

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS  
HIPERPARASITAS DE *Asperisporium caricae*

**JANIELI MAGANHA SILVA VIVAS**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2014.

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS  
HIPERPARASITAS DE *Asperisporium caricae*

**JANIÉLI MAGANHA SILVA VIVAS**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Silvaldo Felipe da Silveira.

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2014.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 036/2014

Vivas, Janieli Maganha Silva

Identificação e caracterização de fungos hiperparasitas de *Asperisporium caricae* / Janieli Maganha Silva Vivas. – 2014.  
68 f. : il.

Orientador: Silvaldo Felipe da Silveira.  
Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2014.  
Bibliografia: f. 56 – 68.

1. *Carica papaya* 2. *Asperisporium caricae* 3. *Hansfordia pulvinata*  
4. *Acremonium* sp. 5. Controle biológico I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 632.96

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS  
HIPERPARASITAS DE *Asperisporium caricae*

**JANIELI MAGANHA SILVA VIVAS**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 11 de fevereiro de 2014.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Olinto Liparini Pereira (D.Sc., Fitopatologia) – UFV

---

Vicente Mussi Dias (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

---

Ricardo Moreira de Souza (Ph.D., Plant Pathology) – UENF

---

Prof. Silvaldo Felipe da Silveira (D.Sc., Fitopatologia) – UENF  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sua presença forte e constante em minha vida;

A todos os meus familiares, em especial, aos meus pais Maria Rita Maganha Silva e Ely Ferreira Silva pelo apoio, pela oração constante e por torcerem sempre por minha felicidade e realização. À minha irmã Juliete Maganha Silva, que sempre esteve ao meu lado como uma verdadeira companheira inseparável;

Ao meu esposo Marcelo Vivas, pelo companheirismo, comprometimento e incentivo;

Ao meu orientador, Professor Silvaldo Felipe da Silveira, pela oportunidade, pela confiança e por todos os ensinamentos, além do grande incentivo;

Ao professor Olinto Liparini Pereira, por ceder seu laboratório para condução das análises filogenéticas, além da colaboração no processo de elaboração e execução dos trabalhos;

Ao Pós-doutorando Danilo Batista Pinho, pelo auxílio ímpar na condução das análises filogenéticas, além das conversas e dos conselhos para melhoria do trabalho;

A Vicente Mussi Dias e Ricardo Moreira de Souza, pela participação na banca e colaboração para a melhoria do trabalho;

Aos Colegas de Laboratório, pela amizade e convivência;

A FAPERJ, pela concessão da bolsa de mestrado;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Centro de Ciências e Tecnologia em Agropecuária, pela oportunidade de realização do curso.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	04
2.1. Cultura do mamoeiro .....	05
2.2. Pinta-preta do mamoeiro .....	05
2.3. Medidas de controle da pinta-preta .....	07
2.4. Controle biológico .....	09
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	14
3.1. Obtenção de isolados e isolamento monospórico.....	14
3.2. Caracterização cultural, morfológica e identificação dos isolados .....	16
3.3. Crescimento micelial dos hiperparasitas e esporulação em diferentes temperaturas.....	17
3.4. Antibiose <i>in vitro</i> : compostos voláteis e não voláteis que possam inibir a germinação de esporos de <i>A. caricae</i> .....	18
3.5. Microscopia ótica da interação entre <i>A. caricae</i> e isolados hiperparasitas .....	19
3.6. Hiperparasitismo <i>in vivo</i> sob condições de telado.....	19

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	21
4.1. Caracterização cultural e morfológica e identificação .....	21
4.2. Crescimento micelial dos hiperparasitas e esporulação em diferentes temperaturas .....	35
4.3. Antibiose <i>in vitro</i> : Compostos voláteis e não voláteis que possam inibir a germinação de esporos de <i>A. caricae</i> .....	41
4.4. Microscopia ótica da interação entre <i>A. caricae</i> e isolados hiperparasitas .....	46
4.5. Hiperparasitismo <i>in vivo</i> sob condições de telado .....	48
<b>5. CONCLUSÃO GERAL</b> .....	54
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	56



## RESUMO

VIVAS, Janieli Maganha Silva M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2014. Identificação e caracterização de fungos hiperparasitas de *Asperisporium caricae*. Orientador: Prof. Silvaldo Felipe da Silveira.

A pinta-preta do mamoeiro causada pelo fungo *Asperisporium caricae*, apresenta expressiva importância, pois é uma doença que provoca danos no desenvolvimento da planta pela redução de área foliar fotossintética e pelas lesões nos frutos, tornando-os inadequados à comercialização. A cultura do mamoeiro é hoje dependente da pulverização de fungicidas, principal medida de controle da pinta-preta. Há, portanto, necessidade de se buscar controle alternativo sustentável, como o controle biológico. Diferentes autores relataram fungos hiperparasitas colonizando sinais de *A. caricae*, entretanto, alguns relatos são pouco sustentados cientificamente e a maioria deles compreende trabalhos, que não comprovam o micoparasitismo, tampouco avaliaram o potencial dos fungos hiperparasitas no biocontrole de *A. caricae*. No presente trabalho objetivou-se: obter, identificar e caracterizar diferentes isolados hiperparasitas; conduzir testes *in vitro* para avaliar o efeito de metabólitos voláteis e não voláteis que possam inibir a germinação de esporos, analisar a interação entre o patógeno *A. caricae* e fungos hiperparasitas; e, avaliar *in vivo* o potencial dos diferentes isolados obtidos quanto à capacidade de colonizar lesões de *A. caricae*. Foram obtidos 24 isolados de fungos a partir de sinais do patógeno de amostras de folhas oriundas de diferentes regiões do Brasil, sendo: 10 isolados pertencentes

ao gênero *Hansfordia* (destes um isolado de *Pseudocercospora* no quiabeiro, um isolado de *Cladosporium* em jiloeiro e oito isolados a partir de *A. caricae* em mamoeiro); 11 isolados pertencentes ao gênero *Acremonium* (destes um de *Pseudocercospora* em quiabeiro e 10 isolados de *A. caricae* em mamoeiro); dois pertencentes ao gênero *Lecanicillium* (obtidos de ferrugem do café) e um pertencente ao gênero *Simplicillium* (obtido de ferrugem no Jasmim-manga). Em sua maioria, os isolados de fungos hiperparasitas apresentaram maior crescimento micelial e esporulação em temperaturas amenas, entre 20 e 25 °C. Em estudo de antibiose *in vitro*, não se constatou, nos isolados testados, ação de composto volátil sobre a germinação de conídio de *A. caricae*. Por outro lado, há evidências de antibiose por compostos não voláteis. Os isolados I-608, I-616, I-600, I-611, I-612, I-604, I-623 e I-617 foram os que mais reduziram a germinação conidial de *A. caricae* nos testes de antibiose por difusão em meio de ágar. Evidências de micoparasitismo direto a tubos germinativos de *A. caricae* foram observadas para os isolados pertencentes aos gêneros *Lecanicillium*, *Simplicillium* e *Acremonium* (à exceção dos isolados I-609 e I-621 de *Acremonium*), e compreenderam colonização associada e penetração das hifas hiperparasitas no tubo germinativo do patógeno. Já os isolados de *Hansfordia* diferiram na frequência e na intensidade de colonizar externamente o tubo germinativo *A. caricae*, mas não se observou invasão. Em casa de vegetação, os isolados de I-614, I-608, I-611, I-615 (isolados de *Hansfordia*) apresentaram maiores médias de incidência de lesões de pinta-preta hiperparasitadas. Conclui-se haver potencial da implementação do biocontrole da pinta-preta do mamoeiro, pela aplicação de fungos hiperparasitas, como medida complementar de controle, visando à redução do inóculo do patógeno, em um contexto de manejo integrado ou agricultura orgânica.

## ABSTRACT

VIVAS, Janieli Maganha Silva M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2014. Identification and characterization of fungal hyperparasites *Asperisporium caricae*. Advisor: Prof. Silvaldo Felipe da Silveira.

The black spot of papaya caused by the fungus *Asperisporium caricae* has a significant importance as it is a disease that damages the development of the plant by reducing photosynthetic leaf area and lesions on fruit, making them unsuitable for marketing. The papaya crop is now dependent on the spraying of fungicides, the main measure to control black spot. There is therefore need to seek sustainable alternative approaches, such as biological control. Different authors reported hiperparasites fungi colonizing *A. caricae* signals, however, some reports are poorly supported scientifically and mostly comprises works that do not prove mycoparasitism nor assessed the potential of hiperparasites fungi in biocontrol of *A. caricae*. In the present study we aimed to: obtain, identify and characterize different isolates hiperparasites; lead in vitro to evaluate the effect of volatile and non-volatile metabolites that inhibit spore germination, analyze the interaction between pathogen and *A. caricae* hiperparasites fungi; and evaluate in vivo the potential of different isolates for their ability to colonize lesions of *A. caricae* . We obtained 24 isolates of fungi from signs of the pathogen from leaf samples from different regions of Brazil, with 10 isolates belonging to the genre *Hansfordia* (these *Pseudocercospora* an isolate of okra in one isolate of *Cladosporium* in *S. gilo* eight isolated from *A. caricae* on papaya); 11 isolates

belonging to the genus *Acremonium* (one of these *Pseudocercospora* to okra and 10 isolates of *A. caricae* on papaya); two belonging to the genus *Lecanicillium* (obtained from coffee rust) and one belonging to the genus *Simplicillium* (got rust in Jasmine manga). Most of the isolates showed higher hiperparasites fungi mycelial growth and sporulation in mild temperatures, between 20 and 25 ° C. In a study of in vitro antibiosis not found in isolates tested volatile compound action on the germination of conidia of *A. caricae*. Moreover, there is evidence for antibiosis non-volatile compounds. The I- 608 , I- 616 , I- 600 , I- 611 , I- 612 , I- 604 , I- 623 and I- 617 isolates were most reduced conidial germination of *A. caricae* in antibiosis tests for diffusion through agar. Direct evidence of mycoparasitism the germ tubes of *A. caricae* were observed for isolates belonging to the genera *Lecanicillium*, *Simplicillium* and *Acremonium* (except the isolated I- 609 and I- 621 *Acremonium*), and comprised associated colonization and penetration of hyphae in hiperparasites germ tube of the pathogen. The isolates from *Hansfordia* differ in the frequency and intensity of colonizing the germ tube externally *A. caricae* but no invasion was observed. In the greenhouse, isolates from I-614, I- 608, I-611, I-615 (isolates *Hansfordia*) showed higher incidence of early blight lesions hiperparasited . It follows the implementation of biocontrol potential of early blight of papaya by applying hiperparasites fungi as an additional control measure aimed at reducing pathogen inoculum, in a context of integrated or organic farming management there.

## 1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma das fruteiras tropicais de maior importância no Brasil. O Brasil é o segundo maior produtor e o terceiro maior exportador da fruta. O mamão é a sétima fruta “*in natura*” mais exportada no País, sendo cultivado em cerca de 30mil hectares, que estão concentrados nos estados do Espírito Santo, Bahia, Ceará e Rio Grande do Norte (AGRIANUAL, 2011).

A cultura do mamoeiro é vulnerável ao ataque de inúmeros fitopatógenos. Dentre estes, o fungo *Asperisporium caricae* (Speg.) Maubl., agente causal da pinta-preta. A pinta-preta é uma das doenças mais comuns na maioria das regiões tropicais e subtropicais onde se cultiva o mamoeiro, tais como: África, Austrália e Oceania, sul e sudeste da Ásia (ex: Índia) e nas Américas Central e do Sul (Liberato et al., 2007). A doença apresenta expressiva importância econômica, pois provoca danos ao desenvolvimento da planta, pois reduz a superfície fotossintética da folha, devido ao grande número de lesões necróticas e de coloração escura. Nos frutos, embora os sintomas sejam superficiais, as lesões os tornam inadequados à comercialização, predispondo-os a podridões na pós-colheita (Rezende & Martins, 2005).

Devido à frequência com que ocorre e os danos que causa, a pinta-preta exige muitas aplicações de fungicidas para o seu controle. Porém, o controle exclusivamente químico repercute negativamente nas exportações. Ademais, o uso intensivo de agrotóxicos oferece riscos de contaminação ambiental (solo e água), de alimentos e dos animais, dos agricultores e dos consumidores. Além

disso, patógenos, pragas e plantas invasoras desenvolvem comumente resistência aos agroquímicos, bem como há o surgimento de doenças iatrogênicas, decorrentes de desequilíbrios fisiológicos e no sistema radicular. Também, o uso de fungicidas ocasiona a eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade da micobiota do solo, dentre outros efeitos indesejados (Bettiol & Morandi, 2009).

Atualmente o interesse por métodos alternativos de controle está alterando o cenário agrícola, para favorecer a conservação e o uso sustentável dos recursos biológicos. Políticas internacionais demandam fortemente alternativas para os agrotóxicos. Dentre as alternativas ao uso de fungicidas químicos convencionais na agricultura, o controle biológico é amplamente discutido. O controle biológico consiste na redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença (crescimento, infectividade, virulência, agressividade e outras qualidades do patógeno, ou processos que determinam infecção, desenvolvimento de sintomas e reprodução) provocada por um patógeno, pelo uso de um ou mais organismos antagônicos, que não o homem (Cook & Baker, 1983).

O controle biológico tem sido apontado como um método promissor para minimizar o uso de agrotóxicos e promover a proteção das culturas, pois se baseia em procedimentos ambientalmente corretos que podem fazer parte de um sistema de controle integrado de doenças (Grigoletti Junior et al., 2000; Slininger et al., 2003). Dentre os fungos empregados no controle de doenças de plantas, espécies de *Trichoderma* encontram-se entre as mais estudadas e utilizadas mundialmente (Benítez et al., 2004). Estudos de controle biológico utilizando fungos também têm sido feitos com os gêneros *Dicyma* (considerados por muitos como sinônimo de *Hansfordia*) (Mitchell et al. 1987, Warwick, 2007), *Acremonium* (Warwick, 2001, 2007), *Penicillium* (De Cal et al. 1990; Larena et al., 1996; Moreira et al., 2008), *Clonostachys* (Valdebenito-Sanhueza et al., 1997; Morandi et al., 2003; Nobre et al., 2005, Morandi et al., 2007; Silvera-Pérez et al., 2010) e *Gliocladium* (Tarantino et al., 2007), dentre outros.

Diferentes autores encontraram fungos colonizando lesões da pinta-preta do mamoeiro, *Rhizotrichum glossypinum* (Charles, 1940), *Sclerospora* sp. e *Verticillium* sp. (Adikaram & Wijepala, 1995); *Cephalosporium* (Silva et al., 1999); *Dicyma* sp. e *Acremonium* sp. (Vivas et al. 2011). Estes relatos reforçam a

hipótese de que a pinta-preta pode ser controlada biologicamente. Entretanto, alguns destes relatos são pouco sustentados cientificamente e a maioria compreende trabalhos incontínuos, publicados em resumos ou anais de congresso. Além disso, há possibilidade de um mesmo fungo ter sido classificado diferentemente por mais de um autor, justificando a tentativa de identificar em nível de espécies os fungos de lesões de pinta-preta do mamoeiro. Sendo assim, embora os fungos tenham sido relatados parasitando lesões de pinta-preta, não há nenhum trabalho que comprove o parasitismo, tampouco que avalie o seu potencial para biocontrole de *A. caricae*. Desta forma, o trabalho visa buscar alternativas para se controlar o fungo *A. caricae*, patógeno que vem se constituindo em um dos principais problemas para a cultura do mamoeiro no Brasil. Os objetivos desse trabalho foram: i) obter em cultura pura isolados de fungos hiperparasitas de *A. caricae* a partir de lesões de pinta-preta do mamoeiro e em outros patossistemas; ii) identificar e caracterizar os diferentes isolados obtidos; iii) conduzir testes *in vitro* para avaliar a presença de metabólitos voláteis e não voláteis que possam inibir a germinação de esporos de *A. caricae*; iv) avaliar a influência da temperatura sobre o crescimento micelial e a esporulação dos isolados obtidos; e, v) avaliar *in vivo* o potencial dos diferentes isolados quanto à capacidade de colonizar lesões em folhas de mamoeiro ocasionada por *A. caricae*, sob condições controladas, bem como selecionar isolados hiperparasitas mais promissores.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Cultura do mamoeiro

O mamoeiro (*Carica papaya* L.), espécie pertencente à Classe *Equisetopsida*, Ordem das Brassicales, Família *Caricaceae* é uma das fruteiras mais comuns em quase todos os países da América Tropical. Há relatos de que este foi descoberto pelos espanhóis na região compreendida entre o sul do México e o norte da Nicarágua (Serrano & Cattaneo, 2010). Após a descoberta, o mamoeiro foi amplamente distribuído em várias regiões tropicais e subtropicais, estendendo-se a 32° de latitude norte e sul, com possível introdução no Brasil em 1587 (Serrano & Cattaneo, 2010). A cultura desenvolve-se de maneira satisfatória em locais com temperatura média anual de 25°C, com limites entre 21°C e 33°C, e precipitação pluviométrica de 1.500 mm anual bem distribuída.

A fruta é fonte importante de papaína, enzima proteolítica de ação semelhante à da pepsina e tripsina, empregada para os mais variados usos na indústria têxtil, farmacêutica, de alimentos e de cosméticos. Das folhas, dos frutos e das sementes é extraído também um alcaloide denominado carpaína, utilizado como ativador cardíaco. Além disso, o mamão é boa fonte de cálcio e excelente fonte de pró-vitamina A e de ácido ascórbico (vitamina C), sendo o teor deste último aumentado com a maturação do fruto (Trindade, 2000).

Segundo a FAO (2011), a produção mundial de mamão representa 10% da produção mundial de frutas tropicais, girando em torno de 8 milhões de toneladas/ano, das quais 39% são produzidas na América Latina e no Caribe. O mamão é a sétima fruta “in natura” mais exportada no país, sendo cultivado em



cerca de 30 mil hectares, que estão concentrados nos estados do Espírito Santo, Bahia, Ceará e Rio Grande do Norte. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial, ficando atrás somente da Índia, e o terceiro maior exportador da fruta (AGRIANUAL, 2011). No entanto, o potencial brasileiro de exportação do mamão é muito grande, visto que as variedades produzidas no país são compatíveis com a demanda do mercado externo (Cruz, 2008).

Um dos problemas relacionados à pequena capacidade de exportação do mamão brasileiro é a falta de certificação que ateste a qualidade das frutas e a forma pouco sustentável como elas foram produzidas. Exigências dessa natureza têm sido feitas pelo Mercado Comum Europeu, principal comprador do mamão brasileiro, bem como pelo mercado norte-americano (Cruz, 2008).

