>>. Acessado em 18/12/2017.

SOARES, K. T; MELO, A. S; MATIAS, E. C. A **Cultura da batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam)**. João Pessoa: EMEPA-PB, p. 26, 2002. (EMEPA-PB. Documentos, 41).

STEFANELLO, L.; STEFANELLO, V. F. V.; HELING, A. L.; HENKEMEIER, N. P.; COLTRO-RONCATO, S.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Manejo da podridão radicular da mandioca pela combinação de manejo de solo, variedade resistente e controle biológico com *Trichoderma harzianum*. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**. v. 13, n.º 1, p. 31-45, 2017.

STOLL, M.; BEGEROW, D.; OBERWINKLER, F. Molecular phylogeny of *Ustilago*, *Sporisorium*, and related taxa based on combined analyses of rDNA sequences. **Mycological Research**. London, v. 109, n.º. 3, p. 342-356, 2005.

TCHAMENI, SN.; SAMEZA, ML.; O'DONOVAN, A.; FOKOM, R.; NGONKEU, ELM.; NANA, LW.; ETOA, F-X.; NWAGA, D. Antagonism of *Trichoderma asperellum* against *Phytophthora megakarya* and its potential to promote cacao growth and induce biochemical defence. **Mycology**. v. 8, n.º. 2, p. 84–92, 2017

TERAO, D.; NECHET, K. L.; PONTE, M. S.; MAIA, A. H. N.; ANJOS, V. D. A.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Physical postharvest treatments combined with antagonistic yeast on the control of orange green mold. **Scientia Horticulturae**. v. 224, p. 317–323, 2017.

THOMPSON, S.; TAN, Y.; YOUNG, A.; NEATE, S.; AITKEN, E.; SHIVAS, R. G. Stem cankers on sunflower (*Helianthus annuus*) in Australia reveal a complex of pathogenic *Diaporthe* (*Phomopsis*) species. **Persoonia**. v. 27, p.80–8., 2011.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 41-55, 2000.

VIANA, F. M. P.; LIMA, J. R.; LIMA, J. S. Leveduras no controle de doenças pós-colheita de frutas. In: FARINA, R. S. I.; ARAÚJO, B. L. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo: RAPP, p.125-140, 2012.

WILHITE, S. E.; LUNSDEN, R. D.; STRANCY, D. C. Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. Appl. **Environmental Microbiology**. v. 67. p. 5055-5062, 2001.

ZACHOW, C.; BERG, C.; MÜLLER, H.; MONK, J.; BERG, G. Endemic plants harbour specific *Trichoderma* communities with an exceptional potential for biocontrol of phytopathogens. **Journal of Biotechnology**. v. 235, p. 162–170, 2016

ZHANG, H.; MAHUNU, G. K.; CASTORIA, R.; APALIYA, M. T.; YANG, Q. Augmentation of biocontrol agents with physical methods against postharvest diseases of fruits and vegetables. **Trends in Food Science & Technology**. v. 69, p. 36 – 45, 2017.

CAPÍTULO II

Atividades de biocontrole de *Trichoderma* spp. sobre *Diaporthe destruens*

ATIVIDADES DE BIOCONTROLE DE *Trichoderma* spp. SOBRE *Diaporthe destruens*

ALMEIDA, T. R. P^{1.}; COELHO, I. L^{1.}; CÂMARA, M. P. S.^{1.}; VIEIRA, W. A. S.^{1.}; NEVES, R. P^{2.}; LARANJEIRA, D.¹

¹Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

²Departamento de Micologia. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos.

RESUMO

O biocontrole do mal-do-pé da batata-doce é uma alternativa para diminuição de perdas econômicas causadas pelo patógeno. O presente trabalho teve como objetivo selecionar isolados de *Trichoderma* eficientes no controle biológico de *Diaporthe destruens*, *in vitro* e *in vivo*. Nas regiões da Zona da Mata e Agreste de Pernambuco, foram coletadas amostras de plantas com sintomas característicos da doença para isolamento do patógeno, sendo esses isolados submetidos ao teste de patogenicidade em túberas da variedade Co-Branca. Para avaliação do biocontrole *in vitro* foi realizado o pareamento de culturas do patógeno e de *Trichoderma* spp. Nos ensaios *in vivo*, avaliou-se a Área Abaixo da Curva de Progresso de *Trichoderma* spp. sobre *D. destruens*, em mudas das variedades Co-Roxa e Co-Branca. Todos os isolados selecionados foram submetidos à identificação molecular, com as regiões ITS1 e ITS4 e TEF1- α , para ambos os isolados, e região APN2, para o patógeno. O isolado TH9 do patógeno foi selecionado para os experimentos. Nos testes *in vitro*, nove isolados de *Trichoderma* spp., foram os selecionados. Na seleção *in vivo*, três isolados reduziram os sintomas causados na Co-Roxa (013, 177 e 162), dos quais dois foram eficientes na Co-Branca (177 e 162). Os resultados mostraram que as espécies *T. longibrachiatum* (013) e *T. asperellum* (177 e 162) são eficientes antagonistas e podem ser utilizadas no manejo da doença no campo.

Palavras-chaves: Antagonismo. Batata-doce. Controle Biológico. Mal-do-pé. Patógeno radicular.

ABSTRACT

The biocontrol of foot rot of sweet potato is an alternative to reduce economic losses caused by the pathogen. The present study aimed to select *Trichoderma* isolates efficient in the biological control of *Diaporthe destruens*, *in vitro* and *in vivo*. In the regions of the Zona da Mata and Agreste of Pernambuco, samples of plants with characteristic symptoms of the disease were collected for isolation of the pathogen, and these isolates were submitted to the pathogenicity test in the Co-Branca variety. *In vitro* biocontrol evaluation was performed through the pairing of cultures of the pathogen and *Trichoderma* spp. In the *in vivo* tests, the Area Under Of The Disease Progress Curve of *Trichoderma* spp. on *D. destruens*, in seedlings of the varieties Co-Roxa and Co-Branca. All the selected isolates were submitted to molecular identification, with the ITS1 and ITS4 and TEF1- α regions, for both isolates, and the APN2 region, for the pathogen. The TH9 isolate from the pathogen was selected for the experiments. In the *in vitro* tests, nine isolates of *Trichoderma* spp. were selected. In the *in vivo* selection, three isolates reduced Co-Roxa symptoms (013, 177 and 162), of which two were efficient in Co-White (177 and 162). The results showed that the species *T. longibrachiatum* (013) and *T. asperellum* (177 and 162) are efficient antagonists and can be used in the management of the disease in the field.

Keywords: Antagonism. Biological control. Foot Rot. Root pathogens. Sweet potato.

INTRODUÇÃO

A batata doce (*Ipomoea batatas* L.) pertence à família Convolvulaceae e tem origem na América Central e do Sul. É uma das culturas de maior expressividade socioeconômica no Brasil, com produção média anual de 525.800 toneladas, gerando lucro de R\$526.084.000. Por ser uma cultura com facilidade no cultivo e rústica, a batata-doce se adapta bem a diferentes características edafoclimáticas, tem alta tolerância à seca e um baixo custo de produção, por isso vem se desenvolvendo por todo o país (PEREIRA; FERNANDES; PINHEIRO, 2011; IBGE, 2016). Fatores como falta de tecnologia e a incidência de doenças são responsáveis pela diminuição na produtividade da cultura.

Dentre as doenças fúngicas de maior expressividade pode-se citar o mal-do-pé da batata doce, ocasionada pelo fungo *Diaporthe destruens* (CLARK et al., 2009). Trata-se de um patógeno habitante do solo, específico da cultura da batata-doce, que pode causar infecções severas em cultivares suscetíveis, chegando a 80% de perda na produtividade, principalmente em áreas de cultivo intenso e sem rotação de cultura. Este fitopatógeno ataca as túberas, parte de maior valor comercial, ocasionando também a morte das plantas (CLARK et al., 2009). Os fungos do gênero *Diaporthe* apresentam como principal característica morfológica a coloração escura dos picnídios, produzidos de forma isolada ou agrupada e possuem rostro alongado. Os conídios são unicelulares, oblongos, medindo 6-10 x 3-4 µm. Ocasionalmente, pode produzir clamidósporos pigmentados isolados ou agregados (GAI et al., 2016).

Um dos principais fatores que predispõem o aparecimento da doença é a proximidade entre a temperatura ideal para o desenvolvimento do patógeno e para germinação, desenvolvimento e produção da cultura. Ambos se desenvolvem bem em temperaturas médias em torno de 24°C, características encontradas nas principais regiões produtoras de batata-doce, no estado de Pernambuco. A sobrevivência do patógeno se dá por meio de restos de cultura, em plantas voluntárias e por meio de estruturas de resistência. A principal forma de propagação da cultura é por meio de ramas, o que tem intensificado a disseminação da doença no campo, tendo em vista que os produtores adquirem ramas de áreas com incidência da doença e plantam em áreas sadias. *Diaporthe destruens* pode infectar as plantas durante todo o ciclo de cultivo e as túberas no armazenamento (EMBRAPA, 2006; PEREIRA; FERNANDES; PINHEIRO, 2011).

Os primeiros sintomas do mal-do-pé da batata-doce se apresentam como cancro de coloração castanha a preta na base das hastes das plantas, ocasionado pelo crescimento do patógeno abaixo da periderme das raízes novas, seguido de murcha, amarelecimento das

folhas e morte da planta. As lesões da haste podem atingir de 10 a 20 cm acima da linha do solo e se estenderem até as raízes, com podridão total destas. Infecções severas podem levar à destruição do sistema radicular, impedindo a formação de raízes tuberosas. Estes sintomas tendem a evoluir durante o armazenamento, danificando parcialmente as raízes tuberosas e tornando-as imprestáveis para utilização na produção de mudas. Nas regiões afetadas no caule, surgem algumas pontuações pretas, que são as estruturas de reprodução do patógeno, denominadas picnídios (GAI et al., 2016).

A principal forma de controle da doença é através da aquisição de mudas sadias, mas esta prática só serve se a área estiver isenta da presença do patógeno. No Brasil ainda não há registro de produtos químicos para controle da doença (AGROFIT, 2018). Porém, com o aumento da preocupação ambiental e a necessidade de manejo do patógeno, com o intuito de minimizar as perdas econômicas, faz-se necessário o estudo de métodos alternativos para o manejo da doença, e dentre esses métodos pode ser utilizado o controle biológico.

Dentre os microorganismos mais utilizados no controle biológico estão os do gênero *Trichoderma*, que são fungos de vida livre, com reprodução assexuada, com desenvolvimento favorecido por clima tropical e/ou temperado, sendo amplamente encontrados nessas áreas (MACHADO et al., 2012). No Brasil são registrados produtos biológicos com as espécies *Trichoderma harzianum* e *T. asperellum* (ABCBio, 2016), porém há registro, em outros países, de produtos com as espécies *T. stromaticum*, *T. longibrachiatum* e *T. viride*. O sucesso de *Trichoderma* spp. se deve ao fato deste fungo ser capaz de colonizar o solo, substrato ou até mesmo o sistema radicular de algumas plantas, além de produzirem um expressivo número de substâncias, incluindo enzimas degradadoras da parede celular de outros fungos, antibióticos e compostos que estimulam o crescimento e a defesa das plantas, além da facilidade de cultivo em laboratórios.

Trichoderma spp. utilizam diferentes mecanismos no controle de patógenos, tais como antibiose, competição, parasitismo e indução de resistência (MACHADO et al., 2012). Várias são as formas de aplicação de *Trichoderma* spp., seja diretamente no solo, na parte aérea das plantas, em substratos para a produção de mudas, sementes ou outros materiais de propagação vegetal, resíduos de culturas ou outros substratos orgânicos ou, ainda, nas plantas utilizadas na rotação de culturas (BETTIOL et al., 2012).

Tendo em vista os prejuízos significativos causados por *D. destruens* e a necessidade de uma forma alternativa para o manejo da doença, o estudo objetivou avaliar a patogenicidade de isolados do patógeno em túberas de batata-doce e o potencial de isolados de *Trichoderma* no biocontrole da doença.

RESULTADOS

Obtenção de isolados e teste de patogenicidade

Foram obtidos um total de 110 isolados fúngicos, sendo 23 oriundos do Município de São Joaquim do Monte, 30 de Belém de Maria, 6 de Palmares, 5 de Cupira e 46 de Lagoa dos Gatos, num total de 110 isolados (Tabela 1).

Os isolados foram classificados em dois grupos distintos de acordo com o teste de Scott-Knott, no qual os mais patogênicos foram agrupados em dois grupos estatisticamente distintos (Tabela 2). Dos 110 isolados, 60 causaram sintomas, sendo considerados patogênicos, variando apenas na severidade e agressividade dos sintomas (Figura 1). Houve variação na Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) entre 16 e 134 mm². Avaliando a AACPD, foi selecionado o isolado TH9, por ser um dos mais agressivos, para os demais ensaios.

Antagonismo in vitro

De acordo com a escala de avaliação proposta por Bell et al (1982), dos 21 isolados de *Trichoderma* obtidos da coleção, 11 obtiveram melhores resultados no cultivo pareado, recebendo média 1. Nove desses isolados (M367, J432, I376, 177, 161, B168, 162, G319 e 013) diferiram significativamente no tratamento, havendo formação do halo de inibição por alguns isolados, quanto a Percentagem de Inibição de Crescimento Micelial (PICM), sendo selecionados para o teste *in vivo* (Tabela 3).

Antagonismo in vivo

Os testes realizados na variedade Co-Roxa mostraram que os isolados de *Trichoderma* 013, 177 e 162 obtiveram os melhores resultados no controle da doença (Tabela 4). Na repetição do experimento, os resultados se repetiram para os três isolados, na variedade Co-Roxa, diferindo estatisticamente da testemunha absoluta, enquanto na variedade Co-Branca, os isolados 177 e 162 diferiram do isolado 013 e da testemunha (Tabela 5).

Identificação molecular

O isolado TH9 apresentou coloração marrom, após sete dias de crescimento, conídio bigutulado elipsoidal, com conidióforos filiformes e γ -conídio sem gutulações. . O isolado 013 apresentou cor verde no centro, ficando branco na medida em que se desenvolviam em direção as margens e na borda da placa, após sete dias, exibiu colônias brancas formando uma

superfície contínua de micélio branco. Os isolados 177 e 162 formaram colônias regulares com o centro verde escuro e com margens brancas após 72 horas de crescimento, apresentando padrões alternados, de cor verde e amarela, após uma semana de crescimento. Os resultados do sequenciamento confirmaram que o isolado TH9 corresponde ao fungo *Diaporthe destruens* (Figura 2), assim como o isolado 013 foi identificado como *Trichoderma longibrachiatum* e os isolados 162 e 177 *T. asperellum*.

DISCUSSÕES

Os resultados deste estudo mostraram que é possível isolar *Diaporthe destruens* de restos de cultura e plantas sintomáticas. O isolado TH9 foi selecionado por ser um dos mais agressivos, com maiores taxas de Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença, e por apresentar maior reprodutibilidade dos resultados, sendo o isolado com a maior uniformidade de sintomas nas repetições. Os parâmetros utilizados para seleção do isolado estão em concordância com os estudos publicados por Michereff (2001), onde a velocidade no aparecimento dos sintomas é relacionado à agressividade.

Nos testes *in vitro*, os isolados selecionados mostraram rápida colonização do meio onde foram cultivados, cobrindo 100% da placa de Petri, sendo a capacidade de crescer rapidamente um dos principais mecanismos de controle biológico utilizados pelos antagonistas, oferecendo vantagens na competição por nutrientes e espaço ao biocontrolador (Benítez et al., 2004; Simon and Sivasithaparam, 1988). A formação de halo de inibição, por alguns isolados, indicou a presença de compostos bioativos liberados por *Trichoderma* spp. Os resultados estão em concordância com os publicados por Zhang et al. (2016), onde os autores identificaram a atividade antifúngica de *T. longibrachiatum*, comprovando a produção de compostos bioativos, sendo essa espécie eficiente no controle de alguns fitopatógenos, principalmente de *Valsa mali*, agente causal do cancro da macieira, *Fusarium* spp., *S. sclerotiorum*, entre outras espécies.

Outro mecanismo observado microscopicamente, nos testes *in vitro*, foi o hiperparasitismo, no qual hifas do antagonista enovelaram as hifas do patógeno, sendo visível o extravazamento celular da hifa de *D. destruens*, corroborando com os resultados publicados por Bonett et al. (2013), na qual foi verificada inibição de crescimento micelial de fitopatógenos por isolados de *Trichoderma* spp. Das; Sarma e Tapadar (2014) também mostraram que *T. harzianum* e *T. viride* inibiram cerca de 75% do crescimento micelial de *Diaporthe vexans*, em testes *in vitro*.

Nos testes *in vivo* em ambas as variedades, um maior crescimento das plantas em relação às testemunhas (absoluta e relativa), foi observado, indicando que os isolados de *Trichoderma* spp, 177, 013 e 162, atuaram na indução de crescimento do hospedeiro da variedade Co-Roxa e os isolados 177 e 162 na variedade Co-Branca, além de reduzirem os sintomas da doença. Alguns estudos mostram que *Trichoderma* spp. podem atuar na promoção de crescimento de plantas, favorecendo a emergência das raízes e/ou o desenvolvimento da parte aérea (JUNGES et al, 2016). A indução de crescimento do hospedeiro por um antagonista diminui o tempo de vulnerabilidade da muda ao ataque do patógeno, tendo em vista *D. destruens* afeta principalmente as mudas da cultura (GAI et al., 2016).

A produção de metabólitos voláteis é um dos mecanismos utilizados por *Trichoderma* spp. no biocontrole de doenças, sendo observado *in vitro*, através dos halos de inibição expressados, indicando que estes metabólitos podem ter sido liberados *in vivo*. Testes de controle biológico, *in vivo*, têm demonstrado bons resultados no controle de *Diaporthe* spp. com *Trichoderma* spp., a exemplo dos estudos publicados por Sanjay; Ponmurugan e Baby (2008), que mostraram o controle *in vivo* de *D. thea* por *Trichoderma* spp., reduzindo os sintomas da ferrugem cinzenta do chá.

Na identificação filogenética, o isolado TH9 foi classificado como *Diaporthe destruens*, havendo uma proximidade deste isolado com o clado de *D. batatas*, agente causal da podridão seca da batata-doce. O isolado patogênico tem características morfológicas pertinentes ao gênero, tais como α -conídio bigutulado elipsoidal, com conidióforos filiformes e γ -conídio sem gutulações (Gao et al. 2017). Gai et al. (2016) mostraram essa similaridade entre as espécies, porém classificaram o patógeno como *Plenodomus destruens*. Essa classificação foi equivocada, pois, como demonstrado por Boerema; Loerakker e Hamers (1996), o patógeno deveria ser reclassificado como *Phomopsis destruens*. Esta reclassificação se deve ao fato de que as características morfológicas de *D. destruens* distintas, não são parâmetros suficientes para reclassificá-los como outro gênero.

Em 2013, o artigo 59, que permitia a nomenclatura binomial para fungos pleiomórficos, foi retirado do Código Internacional de Nomenclatura de algas, fungos e plantas, sendo então atribuído para o fungo anamorfo e teleomorfo o mesmo nome (GOMES et al, 2013). Baseando-se na similaridade entre as regiões ITS, EF1- α , TUB2, CAL e HIST, Gao et al. (2017) reclassificaram alguns fungos do gêneros *Phomopsis* como *Diaporthe*. Desta forma, o nome correto do agente causal do mal-do-pé da batata-doce é *D. destruens*.

As características morfológicas dos isolados de *Trichoderma* são correspondentes às encontradas por Luz (2015), para *T. asperellum* (162 e 177) e *T. longibrachiatum* (013). A identificação morfológica não é um parâmetro único para a identificação de uma espécie, pois diferentes espécies partilham quase todas as características em comum, por exemplo, *T. martiale* é morfológicamente idêntico a *T. viride*, mas difere deste pela produção de pústulas em Extrato de Malte Ágar e pelo seu crescimento que é um pouco mais rápido, sendo necessária a análise filogenética dos isolados (HANADA et al., 2008). As sequências dos isolados 177 e 162 os classificam como *T. asperellum*, indo de acordo à identificação realizada por Santos-Villalobos et al. (2013) e por Wu et al. (2017). O isolado 013, identificado como *T. longibrachiatum*, é semelhante ao encontrado por Shahid et al. (2013).

Os testes indicam que os isolados têm potencial biocontrolador e podem ser mais pesquisados para o controle biológico de *D. destruens*. As propriedades e mecanismos de ação utilizados por microorganismos biocontroladores tais como a produção de antibióticos e metabólitos, são fundamentais para o sucesso do controle biológico. Porém, é necessário que os fatores abióticos sejam monitorados, tais como temperatura, umidade e radiação, para reduzir a influência direta no crescimento populacional dos biocontroladores (BAE; KNUDSEN, 2005; GAVA; MENEZES, 2012).

Com base nos resultados, observou-se que o agente causal do mal-do-pé da batata-doce, em Pernambuco, é *Diaporthe destruens*. Os isolados de *T. asperellum* são eficientes no controle biológico da doença nas duas variedades de batata-doce e *T. longibrachiatum* um promissor agente biocontrolador do patógeno na variedade Co-Branca, podendo ser utilizados no manejo da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação e nos Laboratório de Fungos do Solo e de Micologia, da área de Fitossanidade, no Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Obtenção de isolados e teste de patogenicidade

O teste de patogenicidade foi realizado com os isolados obtidos por isolamento indireto de plantas sintomáticas do mal-do-pé da batata-doce (ALFENAS et al., 2007) e preservados pelo método utilizado por Castellani (1939), de variedades comerciais, coletadas realizadas nos municípios de Cupira, São Joaquim do Monte, região Agreste, Palmares, Lagoa dos Gatos e Belém de Maria, região da Zona da Mata do estado de Pernambuco.

Realizou-se a assepsia da batata-doce imergindo-as numa solução de hipoclorito de sódio (0,2%), por 10 minutos, secando-as em seguida em papel toalha. Os isolados foram cultivados por sete dias em placas de Petri com meio BDA e mantidos em câmara BOD, a uma temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Foram realizadas seis perfurações, de 1 mm, na batata-doce, para a penetração do patógeno, com auxílio de agulha hipodérmica e a inoculação realizada através de discos de meio BDA, contendo crescimento micelial do fungo. Na testemunha, utilizou-se apenas disco de meio BDA. Para uma melhor fixação do disco à batata-doce, usou-se fita crepe, que foi retirada 48 horas após a inoculação. As batatas-doces foram incubadas em câmara úmida, retiradas 48 horas após a inoculação, para prosseguimento das avaliações, durante 11 dias. O experimento foi montado em blocos casualizados, constando de oito repetições, cada tratamento.

Obtenção e preparo de Trichoderma spp. utilizadas como agentes de controle biológico

Os 21 isolados de *Trichoderma* (147, F258, D230, 149, Tric 178, 177, A149, 025, 161, J432, K529, H367, I376, M476, B168, 162, L374, 179, C217, G319 e 013), utilizados para o biocontrole do mal-do-pé da batata-doce, encontraram-se disponíveis no Laboratório de Fungos do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Para o preparo do inóculo, utilizaram-se discos de 5 mm de diâmetro com crescimento micelial do fungo, cultivado em meio de cultura BDA, durante 7 dias, à temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Antagonismo in vitro

Para o teste de biocontrole de *D. destruens*, foi utilizado o isolado TH9, selecionado no teste de patogenicidade, foram utilizados os isolados de *Trichoderma*, em cultivo pareado (Dennis; Webster, 1971). Os isolados de *Trichoderma* e de *D. destruens* foram cultivados em placa de Petri, com meio BDA, por sete dias a uma temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Um disco de meio BDA, de aproximadamente 5 mm de diâmetro, contendo crescimento micelial do patógeno, depositado na extremidade da placa de Petri, enquanto na outra extremidade depositou-se o disco contendo o crescimento micelial do antagonista, ambos a uma distância de 2 cm das bordas da placa de Petri, em posições opostas. As avaliações foram realizadas diariamente, durante quatro dias. Após esse período, utilizou-se a seguinte escala de notas: 1 – antagonista cresce por toda placa de Petri; 2 – antagonista cresce sobre 2/3 da placa de Petri; 3 – antagonista e patógeno crescem até metade da placa; 4 – patógeno cresce sobre 2/3 da Placa; 5 – patógeno cresce sobre toda a placa, proposta por Bell et al. (1982). Os isolados foram considerados como antagonistas eficientes quando apresentaram média das notas ≤ 2 .

Antagonismo in vivo

Os isolados de *Trichoderma* spp. selecionados nos testes *in vitro*, foram utilizados para os ensaios em casa de vegetação. Para preparo da suspensão, na concentração de 10^7 conídios/mL, *Trichoderma* sp. foi cultivado por sete dias à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, em meio BDA, e os esporos contados em Câmara de Neubauer. Como substrato utilizaram-se 6g de arroz umedecidos com 9 mL de água destilada, acondicionados em sacos de polietileno e esterilizados por 1 hora. Após 24 horas da esterilização do substrato, depositaram-se 2 mL da suspensão de *Trichoderma* sp., em cada saco. Após a infestação, os sacos foram mantidos a 25°C durante quinze dias. O patógeno foi cultivado em placas de Petri, contendo meio BDA, por sete dias.

Para a produção das mudas foram utilizadas ramas sadias da variedade Co-Roxa, as quais foram seccionadas, deixando-se duas gemas por rama, para a germinação em água. Após três dias, as mudas enraizadas foram transplantadas para vasos de 2 L contendo substrato. Sete dias após o transplântio, as mudas foram adubadas com solução nutritiva (47,25g de KNO_3 , 21g MaP, 2,63g Quelatec; 2,63g ultraferro; 78,75g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 42g MgSO_4). Após 15 dias do transplântio das muda, os vasos foram infestados com 6 g do substrato colonizado por *Trichoderma* spp., em sulcos, com formato de meia lua. Após quatro dias da infestação do solo com *Trichoderma* spp. depositaram-se discos de BDA, com estruturas do patógeno, em dois pontos da planta, no colo e no terceiro entrenó. Realizaram-se perfurações no caule da planta, nas regiões escolhidas, com auxílio de uma agulha hipodérmica. As mudas permaneceram em câmara úmida por 48 horas.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, constituído por nove tratamentos e controle absoluto, com 10 repetições, representadas pelo de inoculação do patógeno. A testemunha recebeu apenas disco de meio BDA. As avaliações foram realizadas diariamente, durante 11 dias, a partir do quarto dia após a inoculação do patógeno, utilizando-se para medição um paquímetro Digital Caliper (150 mm – 6”) MK-040.