## 2.2. Pinta-preta do mamoeiro

A cultura do mamoeiro foi relatada como hospedeira de aproximadamente 171 diferentes espécies de fungos (Nishijima & Zhu, 2004). Dentre esses, o fungo *Asperisporium caricae* (Speg.) Maubl, agente causal da pinta-preta, constitui-se a doença fúngica de expressiva importância econômica, pela depreciação do aspecto comercial da fruta e pela exigência de muitas aplicações de fungicidas para o seu controle (Santos Filho et al., 2007; Nishijima et al., 1994). O fungo pode incidir sobre folhas e frutos de *Carica papaya*, raramente em *Carica chilensis* (= *Vasconcellea chilensis*) (Caricaceae) (Ellis & Holliday 1972 Crous & Braun, 2003). Santos & Barreto (2003) relataram perdas de 30% na comercialização de frutos de mamão em São Paulo. Segundo Liberato & Zambolim (2002), plantas muito afetadas podem perder de 50 a 60% de suas folhas em um período de dois a três meses, e a incidência da doença em frutos pode atingir quase 100%.

A primeira descrição da pinta-preta no Brasil foi realizada por Maublanc (1913), no Estado do Rio de Janeiro. Ela se tornou uma das doenças mais comumente observadas tanto em pomares comerciais quanto em plantios domésticos. O patógeno encontra-se disseminado na maioria das regiões tropicais e subtropicais do globo incluindo a Argentina, Austrália, Ilhas Bermudas, Colômbia, Cuba, El Salvador, Flórida, Índia, Jamaica, Japão, Quênia, México, Peru, Porto Rico, Ilhas Salmão, África do Sul, Sri Lanka, Tanzânia, Venezuela e

Zimbábue (Liberato et al., 2007). Os mesmos autores relataram a ocorrência de pinta-preta nos E.U.A. e Canadá.

O primeiro nome dado ao fungo, agente causal da pinta-preta, foi dado por Spegazzini com *Cercospora caricae* Speg. em 1886. Ao longo dos anos foram ocorrendo mudanças na nomenclatura como, *Epiclinium cumminsii* Masee, 1898, *Scolecotrichum caricae* Ellis & Everh., 1892, *Fusicladium caricae* (Speg.) Sacc., 1902, *Pucciniopsis caricae* Earle, 1902, até esse fungo ser nomeado *Asperisporium caricae* (Speg.) Maubl., em 1913, sendo esse nome aceito atualmente (Sivanesan, 1990).

*A. caricae* é considerado um fungo biotrófico, baseado na dificuldade de seu cultivo e esporulação *in vitro*. Quanto à posição taxonômica *A. caricae* pertence ao Reino Fungi, ao Filo *Ascomycota*, à Classe *Dothideomycetes*, à Subclasse *Dothideomycetidae*, à Ordem *Capnodiales*, à Família *Mycosphaerellaceae* (INDEX FUNGORUM, 2014). No entanto, alguns aspectos taxonômicos do gênero *Asperisporium* são controversos, tais como a comprovação de *Mycosphaerella caricae* Syd. & P.Syd como teleomorfo. Estudos recentes mostram que *A. caricae* não é anamorfo de *M. caricae*, tratando-se de espécies distintas (Silva, 2010).

*Asperisporium caricae* é um hifomiceto que produz conídios uni ou bicelulares escuros, em esporodóquios formados por conidióforos curtos, escuros e densamente agrupados. Lesões secas, sem esporos assumem coloração cinza e parda, principalmente na face adaxial das folhas, circundadas por estreito halo amarelo (Ellis, 1971). O fungo apresenta estroma subepidérmico com 60 x 200 µm de diâmetro e 60-80 µm de altura, produzindo conidióforos fasciculados, eretos e septados com 40-45 µm de comprimento. Os conídios são piriformes ou oblongos com dimensões de 10-24 x 8-10 µm (Kimati et al, 1997).

A infecção dá-se, comumente, na face inferior das folhas mais velhas, servindo de fonte de inóculo para o fruto, daí a importância de controlar a doença primeiramente nelas. Segundo Stevens (1939), o período de incubação da doença é de oito a dez dias e o período latente de 18 a 21 dias. A doença é mais severa em períodos chuvosos e em regiões com alta umidade relativa (Adikaram & Wijepala, 1995; Elder et al., 2000). Nas folhas o fungo desenvolve frutificações pulverulentas que formam manchas pequenas, geralmente menores do que 4 mm de diâmetro, circulares, ligeiramente angulosas, de coloração escura.

Correspondente à lesão, na face superior, formam-se lesões semelhantes de coloração pardo-clara envolvidas por uma pequena depressão e um halo amarelo (Luna, 1986).

Nos frutos os primeiros sintomas são verificados quando estes ainda estão verdes, na forma de manchas circulares semelhantes às lesões das folhas. O tamanho das manchas acompanha o desenvolvimento dos frutos, tornando-se então pretas, salientes, ásperas ao tato e limitando-se à camada superficial da casca (Liberato et al., 2007). Estas lesões não atingem a polpa do fruto, são restritas apenas à casca, onde causam um endurecimento na parte afetada, porém desvalorizam o produto para o comércio, além de reduzir a sobrevida pós-colheita, a presença de apenas algumas lesões inviabiliza a exportação do fruto.

Devido à grande frequência com que a doença é encontrada no campo sugere-se que o fungo não tenha problemas de sobrevivência, provavelmente porque o mamoeiro apresenta folhas suscetíveis durante todo o ano, além de os conídios poderem ser disseminados pelo vento em longas distâncias. Respingos de chuva e água de orvalho também contribuem para a disseminação (Rezende & Martins, 2005). Para a doença as condições favoráveis ao desenvolvimento de epidemias são de temperatura variando de 25 °C a 30 °C e umidade relativa variando de 80 a 100 % (Suzuki et al., 2007).

### **2.3. Medidas de controle da pinta-preta**

Pela alta frequência com que normalmente ocorre e pelos danos que pode ocasionar ao mamoeiro, particularmente diminuindo o valor comercial dos frutos, a pinta-preta constitui um dos mais sérios problemas da cultura (Chiacchio, 1985; Nishijima et al., 1994; Oliveira & Santos, 2000). Assim, há necessidade de estudos que visem à adoção de estratégias alternativas para o controle desta doença.

No sistema de cultivo atual, a pulverização de fungicidas convencionais é necessária para se garantir a produção do mamoeiro, com reflexos negativos para a saúde humana, o ambiente e a comercialização. Todavia, o mamoeiro é uma planta muito sensível a produtos químicos, especialmente fungicidas triazóis em formulações oleosas, os mais utilizados no combate às doenças foliares causadas por fungos na agricultura (Liberato, 1999). Somado a isso, o mercado

internacional, cada vez mais exigente, estabelece níveis de tolerância de resíduos de agrotóxico mínimos, com base em métodos analíticos modernos, de alta capacidade de detecção, similares àqueles utilizados nos exames “antidoping” do esporte. A recusa de cargas de frutas por presença de resíduos de agrotóxicos é altamente prejudicial à comercialização, não somente pela perda econômica, mas principalmente pelo marketing negativo à exportação de frutas tropicais brasileiras.

Devido aos problemas acarretados pelos agrotóxicos no mamoeiro, há necessidade da adoção de estratégias alternativas para o controle da pinta-preta que tenham por finalidade oferecer alternativas para diminuir a dependência dos agrotóxicos e contribuir para as práticas de agricultura que sejam mais adequadas às novas exigências de qualidade.

Pesquisas recentes apontam para um cenário de controle alternativo aos fungicidas por meio de aplicação de indutores de resistência e, ou ativadores de plantas (Dantas et al 2004, Nascimento et al 2008). Outro produto muito utilizado na agricultura orgânica é a calda bordalesa, um fungicida protetor à base de cobre (Paulus et al., 2000), entretanto, tal produto possui certo grau de toxicidade, tanto para a planta quanto para o ambiente, uma vez que, em excesso, tende acumular no solo desequilibrando o ambiente através da lixiviação.

O melhoramento genético pela seleção de genótipos resistentes constitui outra medida alternativa. Esta metodologia baseia-se em uma medida sustentável de controle da pinta-preta, sendo uma tecnologia de fácil adoção por parte dos agricultores e sem impactos ao meio ambiente e à saúde humana. Mas, não há relatos de cultivares que sejam imunes/resistentes a esta doença (Santos & Barreto, 2003; Dianese et al., 2007; Vivas, 2009, 2012, Vivas et al. 2012).

Outra medida de controle alternativa aos fungicidas é o controle biológico. No entanto, no que tange ao controle da pinta-preta do mamoeiro, não existem praticamente pesquisas completas.

## 2.4. Controle biológico

O controle biológico de pragas pode ser definido como a regulação natural do número de indivíduo de uma população de uma espécie-praga através da ação de outra população, esta ação pode ser algum mecanismo de antagonismo como; antibiose, competição, parasitismo, hipovirulência, predação e indução de defesa do hospedeiro. Tais indivíduos são genericamente conhecidos como agentes de controle biológico e agem de forma a reduzir a soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença (crescimento, infectividade, virulência, agressividade e outras qualidades do patógeno ou processos que determinam infecção, desenvolvimento de sintomas e reprodução) provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem (Cook & Baker, 1983; Bettiol, 1991).

Inicialmente o controle biológico foi aplicado para controlar insetos, ácaros, e ervas daninhas. Com o passar do tempo, seu emprego se tornou mais amplo e outros invertebrados, patógenos de plantas e mesmo alguns vertebrados passaram a ser considerados alvos (Parra et al., 2002). Em 1932, o fungo *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz [*Trichoderma viride* (Pers)] foi observado parasitando fungos fitopatogênicos. Este foi o primeiro relato do uso de fungo como agente de biocontrole de fungos patogênicos, induzindo o início das pesquisas do uso de micoparasitas para esta finalidade (Adams, 1990).

No Brasil, embora o uso do controle biológico não seja uma prática generalizada entre os agricultores, há avanços significativos para algumas culturas. Um exemplo de sucesso consiste no uso de espécies de *Trichoderma* Pers., no controle de *Fusarium* Link, *Pythium* Nees, *Rhizoctonia* D., *Macrophomina* Petr, *Sclerotinia* Fuckel, *Sclerotium* Tode., *Botrytis* P. Micheli e *Moniliophthora* H.C. Evans, Stalpers, Samson & Benny, nas culturas do feijão, da soja, do algodão, do fumo, do morango, do tomate, da cebola, do alho, das plantas ornamentais e do cacau (Bettiol & Morandi, 2009).

Dado à sua ampla gama de hospedeiro, o gênero *Trichoderma* foi testado através de pareamento de cultura, produção de metabólitos fixos e produção de metabólitos voláteis por Almeida (2009), em culturas de *Colletotrichum* spp. *Cercospora musae* e *A. caricae*, a fim de viabilizar o seu controle biológico. Em ensaios conduzidos em laboratório, verificou-se que os isolados de *T. viride*

mostraram ampla potencialidade para antagonizar os fungos fitopatógenos testados. Porém, os resultados obtidos para o fungo *A. caricae* são questionáveis, uma vez que o tempo de condução do experimento (7 a 15 dias em BDA), não é suficientes para o crescimento do fungo *A. caricae* o que inviabiliza a competição entre o antagonista e o patógeno. Segundo Oliveira (2005), o fungo *A. caricae* é cultivado com dificuldade em meio de cultura artificial no laboratório e, nesta condição, possui crescimento muito lento com o diâmetro das colônias em dois meses atingindo apenas 2 mm. À exceção de Almeida (2009), para a cultura do mamoeiro não há estudos de biocontrole de doenças, o que existem são relatos de fungo supostamente hiperparasitando lesões de *A. caricae*: *Rhinostrichum glossypinum* (Speg.) Speg (Charles, 1940), *Sclerospora* J. Schrat. e *Verticillium* Nees. (Adikaram & Wijepala, 1995); *Cephalosporium* Corda (Silva et al., 1999); *Dicyma* Boulanger e *Acremonium* Link. (Vivas et al., 2011).

Dos fungos referidos acima, *R. gossypinum* foi apenas mencionado como parasita Charles (1940), em sua revisão o autor não apresenta detalhes da descrição do fungo encontrado. Quanto aos gêneros *Sclerospora* e *Verticillium* Adikaram & Wijepala (1995) relataram pela primeira vez a ocorrência de pinta-preta em mamoeiro no Sri Lanka, onde encontraram dois fungos crescendo nas lesões com *A. caricae*, os identificando morfológicamente. Segundo os autores, o papel destes dois fungos não ficou esclarecido, mas sugere alguma forma de hiperparasitismo.

Lesões de pinta-preta do mamoeiro colonizadas por *Cephalosporium* sp foram relatadas em um plantio experimental no município de Seropédica (RJ) por Silva et al. (1999). Os autores observaram entrelaçamento de hifas do agente causal da pinta-preta. Também foi feita pulverização de conídios do hiperparasita sobre lesões de pinta-preta em plantas de mamoeiro e os resultados apontaram que 60 a 70% das lesões foram colonizadas pelo fungo, aos 15 e 30 dias após a inoculação. Os resultados observados pelos autores apontam que, aparentemente, o fungo *A. caricae* estava sendo controlado, visto que nas lesões colonizadas não se observou esporulação do patógeno. Entretanto, este trabalho restringiu-se apenas ao resumo, não tendo continuidade dos trabalhos e tão pouco maiores detalhes da metodologia utilizada.

Recentemente, Vivas et al. (2011) observaram a ocorrência de folhas de mamoeiro com lesões de pinta-preta com sinais do fungo hiperparasita (lesões

esbranquiçadas). Os autores analisaram as estruturas reprodutivas dos fungos, e indicaram a presença dos gêneros *Dicyma* e *Acremonium*. Espécies dos gêneros mencionados acima, já estão sendo utilizadas na tentativa de se controlar doenças em outros patossistemas. Sudo (1989) demonstrou a viabilidade de se controlar biologicamente doenças da parte aérea em coqueiro, como as lixas-pequena e grande (*Camarotella acrocomiae* (Mont.) K.D. Hyde & P.F. Cannon (syn. = *Phyllachora torrendiella* (Bat.) Subileau, Renard & Dennet; *Sphaerodothis acrocomiae* (Mont.) Arx & E. Müll )) com *Acremonium alternatum* Link e *Acremonium persicinum* (Nicot) N. Gams. Esses antagonistas foram multiplicados e pulverizados nos talhões de coqueiro afetados pela lixa, cujas plantas estavam no início da frutificação, época mais prejudicial da doença, e quando o *Acremonium* não estava presente. De modo geral obteve-se uma eficiência superior a 65% com apenas uma aplicação anual dos antagonistas. Os hiperparasitas foram isolados diretamente dos estromas dos patógenos, sendo, portanto, um exemplo da viabilidade do método de controle biológico.

Warwick (2001), na tentativa de viabilizar o biocontrole da lixa do coqueiro através de diferentes formas de aplicação de *A. persicinum*, concluiu que a melhor época de aplicação foi nos meses chuvosos, no período da tarde, onde houve colonização efetiva dos estromas pelo hiperparasita. Warwick (2007), avaliando os índices de parasitismo de lixa-grande e pequena do coqueiro pelos fungos hiperparasitas: *Acremonium cavaraeanum* (Jasevali) W. Gams e *Hansfordia pulvinata* (Berk & M.A. Curtis) S.Hugles (Syn. *Dicyma pulvinata* (Berk & M.A. Curtis) Arx) observou em laboratório que *A. cavaraeanum* colonizou todas as cavidades estromáticas dos fitopatógenos. Por outro lado, o fungo *D. pulvinata* não parasitou as partes internas dos estromas, crescendo apenas na superfície externa do mesmo. O autor relatou em condição de campo um controle parcial das doenças avaliadas.

Além do gênero *Acremonium*, espécies pertencentes ao gênero *Dicyma* (= *Hansfordia*) também são relatadas com potencial para o biocontrole. Tal espécie foi relatada pela primeira vez como um hiperparasita em *Isariopsis indica* K.R.G.Nair e em espécies de *Cercospora* Fresen, na Índia (Rathaiah & Pavgi, 1971; Krishna & Singh, 1979). Nos Estados Unidos e na França, *D. pulvinata* tem sido alvo de pesquisas para controle da mancha-preta (*Mycosphaerella berkeleyi* W.A. Jenkins (syn. *Cercosporidium personatum* Berk. & M. A. Curtis) Deighton) do

amendoim (*Arachis hypogea* L.) e da cladosporiose – (*Passalora fulva* (Cooke) U.Braun & Crous (Syn. *Cladosporium fulvum* Cooke) do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Peresse & Le Picard, 1980; Tirilly et al., 1983; Mitchell et al., 1987). Tirilly et al. (1983) isolaram um metabólico antifúngico (13-desoxyphomenome) a partir de culturas líquidas de *D. pulvinata* obtida a partir de lesões de *C. fulvum* em tomate. Watanabe et al. (2003), relataram esse fungo no Japão, colonizando corpos de frutificações de Aphyllophorales (Basidiomata). Alderman et al. (2010) relataram *D. pulvinata* parasitando estroma de *Epichloe typhina* (Pers.) Tul. & C. Tul em orchardgrass (*Dactylis glomerata* L), nos Estados Unidos. Neste último caso para a avaliação da eficácia de *D. pulvinata* como agente de controle biológico de *E. typhina*, foram conduzidos ensaios em condições de estufa e de campo. Em ambos os ensaios os efeitos foram significativos, *D. pulvinata* reduziu o desenvolvimento de peritécios de *E. typhina*. No entanto, em condições de campo os melhores resultados surgiram quando o inóculo foi aplicado no momento em que os estromas de *E. typhina* começaram a surgir, durante a tarde, entre meados de abril e início de maio, quando as condições de umidade são altas.

Outro exemplo no Brasil é o biocontrole do mal das folhas da seringueira [(*Microcyclus ulei* (Henn.) Arx] pela aplicação do hiperparasita *D. pulvinata*. Este fungo tem sido apontado como promissor, pois coloniza e destrói as lesões estromáticas do patógeno e, conseqüentemente, reduz o desfolhamento das plantas e a taxa de inóculo em reinfecções (Junqueira & Gasparotto, 1991). No Brasil, além das avaliações realizadas por Junqueira & Gasparotto (1991), Rodrigues (2002) conduziu experimentos relativos ao cultivo do fungo em laboratório, enquanto na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia são estudados aspectos fisiológicos, morfológicos, moleculares e de patogenicidade, no intuito de selecionar isolados de *D. pulvinata* com potencial para o desenvolvimento de biofungicida (Tavares et al., 2004). Delmadi et al. (2009) concluíram que em campo, as aplicações com as diferentes concentrações de fungo, tiveram um efeito de controle semelhante à aplicação de fungicida à base de benomyl.

Portanto, há possibilidade de se utilizar esta técnica na cultura do mamoeiro, uma vez que já existem trabalhos relatando a ocorrência de fungos supostamente parasitando lesões de *A. caricae* (Charles, 1940; Adikaram &



Wijepala, 1995; Silva et al., 1999; Vivas et al., 2011). Entretanto, não há trabalho que comprove o parasitismo, tampouco que avalie o potencial de biocontrole de *A. caricae* por hiperparasitas. Ademais, acredita-se que a classificação de alguns destes fungos possa ser controversa, o que carece de estudos taxonômicos aprofundados.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Obtenção de isolados e cultura monospórica**

Para coleta e isolamento de fungos potenciais hiperparasitas, folhas de mamoeiro com lesões de pinta-preta e com sinais do patógeno colonizadas por hiperparasitas foram coletadas em diferentes localidades. Concomitantemente, coletaram-se folhas de quiabeiro e jiloeiro que apresentavam sinais de hiperparasitismo semelhantes aos observados na pinta-preta do mamoeiro, bem como folhas de cafeeiro e Jasmim-manga com ferrugem hiperparasitada, para fins de comparação (Tabela 1).