Com os resultados obtidos, foram selecionados os melhores isolados de *Trichoderma* spp. para a repetição do experimento, nas variedades Co-Roxa e Co-Branca. A repetição do experimento foi realizada com três tratamentos, sob as mesmas condições descritas acima, em delineamento inteiramente casualizado.

Identificação molecular dos isolados de Trichoderma e Diaporthe destruens

Para preparo da amostra, os isolados de *Trichoderma* spp. selecionados no teste de controle biológico em mudas, foram cultivados em meio BDA e os isolados de *D. destruens*,

em meio líquido Batata-Dextrose, ambos por sete dias. Os micélios de *Trichoderma* spp. foram coletados através da raspagem, com auxílio de uma alça de Drigalski, enquanto o micélio do patógeno foi filtrado em papel filtro esterilizada. Após esse período, efetuou-se a extração de DNA com o protocolo adaptado de Murray & Thompson (1980). Foram amplificadas as regiões ITS1 e ITS4 e Fator de Elongação (EF), para ambos os isolados e a região APN2 para o patógeno (Tabela 6).

Para a PCR da região ITS utilizou-se 1 µL de DNA extraído (com concentração de 50 ng), 1,8 µL de cada primer, 1,8 µL de MgCl₂, 2 µL de tampão de reação 10x PCR Rxn Buffer (-MgCl₂) (Invitrogen), 2 µL de dNTP 10 nM, 1 µL de DMSO e 0,13 µL deTaq DNA polimerase (5U/ µL) (Invitrogen), completando o volume da reação para 25 µL com água deionizada esterelizada. Conduziu-se a reação em termociclador 2720 Thermal Cycler (applied biosystems) e as temperaturas e tempos de incubação foram: 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 57 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto; 72 °C por 10 minutos.

O DNA extraído também foi amplificado por PCR, utilizando os pares de primers EF1-728F e TEF1R. Para a PCR a reação foi preparada conforme a reação para ITS, sendo a reação conduzida em termociclador 2720 Thermal Cycler (applied biosystems) e as temperaturas e tempos de incubação foram: 94 °C por 2 minutos; 15 ciclos de 94 °C por 30s, 65 °C por 30s, 72 °C por 1 minuto, com mais 35 ciclos de 94 °C por 30s; 48 °C por 30s, 72 °C por 1 minuto, com extensão de 72 °C por 10 minutos, seguindo o protocolo de Montova et al (2016).

Na identificação de *D. destruens*, amplificou-se também a região APN2, do isolado mais patogênico. Para esta PCR utilizou-se 0,5 µL de DNA extraído (com concentração de 50 ng), 1,25 µL de cada primer, 1,8 µL de MgCl₂, 2 µL de tampão de reação 10x PCR Rxn Buffer (-MgCl₂) (Invitrogen), 2 µL de dNTP 10 nM, 1 µL de DMSO e 0,13 µL deTaq DNA polimerase (5U/ µL) (Invitrogen), completando o volume da reação para 25 µL com água deionizada esterelizada. A reação foi conduzida em termociclador 2720 Thermal Cycler (applied biosystems) com a seguinte ciclagem: 95 °C por 1 minuto; 48 ciclos de 95 °C por 30s, 66,5 °C por 50s, 72 °C por 1 minuto; 72 °C por 10 minutos.

A presença do produto amplificado de todos os isolados foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8 %, em tampão TBE 0,5 (1X) e visualizada sob luz ultravioleta. O produto de PCR foi purificado seguindo as instruções do fabricante PureLink® PCR Purification Kit da Invitrogen (Catalog numbers K3100-01 and K3100-02; Publication Part Number 7015021). As amostras foram sequenciadas por eletroforese capilar em aparelho

ABI3730, no Laboratório Myleus Biotecnologia, Belo Horizonte – MG e comparadas aos isolados depositados no Genbank (Tabela 7).

Análises estatísticas

Todos os experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$), utilizando o programa computacional ASSISTAT (versão 7.7 pt; Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Brasil).

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, observou-se que os isolados de *Trichoderma longibrachiatum* (013) e *T. asperellum* (177 e 162) são importantes antagonistas a *Diaporthe destruens* (isolado TH9), podendo ser utilizados no manejo do mal-do-pé da batata-doce. Este é o primeiro relato da redução dos sintomas do mal-do-pé pela ação antagonista que *Trichoderma* spp. sobre *D. destruens*.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa; à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), ao Programa de Pós Graduação em Fitopatologia, pela disponibilização de estrutura para realização do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELRAHMAN, M.; ABDEL-MOTAAL, F.; EL-SAYED, M.; JOGAIHAH, S.; SHIGYO, M.; ITO, S.; TRAN, L. P. Dissection of *Trichoderma longibrachiatum*-induced defense in onion (*Allium cepa* L.) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepa* by target metabolite profiling. **Plant Science**. v, 246, p. 128–138, 2016.

ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; MAFIA, R. G.; GONÇALVES, R. C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; M (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV. p. 53-90, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE CONTROLE BIOLÓGICO (ABCBio). Biodefensivos registrados. Disponível em: < <http://www.abcbio.org.br/biodefensivos-registrados/> > Acesso em: 10 mar, 2018.

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. **Consulta de Praga/Doença**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/lap_praga_detalhe_cons?p_id_cultura_praga=5835> Acesso em: 10 mar, 2018.

- BAE, Y.S.; KNUDSEN, G.R. Soil microbial biomass influence on growth and biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**. v.32, p.236-242, 2005.
- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAN, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal pathogens. **Phytopathology**. St. Paul, v. 72, p. 379-382, 1982.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**. v, 7, p. 249-260, 2004.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; PAULA JÚNIOR, T. J. V.; CORRÊA, E. B.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J. L. Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas, Jaguariúna, SP: **Embrapa Meio Ambiente**. p. 155, 2012.
- BONETT, L.P.; HURMANN, E.M.S.; POZZA JÚNIOR, M.C.; ROSA, T.B.; SOARES, J.L. Biocontrole *in vitro* de *Colletotrichum musae* por Isolados de *Trichoderma* spp. **Uniciências**. v. 17, n. 1, p. 5-10, 2013.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 24, p. 270-276, 1939.
- CHET, I.; INBAR, J.; HADAR, I. Fungal antagonists and mycoparasites. In: WICKLOW, D. T., SODERSTROM, B. (ed.) *The mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Berlin: **Springer-Verlag**. p. 165-184, 1997.
- CLARK, C. A.; HOLMES, G. L.; FERRIN, D. M. Major fungal and bacterial diseases. In: LOEBENSTEIN, G.; TROTTAPPILLY, G. (Ed.). *The sweetpotato*. Netherlands: **Springer**. p. 81-103, 2009. e-book.
- DAS, S. N.; SARMA, T. C.; TAPADAR, S. A. In vitro evaluation of fungicides and two species of *Trichoderma* against *Phomopsis vexans* causing fruit rot of brinjal (*Solanum melongena* L.). **International Journal of Scientific and Research Publications**. v, 4, nº 9, 2014.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. **Transactions British Mycological Society**. Manchester, v. 57, nº. 1, p. 363-369, 1971.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2 ed. 306p.Rio de Janeiro, 2006.
- EL_KOMY, M. H.; SALEH, A. A.; ERANTHODI, A.; MOLAN, Y. Y. Characterization of Novel *Trichoderma asperellum* Isolates to Select Effective Biocontrol Agents Against Tomato Fusarium Wilt. Korean. **The Plant Pathology Journal**. v, 31, nº 1, p. 50-60, 2015.
- GAO, Y.; LIU, F.; DUAN, W.; CROUS, P. W.; CAI, L. *Diaporthe* is paraphyletic. **IMA FUNGUS**. v. 8. Nº 1, p. 153–187. 2017.
- GAVA, C.A.; MENEZES, M.E.L. Eficiência de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de patógenos do solo em meloeiro amarelo. **Revista Ciência Agronômica**. v.43, p.633-640, 2012.

GHAZALIBIGLAR, H.; KANDULA, D.R.W.; HAMPTON, J.G. Biological control of fusarium wilt of tomato by *Trichoderma* isolates. Nova Zelândia. **New Zealand Plant Protection**. v, 69, p. 57-63, 2016.

HARTER, LL.; FIELD, EC. Diaporthe, the ascogenous form of sweet potato dry rot. **Phytopathology**. v. 2, p. 121-124, 1912.

HARTER, L. L.; Pathologist, Cotton and Truck Disease and Sugar-Plant Investigations, Bureau of Plant Industry. **Journal of Agricultural Research**, Dept. of Agriculture, Washington, D. C. v. 1, n°. 3, 1913.

HANADA, R. E.; JORGE SOUZA, T.; POMELLA, A. W.; HEBBAR, K. P.; PEREIRA, J. O.; ISMAIEL, A.; SAMUELS, G. J. *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. **Mycological Research**. v. 112, n°. 11, p. 1335-43, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**, 2016. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>. Acessado em: 20/12/2017.

JUNGES, E.; MUNIZ, M. F.; MEZZOMO, R.; BASTOS, B.; MACHADO R. T. *Trichoderma* spp. na Produção de Mudanças de Espécies Florestais. **Floresta e Ambiente**. v. 23(2), p. 237-244, 2016.

KUSHWAHA. M.; VERMA, AK. Antagonistic Activity of *Trichoderma* Spp, (A BioControl Agent) Against Isolated and Identified Plant Pathogens. **IJCBS RESEARCH PAPER**. v 1 [ISSUE 1]. ISSN:- 2349–2724, 2014.

LEE, YJ; MANNAA, M; JEONG, J-J. First Report of Dry Rot of Sweetpotato (*Ipomoea batatas*) Caused by *Diaporthe batatas* in Korea. **Plant Disease**. v. 100, n° 8, p. 1786, 2016.

LUZ, R. L. **Identificação e aspectos de biocontrole de isolados de *Trichoderma* spp. oriundos de solos agrícolas do norte do Maranhão**. 2012. 126f. Dissertação (mestrado em Biologia Parasitária). Universidade CEUMA. São Luís, Maranhão.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C.F.; ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**. v. 35, 1, p. 274-288, ISSN: 0871-018 X, 2012.

MATOS, D. L.; ALVES, C. F.; FELITO, R. A.; DAVID, G. Q.; PERES, W. M. Biocontrole de *Phytophthora* sp. por isolados de *Trichoderma* spp. *in vitro*. **Cadernos de Agroecologia**. v. 11, N. 2 – ISSN 2236-7934, 2016.

MICHEREFF, S J. **Fundamentos de Fitopatologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco. p. 150, 2001.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**. v. 8, p.4321-4325, 1980.

PEREIRA, R. B.; FERNANDES, F. R.; PINHEIRO, J. B. Recomendações para manejo da podridão-do-pé em batata-doce. 5 p. Brasília, DF: **Embrapa Hortaliças**, 2011. (Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico, 79)

PUNITHALINGAM, E. Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae*. **Vaduz: Pat. J. Cramer**. p.123, 1980.

SANJAY, R.; PONMURUGAN, P.; BABY, U. I. Evaluation of fungicides and biocontrol agents against grey blight disease of tea in the field. **Crop Protection**. v, 27, p. 689–694, 2008.

SANTOS-VILLALOBOS, S.; DORALINDA, A. G-O.; GÓMEZ-LIM, M. A.; DÉLANO-FRIER, J. P.; DE-FOLTER, S.; SÁNCHEZ-GARCÍA, P.; PEÑA-CABRIALES, J. J. Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). **Biological Control**. v., 64, p. 37–44, 2013.

SHAHID, M.; SRIVASTAVA, M.; SHARMA, A.; SINGH, A.; PANDEY, S.; KUMAR, V.; PATHAK, N.; RASTOGI, S. Molecular characterization of *Trichoderma longibrachiatum* 21PP isolated from rhizospheric soil based on universal ITS primers. **African Journal of Microbiology Research**. v. 7, n°. 41, p. 4902-4906, 2013.

SIMON, C.; SIVASITHAPARAM, M. Interaction among *Gaeumannomyces graminum* var. *tritici*, *Trichoderma koningii* and soil bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**. v, 34, p.871-876, 1988.

TCHAMENI, SN.; SAMEZA, ML.; O'DONOVAN, A.; FOKOM, R.; NGONKEU, ELM.; NANA, LW.; ETOA, F-X.; NWAGA, D. Antagonism of *Trichoderma asperellum* against *Phytophthora megakarya* and its potential to promote cacao growth and induce biochemical defence. **MYCOLOGY**. v. 8, n°. 2, p. 84–92, 2017.

VEY, A.; HOAGLAND, R.E.; BUTT, T.M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.N. Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. **Bristol: CAB International**. p.311- 346, 2001.

VINODKUMAR, S; INDUMATHI, T; NAKKEERAN, S. *Trichoderma asperellum* (NVTA2) as a potential antagonist for the management of stem rot in carnation under protected cultivation. **Biological Control**. v. 113, p. 58–64, 2017.

WU, Q.; SUN, R.; NI, M.; YU, J.; LI, Y.; YU, C.; DOU, K.; REN, J.; CHEN, C. Identification of a novel fungus, *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its biocontrol efficacy. **PLOS ONE** 12(6): e0179957. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179957>. 2017> Acesso em 11 mar. 2018.

ZHANG, S.; XU, B.; ZHANG, J.; GAN, Y. Identification of the antifungal activity of *Trichoderma longibrachiatum* T6 and assessment of bioactive substances in controlling phytopathogens. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.02.006>> Acesso em 10 mar. 2018.

ANEXO I – FIGURAS

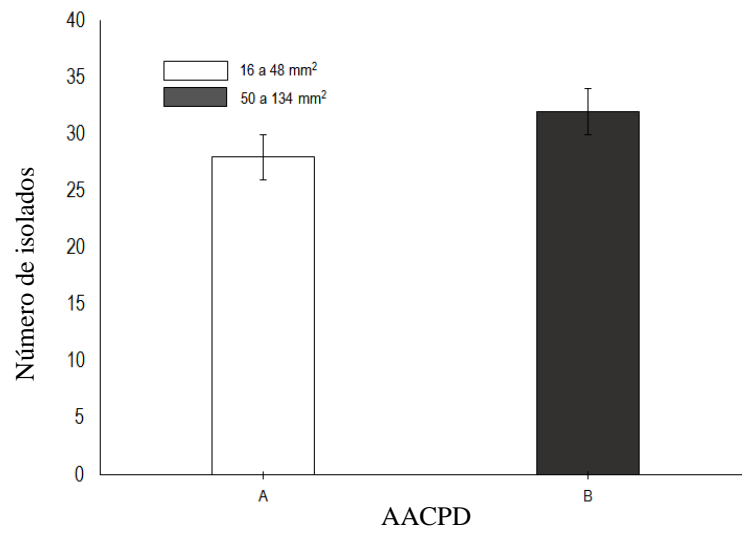


Figura 1. Agrupamento estatístico quando a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) dos isolados de *Diaporthe destruens* em túberas de batata-doce.

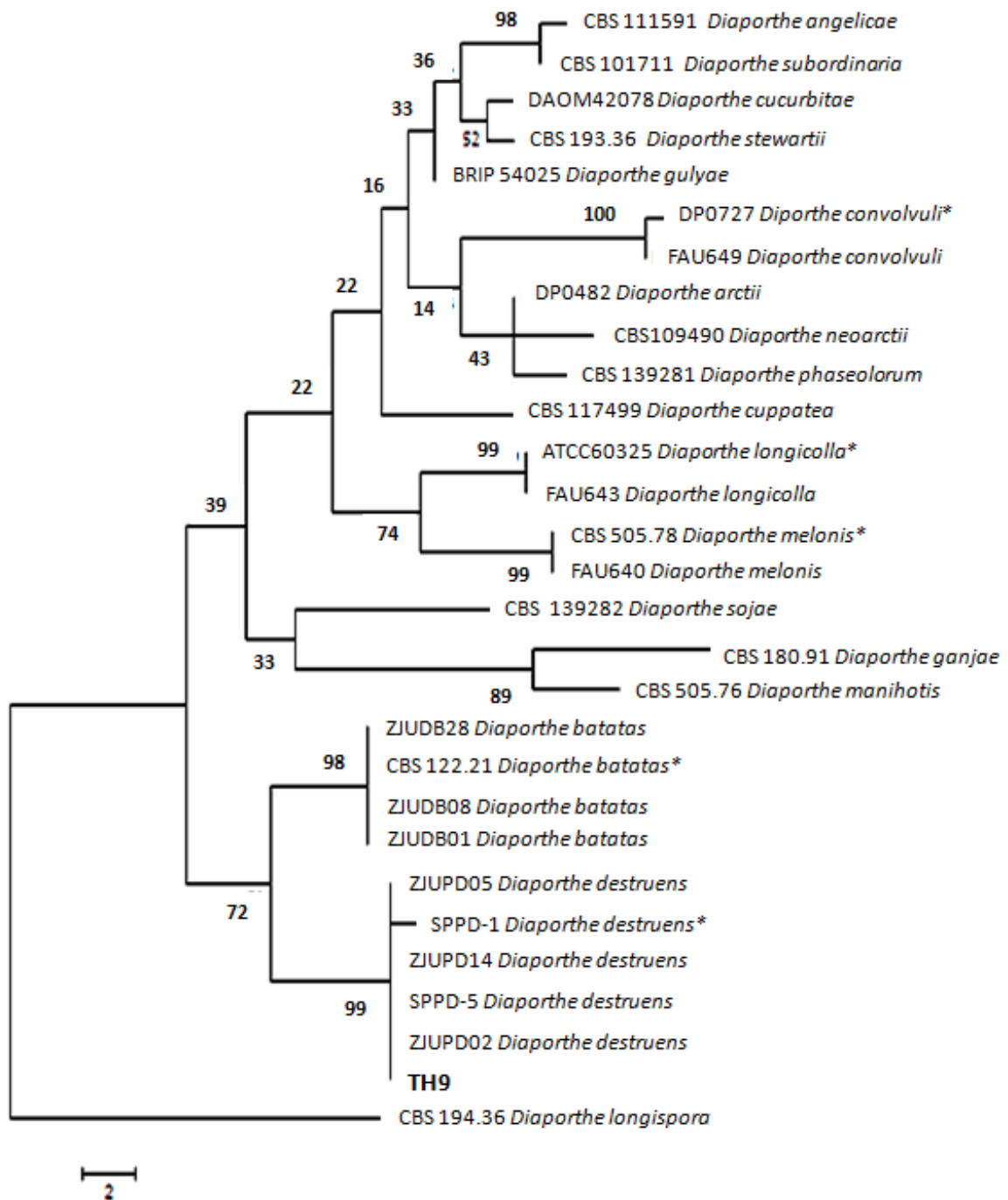


Figura 2. Filograma obtido pela análise de Máxima Parcimônia (MP) e Bootstrep (BO), com 1000 repetições, de alinhamento de seqüências gênicas com 1758 pb das regiões EF; Apn2 e ITS1 e ITS4, de *Diaporthe spp.*, em relação ao *Diaporthe longispora*, outgroup.

ANEXO II – TABELAS

Tabela 1. Procedência de isolados de *Diaporthe destruens* utilizados nos testes de patogenicidade.

Localidade	Isolados*
Zona da Mata	59 isolados
São Joaquim do Monte	TH1 – TH23
Belém de Maria	TH24 – TH53
Palmares	TH54 – TH59
Agreste	51 isolados
Cupira	TH60 – TH64
Lagoa dos Gatos	TH65 – TH110

Tabela 2. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) de *Diaporthe destruens* em túberas de batata-doce.

Isolado	AACPD	Isolado	AACPD	Isolado	AACPD
TH1	55,17667 ± 3,02 a	TH38	38,77667 ± 6,13 b	TH80	122,23333 ± 21,14 a
TH2	46,75667 ± 5,11 b	TH39	112,09000 ± 8,87 a	TH81	31,61667 ± 6,37 b
TH3	42,74333 ± 22,77 b	TH40	75,33000 ± 3,03 a	TH82	22,22333 ± 2,42 b
TH9	128,13333 ± 22,25 a	TH42	42,23000 ± 8,51 b	TH84	37,57333 ± 1,59 b
TH10	91,38667 ± 20,57 a	TH44	75,82000 ± 1,22 a	TH85	25,87667 ± 1,17 b
TH11	68,16333 ± 21,40 a	TH46	78,57000 ± 45,84 a	TH86	24,08333 ± 5,61 b
TH12	30,78667 ± 11,17 b	TH47	82,69333 ± 26,83 a	TH87	36,66333 ± 7,59 b
TH13	37,85333 ± 26,10 b	TH48	94,87000 ± 34,52 a	TH89	35,15000 ± 0,97 b
TH16	36,10333 ± 13,83 b	TH49	60,50667 ± 4,67 a	TH90	60,22667 ± 29,18 a
TH18	85,20667 ± 17,44 a	TH51	56,67000 ± 9,39 a	TH91	45,00000 ± 44,33 b
TH20	33,78333 ± 3,58 b	TH55	58,33000 ± 25,17 a	TH93	94,13667 ± 52,29 a
TH23	33,39333 ± 13,04 b	TH57	47,92000 ± 3,80 b	TH94	90,23667 ± 37,78 a
TH26	83,56667 ± 37,84 a	TH58	83,05333 ± 2,05 a	TH95	34,70667 ± 4,32 b
TH30	62,75667 ± 14,38 a	TH59	35,53333 ± 5,59 b	TH96	79,29000 ± 20,16 a
TH31	37,72667 ± 2,33 b	TH60	15,18000 ± 2,03 b	TH97	24,24000 ± 1,26 b
TH32	39,33333 ± 14,90 b	TH61	89,67000 ± 2,06 a	TH99	51,25667 ± 3,56 a
TH33	51,35333 ± 4,17 a	TH62	38,34333 ± 6,46 b	TH100	19,28667 ± 5,10 b
TH34	133,57667 ± 19,56 a	TH66	30,18333 ± 12,07 b	TH101	30,00000 ± 0,91 b
TH35	39,54667 ± 1,18 b	TH68	50,74333 ± 6,38 a	TH102	31,14667 ± 11,08 b
TH36	39,64333 ± 5,51 b	TH74	90,90333 ± 22,59 a	TH103	37,07000 ± 7,78 b

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3. Porcentagem de Inibição de Crescimento Micelial - (PICM - mm) de *Diaporthe destruens* por isolados de *Trichoderma* spp.

Isolado	Escala Bell et al (1982)	Halo	PICM(%)*
M367	1	N	48.41200 a
F258	2	N	25.88245 c
J432	1	N	53.22345 a
M476	1	N	19.38163 d
25	1	S	35.11045 b
K529	2	S	12.51618 e
TRIC 147	2	S	25.25458 c
TRIC 178	2	N	27.81350 c
149	2	S	24.90938 c
I376	1	S	47.77333 a
177	1	S	44.67938 a
161	1	S	43.34168 a
A149	2	S	25.95150 c
B168	1	N	46.23285 a
162	1	S	48.37103 a
L374	2	N	35.46650 b
179	2	N	31.22680 b
C217	2	N	33.71450 b
G319	1	N	51.52543 a
013	1	N	46.10343 a
D230	2	N	33.42323 b

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 4. Efeito de isolados de *Trichoderma* spp. no controle biológico de *Diaporthe destruens*, avaliado pela Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD - mm²), na variedade de batata-doce Co-Roxa.

Isolado	AACPD*
161	421.44928 a
G319	496.85318 a
013	331.40022 b
B168	500.17022 a
J432	451.65224 a
177	284.15716 b
162	313.05982 b

H367	446.73474 a
I376	446.79310 a
Controle	514.97588 a

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 5. Efeito de isolados de *Trichoderma* spp. no controle biológico de *Diaporthe destruens*, avaliado pela Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD - mm²), nas variedades de batata-doce Co-Roxa e Co-Branca.

Isolado	AACPD (Co-Roxa) *	AACPD (Co-Branca) *
013	19.640000 a	25.533714 ab
162	13.975714 a	20.087143 a
177	11.402857 a	18.670000 a
Controle	42.607857 b	33.786429 b

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 6. Primers utilizados na identificação molecular de *Trichoderma* spp. e *Diaporthe destruens*.

Primer	Sequência
ITS 1	5'-TCCGTWGGTGAACCWGC-3'
ITS 4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
EF1 – 728F	5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3'
TEF1R	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
APN2FW2	5'- GCMATGTTYGAMATYCTGGAG-3'
APN2RW2	5'-CTT GGTCTCCCAGCAGGTG AAC-3'

Tabela 7. Fontes de isolados e números de acesso GenBank utilizados nas análises filogenéticas de *Diaporthe* spp.

Espécies	Isolado/ coleção	Hospedeiro	País	ITS	EF1-a	APN2
<i>Diaporthe angelicae</i>	CBS 111591, AR 3724*	<i>Heracleum sphondylium</i>	Austria	KC343026	KC343752	KM016684
<i>D. arctii</i>	DP0482, CBS 139280*	<i>Arctium lappa</i>	Austria	KJ590736	KJ590776	KM016682
<i>D. batatas</i>	ZJUDB01	<i>Ipomoea batatas</i>	China	KP938292	KP973883	
<i>D. batatas</i>	ZJUDB08	<i>Ipomoea batatas</i>	China	KP938293	KP973885	
<i>D. batatas</i>	ZJUDB28	<i>Ipomoea batatas</i>	China	KP938296	KP973891	