Os materiais coletados foram conduzidos ao laboratório para o preparo de lâminas das estruturas reprodutivas e pré-identificação dos gêneros fúngicos presentes, por Microscopia Ótica (MO). Constatada a presença de fungos hiperparasitas, procedeu-se ao isolamento direto, pela transferência de propágulos para meio batata-dextrose-ágar (BDA), em placas de Petri, seguindo-se a incubação a  $25\pm^{\circ}\text{C}$ , sob regime de 12 h de fotoperíodo.

Tabela 1. Relação dos isolados de fungos potenciais hiperparasitas, local, data da coleta e substrato (patógeno) de origem.

<b>Código</b>	<b>Planta hospedeira</b>	<b>Patógeno</b>	<b>Local da coleta</b>	<b>Data da coleta</b>
A-598	<i>Carica papaya</i> L.	<i>Asperisporium caricae</i>	Alegre – ES	04/06/2012
S-599	<i>Plumeria rubra</i> L.	<i>Coleosporium plumeriae</i>	Campos dos Goytacazes - RJ	19/06/2012
H-600	<i>C. papaya</i>	<i>A. caricae</i>	Alegre – ES	27/06/2012
A-601	<i>C. papaya</i>	<i>A. caricae</i>	Alegre – ES	23/05/2012
A-602	<i>C. papaya</i> .	<i>A. caricae</i>	Mimoso do Sul – ES	02/07/2012
A-603	<i>C. papaya</i>	<i>A. caricae</i>	Linhares - ES	29/12/2012
A-604	<i>C. papaya</i>	<i>A. caricae</i>	Mimoso do Sul – ES	18/11/2012
H-605	<i>C. papaya</i>	<i>A. caricae</i>	Pesqueiro - SP	29/12/2012
H-608	<i>C. papaya</i>	<i>A. caricae</i>	Mimoso do Sul – ES	04/06/2012
A-609	<i>C. papaya</i>	<i>A. caricae</i>	Campos dos Goytacazes - RJ	12/06/2012
H-610	<i>Solanum gilo</i> Raddi	<i>Cladosporium</i> sp.	Mimoso do Sul – ES	12/06/2012
H-611	<i>C. papaya</i> .	<i>A. caricae</i>	Colatina - ES	26/09/2012
H-612	<i>C. papaya</i>	<i>A. caricae</i>	Alegre – ES	29/06/2012
H-613	<i>C. papaya</i>	<i>A. caricae</i>	Campos dos Goytacazes - RJ	23/05/2012
H-614	<i>C. papaya</i>	<i>A. caricae</i>	Mimoso do Sul – ES	02/07/2012
H-615	<i>C. papaya</i>	<i>A. caricae</i>	Cachoeiras de Macacu – RJ	18/11/2012
A-616	<i>C. papaya</i>	<i>A. caricae</i>	Alegre – ES	27/06/2012
A-617	<i>C. papaya</i>	<i>A. caricae</i>	Cachoeiras de Macacu – RJ	21/11/2012
A-618	<i>C. papaya</i>	<i>A. caricae</i>	Mimoso do Sul – ES	29/06/2012
A-619	<i>C. papaya</i> .	<i>A. caricae</i>	Mimoso do Sul – ES	26/09/2012
L-620	<i>Coffea arabica</i> L.	<i>Hemileia vastatrix</i>	Mimoso do Sul – ES	30/06/2012
A-621	<i>Abelmoschus esculentus</i> L.	<i>Pseudocercospora abelmoschi</i>	Campos dos Goytacazes - RJ	12/06/2012
L-622	<i>C arabica</i>	<i>H. vastatrix</i>	Alegre – ES	03/07/2012
H-623	<i>A esculentus</i>	<i>P. abelmoschi</i>	Campos dos Goytacazes - RJ	12/06/2012

Código dos isolados representado pela letra inicial A=Acremonium, H=Hansfordia, S=Simplicillium e L= lecanicillium

As culturas puras obtidas foram submetidas a isolamentos monospóricos com o intuito de se garantir a pureza genética para fins de identificação. Neste procedimento esporos diluídos em gota de água estéril foram espalhados em meio de ágar 2%, sob lâmina, com alça de Drigalsky, seguindo-se de incubação em câmara úmida, a 25°C, fotoperíodo de 12 h. Sob microscópio óptico, esporos recém-germinados foram transferidos para meio BDA em placas de Petri. As culturas foram mantidas em tubos com BDA a 10°C (Dhingra & Sinclair, 1995), bem como utilizaram outros métodos de conservação em água (Castellani, 1939) e óleo mineral (Sherf, 1943).

### **3.2. Caracterização cultural, morfológica e identificação dos isolados**

Observaram-se dois gêneros fúngicos em *A. caricae*: *Hansfordia* e *Acremonium*. Para caracterização de fungos do gênero *Acremonium* o meio padrão utilizado foi o meio de malte (MEA) e o meio de BDA para avaliação do crescimento micelial após 10 d de incubação. Para os isolados de *Hansfordia* utilizou-se apenas BDA.

Das culturas dos isolados com 10 d de incubação em BDA a 25°C, fotoperíodo de 12 h, foram observados: o aspecto visual da colônia, a coloração de frente e verso da colônia, o aspecto do micélio e a forma da margem das colônias.

Para a visualização das estruturas fúngicas, efetuaram-se microculturas em meio de BDA sobre lâmina de microscopia. Sobre a cultura colocou-se lamínula e incubou-se em câmara úmida. Após 48 h o fungo se desenvolveu na parte inferior da lamínula, as quais foram analisadas diretamente sob o microscópio ótico.

A partir de preparações em lâminas em ácido láctico, com corante azul-de-algodão, foram efetuadas 30 medições micrométricas das estruturas reprodutivas (corpos de frutificação, conidióforos, conídios e demais estruturas), sob aumentos variados de 100 a 1000X, ao microscópio Nikon E-400, munido de ocular micrométrica e câmera integrada a microcomputador. Para identificação em nível de gênero, recorreram-se às referências da área de Micologia e Taxonomia de fungos (Ellis, 1971; Barnett & Hunter, 1972; Carmichael et al., 1980; Ellis, 1980;

Sutton, 1980; Ainsworth et al., 1973; Dennis, 1978; Hawksworth et. al., 1995; Seifert et al., 2011).

O isolado de ferrugem do jasmim manga, S-599, e os isolados de ferrugem do cafeeiro, L-620 e L-622, não foram caracterizados em cultura e identificados em nível de espécie, por não serem encontrados infectando naturalmente pústulas de pinta-preta em mamoeiro, fugindo ao escopo deste trabalho. Mas, foram incluídos nos testes de antibiose e hiperparasitismo, para se avaliar a especificidade ao hospedeiro dos fungos hiperparasitas.

### **3.3. Crescimento micelial dos hiperparasitas e avaliação da esporulação em diferentes temperaturas**

Foi retirado com o auxílio de um furador discos de 7 mm da borda da colônia de culturas puras dos isolados em BDA, com 5 d de incubação, fotoperíodo de 12 h. Os discos foram depositados no centro de placas de Petri contendo meio de BDA e em seguida, incubados em B.O.D. sob regime de luz de 12 h de fotoperíodo, a diferentes temperaturas (15, 20, 23, 25, 27 e 30 °C). O ensaio foi instalado em blocos casualizados com quatro repetições (placas) para cada isolado.

Avaliou-se após 10 d de incubação o crescimento radial das colônias, medindo-se o diâmetro médio das colônias em dois sentidos ortogonais. Avaliou-se também a produção de conídios em discos de 7 mm de diâmetros nas diferentes temperaturas. Para tal, com o auxílio de um furador, disco de 7 mm de diâmetro foram retirados da região mediana das colônias e mergulhados em 1ml de água com uma gota solução Tween a 20%. Após agitação por 1 min em agitador de tubos, retirou-se com pipeta a suspensão e procedeu-se a contagem em câmara de Neubauer.

Os dados de crescimento micelial e esporulação nas diferentes temperaturas foram submetidos à análise de variância, com delineamento em blocos casualizados, sob arranjo fatorial (6 temperaturas x 10 isolados). As variáveis significativas pelo teste F da análise de variância foram submetidas à análise de regressão linear. Para determinar a temperatura ótima ou o ponto de máximo

crescimento micelial e esporulação, foi realizada a derivada de primeira ordem da equação de segundo grau ajustada por regressão (método dos quadrados mínimos).

### **3.4. Antibiose *in vitro*: Avaliação de compostos voláteis e não voláteis que possam inibir a germinação de esporos de *A. caricae***

Devido à dificuldade de se cultivar *A. caricae* em meio de cultura, por este patógeno apresentar crescimento micelial muito lento (Oliveira, 2005), os testes *in vitro* foram realizados avaliando-se a germinação do conídio de *A. caricae*.

Para avaliar a ação de componentes voláteis, sobre a cultura de cada hiperparasita com 10 d de crescimento em meio de BDA, à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h, foi colocado um suporte (fragmentos de ágar), acima deste foram postas lâminas de vidro contendo disco de ágar de 7 mm, sendo posteriormente adicionada uma suspensão de  $10^4$  conídios.ml<sup>-1</sup> de *A. caricae* sobre os discos. A placa de Petri de cada hiperparasita foi vedada hermeticamente com parafilme e conduzida até a B.O.D. onde permaneceu até o momento da avaliação.

Para o estudo da antibiose por compostos não-voláteis, os isolados foram cultivados sobre papel celofane esterilizado sobreposto ao meio de BDA em placa de Petri. Após 10 d de crescimento, à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h, o papel celofane foi retirado da superfície do meio e descartado juntamente com a cultura do antagonista. Disco de 7 mm do meio de BDA, retirado da cultura, na qual cresceu o hiperparasita foi depositado sobre uma lâmina de microscopia, sendo posteriormente adicionada uma suspensão de  $10^4$  conídios.ml<sup>-1</sup> de *A. caricae*. As lâminas foram colocadas em placa de Petri e vedadas com parafilme e incubadas em B.O.D., onde permaneceram até avaliação.

Os ensaios descritos acima foram repetidos uma vez. Tanto para o teste de componente volátil quanto para o não volátil foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, com 26 tratamentos (24 isolados + 1 controle +1 controle negativo) e 4 repetições. Como controle, utilizou-se placas sem crescimento de fungo. Como controle negativo, utilizou-se pré-cultivo do fungo *Cladosporium* sp,

que é considerado um fungo de crescimento rápido, com a finalidade de saber se há efeito de componente volátil ou se houve efeito de acúmulo de gás carbônico, procedente da respiração micelial, impedindo a germinação de *A. caricae*.

Após 24 h de incubação, à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h, sob microscópio ótico no aumento de 20x, foram contados em três campos de visualização, os conídios germinados e não germinados. Estes foram comparados com a testemunha (meio de BDA sem cultura prévia do antagonista) e com testemunha negativa. Os dados de germinação dos conídios de *A. caricae* na presença de componentes voláteis e não-volátil foram submetidos a análises de variância, com arranjo em fatorial. Quando constatado efeito significativo foram conduzidos teste de comparações de média (Scott-knott a 0,05 de probabilidade) utilizando-se o programa Genes (Cruz, 2013).

### **3.5. Microscopia ótica da interação entre *A. caricae* e isolados hiperparasitas**

A fim de se verificar o parasitismo direto e a interação entre os fungos (hiperparasitas x *A. caricae*) foi realizado um ensaio de co-cultivo em microcultura (meio de ágar-água em lâminas de microscopia). Após a solidificação do meio, suspensões de  $10^4$  conídios.ml<sup>-1</sup> do hiperparasita e de *A. caricae* foram depositadas sobre meio de Ágar água em lâminas, seguindo-se a incubação em câmara úmida, em placas de Petri, à temperatura de 25 °C, durante 24, 48 e 72 h, sob fotoperíodo de 12 h.

Analizou-se ao microscópio a ocorrência de crescimento direcionado e associado das hifas, a penetração do tubo germinativo pelas hifas dos hiperparasitas, bem como as alterações nos padrões de crescimento do patógeno, na presença e ausência dos prováveis isolados hiperparasitas.

### **3.6. Hiperparasitismo *in vivo* sob condições de telado**

Os fungos hiperparasitas foram inoculados em folhas de mudas de mamoeiro apresentando sintomas de pinta-preta e sinais de *A. caricae*, sob condições de telado. Para isso, mudas de mamoeiro cv. Golden, suscetíveis à

pinta-preta (Vivas et al., 2012), com seis meses após transplante foram pulverizadas adaxialmente com suspensão de  $10^5$  conídios.ml<sup>-1</sup> dos fungos hiperparasitas.

Instalaram-se dois experimentos, o primeiro em julho e o segundo em novembro de 2013, delineados em blocos casualizados, com 25 tratamentos (24 hiperparasitas e testemunha – aspersão com água) e três repetições. A parcela experimental constituiu-se de uma planta por vaso, previamente inoculada com o patógeno, pela atomização adaxial de folhas com  $10^5$  esporos por mL, seguindo-se de incubação em viveiro telado com irrigação por aspersão (mist) intermitente diurna.

Para avaliações, considerou-se apenas 10 cm da extremidade apical (nervura central) de cada quinta folha do ápice para a base. Foram avaliados: (i) o tempo médio em dias para aparecerem a colonização das estruturas de *A. caricae* pelos hiperparasitas (lesões hiperparasitadas e recobertas por esporulação branca, sinais dos fungos aplicados); (ii) a incidência (%) de lesões brancas, hiperparasitadas, avaliadas aos 15 dias após inoculação. Os dados foram submetidos à análise de variância, com arranjo em fatorial. Quando constatado efeito significativo, conduziram-se teste de comparação de médias visando selecionar os isolados mais promissores quanto à capacidade de colonizar lesões de pinta-preta. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Genes (Cruz, 2013).



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização cultural, morfológica e identificação dos isolados

Os isolados estudados no presente trabalho foram classificados e encontram-se descritos em três grupos, conforme gêneros identificados e tipos de patossistemas. Os isolados obtidos de mamoeiro e quiabeiro, foram classificados em dois gêneros hifomicetos, segundo características morfológicas dos conidióforos e conídios, a saber *Hansfordia* e *Acremonium*. Os isolados de jiloeiro, foram identificados no gênero *Hansfordia*. Os isolados obtidos de ferrugens, nas plantas de Jasmim-Manga e Cafeeiro, foram classificados em dois gêneros, já conhecidos hiperparasitas em ferrugens: *Lecanicillium* e *Simplicium*.

#### **Isolados de *H. pulvinata***

O primeiro grupo, formado pelos isolados H-610, H-623, H-600, H-614, H-612, H-613, H-608, H-611, H-615 e H-605, apresentou crescimento lento em meio de BDA, atingindo em média 14 mm de diâmetro em 10 dias. Em média os isolados produziram colônias efusas, de aspecto aveludado e coloração que variou de cinza-claro a cinza-escuro, tornando-se mais escuras com o passar do tempo (Figura 1D). Além disso, os isolados apresentam micélio superficial, septado e ramificado. Conidióforos lisos, mais escuros na base, eretos,

ramificados no terço superior, terminados em células conidiogênicas com ramificações verticiladas, poliblasticas e denticuladas no ápice (Figura 1E e F). Conídios globosos, lisos, solitários, subialinos, unicelulares e com cicatriz basal (Figura 1G).

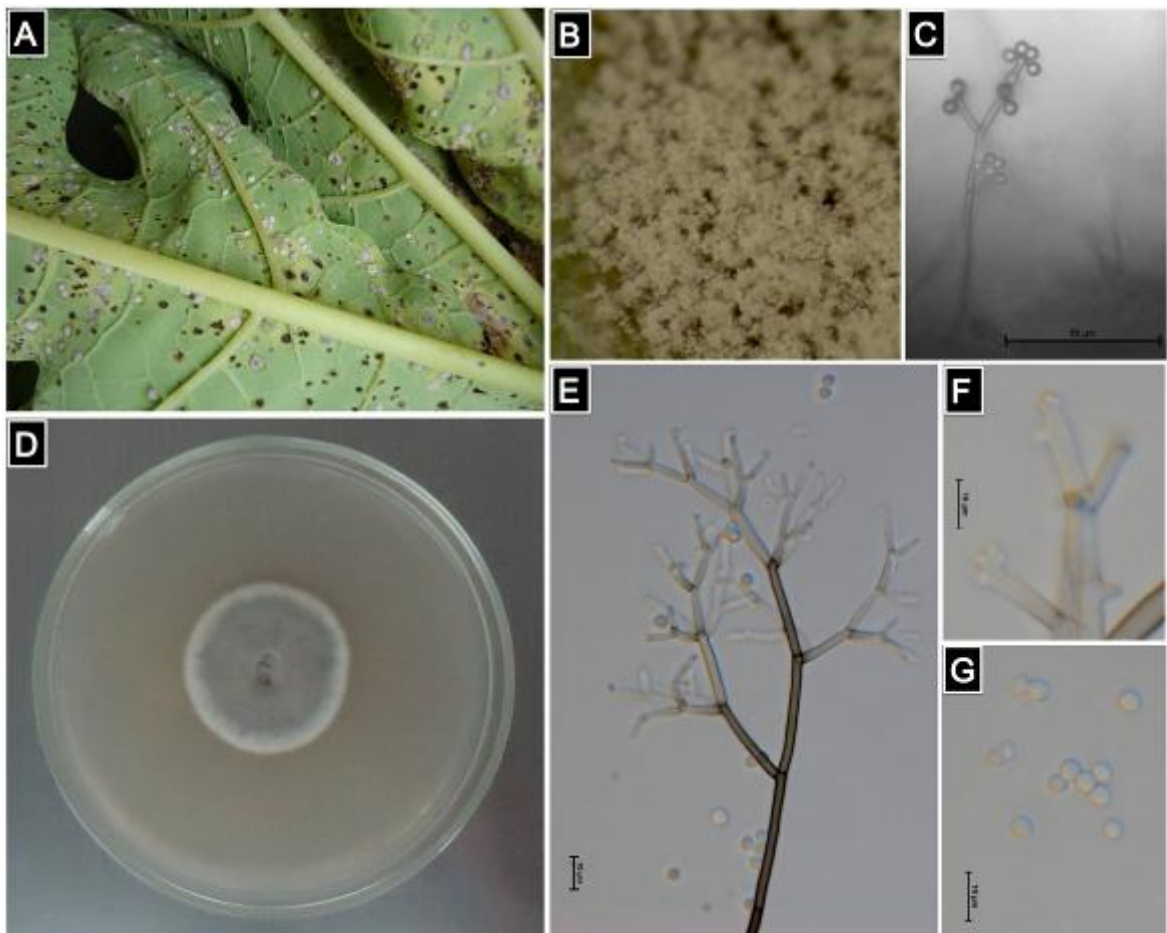


Figura 1 Fungo *Hansfordia pulvinata*, hiperparasita de *A. caricae*. (A) sinais de hiperparasitismo sobre lesões de pinta-preta em folhas de mamoeiro; (B) lesão hiperparasitada em lupa; (C) Estrutura reprodutiva em microcultura; (D) colônia do fungo em meio de BDA; (E) conidióforo, (F) dentículo da célula conidiogênica e (G) conídios do fungo.