<i>D. batatas</i>	CBS 122.21*	<i>Ipomoea batatas</i>	USA L.H.	KC343040	KC343766	KM016677
<i>D. convolvuli</i>	CBS 124654, DP0727*	<i>Convolvulus arvensis</i>	Turkey	KC343054	KC343780	
<i>D. convolvuli</i>	FAU649	<i>Convolvulus arvensis</i>	Canada	KJ590721	KJ590765	KM016674
<i>D. cucurbitae</i>	DAOM42078*	<i>Cucumis sativus</i>	Canada	KM453210	KM453211	
<i>D. cuppatea</i>	CBS 117499, STE-U 5431*	<i>Aspalathus linearis</i>	South Africa	KC343057	KC343783	
<i>D. ganjiae</i>	CBS 180.91, ILLS43621*	<i>Cannabis sativa</i>	USA:IL	KC343112	KC343838	
<i>D. gulyae</i>	BRIP 53158*	<i>Helianthus annuus (wild)</i>	Australia	JF431284	JN645799	
<i>D. longicolla</i>	FAU599, ATCC 60325*	<i>Glycine max</i>	USA:OH	KJ590728	KJ590767	KM016676
<i>D. longicolla</i>	FAU643	<i>Glycine max</i>	USA: MD	KJ590731	KJ590770	
<i>D. longispora</i>	CBS 194.36*	<i>Grossulariaceae</i>	Canada	KC343135	KC343861	
<i>D. manihotis</i>	CBS 505.76*	<i>Manihot utilissima</i>	Ruanda	KC343138	KC343864	
<i>D. melonis</i>	CBS 507.78*	<i>Cucumis melo</i>	USA:TX L.	KC343142	KC343868	KM016680
<i>D. melonis</i>	FAU640	<i>Cucumis melo</i>	USA:TX	KJ590702	KJ590741	
<i>D. neoarctii</i>	AR3450,GB6421, ¼ CBS 109490*	<i>Ambrosia trifida</i>	USA:NJ	KC343145	KC343871	KM016683
<i>D. phaseolorum</i>	AR4203, CBS 139281*	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA:DE	KJ590738	KJ590739	
<i>D. sojiae</i>	FAU635, CBS 139282*	<i>Glycine max</i>	USA:OH	KJ590719	KJ590762	KM016675
<i>D. stewartii</i>	CBS 193.36*	<i>Cosmos bipinnatus</i>	USA	FJ889448	GQ250324	
<i>D. subodinaria</i>	CBS 101711*	<i>Plantago lanceolata</i>	New Zealand	KC343213	KC343939	
<i>D. destruens</i>	SPPD-1*	<i>Ipomoea batatas</i>	China	JN848791		
<i>D. destruens</i>	SPPD-5	<i>Ipomoea batatas</i>	China	JX421687		
<i>D. destruens</i>	ZJUPD02	<i>Ipomoea batatas</i>	China	KP990617	KP990647	
<i>D. destruens</i>	ZJUPD05	<i>Ipomoea batatas</i>	China	KP990620	KP990650	
<i>D. destruens</i>	ZJUPD14	<i>Ipomoea batatas</i>	China	KP990623	KP990653	

CAPÍTULO III

**Potencial biocontrolador de *Candida orthopsilosis* e *Moesziomyces aphidis* sobre
*Diaporthe destruens***

POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE *Candida orthopsilosis* E *Moesziomyces aphidis*
SOBRE *Diaporthe destruens*

ALMEIDA, T. R. P^{1.}; COELHO, I. L^{1.}; CÂMARA, M. P. S^{1.}; VIEIRA, W. A. S^{1.}; NEVES,
R. P^{2.}; LARANJEIRA, D.^{1.};

¹Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

²Departamento de Micologia. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos.

RESUMO

Patógenos radiculares são responsáveis por grandes perdas de produtividade da cultura da batata-doce, dentre eles destaca-se o fungo *Diaporthe destruens*, agente causal do mal-do-pé da batata-doce. Não há registro de produtos químicos para controle do fungo no Brasil, sendo o biocontrole uma alternativa viável para manejo da doença. O presente trabalho objetivou avaliar a atividade biocontroladora de isolados de leveduras sobre *D. destruens*. Foram realizados testes de cultivo conjunto e difusão de compostos, para seleção *in vitro*, e testes em mudas das variedades Co-Branca e Co-Roxa, para seleção *in vivo*. O isolado patogênico TH9 foi escolhido para os experimentos. No cultivo conjunto, todos os isolados de leveduras inibiram o crescimento micelial do patógeno, enquanto na difusão de compostos, 15 isolados de leveduras mostraram melhores resultados. Destes 15 isolados testados em mudas, quatro foram eficientes na redução dos sintomas da doença, nos testes *in vivo*, nas variedades Co-Roxa e Co-Branca. Os resultados mostram que houve redução nos sintomas da doença nas mudas, pelos isolados LFB22 e LCB25 (*Candida orthopsilosis*); LFB15 e LFB13 (*Moesziomyces aphidis*), indicando que as leveduras são promissores agentes biocontroladores para o manejo do Mal-do-pé da batata- doce, ajudando a reduzir as perdas causadas pela ação do patógeno, podendo essas espécies ser utilizadas no manejo da doença. Este é o primeiro relato da ação antagônica e do biocontrole, em mudas de batata-doce, por estas leveduras.

Palavras-chaves: Batata-doce. Biocontrole. Leveduras. Mal-do-pé.

ABSTRACT

Root pathogens are responsible for large losses of productivity of the sweet potato crop, among them the *Diaporthe destruens* fungus, causal agent of foot rot of sweet potato. There is no registration of chemical products for fungus control in Brazil, and biocontrol is a viable alternative for the management of the disease. The present study aimed to evaluate the biocontrol activity of yeast isolates on *D. destruens*. *In vitro* selection and compound selection tests were performed and for *in vivo* selection were performed tests on Co-Branca and Co-Roxa seedlings. The pathogenic isolate TH9 was chosen for the experiments. In the whole culture, all yeast isolates inhibited the mycelial growth of the pathogen, while in the diffusion of compounds, 15 isolates of yeasts showed better results. Of these 15 isolates tested on seedlings, four were efficient in reducing symptoms of the disease, in the *in vivo* tests, in the Co-Roxa and Co-Branca varieties. The results show that there was a reduction in the symptoms of the disease in the seedlings, by the isolates LFB22 and LCB25 (*Candida orthopsilosis*); LFB15 and LFB13 (*Moesziomyces aphidis*), indicating that yeasts are promising biocontrol agents for the management of Sweet Potato Malaria, helping to reduce the losses caused by the action of the pathogen, and these species can be used in the management of the disease. This is the first report of the antagonistic action and the biocontrol, in sweet potato seedlings, by these yeasts.

Key words: Biocontrol. Foot rot. Sweet potato. Yeasts.

INTRODUÇÃO

A batata-doce (*Ipomoea batatas*) é uma hortaliça pertencente à família Convolvulaceae, com origem na América Central e do Sul. Seu caule é herbáceo, tem hábito prostrado e sua propagação é vegetativa, através de ramos, mudas, estacas ou sementes. Com produção média anual de aproximadamente 525.800 toneladas, no Brasil, a cultura gera um lucro de R\$526.084.000 por ano (IBGE, 2016). Considerada rústica, tem boa adaptabilidade a diferentes características edafoclimáticas e baixo custo de produção, sendo assim produzida em todo Brasil (PEREIRA; FERNANDES; PINHEIRO, 2011). Os patógenos radiculares são responsáveis por grandes perdas econômicas na produção de hortaliças em todo o mundo, pois possuem uma ampla gama de hospedeiros, sendo a batata-doce uma das culturas mais afetadas no Brasil (MICHEREFF, 2005; ANDRADE; MENEZES, 2005).

Entre os principais patógenos que afetam a cultura pode-se destacar o fungo *Diaporthe destruens*, agente causal do mal-do-pé da batata-doce. Trata-se de um patógeno radicular, no qual pode ocasionar perdas de até 80% na produtividade, principalmente em áreas de cultivo intenso, sem rotação de cultura, afetando principalmente as túberas (CLARK et al., 2009). O patógeno pode infectar a cultura em todo o ciclo de cultivo e as túberas durante o armazenamento. Um fator que predispõe o aparecimento da doença é a proximidade entre a temperatura ideal para o desenvolvimento do patógeno e para o crescimento de produção da batata-doce, em torno de 24°C. Tais características podem ser encontradas nas principais regiões produtoras do estado de Pernambuco, que figura entre os dez principais produtores de batata-doce do país. O patógeno sobrevive em restos culturais, hospedeiros alternativos, podendo ainda criar estruturas de resistência que o permitem sobreviver por até três anos no solo (EMBRAPA, 2006; PEREIRA; FERNANDES; PINHEIRO, 2011).

A disseminação do patógeno nas áreas produtoras do Brasil se verifica através da propagação de ramos de áreas infestadas para áreas sadias, tendo em vista que essa é a principal forma de propagação da cultura. Os sintomas iniciam-se com um cancro de coloração variando entre castanha clara e preta, seguido de murcha, amarelecimento das folhas e morte da planta. Os sintomas aparecem geralmente na região do colo da planta podendo atingir a região de 10 a 20 cm acima da linha do solo. Em níveis altos de infestação, as raízes podem ser destruídas, impedindo a formação das túberas, reduzindo a produtividade da cultura (PEREIRA; FERNANDES; PINHEIRO, 2011).

O controle de *D. destruens* é feito, principalmente, através da aquisição de mudas sadias e de cultivares resistentes, mas não há registros de produtos químicos para manejo, no Brasil. Por isso, o controle biológico tem se tornado uma alternativa viável para manejo da

doença, tendo em vista a crescente preocupação com residuais deixados por produtos químicos no meio ambiente. Um método alternativo de manejo da doença pouco estudado é o controle biológico com leveduras, não havendo relatos para a espécie *D. destruens*.

Existem vários exemplos de sucesso de controle biológico com leveduras, a exemplo de *Moesziomyces aphidis*, induzindo a resistência de plantas de tomate a *Clavibacter michiganensis* (BARDA et al., 2015). Buxdorf et al. (2013), mostraram a a resistência local induzida por *M. aphidis* através da produção de ácido jasmônico e salicílico. Sriram; Poornachanddra (2013) mostraram que *Candida tropicalis* pode ser utilizada para controle da podridão dos frutos de manga, causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, sendo uma alternativa viável à redução do uso de fungicidas tóxicos aos seres humanos.

Outro fator que oferece vantagens à competição de leveduras com outros fitopatógenos é a excreção de toxinas killer, uma vez que são autoimunes às toxinas que excretam, mas suscetíveis às excretadas por outros isolados, inclusive da mesma espécie (GIOVATI et al., 2018). Isolados de *Moesziomyces aphides* são capazes de expressar o fenótipo killer (DOGEN et al., 2017). Vale salientar que a atividade killer não pode ser utilizada como um único parâmetro para seleção de antagonistas, pois é um fator que pode variar entre os isolados. Além disso, algumas espécies que não expressam este fator podem ser excelentes biocontroladoras, como é o caso de *Candida* spp., onde *Candida orthopsilosis* não excretam toxinas killer, como mostrado por Robledo-Leal et al. (2014), mas podem ser eficientes agentes antagonistas.

A adoção de medidas de manejo que causam menos impactos ao meio ambiente vem sendo a prioridade na escolha dos métodos utilizados para controle de doenças, em sua maioria. Por este motivo o biocontrole, através de microorganismos inócuos aos animais e aos seres humanos está em constante crescimento. Diante do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar a atividade biocontroladora *in vitro* e *in vivo* de leveduras, isoladas do filoplano da batata-doce, sobre *Diaporthe destruens*, agente causal do mal-do-pé da batata-doce, bem como a identificação molecular dos isolados selecionados nesta pesquisa.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram realizados em casa de vegetação e no Laboratório de Fungos do Solo, da área de Fitossanidade, no Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Nos experimentos foi utilizado o isolado TH9 de *D. destruens*, o qual pertence ao Laboratório de Fungos de Solo (UFRPE). Esse isolado é altamente agressivo à cultivar de batata-doce Co-Branca e foi identificado molecularmente com os as regiões ITS1 e ITS4, APN2 e TEF1 (ALMEIDA, 2018).

Obtenção das leveduras utilizadas como agentes de controle biológico

As leveduras testadas no controle do mal-do-pé da batata-doce foram isoladas de caule e folhas sadias de plantas de batata-doce. Para o isolamento foram retirados 6 fragmentos de folha e 8 fragmentos do caule, os quais foram colocados separadamente em tubos de ensaio contendo água destilada esterilizada-ADE (10 mL) adicionada de cloranfenicol (50 mg.L⁻¹) mantidos sob agitação em banho de ultra-som durante 25 minutos e colocados em vórtex durante 30 segundos. Retiraram-se alíquotas de 0,1 mL e distribuídas em placas de Petri contendo meio Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YEPD+ágar) e mantidas à temperatura de 25±2°C durante um período de 72 horas. As colônias foram isoladas através da observação das características morfológicas, tais como cor, textura, forma, borda, superfície e elevação e repicadas para placas contendo meio ágar YEPD+ágar para purificação. Posteriormente, foram conservadas em óleo mineral (28±2°C) e pelo método de Castellani (1939).

Teste de patogenicidade a seres humanos

Os isolados obtidos foram cultivados em placas de Petri, em meio YEPD+ágar, e mantidos em câmara BOD, à temperatura de 37±2°C, durante cinco dias. O experimento constou de quatro repetições, sendo avaliado o crescimento das colônias após esse período.

*Antagonismo “in vitro” de leveduras a *Diaporthe destruens**

Cultivo conjunto

Os isolados foram cultivados em placas de Petri, contendo meio ágar + YEPD, e mantidos à temperatura de 25±2°C durante um período de 48 horas. Após esse período, foi feita a suspensão com leveduras, com concentração de 10⁸ células/mL, em solução tampão PBS 1x, plaqueando 1 mL em placa de Petri com meio YEPD + Ágar. Com auxílio do swab, espalhou-se a suspensão uniformemente por toda a placa, até secarem. Em seguida, depositou-se um disco com o patógeno, com sete dias de cultivo em meio BDA, no centro da placa de Petri.

O experimento constou de 52 tratamentos mais o controle só com patógeno, com cinco repetições cada, sendo as avaliações realizadas através da medição da Porcentagem de Inibição de Crescimento Micelial (PICM) do patógeno, diariamente, por 12 dias.

Difusão de compostos

A difusão de compostos foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Coelho (2018), com adaptações. O patógeno foi cultivado em meio BDA por sete dias, para utilização do disco contendo crescimento micelial. As placas foram vedadas e acondicionadas em câmara BOD, por 96 horas, sendo avaliadas diariamente, através da Porcentagem de Inibição de Crescimento Micelial (PICM) do patógeno.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 52 tratamentos, contendo cinco repetições cada, sendo avaliado diariamente, por 12 dias.