Os dados morfométricos obtidos para os isolados permitiram enquadrá-los como sendo *H. pulvinata* (Berk & M.A. Curtis) S.Hugles (*syn. Dicyma pulvinata* (Berk & M.A. Curtis) Arx), e como confirmado por outros autores (Watanabe et al., 2003; Tavares et al., 2004; Alderman et al., 2010; Park et al., 2010) (Tabela 02). Segundo Deighton (1972), a variação de tamanho do conídio pode ser atribuída a variações comumente observadas na espécie, em função da origem dos isolados e das condições de cultivo.

O fungo *Dicyma pulvinata* é considerado por muitos autores como sinônimo de *Hansfordia pulvinata*. Contudo, alguns autores consideram estas duas espécies distintas. De acordo com as diferenças apontadas entre estes dois fungos por Seifert, et al (2011), os isolados obtidos neste estudo pertencem a *H. pulvinata*. A espécie hiperparasita, mitospórica, *H. pulvinata* é considerada cosmopolita e saprofítica, sendo relatada sobre muitos fungos dematiáceos principalmente cercosporioides, tais como *Cercospora* (Hawksworth, 1981), mas também *Passalora fulva* em tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Peresse & Le Picard, 1980), e *P. personata* sobre folha de amendoim (*Arachis hipogea* L.) (Mitchell et al., 1986, 1987).

Este hiperparasita já foi relatado sobre *Microcyclus ulei* em diferentes áreas de cultivo de seringueira do Brasil, tais como Acre, Amazonas, Bahia, Mato Grosso, Pará e Rondônia (Mello et al , 2003) e em São Paulo (Furtado & Sridhar, 2004). O fungo também já foi encontrado sobre lixa do coqueiro (*Phyllachora torrendiella*) no Sergipe (Warwick, 2007). No entanto, é a primeira vez que esta espécie é isolada em diferentes regiões dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo hiperparasitando pinta-preta no mamoeiro, e nos demais patossistemas estudados, tais como *Cladosporium* sp. no jiloeiro e *Pseudocercospora abelmoschi* em quiabeiro.

Tabela 2. Medidas morfométricas das estruturas reprodutivas de isolados de *Hansfordia pulvinata* obtidas de diferentes regiões e patossistemas e medidas típicas fornecidas por diferentes autores.

Isolado	Conidióforo		Célula Conidiogênica		Conídio
	N=30		N=30		N=30
	Comp. ( $\mu\text{m}$ )	Larg.Base ( $\mu\text{m}$ )	Comp ( $\mu\text{m}$ ).	Larg. ( $\mu\text{m}$ )	Diâm. ( $\mu\text{m}$ )
H-610	88,5-324,5	2,0-4,5	9,0-15,0	1,0-3,0	2,5-5,5
H-623	75,5-289,0	3,0-4,5	8,5-16,5	1,5-2,0	3,0-5,0
H-600	102,0-282,0	2,0-4,0	9,5-16,5	1,0-2,5	3,0-5,0
H-614	115,0-236,0	2,0-3,5	9,0-13,0	1,5-2,0	3,0-5,0
H-612	104,0-352,5	2,0-4,0	7,5-16,5	1,5-3,5	3,5-5,5
H-613	112,0-288,0	2,5-4,0	8,0-18,5	1,0-2,5	3,0-5,0
H-608	96,0-261,0	2,0-4,0	8,5-17,1	1,0-2,5	3,0-5,0
H-611	144,5-276,0	2,5-4,5	6,0-14,5	1,5-3,0	3,5-5,5
H-615	110,5-339,0	3,0-5,0	9,5-14,5	1,5-3,0	3,0-5,5
H-605	85,5-351,0	3,0-4,0	7,5-17,0	2,0-3,5	3,5-5,0
W1	200	1,2-3,0	8,0-18,0	1,6-2,0	2,8-6,0
A2	-----	3-5	-----	-----	5-7
P3	500	2-4	7-15	2-3,5	4-6

W1, A2 e P3 corresponde, respectivamente às descrições de Watanabe et al. (2003), Alderman, (2009) e Park et al. (2010).

### **Isolados de *Acremonium* spp.**

Os isolados A-598, A-609, A-604, A-601, A-619, A-618, A-616, A-603, A-602, A-621 e A-617 foram classificados em *Acremonium*. Para estes isolados observou-se maior variação nas características culturais e morfológicas (Tabela 3 e Figuras 2, 3 e 4). Considerando que houve grande variabilidade entre a morfologia dos isolados, estes serão descritos em grupos separados. Como características comuns a todos, incluem-se: colônias efusas e com a idade liberando exsudatos; micélio superficial, hifas septadas, ramificadas, plectonematogênicas; esporulação abundante. Células conidiogênicas em monofiálide, lateral ou terminal, ereta, simples, acicular, hialina e lisa; conídios unicelulares (ameroconidia), hialinos, produzidos em cadeia no vértice de cada monofiálide (Figura 2).

O gênero *Acremonium* aparentemente é uma das espécies que incluem algumas das estruturas mais simples de hifomicetos. Em meio de cultura seu crescimento geralmente é lento. Possui conídios geralmente pequenos, hialinos ou pouco pigmentados, de parede fina e lisa, forma esférica ou cilíndrica, unicelulares e agregadas em falsas cabeças viscosas ou formando cadeias. Com certa frequência um mesmo isolado pode apresentar falsas cabeças e cadeias conidiais em cultura. Algumas espécies formam clamidósporos e outras não produzem clamidósporos (Gams 1971, 1975; Domsch et al., 2007; Perdomo et al 2011).

Cerca de 100 espécies já foram descritas no gênero *Acremonium*, e segundo Kirk et al.(2001) estão geograficamente difundidas e registradas em todo o mundo, em vários substratos. Estudos moleculares têm demonstrado que *Acremonium* é polifilético, com espécies pertencendo a diferentes ordens de Sordariomycetes. Muitas espécies, incluindo a espécie tipo *A. alternatum* Link: Fr pertencem à Hypocreales. Outras pertencem à Sordariales e um pequeno grupo à Família Plectosphaerellaceae, em Glomerellales (Glenn et al., 1996; Zare et al., 2007; Perdomo et al., 2011; Summerbell et al., 2011).

Tabela 3. Medidas morfométricas das estruturas reprodutivas de isolados de *Acremonium* spp obtidas de diferentes regiões e patossistemas.

Isolado	Fiálide		Conídio		Clamidósporo	
	N=30		N=30		N=30	
	Comp. ( $\mu\text{m}$ )	L. base ( $\mu\text{m}$ )	Comp. ( $\mu\text{m}$ )	Larg. ( $\mu\text{m}$ )	Comp. ( $\mu\text{m}$ )	Larg. ( $\mu\text{m}$ )
A-601	16,0-32,0	1,5-2,5	3,0-4,0	1,5-2,0	4,0-9,0	3,0-7,5
A-598	18,0-40,0	1,5-3,0	2,5-4,0	1,5-2,0	3,0-9,0	2,5-6,5
A-621	14,0-48,0	2,0-3,0	3,0-5,0	1,5-2,0	NO*	NO
A-602	15,0-25,0	1,5-2,0	2,0-4,0	1,5-2,5	4,5-10,0	4,0-9,0
A-617	19,0-35,5	1,0-2,5	2,5-4,0	1,5-2,0	3,0-6,5	2,5-5,5
A-616	17,0-42,0	1,5-2,0	2,5-4,5	1,5-2,0	3,0-7,5	2,5-7,0
A-604	15,5-34,0	1,5-2,5	3,0-5,0	1,5-2,0	3,0-6,0	2,5-4,0
A-603	17,0-31,0	1,5-2,5	2,5-4,0	1,5-2,0	4,0-7,0	3,0-6,5
A-619	19,5-34,0	2,0-2,5	3,0-5,0	1,5-2,0	3,5-10,5	3,0-9,0
A-618	17,0-38,0	2,0-2,5	3,0-5,0	1,5-2,0	3,0-8,5	2,5-6,0
A-609	18,0-30,0	1,5-2,5	3,0-5,0	1,0-2,0	NO	NO

\*NO = Não observado

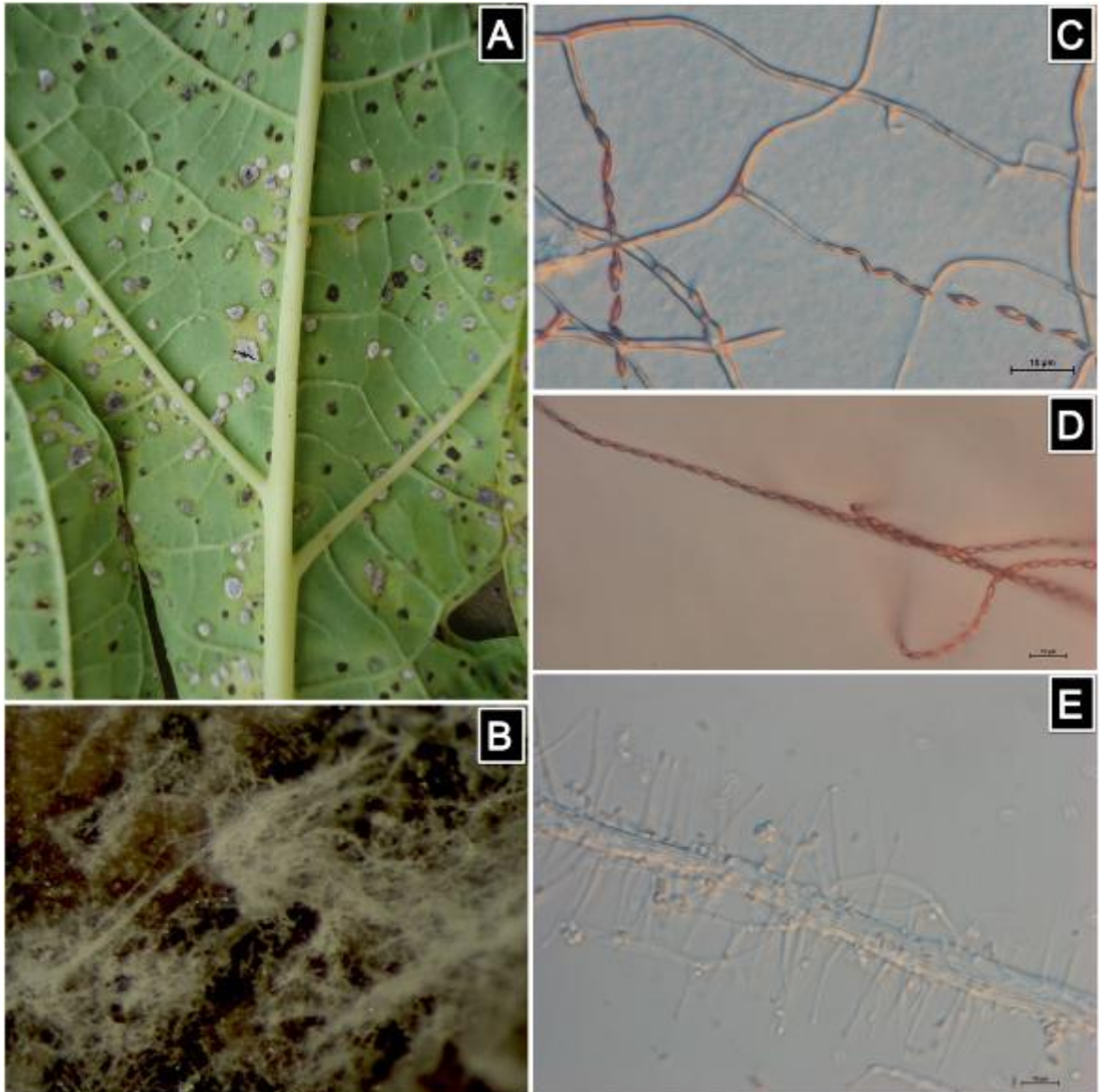


Figura 02. Fungo *Acremonium* spp, hiperparasita de *A. caricae*. (A) sinais do hiperparasita sobre lesões de pinta-preta em folhas de mamoeiro; (B) lesão hiperparasitada em lupa; (C) Estrutura reprodutiva em microcultura; (D) Conídios produzidos em cadeia; (E) micélio plectonematogênico.

Considerando as médias de crescimento micelial, observa-se que os isolados A-609 e A-621 possuem o crescimento mais rápido, crescendo em média 29 e 31 mm em meio BDA, e 25 e 28 mm em MEA, após 10 dias à temperatura de 25 °C (Figura 03 A e B). Estes apresentam micélio aéreo, coloração da colônia de verso laranja e reverso laranja mais intenso em ambos os meios, conídios cilíndricos e ausência de clamidósporo (Figura 3 C e D, Tabela 3).

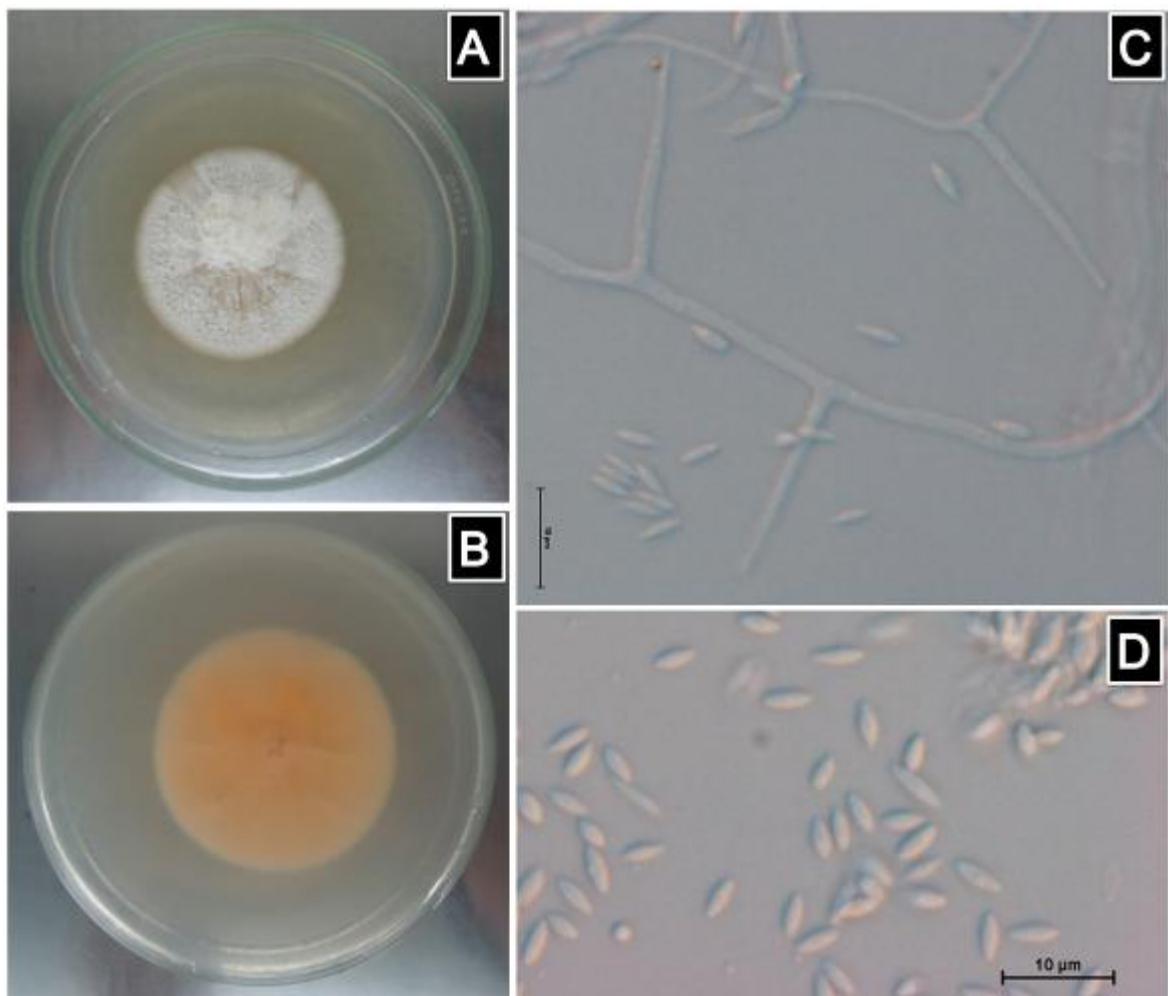


Figura 03. Isolado do fungo *Acremonium* sp A-609 hiperparasita de *A. caricae*. (A) Característica da Frente e (B) do verso de colônia em meio de BDA; (C) conidióforo; (D) conídios.



Os isolados A-601, A-602 e A-603 formaram um subgrupo à parte, com diferenças na coloração da colônia, o isolado A-601 apresenta coloração cinza-clara, o A-602 cinza-escuro e o A-603 bege na frente e no verso das colônias. (figura A – F) Este subgrupo, a uma temperatura de 25<sup>0</sup>C e após 10 d, em meio BDA crescem de 11 a 18 mm e em meio de MEA cresceram de 6 a 8 mm. Estes apresentam aspecto da colônia rugoso, micélio com crescimento superficial, o conídio com formato obovoide, produzem clamidósporo de formato irregular (Tabela 3, Figura 4 G, H e I).

Por último o subgrupo formado pelos isolados A-598, A-604, A-616, A-617, A-618 e A-619 cresceram de 10 a 17 mm em BDA e de 4 a 8 mm em MEA, possuem coloração da colônia branca na frente e no verso de aspecto rugoso a floculoso. (Figura 5 A e B). Conídios cilíndricos. Produzem clamidósporos de formato irregular (Figura 5 C,D e E, Tabela 3).