Determinação da atividade Killer das leveduras

A presença do fenótipo *killer* foi avaliada em meio YEPD suplementado com 0,003% de azul de metileno (YEPD-azul de metileno). A levedura sensível padrão foi ativada em Ágar+YEPD a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas e suspensas em solução salina, numa concentração de aproximadamente $4,0 \times 10^{-1}$ células mL, e em seguida espalhadas com swab estéril sob a superfície de ágar YEPD+azul de metileno. As placas ficaram incubadas a 25°C por 30 minutos. As leveduras estudadas nesse teste foram ativadas em meio Ágar+YEPD, por 48 horas e inoculadas em pontos determinados na placa de Petri, para posterior comparação com as leveduras sem e com fenótipo killer. A avaliação se deu pela presença ou ausência do halo de inibição, indicativo da produção de toxinas killer.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, após 48 horas de incubação, com 52 tratamentos, contendo cinco repetições cada, sendo avaliada a expressão do halo de inibição através da expressão do halo fraco (+), moderado (++), forte (+++) e sem expressão de halo (-).

Antagonismo “in vivo”

Para este teste, foram escolhidas as leveduras que obtiveram melhores resultados nos testes *in vitro*. O substrato, constituído por terra vegetal, pó de carvão, estrume, pó de coco, torta de mamona, adubo 101010 e farinha de osso, foi esterilizado em autoclave (120°C , 1 atm, 60 min, 2 dias consecutivos). As mudas de batata-doce das cultivares Co-Branca e Co-Roxa foram obtidas de ramas sadias, deixando-se duas gemas por rama. Para enraizamento das gemas, os fragmentos foram colocados em água, por três dias, sendo a água renovada diariamente. Após o período de enraizamento, as ramas foram plantadas em vasos de 2 litros e tutoradas com auxílio de Palitos (25 cm). As mudas foram irrigadas a cada 48 horas e sete dias após o plantio receberam adubo químico (47,25g de KNO_3 , 21g MaP, 2,63g Quelatec;

2,63g ultraferro; 78,75g Ca(NO₃)₂; 42g MgSO₄). Ap partir do sétimo dia da aplicação do adubo, realizou-se a inoculação das leveduras, através de pulverização da parte aérea. A suspensão de leveduras foi calibrada, em câmara de Neubauer, para concentração de 10⁷ células/mL e, em seguida realizou-se a curva de regressão para calibração das suspensões no Fotocolorímetro Microprocessado Analyser, com absorvância de onda de 570, criando-se equações de regressão de acordo com a turbidez da suspensão.

Foram realizadas pulverizações utilizando-se 20 mL de suspensão. Após quatro dias da inoculação das leveduras, procedeu-se a inoculação do patógeno no caule da planta, realizando-se seis perfurações, de 1 mm, no caule da planta, para a penetração do patógeno, com auxílio de agulha hipodérmica e a inoculação realizada através de discos de meio BDA, contendo crescimento micelial do fungo. Na testemunha, utilizou-se apenas disco de meio BDA. Para uma melhor fixação do disco ao caule da planta, usou-se fita crepe, que foi retirada 48 horas após a inoculação. As mudas foram incubadas em câmara úmida, retiradas 48 horas após a inoculação, para prosseguimento das avaliações, durante 11 dias.

Cada ponto de inoculação correspondeu a uma repetição, tendo cada planta duas repetições. Foram avaliados também os tratamentos com testemunha absoluta (plantas desenvolvidas sem a levedura e sem o patógeno) e testemunha relativa (plantas apenas infectadas com o patógeno). Após a inoculação do patógeno, a planta ficou em câmara úmida, por 48 horas, sendo retirada após esse período. As avaliações foram realizadas 4 dias após a inoculação do patógeno, diariamente, durante 11 dias.

O experimento foi constituído de 15 tratamentos com 18 repetições, sendo cada repetição composta de um ponto de inoculação, em delineamento inteiramente casualizado. Foi realizada a medição dos sintomas com paquímetro digital, para realização do cálculo da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD).

Com os resultados obtidos, foram selecionados os melhores isolados de leveduras para a repetição do experimento, nas variedades Co-Roxa e Co-Branca. A repetição do experimento foi realizada com nove tratamentos, mais a testemunha absoluta, sob as mesmas condições descritas acima.

Identificação molecular dos isolados de leveduras

Para preparo da amostra, as Leveduras foram cultivadas por três dias, em meio Ágar + YEPD. Para liberação do conteúdo celular, fez-se uma suspensão com o isolado da levedura em tampão de extração, colocando-a no congelador por, aproximadamente, 2 horas. Após esse período, seguiu-se o protocolo para extração de DNA, adaptado de Murray & Thompson (1980). Para identificação dos isolados de leveduras, amplificou-se a região ITS, tanto para as

leveduras, quanto para o patógeno, por meio de técnicas de PCR (Reação de Cadeia Polimerase), utilizando os primers ITS 1 (senso: 5' TCC GTW GGT GAA CCW GC 3') e ITS 4 (anti-senso: 5' TCCTCC GCT TAT TGA TAT GC 3') que correspondem às regiões ITS 1 e ITS 2.

Para a realização da PCR utilizou-se 1 µL de DNA extraído (com concentração de 50 ng), 1,8 µL de cada oligonucleotídeo, 1,8 µL de MgCl₂, 2 µL de tampão de reação 10x PCR Rxn Buffer (-MgCl₂) (Invitrogen), 2 µL de dNTP 10 nM, 1 µL de DMSO e 0,13 µL de Taq DNA polimerase (5U/ µL) (Invitrogen), completando o volume da reação para 25 µL com água deionizada esterelizada. A reação foi conduzida em termociclador 2720 Thermal Cycler (applied biosystems), com a seguinte ciclagem: 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 57 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto; com extensão final de 72 °C por 10 minutos.

A presença do produto amplificado foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % em tampão TBE 0,5 (1X), contendo 54 g Tris; 27,5 g ácido bórico; 20 µL EDTA 0,5M (pH 8,0) para 1L H₂O destilada, e visualizada sob luz ultravioleta. O produto resultante da PCR foi purificado, seguindo o protocolo do PureLink® PCR Purification Kit (Catalog numbers K3100-01 and K3100-02; Publication Part Number 7015021), da Invitrogen. As amostras foram sequenciadas por eletroforese capilar em aparelho ABI3730, no Laboratório Myleus Biotecnologia, Belo Horizonte – MG.

Análises estatísticas

Todas as avaliações foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e os tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott (P<0,05), utilizando o programa computacional ASSISTAT (versão 7.7 pt; Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Brasil).

RESULTADOS

Obtenção das leveduras utilizadas como agentes de controle biológico

Foram obtidos 54 isolados de leveduras, sendo 24 oriundos das folhas (LFB) e 30 do caule (LCB) de batata-doce (Tabela 1). Os isolados obtidos apresentaram coloração, forma, textura, superfície e elevação diferentes (Tabela 2). Os isolados LFB15, LCB14, LCB32B e LCB113 foram descartados previamente, pois o crescimento foi tardio e desuniforme.

Tabela 1. Leveduras isoladas de folhas e caule de batata-doce sadios.

Isolados	Isolados	Isolados	Isolados
LFB VR1	LFB 24	LCB 15	LCB 43
LFB VR2	LFB 25	LCB 16	LCB 44

LFB 11	LFB 31	LCB 17	LCB 110
LFB 12	LFB 32 A	LCB 18	LCB 111
LFB 13	LFB 33	LCB 19	LCB 112
LFB 14	LFB 34	LCB 21 A	LCB 113
LFB 15	LFB 35	LCB22	LCB 114
LFB 16	LFB 40	LCB 23	LCB 115
LFB 17	LFB TBS1	LCB 31	LCB 116
LFB 18	LFB TBS 2	LCB 32 B	LCB 118
LFB 21 A	LCB 11	LCB 32 A	LCB 119
LFB 21 B	LCB 12	LCB 40	LCB 120
LFB 22	LCB 13	LCB 41	
LFB 23	LCB 14	LCB 42	

Tabela 2. Morfologia de leveduras isoladas da batata-doce.

Isolado / Morfologia	Cor	Textura	Forma	Borda	Superfície	Tamanho*
LFB VR1	Branca	Brilhosa	Circular	Redonda	Convexa	Médio
LFB VR2	Branca	Brilhosa	Circular	Redonda	Papilada	Pequeno
LFB 11	Bege	Brilhosa	Circular	Ondulada	Papilada	Médio
LFB 12	Bege	Seca	Circular	Redonda	Convexa	Médio
LFB 13	Bege	Seca	Irregular	Rizoide	Papilada	Grande
LFB 14	Bege	Seca	Circular	Rizoide	Papilada	Pequeno
LFB 16	Bege	Brilhosa	Circular	Ondulada	Papilada	Médio
LFB 17	Marrom	Seca	Irregular	Lobulada	Papilada	Médio
LFB 18	Bege	Seca	Irregular	Espiculada	Planaconvexa	Médio
LFB 21 A	Branca	Brilhosa	Circular	Redonda	Convexa	Pequeno
LFB 21 B	Bege	Seca	Irregular	Espiculada	Umbilicada	Pequeno
LFB 22	Branca	Brilhosa	Circular	Redondeada	Papilada	Pequeno
LFB 23	Bege	Seca	Irregular	Rizoide	Umbilicada	Grande
LFB 24	Branca	Brilhosa	Circular	Redondeada	Convexa	Pequeno
LFB 25	Branca	Brilhosa	Circular	Redondeada	Papilada	Pequeno
LFB 31	Laranja	Brilhosa	Circular	Redondeada	Convexa	Pequeno

Tabela 2 (Continuação). Morfologia de leveduras isoladas da batata-doce.

LFB 32 A	Laranja	Brilhosa	Circular	Redondeada	Convexa	Médio
LFB 33	Branca	Brilhosa	Circular	Redondeada	Convexa	Médio
LFB 34	Marrom	Seca	Irregular	Rizoide	Umbilicada	Médio
LFB 35	Branca	Brilhosa	Circular	Redondeada	Convexa	Pequeno
LFB 40	Bege	Seca	Irregular	Rizoide	Papilada	Pequeno
LFB TBS1	Marrom	Seca	Irregular	Rizoide	Umbilicada	Médio
LFB TBS 2	Bege	Seca	Irregular	Ondulada	Umbilicada	Pequeno
LCB 11	Branca	Brilhosa	Circular	Redondeada	Convexa	Pequeno
LCB 12	Branca	Brilhosa	Circular	Redondeada	Convexa	Pequeno
LCB 13	Bege	Brilhosa	Circular	Ondulada	Papilada	Médio
LCB 15	Bege	Seca	Irregular	Ondulada	Umbilicada	Pequeno
LCB 16	Bege	Seca	Irregular	Ondulada	Umbilicada	Grande
LCB 17	Bege	Seca	Irregular	Rizoide	Papilada	Médio
LCB 18	Marrom	Seca	Irregular	Rizoide	Umbilicada	Grande
LCB 19	Bege	Seca	Irregular	Rizoide	Papilada	Médio
LCB 21 A	Branca	Brilhosa	Circular	Redondeada	Convexa	Médio
LCB22	Branca	Brilhosa	Circular	Redondeada	Convexa	Pequeno
LCB 23	Branca	Brilhosa	Circular	Redondeada	Convexa	Pequeno
LCB 31	Bege	Seca	Irregular	Rizoide	Umbilicada	Grande
LCB 32 A	Laranja	Brilhosa	Circular	Redondeada	Convexa	Médio
LCB 40	Bege	Seca	Irregular	Espiculada	Umbilicada	Médio
LCB 41	Bege	Brilhosa	Circular	Ondulada	Papilada	Médio
LCB 42	Laranja	Brilhosa	Circular	Redondeada	Convexa	Médio
LCB 43	Bege	Brilhosa	Irregular	Espiculada	Umbilicada	Grande
LCB 44	Bege	Brilhosa	Circular	Ondulada	Papilada	Pequeno
LCB 110	Bege	Seca	Irregular	Rizoide	Papilada	Grande
LCB 111	Bege	Seca	Irregular	Rizoide	Papilada	Grande
LCB 112	Laranja	Brilhosa	Circular	Redondeada	Convexa	Médio
LCB 114	Branca	Brilhosa	Circular	Redondeada	Convexa	Médio
LCB 115	Branca	Brilhosa	Circular	Ondulada	Convexa	Pequena
LCB 116	Bege	Seca	Irregular	Lobulada	Umbilicada	Médio
LCB 118	Bege	Seca	Circular	Ondulada	Redondeada	Médio
LCB 119	Marrom	Seca	Irregular	Ondulada	Papilada	Médio

Tabela 2 (Continuação). Morfologia de leveduras isoladas da batata-doce.

LCB 120	Bege	Seca	Circular	Ondulada	Papilada	Grande
---------	------	------	----------	----------	----------	--------

*Pequeno (<2mm); Médio (2 – 5 mm); Grande (>5 mm)

Teste de patogenicidade a seres humanos

Com a temperatura média do corpo humano de 36°C, há uma probabilidade de leveduras que crescem a essa temperatura serem patogênicas ao ser humano. Nos testes, nenhum dos isolados cresceu sob a temperatura de 37±2°C, provavelmente não são patogênicas ao ser humano.

Antagonismo *in vitro*

No método de cultivo conjunto, todos os isolados de leveduras se desenvolveram por toda a placa de Petri antes do patógeno, promovendo controle de 100% do crescimento micelial de *D. destruens* (Fig. 1).