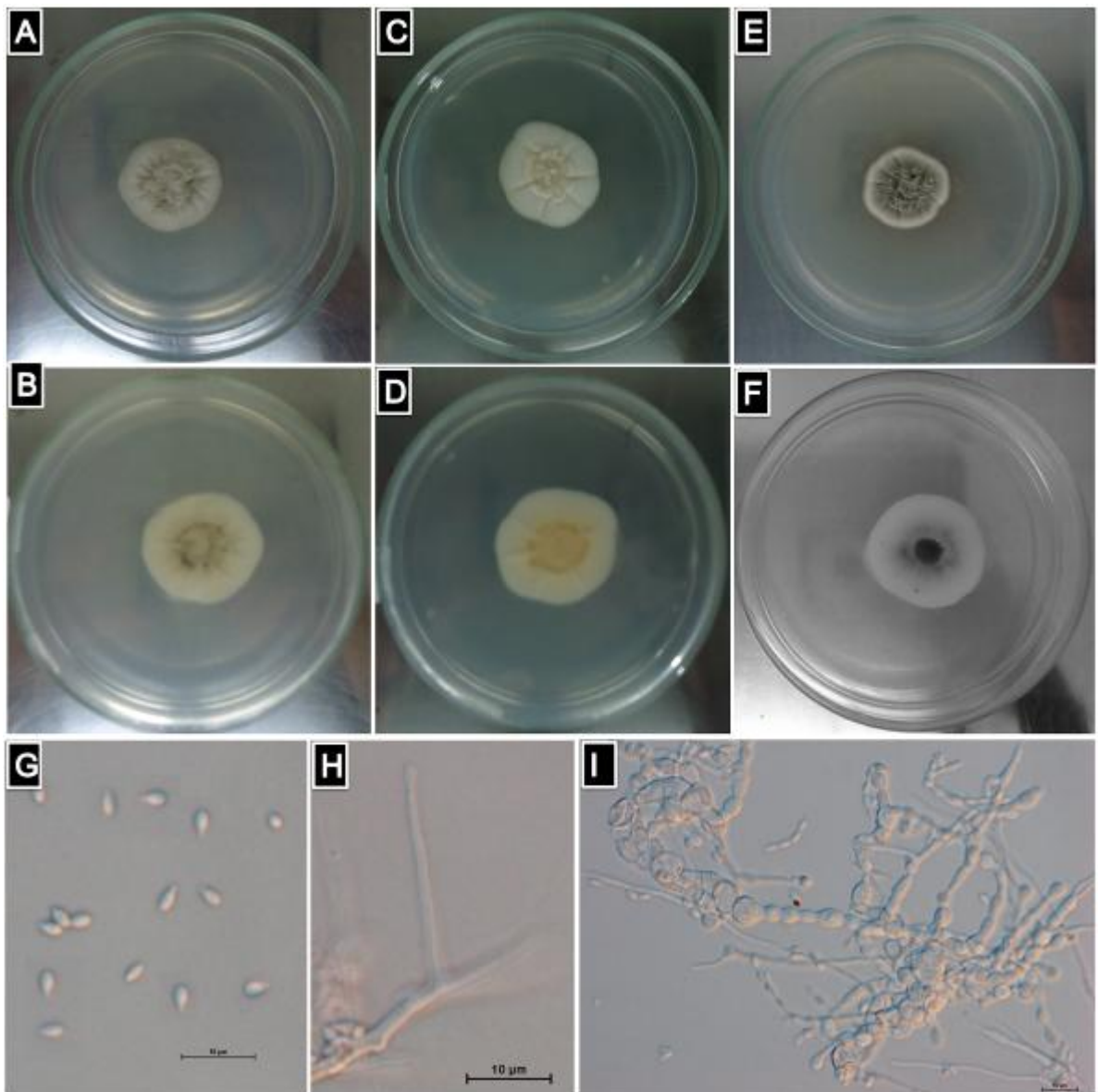


Figura 04. Variação morfo cultural de isolados de *Acremonium sp* hiperparasitas de *A. caricae* (A) Frente e (B) verso da colônia do Isolado A-601, (C) frente e (D) verso da colônia do Isolado A-602, (E) Frente e (F) verso da colônia do Isolado A-603 em meio de BDA; (G) conídio; (H) conidióforo e (I) Clamidósporo isolado A-603.

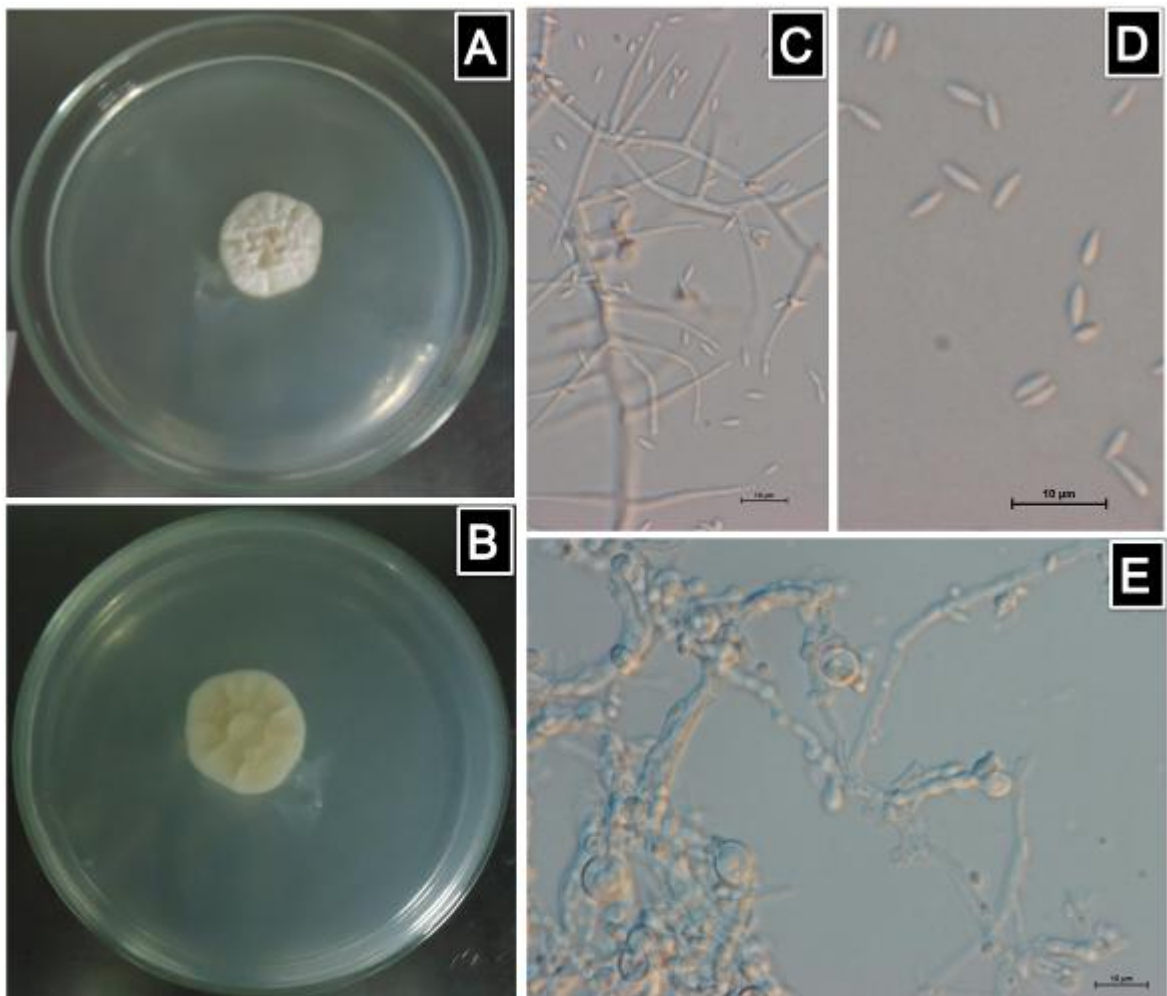


Figura 05. Isolados A-618 do fungo *Acremonium sp*, hiperparasita de *A.caricae*. (A) Frente e (B) verso da colônia em meio de BDA; (C) conidióforo; (D) conídio, (E) clamidósporo

Observa-se uma grande diversidade entre os isolados de *Acremonium* obtidos neste estudo, o que sugere a existência de mais de uma espécie envolvida no hiperparasitismo de lesões de pinta-preta no mamoeiro. Delgado (2011) realizou um levantamento sobre fungos relatados na Nicarágua, onde faz referência a Gonzáles (1985), relatando a ocorrência do gênero *Acremonium* como hiperparasita de pinta-preta no mamoeiro, porém nenhuma informação foi referida em nível de espécie.

Aventa-se, neste trabalho, a possibilidade de ocorrência de diferentes espécies relacionadas ao patossistema *A. caricae* x *C. papaya*. Todavia, a identificação de isolados de *Acremonium* em nível de espécie é muito complicada devido às poucas características para diferenciar as espécies e o tamanho diminuto das estruturas fúngicas, neste sentido para uma correta identificação faz-se necessário recorrer a análises filogenéticas, envolvendo o sequenciamento de genes conservados tais como LSU, actina e RNA polimerase (Graffenhan et al., 2011; Giraldo et al., 2012).

Os isolados A-609 e A-621 (Figura 03), por não produzirem clamidósporo, e pelas características culturais e morfológicas, aproximam-se de *Acremonium cavaraeanum* (Jasevoli) W. Gams, espécie relatada hiperparasitando lixa-grande do coqueiro, no Brasil (Warwick, 2001) *A. cavaraeanum* cresce de 32-33 mm em meio MEA após 10 d. Suas colônias são de aspecto aveludado, coloração de verso branco e reverso rosa-violácea; comprimento da fialide; conídios em longas cadeias, hialinos ou pálidos castanho-amarelados, fusiformes a elipsoides, ausência de clamidósporos. Ainda as características, dos isolados A-609 e A-621 sobrepõem a outra espécie distinta, *Acremonium implicatum* J.C. Gilman & E.V. Abbott W. Gams.

Summerbel (2011) em seu trabalho sobre filogenia de *Acremonium* e afins, relata que a espécie descrita como *Acremonium implicatum*, micoparasita de *Puccinia graminis*, não apresentava cultura viável que permitisse sua identificação. O autor relata ainda a possibilidade de *A. implicatum* ser *Fusidium terricola* JH Mill., Giddens & A. A. Foster. A cultura de *F. terricola* apresenta coloração que a princípio é branca, depois bege meio rosado; conidióforo simples, estreitado em direção à ponta, hifas aéreas, ereto ou procumbentes, fialide 10-33 x 2-3 µm; conídios em cadeias flexuosas muito longas, fusiforme medindo 3-6 x 1-

1,5 µm com extremidades agudas, hialino. Não sendo relatada presença ou ausência de clamidósporo.

Já os isolados A-601, A-602 e A-603 (Figura 04) apresentam características semelhantes à espécie *Acremonium sordidulum* Gams, W. 1975. *Acremonium sordidulum* micoparasita de *Colletotrichum dematium*, em meio de cultura possui coloração branca, tornando-se cinza-esverdeada e aspecto flocoso; conídio em longas cadeias, fusiforme com extremidade muciosamente truncar ou periforme com uma extremidade superior ligeiramente arredondada e mais apiculada na base com largura maior no terço superior, hialino ou levemente pigmentado. No entanto, esta espécie não possui clamidósporo, o que a difere dos isolados apresentados acima.

Os isolados A-598, A-604, A-616, A-617, A-618 e A-619 (Figura 05) apresentam-se semelhantes à *Acremonium acutatum* Gams, W. *Acremonium acutatum* foi encontrado hiperparasitando *Cercospora atromarginalis* em *Solanum nigrum*. Suas colônias são de coloração branca para rosa pálido, aspecto flocoso, granuloso no centro; conídios medindo em longas cadeias; possuem clamidósporos. *A. acutatum*, porém, possui conídios mais ou menos simétricos, diferentemente dos isolados A-598, A-604, A-616, A-617, A-618 e A-619, os quais apresentam conídios simétricos.

Estas espécies citadas acima são apenas exemplos que apresentam semelhanças com os isolados caracterizados neste estudo. Conforme já comentado, a identificação dos isolados inclusos no presente estudo em nível de espécies requer o uso de análise filogenética ampla, baseada em marcadores moleculares, havendo, inclusive a possibilidade de alguns dos grupos de isolados caracterizados no presente estudo, pertencerem à nova espécie.

### **Isolados hiperparasitas de Ferrugens**

O isolado S-599 apresentou características morfológicas de acordo com as descritas por Zare & Gams, (2001) para o gênero *Simplicillium*. Este gênero possui aspecto cotonoso e coloração que varia do creme ao branco. Fiálides exclusivamente solitárias, longas e estreitas, surgindo a partir de pares opostos. Conídios produzidos em pequenas cabeças globosas no ápice das fiálides

encontram-se envoltos por uma massa gelatinosa. Os conídios são pequenos, variáveis na forma podendo ser subglobosos, ovais ou elipsoidais para subcilíndricos.

O gênero *Simplicillium*. já foi descrito sobre várias espécies de Pucciniales, incluindo dentre as plantas hospedeiras cultivadas, o café e a soja (Zare & Gams, 2001 Ward, 2011). Em *Plumeria rubra* L. popularmente conhecido como Jasmim manga, é o primeiro relato deste gênero hiperparasitando a *Coleosporium plumariae* Pat. Estudos adicionais, para correta identificação em nível de espécie do isolado de *Simplicillium* S-599 deverão ser conduzidos, envolvendo caracterização morfológica e molecular.

Já os isolados L-620 e L-622 apresentaram características morfológicas semelhantes às descritas por Zare & Gams (2001) para o gênero *Lecanicillium*. Este gênero possui aspecto cotonoso e coloração branca-amarelada tênue. O micélio origina o conidióforo que se caracteriza por apresentar fiálides pontiagudas, com uma disposição verticiliada. Quanto aos conídios são produzidos individualmente e agregam nas cabeças ,são elipsoidais para cilíndricos com extremidades arredondadas, encontram-se envoltos por uma massa gelatinosa na extremidade da fiálide.

O gênero *Lecanicillium* já é amplamente conhecido como hiperparasita de várias ferrugens e, no Brasil, e no mundo a relação foi bastante estudada por Vandermeer, (2009) Jackson (2012) sobre *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome, agente causal da ferrugem do cafeeiro. Porém, para confirmação em nível de espécie, estudos adicionais deverão ser conduzidos, estudos morfológicos e moleculares.

Zare & Gams (2001), revisando o gênero *Lecanicillium* e *Simplicillium* em um amplo estudo filogenético e morfológico classificaram as espécies em Cordyciptaceae, a qual inclui fungos micoparasitas e entomopatogênicos.. Segundo estes mesmos autores, estes fungos são um dos agentes mais efetivos e possuem potencial de utilização no controle biológico, apresentando uma ampla gama de hospedeiros. São um importante patógeno de homópteros (Grajek, 1994 e Jackson, 2012), além de causar doenças em alguns ácaros e hiperparasitar fungos patógenos de plantas tais como aqueles causadores de várias ferrugens (Verhaar & Hijwegen, 1993; Castaldi & Nicoli, 1993, ward, 2011).

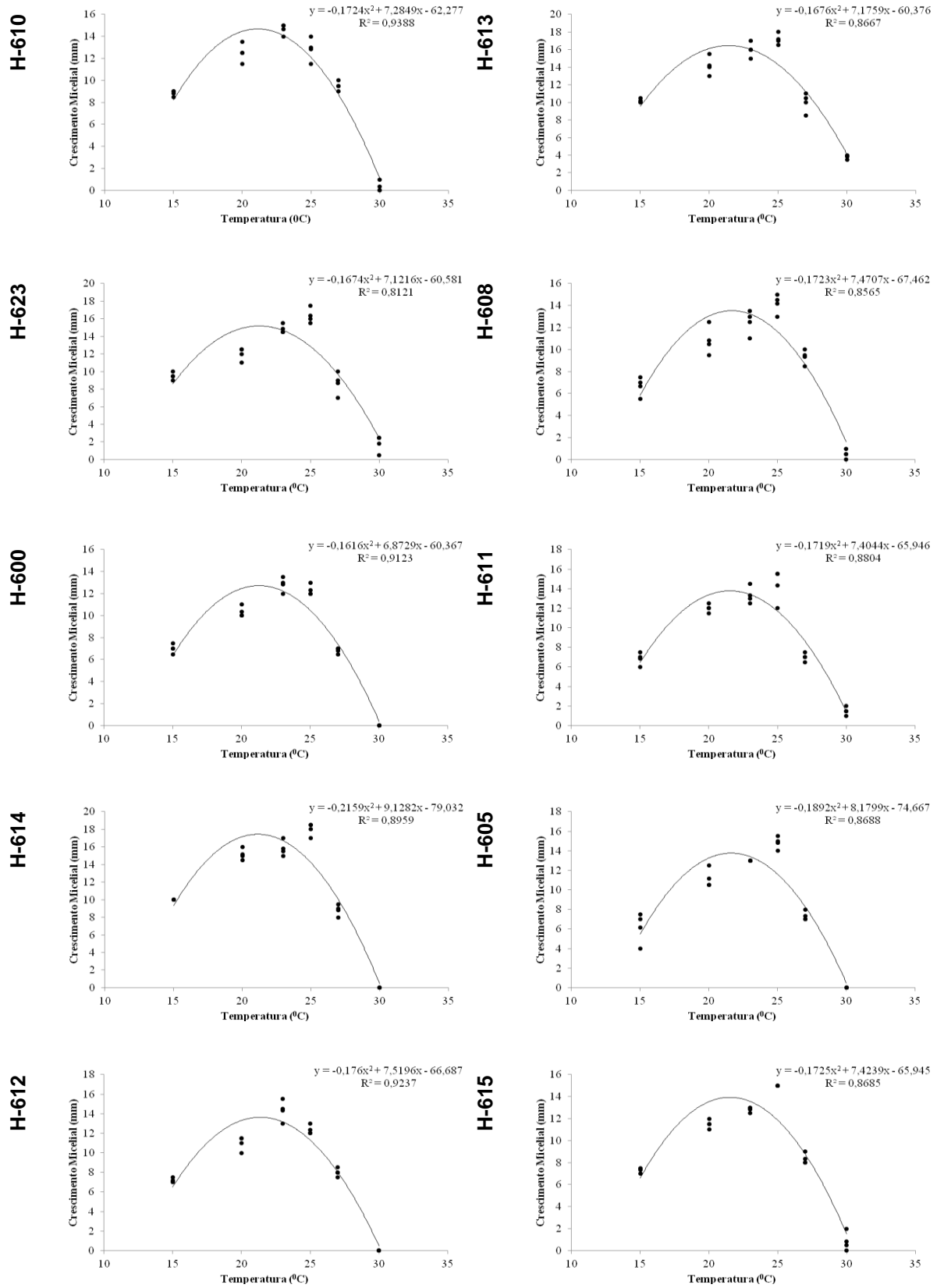
#### 4.2. Crescimento micelial dos hiperparasitas e avaliação da esporulação em diferentes temperaturas

As diferenças observadas nos resultados de estudos de hiperparasitismo *in vivo* conduzidos em telado, em função da época do ano, sugeriram que os fungos hiperparasitas diferem entre si quanto às exigências térmicas e, baseando-se nisto, foram conduzidos ensaios em laboratório, para se determinar o ótimo de temperatura para crescimento micelial em meio de cultura. Esse é um dado relevante, tanto para produção de inóculo, quanto para se inferir sobre as condições ambientais e indicação dos períodos de aplicação dos fungos para fins de controle biológico.

Observou-se que os isolados de *Hansfordia* sp. apresentam preferência por temperaturas amenas, variando de 19 a 22 °C, tanto para crescimento micelial, quanto para esporulação. Todos os isolados desta espécie apresentaram comportamento semelhante em termos de desenvolvimento e esporulação. Independente do patossistema de origem, local e época de coleta (Tabela 1) não houve variação na resposta dos isolados nas diferentes temperaturas para crescimento micelial (Figura 6), confirmando possível similaridade fisiológica dos diferentes isolados de *Hansfordia pulvinata*.

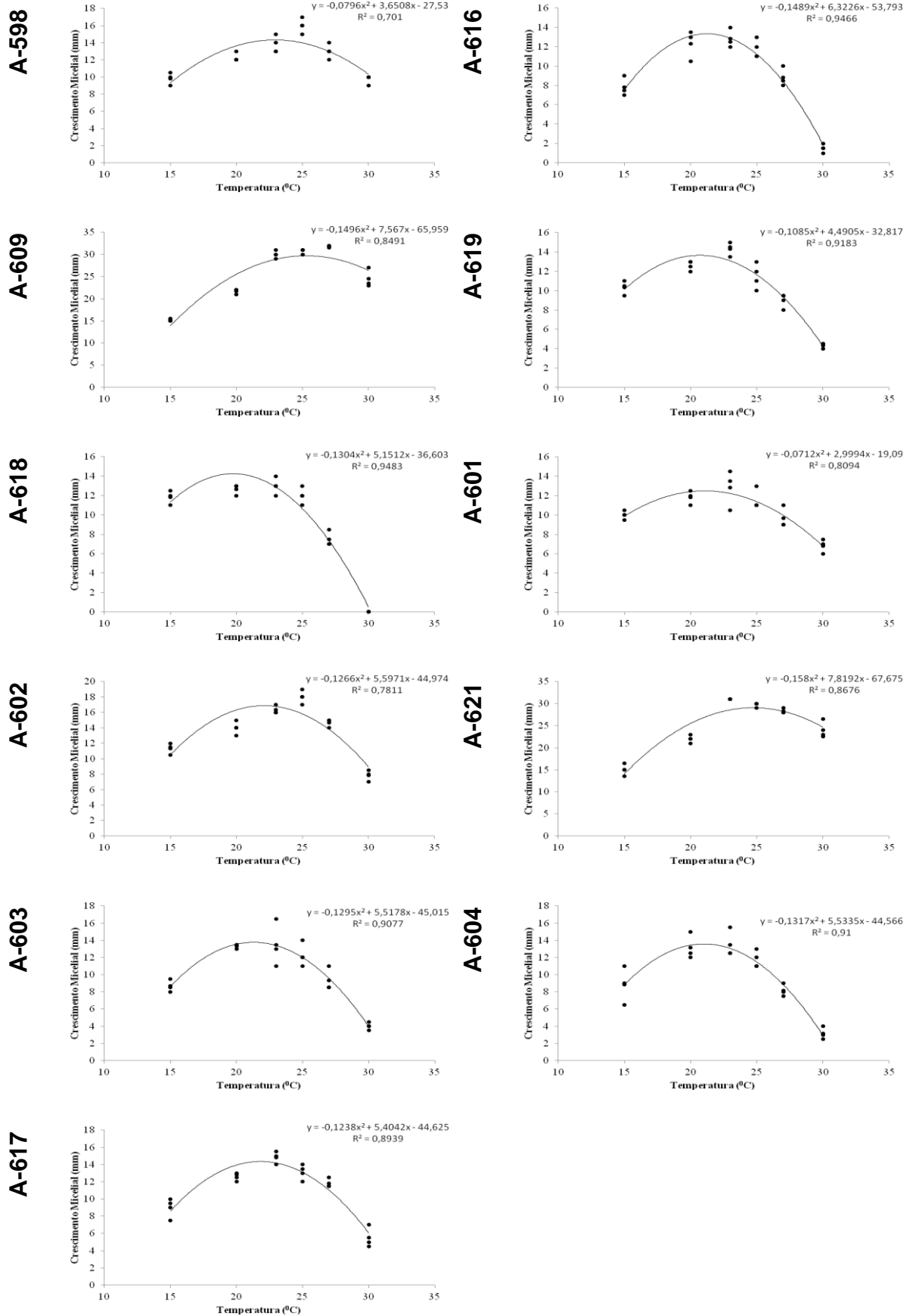
A temperatura ótima para o maior crescimento micelial dos diferentes isolados variou de 21 °C a 22 °C. Todos os isolados apresentaram crescimento micelial nas temperaturas entre 15 e 27 °C. Porém, a 30 °C somente os isolados H-610, H-613, H-623, H-608, H-611 e H-615 apresentaram crescimento mínimo em BDA, embora este não ultrapassasse 3,5 mm (Figura 6).

Para os isolados de *Acremonium* spp., a temperatura ótima para crescimento micelial variou de 20°C a 25°C. Para a grande maioria dos isolados (A-618, A-602, A-598, A-604, A-601, A-619, A-616, A-603 e A-617) a temperatura ótima para crescimento micelial ficou entre 20 e 22 °C (Figura 07). Já para os isolados A-609 e A-621, a temperatura ótima de crescimento micelial foi de 25 °C. Nesta temperatura, o crescimento máximo previsto para os dois últimos isolados foi de 29,5 mm (Figura 7).



**Figura 06.** Curvas de crescimento micelial, dos isolados de *Hansfordia pulvinata* em função da temperatura aos 10 d de incubação, em meio de BDA





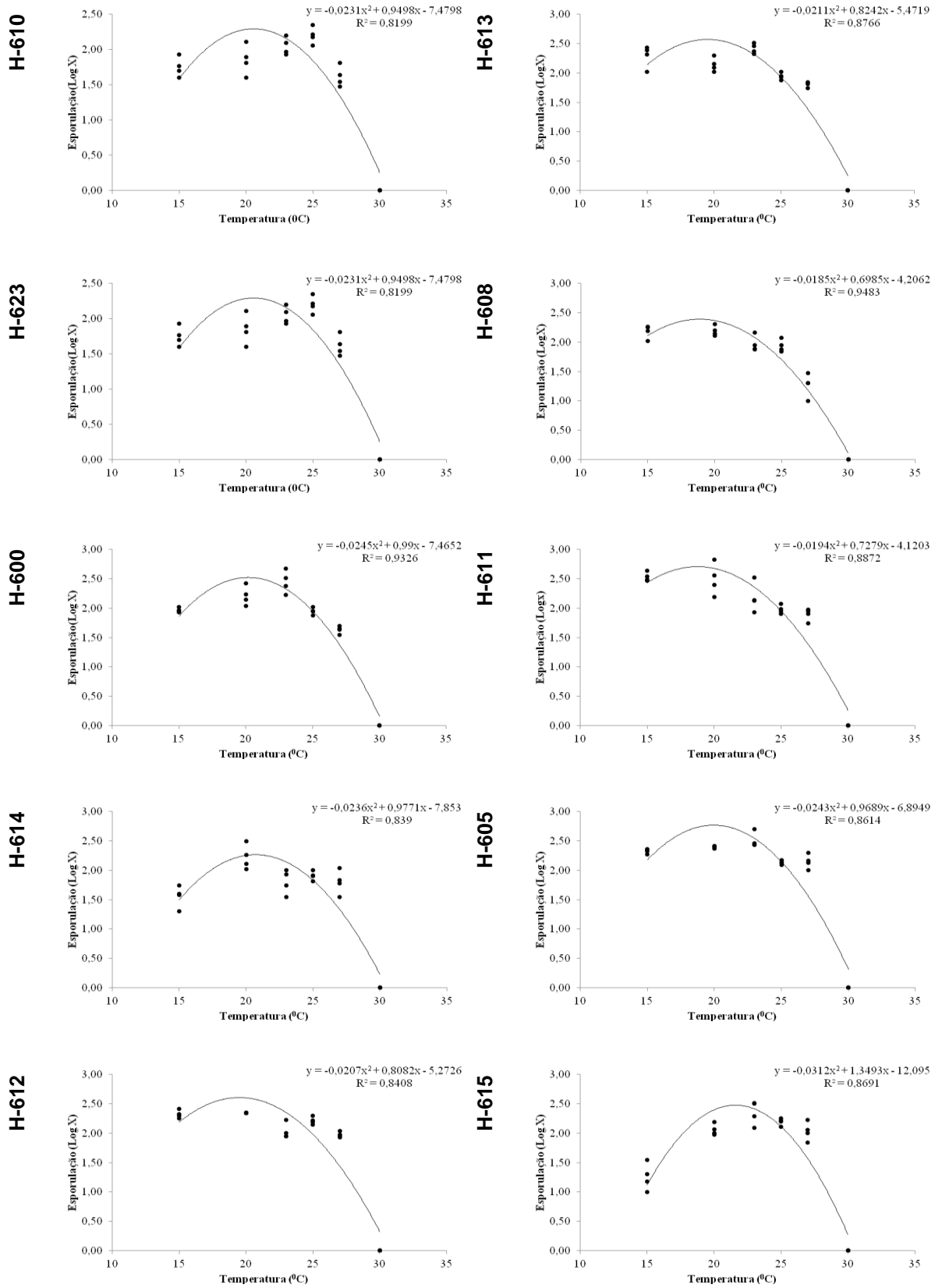
**Figura 07.** Curvas de crescimento micelial, dos isolados de *Acremonium* spp em função da temperatura aos 10 d de incubação, em meio de BDA.

Para esporulação também houve interação significativa entre isolados e temperatura. Os isolados H-608 e H-611, obtidos de lesões de pinta-preta (Tabela 1), apresentaram a temperatura ótima para esporulação de 19°C. Já para os isolados I-623 (obtido de *P. abelmoschi*) e H-600, H-612, H-613 e H-605 (obtidos de lesões de pinta-preta), a temperatura ótima para a esporulação ficou em torno de 20°C. Enquanto os isolados H-610 e H-614, obtidos respectivamente de *Cladoporium*/tomateiro e *A. caricae*/mamoeiro, apresentaram ótimo de esporulação a 21°C. O isolado I-615, obtido de pinta-preta do mamoeiro, esporulou mais em torno de 22°C (Figura 8).

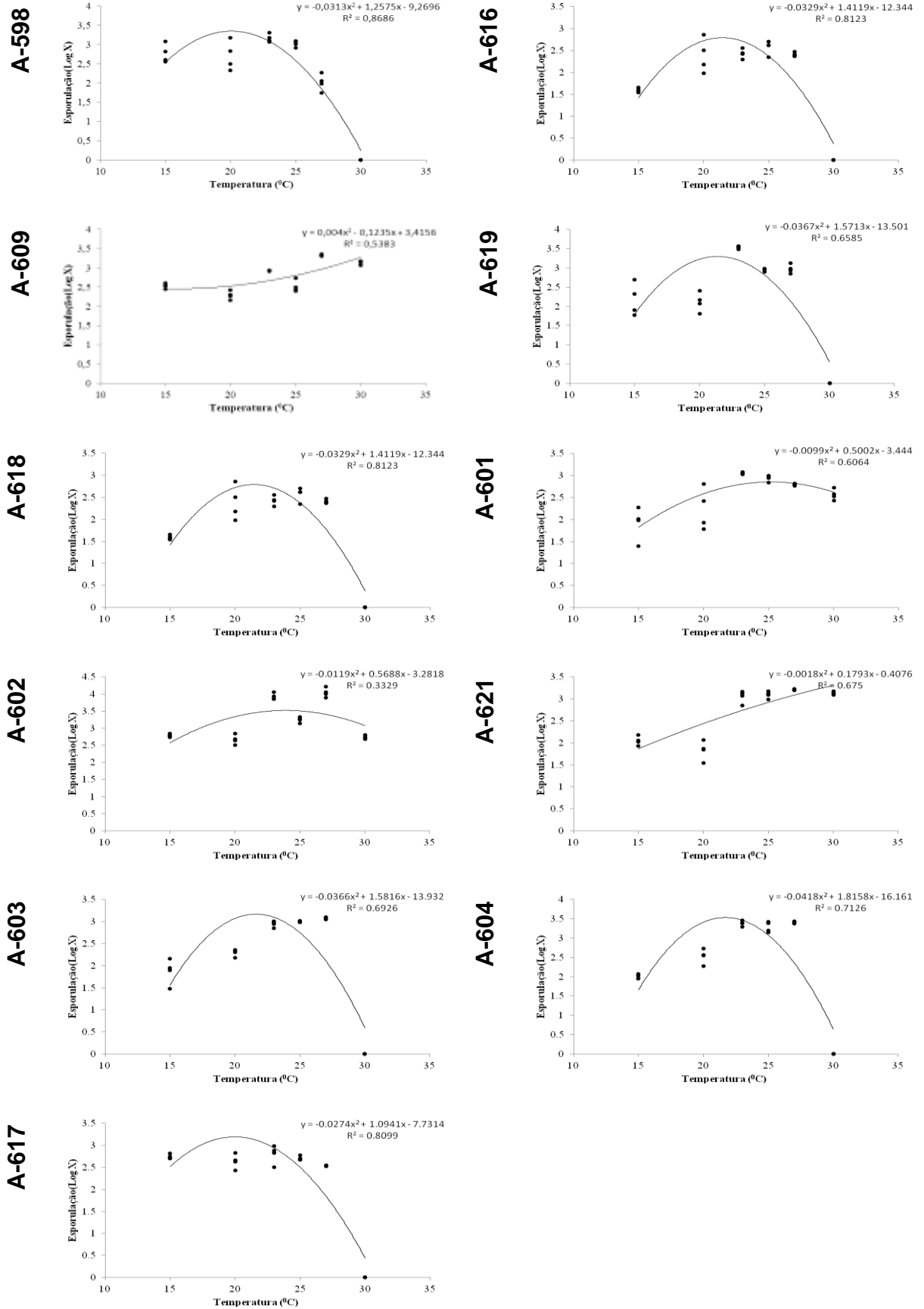
Os isolados A-609 e A-621 não tiveram a produção de conídios afetada mesmo nas maiores temperaturas (Figura 9). Para estes isolados, não foi possível propor um modelo que descrevesse a relação entre temperatura e esporulação.

Os isolados A-601 e A-602, também não tiveram a esporulação fortemente afetada pela temperatura (Figura 9). Entretanto, ao se analisar o crescimento micelial destes isolados, observou-se que a temperatura entre a faixa de 25 a 30 °C apresentou menor crescimento (Figura 07). Aventa-se, portanto, a possibilidade da temperatura influenciar pouco a conidiogênese, sendo que a produção de conídios, mais dependente da massa micelial preexistente, uma vez que os esporos foram obtidos do centro de colônias aos 10 d, tendo estas, crescido mais ou menos, em função da temperatura. Possivelmente, ao se avaliar a quantidade de esporos produzidos por placa, ao invés de se amostrar discos de culturas já crescidas, o resultado seria diferente. Assim, a temperatura final influenciaria pouco a conidiogênese, estando esta na dependência direta da biomassa micelial preexistente (Sales-Campos & Andrade, 2010).

Para os demais isolados observou-se que a temperatura ótima para esporulação variou de 20 a 22 °C. A temperatura de 20 °C foi a que mais favoreceu a esporulação dos isolados A-598, A-618 e A-617, enquanto que para A-616 a temperatura ótima foi de 21°C e para os isolados A-604 e A-603 esta foi de 22°C (Figura 09).



**Figura 08.** Curvas de produção de conídios dos isolados de *Hansfordia pulvinata*, em função da temperatura aos 10 d de incubação em meio de BDA.



**Figura 09.** Curvas de produção de conídios dos isolados de *Acremonium* spp. em função da temperatura aos 10 d de incubação em meio de BDA.

Os resultados acima evidenciam que a faixa de temperatura ótima para crescimento micelial e esporulação, para a grande maioria dos isolados estudados de *H. pulvinata* e *Acremonium* spp, foi em temperaturas amenas, variando entre 20 e 22 °C. A única exceção foi para os isolados A-609 e A-621 de *Acremonium*, que apresentaram ótimo crescimento e esporulação a 25°C. De todo modo, em todos os casos, os ótimos de temperatura foram inferiores a 25 °C, tanto para crescimento micelial quanto para esporulação, sugerindo que as condições de verão, com temperaturas médias superiores a 25 °C, não sejam propícias a aplicação dos hiperparasitas. No entanto, estudos em nível de campo são necessários para corroborar o observado no presente estudo. Ademais, tem-se observado que no verão as epidemias de pinta-preta são menos severas. Embora Suzuki et al. (2008) tenham relatado que a doença ocorre o ano todo até mesmo à temperatura de 30 °C. Porém, na região sul do espírito Santo e norte do Rio de Janeiro, observa-se uma redução na epidemia de pinta-preta nas condições de temperaturas elevadas, o que sugere novos estudos nestas condições.

#### **4.3. Antibiose *in vitro*: Avaliação de componentes voláteis e não voláteis que possam inibir a germinação de esporos de *A. caricae***

Observou-se que não houve diferença estatística entre as médias de germinação conidial em nenhum dos dois ensaios conduzidos para avaliar a presença de componentes voláteis (Tabela 4). Portanto, nenhum dos 24 isolados testados apresentou evidências de produção de compostos voláteis que possam ter efeito de antibiose sobre a germinação conidial de *A. caricae*. Observou-se, contudo, diferenças nas médias de germinação conidial entre os ensaios, o que pode estar associado às condições ambientais e épocas de coleta dos conídios de *A. caricae*.

Tabela 4. Médias da porcentagem de germinação de conídios de *Asperisporium caricae* em ensaio de produção de compostos voláteis de 24 isolados de fungos hiperparasitas.

Isolado	% Germinação			
	Primeiro Ensaio		Segundo Ensaio	
A-598	29,11	A	40,77	A
H- 608	28,04	A	46,54	A
A-616	32,90	A	44,71	A
A-609	30,98	A	38,97	A
A-619	32,25	A	39,99	A
A-618	29,39	A	42,93	A
S-599	34,76	A	42,69	A
H-600	32,17	A	48,55	A
A-601	24,41	A	39,45	A
H-610	32,51	A	43,23	A
H-611	29,18	A	39,63	A
A-602	30,54	A	40,97	A
H-612	27,30	A	41,91	A
A-603	19,55	A	47,15	A
L-620	24,00	A	45,96	A
H-613	30,36	A	42,57	A
A-604	28,83	A	37,83	A
A-621	25,06	A	40,35	A
H-614	24,80	A	42,00	A
H-623	31,19	A	45,84	A
L-622	25,96	A	47,35	A
A-617	30,40	A	36,54	A
H-605	37,39	A	43,85	A
H-615	36,25	A	39,73	A
Controle negativo ( <i>cladosporium</i> sp)	28,85	A	44,06	A
Controle sem fungo	31,47	A	33,49	A
Média	29,52		42,19	
CV (%)	24,19		13,90	

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (0,05).

Por outro lado, verificou-se efeito de antibiose para alguns hiperparasitas, para componentes não-voláteis, reduzindo a germinação de *A. caricae*. Nos dois ensaios repetidos no tempo, observou-se que os isolados H-608, A-616, H-600, H-611, H-612, A-604, H-623 e A-617 foram os que mais inibiram a germinação conidial de *A. caricae* (Tabela 5). Destes, A-616, A-604, e A-617 pertencem a *Acremonium* sp., obtidos de lesões de pinta-preta do mamoeiro. Os demais isolados são de *Hansfordia pulvinata*. Isolados desta espécie e gênero já foram relatados em outros patossistemas apresentando antibiose e componentes antifúngicos. Tirilly et al. (1983) investigando o mecanismo de hiperparasitismo de *H. pulvinata* sobre *Cladosporium fulvum* Cook em folhas de tomateiro comprovaram *in vitro* a presença de um composto sesquiterpene, (13-desoxyphomenome), com ação fungistática.