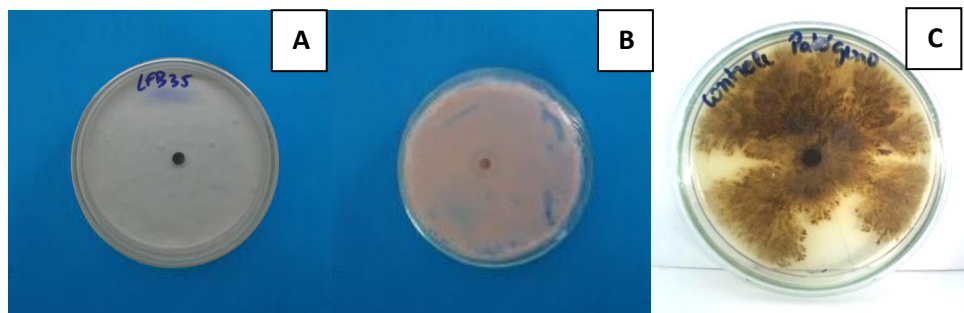


Figura 1. Cultivo Conjunto de Leveduras e *D. destruens* onde é possível visualizar a inibição do crescimento micelial do patógeno (A); halo de inibição de crescimento micelial do patógeno (B); Controle positivo com o patógeno (C).

Na difusão de compostos verificou-se que 15 dos 50 isolados testados inibiram 100% o crescimento micelial de *D. destruens*, não permitindo que o mesmo se desenvolvesse na Placa de Petri (Tabela 3).

Tabela 3. Crescimento micelial - (mm) de *Diaporthe destruens*, isolado TH9, cultivado *in vitro* sob ação antagonista de leveduras.

Isolado	PICM*	Isolado	PICM*
Controle	17,1283 f	LFB11	65,1529 c
LCB11	100 a	LFB12	54,6263 d
LCB12	100 a	LFB13	100 a
LCB15	100 a	LFB14	62,7443 c
LCB16	57,4141 d	LFB16	62,315 c
LCB17	54,5538 d	LFB17	60,2353 c
LCB18	57,5981 d	LFB18	62,5436 c
LCB19	63,3743 c	LFB21A	100 a
LCB21A	67,3441 b	LFB21B	58,3898 d

LCB22	100 a	LFB22	100 a
LCB23	64,6901 c	LFB23	64,2497 c
LCB31	52,0225 e	LFB24	100 a
LCB32A	47,774 e	LFB25	100 a
LCB40	20,3256 f	LFB26	49,809 e
LCB41	67,5671 b	LFB31	100 a
LCB42	65,7495 b	LFB32A	100 a
LCB43	52,0727 e	LFB33	100 a
LCB44	68,9499 b	LFB34	68,3477 b
LCB110	100 a	LFB35	100 a
LCB111	64,2106 c	LFB40	56,968 d
LCB112	67,4445 b	LFBTBS1	67,3106 b
LCB115	58,5403 d	LFBTBS2	61,2779 c
LCB116	65,2421 b	LFBVR1	100 a
LCB117	67,5671 b	LFBVR2	100 a
LCB118	57,1632 d		
LCB119	53,7398 e		

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Na determinação da atividade *Killer* das leveduras, 45 isolados apresentaram halo de inibição, que variaram entre fraco (+), moderado (++) e forte (+++), e cinco não apresentaram halo, conforme mostra a tabela 4.

Tabela 4. Expressão do fenótipo *Killer* em leveduras isoladas de Batata-doce.

Isolados	Atividade <i>Killer</i> *	Isolados	Atividade <i>Killer</i> *	Isolados	Atividade <i>Killer</i> *
LFB VR1	+	LFB 33	-	LCB 41	++
LFB VR2	+	LFB 34	+	LCB 42	++
LFB 11	++	LFB 35	++	LCB 43	+
LFB 12	++	LFB 40	+	LCB 44	++
LFB 13	+++	LCB 11	+	LCB 110	++
LFB 14	+++	LCB 12	++	LCB 111	+++
LFB 16	++	LCB 15	+++	LCB 112	-
LFB 17	++	LCB 16	++	LCB 115	+++
LFB 18	++	LCB 17	+	LCB 116	+

LFB 21 A	-	LCB 18	+++	LCB 118	++
LFB 21 B	+	LCB 19	++	LCB 119	+++
LFB 22	-	LCB 21 A	+	LCB 120	++
LFB 23	++	LCB 22	+	LFB TBS 1	+
LFB 24	++	LCB 23	+++	LFB TBS 2	++
LFB 25	-	LCB 31	+		
LFB 26	+	LCB 32 A	++		
LFB 31	+	LCB 40	+		
LFB 32 A	-				

* Intensidade do halo expressado: sem halo (-); halo fraco (+); halo moderado (++); halo forte (+++).

Antagonismo “in vivo”

No primeiro screening, das 15 leveduras testadas, nove isolados foram responsáveis por 100% de inibição dos sintomas, na variedade Co-Roxa (Tabela 6). Na repetição do experimento com os nove isolados, todos controlaram 100% a doença na variedade Co-Roxa e quatro na variedade Co-Branca (Tabela 7), sendo então selecionados para a identificação molecular.

Tabela 6. Avaliação de 15 isolados de leveduras no controle biológico de *Diaporthe destruens*, na variedade Co-Roxa.

ISOLADO	AACPD ^{1*}	ISOLADO	AACPD ^{1*}
LCB11	14,875b	LFB24	10,451c
LCB12	11,365c	LFB25	0,000d
LCB15	0,000d	LFB32 A	15,324b
LCB22	0,000d	LFB33	17,254b
LCB110	0,000d	LFB35	0,000d
LFB13	0,000d	LVFVR1	0,000d
LFB21A	0,000d	LFBVR2	14,652b
LFB22	0,000d	Controle	32,354 a

¹Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (mm²).

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 7. Avaliação de nove isolados de leveduras no controle biológico de *Diaporthe destruens*, na variedade Co-Branca.

Isolado	AACPD ^{1*}	Isolado	AACPD ^{1*}
Controle	23,03841 a	LFB 13	0,00000 d
LCB 22	20,53667 b	LFB 22	0,00000 d
LCB110	21,36413 b	LFB 25	0,00000 d
LCB15	0,00000 d	LFB21A	14,68595 c
LFB35	14,56837 c	VR1	20,52924 b

¹Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (mm²).

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Identificação molecular dos isolados de leveduras

As sequências obtidas foram comparadas às sequências depositadas no Genbank (Tabela 8) para criação da árvore filogenética dos isolados selecionados (Figura 2). Foram identificadas duas espécies de leveduras: *Moesziomyces aphidis* (isolados LCB15 e LFB13) e *Candida orthopsilosis* (LFB22 e LFB25).

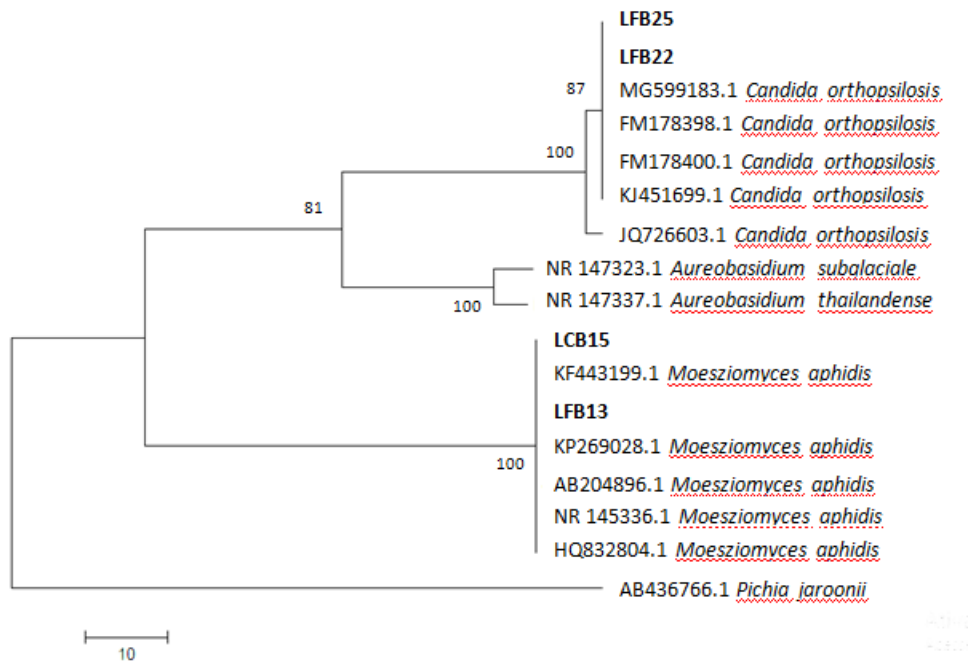


Figura 2. Filograma obtido pela análise de Máxima Parcimônia (MP) e Bootstrep (BO), com 1000 repetições, de alinhamento de sequências gênicas com 520 pb das regiões ITS1 e ITS4, de leveduras em relação à *Pichia jaroonii*, outgroup.

Tabela 8. Fontes de isolados e números de acesso GenBank utilizados nas análises filogenéticas de isolados de leveduras.

Espécie	Isolado	País	ITS
<i>Moesziomyces aphidis</i>	PFS037	JAPÃO	AB204896
<i>Moesziomyces aphidis</i>	CBS517.83*	EUA	NR_145336
<i>Moesziomyces aphidis</i>	CNM2012	CHINA	KF443199
<i>Moesziomyces aphidis</i>	LH59	CHINA	HQ832804
<i>Moesziomyces aphidis</i>	OUCMBI110117	CHINA	KP269028
<i>Candida orthopsilosis</i>	JQ726603	BRASIL	JQ726603
<i>Candida orthopsilosis</i>	LEM071	BRASIL	MG599183
<i>Candida orthopsilosis</i>	LMICRO175	BRASIL	KJ451699
<i>Candida orthopsilosis</i>	FM178400	AUSTRALIA	FM178400
<i>Candida orthopsilosis</i>	FM178398	AUSTRALIA	FM178398
<i>Pichia jaroonii</i>	S-75	TAILÂNDIA	AB436766
<i>Aureobasidium subglaciale</i>	CBS123387	EUA	NR_147323
<i>Aureobasidium thailandense</i>	NRRL58539	EUA	NR_147337

DISCUSSÃO

O resultado obtido com o isolamento mostrou variabilidade nos aspectos morfológicos entre as colônias, sendo a maioria dos isolados não pigmentados. Isso se deve ao fato das leveduras isoladas serem endofíticas, pois os pigmentos, tais como carotenóides e melanina, têm a função de proteger as leveduras da radiação encontrada na superfície de frutos (FONSECA; INÁCIO, 2006). As leveduras habitam vários ecossistemas, sendo essa diversidade de habitat um aliado na seleção de espécies para uso na indústria. A obtenção de 54 isolados de leveduras mostrou que a batata-doce é uma boa hospedeira para estes microorganismos, devido aos seus nutrientes armazenados. Resultados semelhantes foram encontrados por Costa; Abreu-Lima e Carreiro (2011), que isolaram 98 leveduras do filoplano de plantas desta cultura.

No cultivo conjunto o controle do patógeno pelas leveduras ocorreu devido ao rápido crescimento da levedura pela placa de Petri, impedindo que o patógeno crescesse no meio. Essa diferença de colonização faz com que as leveduras tenham vantagens na competição, pois conseguem colonizar o meio mais rapidamente. A competição é um dos mecanismos estudados no biocontrole de patógenos com o uso de leveduras. Resultados similares foram publicados por Di Francesco et al. (2017), que concluíram que a competição por nutrientes foi o principal mecanismo de bicontrolado utilizado por *Aureobasidium pullulans* para controle de *Monilinia laxa*, desempenhando um papel importante no manejo da podridão marrom em pêssegos e nectarinas.

Na difusão de compostos, a principal justificativa para a inibição do crescimento micelial do patógeno por 15 isolados de leveduras é a produção de antibióticos e/ou compostos voláteis, pois não houve contato entre a levedura e o patógeno. Ainda não há relatos minuciosos sobre a produção de antibióticos pelas leveduras, porém alguns estudos mostram que a espécie *Candida oleophila* é capaz de produzir várias enzimas degradativas da parede celular de *Penicillium digitatum*, incluindo-se $\text{exo-}\beta\text{-1,3}$ -glucanases, quitinases e proteases (BAR-SHIMON et al., 2004).

Diante dos resultados obtidos nos estudos, observa-se que, dos 15 isolados mais eficientes nos testes *in vitro*, 12 expressaram halo característico para a produção desta toxina, enquanto três não expressaram. O fenótipo *Killer* não determina o potencial biocontrolador da levedura, como é o exemplo de *Candida orthopsilosis* que, assim como demonstrado por Robledo-Leal et al. (2014), não produz essas toxinas, mas se motra uma eficiente antagonista. Porém, a produção de toxinas *killer* é um importante fator nessas interações antagônicas, sendo essas glicoproteínas letais ao patógenos e não letais às cepas que as excretam (STOLL et al., 2005).

Características de competitividade foram observadas nos resultados dos experimentos *in vivo*, onde quatro isolados de leveduras (LCB15, LFB13, LFB22 e LFB25) controlaram a expressão de sintomas em ambas as variedades de batata-doce (Co-Roxa e Co-Branca), sendo o principal mecanismo observado a rápida colonização da superfície da planta, resultando na competição por nutrientes e espaço. Os resultados obtidos estão em concordância com aqueles publicados por El-Ghaouth et al. (2000), que mostraram o potencial bicontrolador de *Candida saitoana* a *Phomopsis citri* (*Diaporthe citri*), em combinação com glicoquitosana, devido a sua capacidade de colonização da superfície do fruto.

Outros mecanismos utilizados pelos antagonistas foram observados nos testes *in vivo*, como na produção dos halos de inibição extremamente fortes, pelos isolados LCB15 e LFB13, no teste de toxinas *killer*, indicando que esse pode ser um dos mecanismos utilizados no biocontrole. Resultados similares foram encontrados por Aloui et al. (2015), que ao estudar os filmes bioativos, formados por *Wickerhamomyces anomalus*, mostraram quem houve controle no bolor verde em frutas inoculadas com *Penicillium digitatum*.

A produção de metabólitos pelas leveduras nos testes *in vitro* indica que as leveduras podem ter liberado metabólitos nos testes em mudas, confirmando os resultados encontrados por Buxdorf; Rahat e Levy (2013), que mostraram a indução de resistência em plantas por *Moesziomyces aphidis*, através do aumento da produção de etileno pelas plantas. Outros estudos também confirmam os resultados encontrados nos testes *in vivo*, como os de Barda et

al. (2015), que comprovaram o aumento da produção de ácido salicílico em plantas de tomate, causado por *M. aphidis*, sendo este aumento responsável pela indução de resistência das plantas a *Clavibacter michiganensis*.

A classificação morfológica das leveduras não deve ser o único parâmetro para identificação das cepas, pois muitos gêneros distintos partilham das mesmas características, sendo diferenciadas apenas por identificação molecular. Os isolados LCB15 e LFB13, pertencentes à espécie *M. aphidis*, tem características de coloração bege, aspecto seco, de forma irregular, bordas rizóide, superfície papilada e colônias grande, correspondendo àquelas publicadas por Boro et al. (2017), identificando isolados de *M. aphidis* em manguezaís brasileiros. A sequência filogenética, da região ITS desses isolados, mostraram similaridade ao isolado tipo de *M. aphidis*, descrito por Alvis et al. (2001).

Os isolados LFB22 e LFB25, com coloração branca, aspecto brilhoso, forma irregular, borda arredondada, superfície papilada e colônias pequenas, têm características similares àquelas descritas por Atades et al. (2015), bem como as sequências da região ITS obtiveram similaridade às sequências das leveduras encontradas por estes autores na identificação molecular de *C. orthopsilosis*. Algumas espécies de *Candida* são conhecidamente biocontroladoras (Aylward et al., 2017), podendo *C. orthopsilosis* ser um eficiente antagonista a fitopatógenos.

Com base nos resultados, observou-se que os isolados de *M. aphidis* (LCB15 e LFB13) e *C. orthopsilosis* (LFB22 e LFB25) são eficientes no controle biológico da doença, nas duas variedades de batata-doce (Co-Roxa e Co-Branca), podendo ser utilizados no manejo da doença.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam a eficiência de *M. aphidis* e *C. orthopsilosis* como agentes de controle biológico de *D. destruens*. Desta maneira, o uso desses antagonistas torna-se um aliado ao manejo do Mal-do-pé da batata-doce, reduzindo a incidência da doença e a severidade do patógeno. Este é o primeiro relato de controle biológico de *D. destruens* pelas espécies *M. aphidis* e *C. orthopsilosis*.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa; à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), ao Programa de Pós Graduação em Fitopatologia, pela disponibilização de estrutura para realização do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATAIDES, F. S.; COSTA, C. R.; HASIMOTO E SOUZA, L. K.; FERNANDES, O. F. L.; JESUINO, R. S. A.; RODRIGUES SILVA, M. R. R. Molecular identification and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis* complex species isolated from culture collection of clinical samples. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n° 4, p. 454-459, 2015.
- AVIS, T. J.; CARON, S. J.; BOEKHOUT, T.; HAMELIN, R. C.; BÉLANGER, R. R. Molecular and Physiological Analysis of the Powdery Mildew Antagonist *Pseudozyma flocculosa* and Related Fungi. **Phytopathology**. v. 91, n° 3, p. 249 – 254, 2001.
- AYLWARD, J.; STEENKAMP, E. T.; DREYER, L. L.; ROETS, F.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. A plant pathology perspective of fungal genome sequencing. **IMA FUNGUS**. v. 8, n°1, p. 1–15, 2017.
- BARDA, O.; SHALEV, O.; ALSTER, S.; BUxDORF, K.; GAFNI, A.; LEVY, M. *Pseudozyma aphidis* Induces Salicylic-Acid-Independent Resistance to *Clavibacter michiganensis* in Tomato Plants. **Plant Disease**. v. 99. n° 5, p. 621 – 626, 2015.
- BAR-SHIMON, M.; YEHUDA, H.; COHEN, L.; WEISS, B.; KOBESHNIKOV, A.; DAUS, A.; GOLDWAY, M.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Current Genetics**, New York. v. 45, n°. 3, p. 140-148, 2004.
- BETTIOL, W. Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas. **Embrapa Meio Ambiente**. Jaguariúna, SP. p. 341, 2009.
- BEVAN, E. A. & MAKOWER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. **Proceedings of the Eleventh International Congress of Genetics I**, 203. (abstract), 1963.

BORO, M. C.; JESUS, A. L.; SOUZA, J. I. (*in memoriam*); MARANO, A. V.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A. Molecular identification of *Pseudozyma aphidis* (Henninger & Windisch) Boekhout: first record from a Brazilian mangrove swamp. **Hoehnea**. v.44, n° 4, p.599-606, 2017.

BUXDORF K, RAHAT I, GAFNI A, LEVY M. The epiphytic fungus *Pseudozyma aphidis* induces jasmonic acid-and salicylic acid/ nonexpressor of PR1-independent local and systemic resistance. **Plant Physiology**. v. 161, p. 2014–2022, 2013.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 24, p. 270-276, 1939.

CHEN, P-H.; CHOU, J-Y. Screening and Identification of Yeasts Antagonistic to Pathogenic Fungi Show a Narrow Optimal pH Range for Antagonistic Activity. **Polish Journal of Microbiology**. v. 66, n° 1, p. 101–106, 2017.

CHET, I.; INBAR, J.; HADAR, I. Fungal antagonists and mycoparasites. In: WICKLOW, D. T., SODERSTROM, B. (ed.) *The mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Berlin: Springer-Verlag. p. 165-184, 1997.

CLARK, C. A.; HOLMES, G. L.; FERRIN, D. M. Major fungal and bacterial diseases. In: LOEBENSTEIN, G.; TROTTAPPILLY, G. (Ed.). *The sweetpotato*. Springer, Netherlands. p. 81-103, 2009.

CIFUENTES, C.; VILAPLANA, R.; VALENCIA-CHAMORRO, S. Actividad antagonista *in vitro* de diferentes agentes de control biológico contra *Alternaria* spp. y *Colletotrichum* spp. **Agronomía colombiana**. v. 34(1Supl.), p. 933-936, 2016.

COSTA, S. T. C.; ABREU-LIMA, T. L.; CARREIRO, S. C. Atividade amilolítica de leveduras isoladas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **RevBio - Revista de Biociências da Universidade de Taubaté**. v. 17, n°. 2, 2011.

DI FRANCESCO, A.; UGOLINI, L.; D'AQUINO, S.; PAGNOTTA, E.; MARI, M. Biocontrol of *Monilinia laxa* by *Aureobasidium pullulans* strains: Insights on competition for nutrients and space. **International Journal of Food Microbiology**. v. 248, p. 32–38, 2017.

DOGEN, A.; METIN, B.; ILKIT, M.; HOOG, G. S.; HEITMAN, J. MTL genotypes, phenotypic switching, and susceptibility profiles of *Candida parapsilosis* species group

compared to *Lodderomyces elongisporus*. **PLOS ONE**. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182653>. 2017. Acessado em: 12/11/2017.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2 ed. 306p. Rio de Janeiro, 2006.

FONSECA, A.; INÁCIO, J. Phylloplane yeasts, in: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, G. Peter & C.A. Rosa (Eds). **Springer-Verlag**, Berlin. p.263-301, 2006.

GAFNI, A.; CALDERON, C. E.; HARRIS, R.; BUXDORF, K.; DAFA-BERGER, A.; ZEILINGER-REICHERT, E.; LEVY, M. Biological control of the cucurbit powdery mildew pathogen *Podosphaera xanthii* by means of the epiphytic fungus *Pseudozyma aphidis* and parasitism as a mode of action. **Frontiers in Plant Science**. v. 6, article 132, 2015.

GAI, Y.; MA, H.; CHEN, X.; ZHENG, J.; CHEN, H.; LI, H. Stem blight, foot rot and storage tuber rot of sweet potato caused by *Plenodomus destruens* in China. **Journal of General Plant Pathology**. v. 82, p. 181–185, 2016.

GAO, Y.; LIU, F.; DUAN, W.; CROUS, P. W.; CAI, L. *Diaporthe* is paraphyletic. **Ima Fungus**. v. 8. n° 1, p. 153–187, 2017.

HARTER, L. L. Foot-rot, a new disease of the sweet potato. **Phytopathology**. v. 3, p. 243–245, 2013.

HARTER, L. L. Notes on the distribution and prevalence of three important sweet potato diseases. **Phytopathology**. v. 5, p. 124–126, 1915.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**, 2016. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>. Acessado em: 28/12/2017.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. The Yeasts, a taxonomic study. **Elsevier Science Publishers**. 4. Ed. Amsterdam. v. 2, p. 1088, 1988.

LIU, Y.; WANG, W.; ZHOU, Y.; YAO, S.; DENG, L.; ZENG, K. Isolation, identification and *in vitro* screening of Chongqing orangery yeasts for the biocontrol of *Penicillium digitatum* on citrus fruit. **Biological Control**. v. 110, p. 18–24, 2017.

LOPES, C.A.; BOFF, P.; DUARTE, V. Foot rot of sweet potato in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 29, p. 1407–1410, 1994.

MICHEREFF, S J. **Fundamentos de Fitopatologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, p. 150, 2001.

MICHEREFF, S. J.; DOMINGOS E. G. T.; ANDRADE, M. M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife : UFRPE, Imprensa Universitária, 398 p. : il. ISBN 85-87459-09-0, 2005.

NEVEU, B.; LABBÉ, C.; BÉLANGER, R. R. GFP technology for the study of biocontrol agents in tritrophic interactions: a case study with *Pseudozyma flocculosa*. In **Nouveaux outils moléculaires pour l'étude des propriétés de Pseudozyma flocculosa**. Bertrand Neveu. Université Laval, 2007.

PEREIRA, R. B.; FERNANDES, F. R.; PINHEIRO, J. B. **Recomendações para manejo da podridão-do-pé em batata-doce**. 5 p. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2011. (Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico, 79)

RAMÍREZ, R. A. C. Studies of *Debaryomyces hansenii* killer toxin and its effect on pathogenic bloodstream *Candida* isolates. Theses (**The Graduate College at the University of Nebraska**), 2016

ROBIGLIO, A.; SOSA, M. C.; LUTZ, M. C.; LOPES, C. A.; SANGORRÍN, M. P. Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature. **International Journal of Food Microbiology**. v. 147. n°1 p. 211-216, 2011.

ROBLEDO-LEAL, E.; ELIZONDO-ZERTUCHE, M.; VILLARREAL-TREVIÑO, L.; TREVIÑO-RANGEL, R. J.; GARCÍA-MALDONADO, N.; ADAME-RODRÍGUEZ, J. M.; GONZÁLEZ, G. Killer behavior within the *Candida parapsilosis* complex. **Folia Microbiologica**. v 59, p. 503–506, 2014.

SILVA, C. L. **Alternativas no controle do cretamento gomoso em meloeiro**. 2015, 85f. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2015.

SRIRAM, S.; POORNACHANDRA, S.R. Biological control of postharvest mango fruit rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and *Diplodia natalensis* with *Candida tropicalis* and *Alcaligenes faecalis*. **Indian Phytopathology**. v. 66, n. 4, p. 375-380, 2013.

STOLL, M.; BEGEROW, D.; OBERWINKLER, F. Molecular phylogeny of *Ustilago*, *Sporisorium*, and related taxa based on combined analyses of rDNA sequences. **Mycological Research**, London. v. 109, n. 3, p. 342-356, 2005.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A. R.; MAIDEN, M. C. J.; ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. **Journal Of Clinical Microbiology**. v. 43, N° 1, p. 284–292, 2005.

TIAN, S.; TORRES, R.; BALLESTER, A-R.; LIA, B.; VILANOVA, L.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L. Molecular aspects in pathogen-fruit interactions: Virulence and resistance. **Postharvest Biology and Technology**. v. 122, p.11–21, 2016.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- *Trichoderma asperellum* é eficiente no controle da doença nas variedades Co-Roxa e Co-Branca e *T. longibrachiatum* na redução dos sintomas na cultivar Co-Branca;
- *Moesziomyces aphidis* e *Candida orthopsilosis* controlaram em 100% a incidência da doença nas variedades Co-Branca e Co-Roxa;
- Em Pernambuco o patógeno causador do Mal-do-pé da batata-doce é *Diaporthe destruens*;
- Ambos os antagonistas, *Trichoderma* spp. ou leveduras, podem ser inseridos no manejo da doença.