O gênero *Acremonium* também produz importantes metabólitos secundários ativos. Estas substâncias são muito importantes, por apresentarem, dentre outras atividades biológicas relevantes, ação bactericida, fitotóxica e anticancerígena (Assante et al., 2005). Entretanto, o uso do gênero *Acremonium* como agente de controle biológico deve ser encarado com cautela, uma vez que há relatos de espécie deste gênero como agentes patogênicos oportunistas em pessoas imunocomprometidas, assim como doentes com HIV, no caso de leucemia, após trauma ou queimaduras, transplante de órgãos e outras cirurgias (Weisenborn 2010). Todavia, a taxonomia destas espécies, inclusive as micoparasitas de fungos fitopatogênicos, é controversa e merece um amplo estudo. Ainda, faltam estudos contundentes demonstrando a eficiência de biocontrole de doenças de parte aérea em plantas por espécies de *Acremonium*. No Brasil, por exemplo, existem poucos trabalhos relatando eficiência técnica da aplicação de *Acremonium* spp. no biocontrole de doenças em plantas, a exemplo, na cultura do coqueiro, no controle da lixa-grande e lixa-pequena (Warwick, 2001 e 2007, Sudo, 1989). Mas, até o momento, não há registro de produto formulado à base de hiperparasitas pertencentes à *Acremonium* spp.

O teste de componente não volátil conduzido neste experimento demonstra que um dos modos de ação exercido pelo antagonista é a antibiose - interação entre organismos, na qual um ou mais metabólitos produzidos pelo antagonista têm efeito negativo sobre o fitopatógeno, resultando na inibição do crescimento e/ou germinação (Bettiol, 1991). No entanto, pode-se mencionar que um fungo

pode apresentar mais de um mecanismo de ação antagônica, como no caso de *Trichoderma*, um fungo que é um agente de controle biológico que pode agir pela competição por espaço e nutrientes, modificação das condições ambientais, produção de antibióticos e inativação das enzimas do patógeno, ou mediante o micoparasitismo direto (Benitez et al, 2004) e, ainda, indução de resistência na planta hospedeira (Harman et al 2004). Estudos adicionais deverão comprovar outras formas de ação de fungos micoparasitas em lesões foliares da pinta-preta do mamoeiro.



Tabela 5. Médias da porcentagem de germinação de conídios de *A. caricae* submetidos à ação de componentes não voláteis de 24 isolados hiperparasitas da pinta-preta no mamoeiro.

Isolado	(% germinação)			
	Primeiro Ensaio		Segundo Ensaio	
A-598	22.16	C	34.06	C
H- 608	2.21	F	3.94	G
A-616	0.18	F	0.05	G
A-609	8.99	E	10.15	F
A-619	17.67	D	26.01	D
A-618	25.53	C	38.16	B
S-599	28.37	C	39.11	B
H-600	0.00	F	0.00	G
A-601	19.09	D	30.07	D
H-610	9.78	E	20.72	E
H-611	11.16	E	10.13	F
A-602	20.07	D	41.18	B
H-612	2.11	F	2.90	G
A-603	6.20	E	21.72	E
L-620	27.75	C	34.64	C
H-613	22.82	C	13.30	F
A-604	10.01	E	15.81	F
A-621	25.87	C	20.28	E
H-614	16.80	D	19.16	E
H-623	2.30	F	1.53	G
L-622	25.89	C	32.06	C
A-617	0.00	F	0.00	G
H-605	11.56	E	9.92	F
H-615	23.57	C	14.05	F
Controle negativo ( <i>cladosporium</i> sp)	43.02	A	49.23	A
Controle sem fungo	34.15	B	40.83	B
Média	16,05		20,35	
CV (%)	23,82		19,74	

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (0,05).

#### 4.4. Microscopia ótica da interação entre *A. caricae* e isolados hiperparasitas

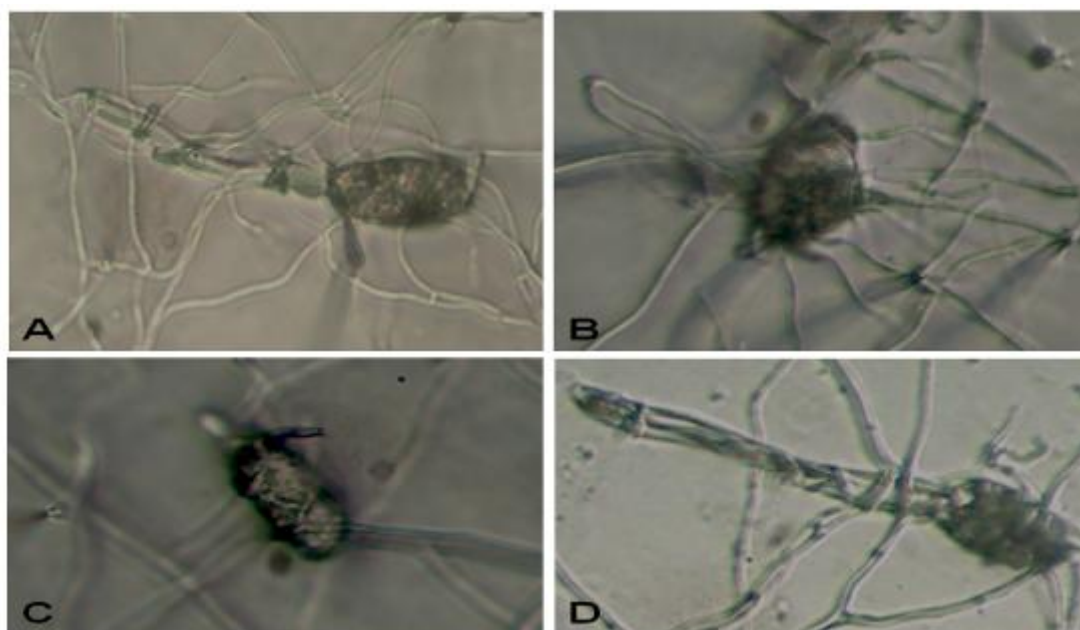
Após 24 h de incubação, em meio de ágar, ambos, fitopatógeno (*A. caricae*) e hiperparasitas, apresentaram germinação satisfatória. Inicialmente, os antagonistas não apresentaram aparentemente crescimento de hifas direcionado aos conídios de *A. caricae*. Porém, após 48 h, observou-se entrelaçamento das hifas do hiperparasitas ao redor dos tubos germinativos dos conídios de *A. caricae*. Às 72 h, os isolados obtidos de ferrugens, de *Lecanicillium* (L-620 e L-622), e de *Simplicillium* (S-599) e *Acremonium* sp (à exceção dos isolados A-609 e A-621) penetraram nas paredes do tubo germinativo dos conídios do patógeno (Figura 10 A, B e D).

Observaram-se sinais de degradação de parede celular e os conídios invadidos entraram em colapso. Já os isolados de *Hansfordia* diferiram na frequência e mais claramente diferiram quanto à intensidade de entrelaçar os conídios de *A. caricae*, mas, para estes isolados não se observou invasão das hifas nos conídios e nos tubos germinativos do patógeno (Figura 10 C). O observado para *Hansfordia* no presente estudo está em acordo com o relatado por Peresse & Le Picard (1980). Estes últimos autores observaram que *H pulvinata* entrelaça suas hifas nos conídios de seus hospedeiros, matando-os. Tirilly et al. (1991) afirmam que em continuidade ao processo de micoparasitismo direto, há também ação de metabólito fungistático sesquiterpeno, deoxyphomenone (Tirilly et al., 1991).

*Lecanicillium* e *Simplicillium* pertencem à mesma família, *Cordyciptaceae*, são micoparasitas e entomopatogênicos. *Simplicillium lanosoniveum* é um hiperparasita e pode ser encontrado em lavouras de soja, onde são utilizados como micofungicidas sobre urédias de *Phakopsora pachyrhizi* (Ward, 2011). O fungo *Lecanicillium* (sin. *Verticillium lecanii*) tem sido estudado com agente de controle biológico da ferrugem do cafeeiro (Shaw, 1988; Carrion, 2002). A ação entomopatogênica e micoparasítica de *Lecanicillium lecanii* foi confirmada por Jackson et al. (2012), em estudo com *Hemileia vastatrix*, o qual observaram o papel regulatório desse antagonista na ocorrência da doença.

Para ocorrência de micoparasitismo direto, a primeira barreira a ser quebrada no hospedeiro é a parede celular fúngica, que é constituída primariamente por quitina, proteínas e outros compostos. O envolvimento de

enzimas hidrolíticas com capacidade de degradar a parede do fungo hospedeiro deve ser uma das primeiras características requeridas para o micoparasitismo (Chet, & Inbar, 1994; Lima et al., 2000). Sendo assim, pode existir uma correlação entre o potencial antagônico e a secreção enzimática pelo antagonista, refletindo na eficiência de biocontrole. Todavia, nos estudos de microscopia ótica, a lise da parede não é facilmente visualizada, devido à extensa colonização pelo fungo hiperparasita, impedir a resolução da parede celular do fungo sob ataque (Figura 10). O que se observou, nos casos de hiperparasitismo acentuado, para isolados de *Acremonium*, *Lecanicillium* e *Simplicillium* foi uma extensa colonização ao redor dos esporos e tubos germinativos pelas hifas dos hiperparasitas.



**Figura 10.** Entrelaçamentos das hifas dos hiperparasitas ao redor de conídios e tubos germinativos de *A. caricae*, sob microscópio óptico, após 72 h de incubação: (A) *Simplicillium* sp. (isolado S-599); (B) *Acremonium* sp. (isolado A-616); (C) *Hansfordia* sp. (isolado H-613); (D) *Lecanicillium* sp. (isolado L-620)

Neste ensaio não foi observada interação dos isolados de *Acremonium* A-609 e A-621 com conídios do *A. caricae*. Vale ressaltar que estes isolados obtidos de *A. caricae* e *Pseudocercospora*, foram alguns dos que mais se diferenciaram morfológicamente dos demais isolados de *Acremonium*. Para Lorito (1998), o micoparasitismo parece ser o mecanismo mais eficiente de antagonismo no controle biológico natural, pois, os hiperparasitas, por viverem às custas do patógeno, estão sujeitos às mesmas variações ambientais e dependem das mesmas condições do organismo parasitado. No entanto, outros mecanismos podem estar envolvidos na ação destes isolados sobre *A. caricae*, conforme já comentado. Ademais, as condições de cultivo *in vitro* utilizadas na condução deste ensaio, podem ter influenciado a interação destes hiperparasitas com o fungo-teste utilizado. Novos estudos, utilizando técnicas de microscopia eletrônica de varredura, deverão ser conduzidos a fim de elucidar o envolvimento destes isolados no hiperparasitismo de *A. caricae*.

#### **4.5. Hiperparasitismo *in vivo* em condições de telado**

Com relação às avaliações *in vivo* da inoculação de hiperparasitas sobre folhas de mamoeiro infectadas por *A. caricae*, houve efeito significativo de todas as fontes de variação testadas: isolado, período de inoculação e interação entre estes dois fatores.

Observou-se que, por ocasião da primeira avaliação (julho de 2013), o número de lesões foliares de tinta-preta foi menor que o observado na segunda avaliação (novembro de 2013). Parte desta diferença pode ser explicada pelo fato da umidade do ar, bem com a duração diária de molhamento foliar no segundo período, terem sido superiores que as do primeiro período de avaliação. No primeiro período de avaliação, as temperaturas no interior do telado variaram de 17 a 32 °C, com umidade de 57 a 78%; enquanto que no segundo período, a temperatura variou de 20 a 30 °C e a umidade de 64 a 98%. Ademais, antes da aplicação dos hiperparasitas, as plantas estavam sob as mesmas condições de incubação, em telado coberto e sob sombrite. Assim, as condições ambientais afetaram tanto a manifestação dos sintomas da doença, quanto a eficiência dos hiperparasitas inoculados. Todavia, ao se analisar as médias do número de

lesões de pinta-preta (com ou sem sinais de hiperparasitismo), nas duas épocas de inoculação, não houve diferença entre tratamentos, ou seja, em ambas as épocas de avaliação os isolados hiperparasitas (tratamentos) foram aplicados em plantas com quantidades equivalentes de lesões de pinta-preta nas folhas (Tabela 6). O segundo ensaio foi o mais favorável, tanto para o patógeno (*A. caricae*) quanto para os hiperparasitas, uma vez que houve maior quantidade de lesões produzidas pelo patógeno e hiperparasitadas (Tabela 7). Ao analisar as condições ambientais ocorridas nesta época, observa-se que a temperatura variou de 20 a 30°C e umidade de 64 a 98%, o que favoreceu tanto o patógeno quanto o hiperparasita. Tais resultados corroboram observações de campo obtidas por Suzuki et al. (2007), os quais afirmam que para a pinta-preta as condições favoráveis ao desenvolvimento de epidemias no campo envolvem temperaturas variando de 25 °C a 30 °C e umidade relativa mais elevada, variando de 80 % a 100 %, no Norte do Estado do Espírito santo, Brasil.

Considerando a incidência de lesões de pinta-preta hiperparasitadas, observou-se, no primeiro ensaio, que os isolados A-619, A-616, A-602, H-610, H-623, H-600, H-614, H-612, H-613, H-608, H-611, H-605 e H-615 apresentaram médias mais elevadas de incidência de lesões de pinta-preta hiperparasitadas. No segundo ensaio, os isolados A-609, A-603, A-602, S-599, H-623, H-614, H-612, H-613, H-608, H-611, H-605 e H-615 apresentaram as maiores médias de incidência de lesões hiperparasitadas. Foi possível assim, identificar isolados potencialmente promissores para o controle biológico da pinta-preta, notadamente os isolados de *H. pulvinata* (H-614, H-608, H-611 e H-615), os quais se destacaram nas duas épocas de inoculação (Tabela 6). Estes isolados foram obtidos em diferentes regiões do estado do Rio de Janeiro e Espírito Santo. Há, portanto, possibilidade de variabilidade entre os mesmos em função de outras épocas do ano, não avaliadas neste estudo, haja vista, que as condições climáticas de cada região de origem dos hiperparasitas são bastante distintas.

Quanto aos isolados de *Acremonium* ssp., embora estes não se destacaram como os isolados de *H. pulvinata*, apresentaram potencial de biocontrole. Alguns isolados de *Acremonium* spp. produzem clamidósporos, o que lhes oferece maior vantagem adaptativa e competitiva no ambiente, o que pode viabilizar sua manutenção e multiplicação massal para fins comerciais, bem como sua sobrevivência sob condições de campo, a exemplo de outros fungos agentes

de biocontrole já consagrados. Dentre espécies fúngicas de sucesso no biocontrole e capazes de produzir clamidósporos, pode-se citar *Lewia chlamidosporiformans* B.S. Vieira & R.W. Barreto, utilizado como micoherbicida em *Euphorbia heterophylla* (Vieira e Barreto, 2010); *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & Gams utilizadas em programas de controle biológico do nematoide das galhas, *Meloidogyne javanica* (Dallemele-Giaretta et al, 2008, 2012) e *Trichoderma* spp. ,que são utilizadas na promoção de crescimento vegetal e no controle de diversos fitopatógenos principalmente do solo (Melo,1998) dentre outros.

Quanto ao número de dias decorridos entre a inoculação e o aparecimento de sinais de hiperparasitismo, não foi possível conduzir análise estatística, pois houve isolados que não manifestaram sinais de hiperparasitismos na ocasião em que se procederam as avaliações. De forma geral, observou-se que na primeira inoculação, os sinais apareceram entre 8 e 11 d após a inoculação (d.a.i.), enquanto que na segunda estes apareceram no intervalo de 6 a 9 d. (Tabela 7).

No Brasil, *Hansfordia pulvinata* (= *Dicyma pulvinata*) já foi relatada na lixadeira e pequena do coqueiro por Warnick (2007). A mesma autora avaliou os índices de parasitismo pelos fungos, relatando um controle parcial da doença. Mas, o estudo de maior abrangência sobre *H. pulvinata* foi como hiperparasita em lesões do mal-das-folhas da seringueira, causada por *Microcyclus ulei*. Diversos trabalhos foram conduzidos comprovando o potencial de *H. pulvinata* (= *D. pulvinata*) no biocontrole de *M. ulei*, por meio do hiperparasitismo (Junqueira et al., 1989; Junqueira & Gasparotto, 1991; Rodrigues, 2002; Tavares et al., 2004). Segundo Junqueira & Gasparotto (1991), *D. pulvinata* coloniza as lesões estromáticas, destruindo as estruturas sexuais do patógeno, reduzindo o desfolhamento das plantas e a taxa de inóculo em reinfecções. Além disso, o gênero tem despertado interesse, também, no isolamento de novos compostos terapêuticos para usos medicinais (Vázquez et al., 2003).

Tabela 6. Médias do número de lesões da pinta-preta, causadas por *Asperisporium caricae*, em folhas de mamoeiro, e incidência de lesões com sinais de hiperparasitismo, em duas épocas de inoculação (Julho e Novembro de 2013), em viveiro telado, sob sombrite.

ISOLADOS	Número total de lesões de pinta-preta		Incidência de lesões de pinta-preta hiperparasitada (%)	
	Primeira Inoculação	Segunda Inoculação	Primeira Inoculação	Segunda Inoculação
A-598	15 A*	89 A	0,00 C	31,69 C
A-609	17 A	57 A	0,00 C	42,59 B
A-604	29 A	103 A	0,00 C	12,07 D
A-601	14 A	80 A	0,00 C	22,07 C
A-619	74 A	81 A	60,18 A	31,90 C
A-618	24 A	86 A	0,00 C	9,64 D
A-616	45 A	118 A	36,37 B	17,77 D
A-603	22 A	95 A	0,00 C	51,22 B
A-602	34 A	88 A	35,21 B	51,91 B
A-621	18 A	87 A	0,00 C	19,07 D
S-599	31 A	115 A	0,00 C	45,84 B
L-622	25 A	82 A	0,00 C	9,52 D
L-620	20 A	99 A	0,00 C	11,17 D
A-617	17 A	101 A	0,00 C	17,26 D
H-610	25 A	74 A	32,28 B	31,50 C
H-623	53 A	90 A	62,55 A	46,59 B
H-600	52 A	114 A	56,01 A	11,93 D
H-614	19 A	120 A	54,09 A	60,39 A
H-612	43 A	110 A	51,61 A	49,22 B
H-613	37 A	110 A	50,68 A	67,52 A
H-608	51 A	155 A	53,66 A	43,42 B
H-611	55 A	58 A	60,28 A	75,46 A
H-605	23 A	149 A	41,82 B	36,24 B
H-615	66 A	88 A	49,76 A	70,25 A
TEST.	47 A	122 A	0,00 C	0,00 D
MÉDIA	34,24	98,84	27,78	34,65

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (0,05).

Tabela 7. Número de dias decorridos da inoculação de isolados de fungos hiperparasitas em lesões da pinta-preta do mamoeiro, causadas por *Asperisporium caricae*, até o aparecimento dos sinais de hiperparasitismo, em duas épocas de aplicação (julho e novembro de 2013), sob condições de telado sob sombrite.

ISOLADOS	Dias para aparecer sinais de hiperparasitas	
	Época 1	Época 2
A-598	Ns	8
A-609	Ns	8
A-604	Ns	9
A-601	Ns	7
A-619	11	7
A-618	Ns	7
A-616	11	6
A-603	Ns	7
A-602	10	7
A-621	Ns	7
S-599	Ns	6
L-622	Ns	8
L-620	Ns	8
A-617	Ns	9
H-610	8	6
H-623	9	6
H-600	8	6
H-614	8	6
H-612	8	6
H-613	8	6
H-608	8	6
H-611	8	6
H-605	8	6
H-615	8	6
TEST.	Ns	Ns

ns – não apresentou sinais de hiperparasitismo.



Analogamente, o gênero *Acremonium* apresenta potencial para uso na agricultura. Diferentes trabalhos relatam o potencial de biocontrole de doenças e pragas em plantas de *Acremonium* spp. endófitas (Poling, et al., 2008). Segundo Azevedo et al. (2000), este gênero pode ser utilizado no controle de insetos nocivos. Koga et al. (1997) estudaram o efeito em *Festuca arundinacea* e *Lolium perenne*, associada à *Acremonium* sp. endofítico. Estes autores conseguiram, transmitir via semente, a capacidade de controlar larvas da praga *Parapediasia teterrella*. O fungo *Acremonium implicatum* foi considerado potente protetor em *Brachiaria* spp. e aumentou a resistência de gramíneas tropicais contra ataques de insetos e patógenos (Kelemu et al., 2002). *Acremonium zeae* tem sido caracterizada como espécie endofítica que confere proteção em milho contra outros fungos e exibe atividade antifúngica (Wicklow, et al., 2005; Poling, 2008). Trabalhos demonstram o micoparasitismo de *A. strictum* em *Botrytis cinerea* (Choi, et al 2008) e *A. furcatum* em *Aspergillus* spp. (Srivastava et al 1981).

No Brasil, o potencial dos fungos hiperparasitas *A. alternatum* e *A. persicinum* como hiperparasitas tem sido avaliado para o controle da lixa-pequena como da lixa-grande (Kimati et al, 1997, Sudo 1989) Warwick (2001) avaliou a colonização de estromas de *Sphaerodothis acrocomiae*, agente causal da lixa-grande no coqueiro por *A. persicinum* e concluiu que a concentração de  $10^7$  conídios por ml foi a que proporcionou maior colonização no ensaio de campo e a aplicação de hiperparasitas com melhores resultados foi na estação chuvosa e quando realizada no período da tarde.

Para Lumsden & Locke, (1989) não basta apenas que o antagonista seja um potente agente de controle em condições de laboratório. É preciso também conhecer os fatores ecológicos que podem afetar a permanência e o desempenho dos antagonistas, para se adotar práticas de manejo adequadas visando favorecer o controle biológico da doença no ambiente. Com base nisso, estudos adicionais, sob condições de campo, deverão avaliar não somente a ação dos hiperparasitas sobre a doença e sua presença nas lesões de pinta-preta, mas como também deverão determinar as condições que propiciam ao hiperparasitismo e aumentam a eficiência do controle da pinta-preta do mamoeiro. Ademais, formulações e formas de aplicação dos agentes de biocontrole carecem de estudo visando à aplicação na cultura do mamoeiro e em diversas outras culturas no mundo.

## 5. CONCLUSÃO GERAL

Pelas análises morfométricas e culturais observou-se a ocorrência de ao menos dois gêneros hiperparasitas de lesões da pinta-preta do mamoeiro, causadas por *Asperisporium caricae*: *Hansfordia pulvinata*, que apresentou menor variação entre os isolados avaliados e *Acremonium ssp*, que apresentou maior variabilidade entre os isolados. Há indícios de ocorrência de mais de uma espécie de *Acremonium* associada ao hiperparasitismo de lesões de *A. caricae*.

A variabilidade dentre os isolados de fungos hiperparasitas estudados também foi percebida quando se estimou a temperatura ótima para o crescimento micelial e a esporulação. Observou-se para os isolados de *Hansfordia pulvinata*, que temperaturas amenas (em torno de 21 °C) favorecem tanto o crescimento micelial quanto a esporulação. Para o *Acremonium spp.*, o ótimo de crescimento micelial varia entre 20 °C e 25 °C. Para os isolados de *Acremonium sp.*, A-609 e A-621, a temperatura ótima para crescimento micelial foi de 25 °C e, para os demais isolados deste gênero, esta foi de 20 °C a 22 °C.

Não se constatou entre os isolados estudados, evidência de produção de compostos voláteis, com ação inibidora da germinação de conídios de *Asperisporium caricae*, nas condições experimentais utilizadas. Por outro lado, há evidências de antibiose por compostos não voláteis. Os isolados H-608, A-616, H-600, H-611, H-612, A-604, H-623 e A-617 foram os que mais reduziram a germinação de conídios de *A. caricae*.

Observou-se que os isolados de *Lecanicillium*, *Simplicillium* e *Acremonium* spp (à exceção dos isolados A-609 e A-621 de *Acremonium*) entrelaçam suas hifas e invadem o tubo germinativo de *A. caricae*. Já os isolados de *Hansfordia pulvinata* diferiam quanto à capacidade de entrelaçar hifas nos conídios e tubos germinativos de *A. caricae* e estes não foram capazes de invadir as hifas e o tubo germinativo do patógeno, nas condições experimentais.

No teste de aplicação dos hiperparasitas em lesões de pinta-preta do mamoeiro em mudas sob condições de telado sob sombrite, observou-se que todos os isolados testados dos quatro gêneros *Hansfordia*, *Acremonium*, *Lecanicillium* e *Simplicillium*, foram capazes de hiperparasitar lesões de pinta-preta, com destaque para os isolados H-614, H-608, H-611, H-615, pertencentes a *Hansfordia pulvinata*, os quais foram os mais eficientes. Portanto, há possibilidade de se utilizar estes isolados no controle biológico da pinta-preta na cultura do mamoeiro. No entanto, deve-se atentar para o efeito das condições ambientais afetando o hiperparasitismo, notadamente a temperatura, uma vez que há evidência de que esta possa atrasar ou mesmo impedir a colonização de lesões de pinta-preta pelo fungo antagonista.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, P.B. (1990) The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*. 28:59-72.
- Adikaram, N.K.B. & Wijepala, M. (1995) *Asperisporium* black spot in *Carica papaya*: A new disease in Sri Lanka. *Journal of the National Science Council of Sri Lanka*. 23 (4), 213-219.
- Agrianual 2011: Anuário da agricultura brasileira: Mamão. São Paulo: FNP, 2011. p. 325-332.
- Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K., Sussman, (1973) A.S. *The Fungi An Advanced treatise*, v. IVB. Academic Press, New York, USA, 56p.
- Alderman, S.C., Rao, S. & Martin, R. (2010) First report of *Dicyma pulvinata* on *Epichloë typhina* and its potential for *E. typhina* control. *Plant Health Progress*.
- Almeida, W.K.D.S. (2009) Antagonismo de *Trichoderma viride* sobre fungos fitopatogênicos, *Colletotrichum* spp, *Cercospora musae* e *Asperisporium caricae* em fruteiras tropicais. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 4, (2): 1374-1378.
- Assante, G. et al., *Acremines* A-F, (2005) Novel secondary metabolites produced by a strain of an endophytic *Acremonium*, isolated from sporangiophores of *Plasmopara viticola* in grapevine leaves. *Tetrahedron*, 61, (32):7686-7692.
- Azevedo, L.J.; Araujo, L.W. & Walter Junior, M. (2000) Importância dos Microorganismo endofítico no controle de insetos. In Melo, I.S. & Azevedo, J.L. *Controle biológico*. Jaquariúna: Embrapa Meio Ambiente, 3:57-94.

- Barnett, H.L. & Hunter, B.B. Illustrated Genera of Imperfect Fungi,. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, USA, 3 :241-1972.
- Benítez, T.; Rincón, A.M. & Limón, M.C. (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7:249-260.
- Bettiol, W. (1991) Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA,. 226p.
- Bettiol, W. & Morandi, M.A.B. (2009) Biocontrole de doenças de plantas: Uso e Perspectiva. Jaquariuna: Embrapa Meio Ambiente, 341p.
- Carmichael, J.K., Kendrick, W.B., Connors, I.L.; Sigler, L. (1980) Genera of Hyphomycetes. The university of Alberta Press, Alberta, Canada, 386p.
- Carrion, G.; Rico-Gray, V. (2002) Mycoparasites on the coffee rust in Mexico. *Fungal Diversity*, Chiang Mai. 11:49-60.
- Castaldi, R.; Nicoli, G. (1993). *Verticillium lecanii*. *Informatore Fitopatologico*, Bologna, 43, (10):20-24.
- Castellani, A.(1939) The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 42: 225-226.
- Charles, V.K. (1940) An entomogenous fungus on spider mites on water hyacinth. *Mycologia*, .32, (4):537-540.
- Chet, I. & Inbar, J. (1994) Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 48: 37-43.
- Chiacchio, F.P.B. (1985) Doenças em fruteiras: mamão. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 11, (123):27-30.
- Cho, K.Y.; Choi, G.J.; Kim, H.T.; Kim, J.C.; Jang, K.S. & Choi, Y.H. (1999) Novel *Acremonium strictum* strain, a hyperparasite of *Botrytis cinerea*, and method for the biological control of gray mold by using same. *Korea Patent*, 99-246p.
- Choi, G. Kim, J.C., Jang K. S. Cho K. Y. , Kim H. T. (2008) Mycoparasitism of *Acremonium strictum* BCP on *Botrytis cinerea*, the Gray J. *Microbiol. Biotechnol.* 18(1):167–170
- Cook, R.J. & Baker, K.F. (1983) The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS Press, St. Paul, 539p.

- Crous, P.W. & Braun, U. (2003) *Mycosphaerella* and its anamorphs: . Names published in *Cercospora* and *Passalora*. CBS Biodiversity., 571p.
- Cruz, J.L. Certificação em produção integrada de mamão: Informações básicas. 2008. Disponível em: [http://www.cnpmf.embrapa.br/pic\\_bahia/certificacao\\_mamao.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/pic_bahia/certificacao_mamao.pdf). Acesso em: 22 de janeiro de 2014.
- Cruz, C.D. (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 35:271-276.
- Dallemole-Giaretta, R.; Freitas, L. G.; Ferraz, S.; Neves, W. S.; Lopes, E. A.; Coutinho, M. M. (2008) Efeito da concentração de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, 32, (4):327-332.
- Dallemole-Giaretta, R.; Freitas, L. G.; Lopes, E. A.; Pereira, O. L.; Zooca, R. J. F.; Ferraz, S. (2012) Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. *Crop Protection*, Amsterdam, 42, (1): 102-107.
- Dantas, S.A.F.; Oliveira, S.M.A.; Bezerra N, E.; Coelho, R.S.B.; Silva, R.L.X. da. (2004) Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. *Summa Phytopathologica*, 30: 314-319.
- De Cal, A.; Sagasta, E.M. & Melgarejo, P. (1990) Biological control of peach twig blight (*Monilinia laxa*) with *Penicillium frequentans*. *Plant Pathology*, London, 39, (4): 612-618.
- Deighton, F.C. (1972) Synonymy of *Hansfordia pulvinata* (Berk. & Curt.) Hughes. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 59:531-536.
- Delgado, G. (2011) Nicaraguan fungi: a checklist of hyphomycetes, *Mycotaxon*, 5p.
- Delmadi, L. C.; Cassetari N., D.; Freitas R., V. (2009) Avaliação do potencial de uso do hiperparasita *Dicyma pulvinata* (Berk. & M. A Curtis) no controle biológico do mal-das-folhas [*Microcyclus ulei* (Henn.) Arx] de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Wild. Ex A. Juss.) Muell. arg.] em São José do Rio Claro, *MT Ciência Florestal*, 19, (2): 183-193.
- Dennis, R. W. G. (1978) *British Ascomycetes*. John Cramer, German, 585 p.

- Dhingra, O.D. & Sinclair, J.B (1995). Basic Plant Pathology Methods. 2. ed. Boca Rota: CRC Press Inc, 434p.
- Dianese, A. C.; Blum, L. E. B.; Dutra, J. B.; Lopes, L. F.; Sena, M. C.; Freitas, L. F. & Yamanishi, O. K. (2007) Reação de genótipos de mamoeiro à varíola e à podridão-do-pé. *Fitopatologia Brasileira*, Lavras, 32, (5):419-423.
- Domsch, K.H.; Gams, W. & Anderson, T-H. (2007) Compendium of soil fungi. IHW-Verl., Eching, Germany. 672p.
- Elder, R.J.; Macleod, W.N.B.; Bell, K.L.; Tyas, J.A. & Gillespie, R.L. (2000) Growth, yield and phenology of hybrid papayas (*Carica papaya* L.) as influenced by method of water application. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 40:739-746.
- Ellis, M.B. (1980) Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 608p.
- Ellis, M.B. (1971) Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Micological Institute. Kew Surrey, England., 273-274p.
- Ellis, M.B. & Holliday, P. (1972) *Asperisporium caricae*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 347:1– 2.
- FAO 2011. FAOSTAT. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acessado em 15 de junho de 2011.
- Furtado, E.L & Trindade, D.R. (2005) Doenças da seringueira (*Havea*). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamim Filho, A. & Camargo, L.E.A. (Ed) Manual de Fitopatologia - Doenças de Plantas cultivadas. São Paulo. Agronômica Ceres. 559-567.
- Gams, W. (1971) Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes). 1–262. G. Fischer, Stuttgart., 262p.
- Gams, W. (1975) *Cephalosporium*-like Hyphomycetes: some tropical species. *Transactions of the British Mycological Society*, 64, (3):389-404.
- Glenn, A.E.; Bacon, C.W.; Price, R. & Hanlin, R.T. (1996) Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia* .88:369–383,.
- Grajek, W. Sporogenesis of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in solid-state cultures. *Folia Microbiologica*, Prague, v.39, n.1, p.29-32, 1994

- Grigoletti Junior, A.; Santos, A.F. dos & Auer, C.G. (2000) Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. *Floresta*, 30:155-165.
- González, M.; García, M.; Pérez, M.L. (1985) Nuevos reportes de hongos en cultivos agrícolas de Nicaragua. *Ciencia de la agricultura*. 25:126-129.
- Harman, G.E.; Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. (2004) *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*. 2:43-56.
- Hawksworth, D.L.; Kirk, P.M.; Sutton, B.C.; Pegler, D.N (1995). “Ainsworth & Bisby`s” - Dictionary of the Fungi, ed. 7. International Mycological Institute, CAB International, University Press, Cambridge, UK, 616p.
- INDEX FUNGORUM. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>>, acesso 02 de janeiro de 2014
- Jackson, D.; Skillman, J.; Vandermeer, J (2012). Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. *Biological Control*, Orlando, 61: 89-97.
- Junqueira, N.T.V. & Gasparotto, L. (1991) Controle biológico de fungos estromáticos causadores de doenças foliares em seringueira. In: Bettiol, W. (Org.). Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna, SP: Embrapa-CNPDA,. 1:307-331.
- Kelemu, S.; Dongyi, H.; Guixiu, H. & Takayama, Y. A. (2002) PCR-based assay for specific detection of *Acremonium implicatum*, an endophytic fungus in species of *Brachiaria*. *Phytopathology*, 92:40-41.
- Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. & Rezende, J.A.M (1997). Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas cultivadas, Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo .2: 73-75.
- Kirk P M, Cannon P F, David J C, Stalpers J A (2001) Dictionary of fungi. CABI Publishing: Wallingford. 655p.
- Koga, H.; Hiral, Y.; Kanda, K.; Tsukiboshi, T. & Uematsu, T. (1997) Successive transmission of resistance to bluegrass webworm to perennial ryegrass and tall



- fescue plants by artificial inoculation with *Acremonium* endophytes. Japan Agricultural Research Quarterly, 31:109-115.
- Krishna, A. & Singh, R.A. (1979) *Hansfordia pulvinata* mycoparasitic on *Cercosora* species causing "Tikka disease" of groundnut. Indian Phytopathology 32:318-320.
- Larena, I. & Melgarejo, P. (1996) Biological control of *Monilinia laxa* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* a lytic enzyme-producing *Penicillium purpurogenum*. Biological control, Orlando, 6:361-367.
- Liberato, J.R. & Zambolim, L. (2002) Controle das doenças causadas por fungos, bacterias e fitonematóides em mamoeiro. In: Zambolim, L., Vale, F.X.R., Monteiro, A.J.A. & Costa H (Eds.) Controle de doenças de plantas fruteiras. v.2. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa.1023-1169p.
- Liberato, J.R., McTaggart, A.R. & Shivas, R.G. (2007) *Asperisporium* Black Spot of Papaya (*Asperisporium caricae*) Pest and Diseases Image Library. Updated on 2/20/2007 2:30:45 PM. Available online: <http://www.padil.gov.au>.
- Liberato, J.R.; Tatagiba, J.S.; Zambolim, L. & Costa, H. (1999) Fitotoxicidade de Fungicidas Triazois ao Mamoeiro. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 24:112-113.
- Lima, L. H. C.; De Marco, J. L.; Felix, C. R. (2000) Enzimas Hidrolíticas Envolvidas no Controle Biológico por Micoparasitismo. In: Controle Biológico. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP..2: 263-304
- Lorito, M. (1998) Chitinolytic enzymes and their genes. In : Trichoderma and Gliocladium – enzymes, biological control and commercial applications ( Harmen, G.E.; Kubicek, C.P., Eds). London, Taylor & Francis, 2:73-99.
- Luna, J.V.U. (1986) Variedades de mamoeiro. Informe Agropecuário. Epamig, Belo Horizonte, MG, 12, (134):14-18
- Lumsden, R.D. & Locke, J.C. (1989) Biological control of damping-off caused by *Phytophthora ultimum* and *Rizoctonia solani* in soilless mix. Phytopathology, 79:361-366.
- Maublan, A. (1913) Uma moléstia do mamoeiro (*Carica papaya* L.). Boletim do Ministério da Agricultura Indústria e Comércio. Rio de Janeiro, v.2, (1):126-130.

- Melo, I.S. (1998) - Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo, I.S. e Azevedo, J.L. (Ed.) - Controle Biológico, v.1. Jaguariúna, Embrapa, 17–60 p.
- Mello, S.C.M.; Santos, M.F.; Gangana, F. & Kossoski, R. (2003) Isolados de *Dicyma pulvinta* obtidos em um levantamento realizado em seringais brasileiros. Brasília. Embrapa-CENARGEN...1-4 p.
- Mitchell, J. K., and Taber, R. A. (1986). Factors affecting the biological control of *Cercosporidium* leaf spot of peanuts by *Dicyma pulvinata*. *Phytopathology*. 76: 990-994.
- Mitchell, J.K.; Smith, D.H. & Taber, R.A. (1987) Potential for biological control of *Cercosporidium personatum* leaf spot of peanuts by *Dicyma pulvinata*. *Canadian Journal of Botany*, 65:2263-2269.
- Morandi, M.A.B.; Maffia L.A.; Mizubuti, E.S.G.; Alfenas, A.C. & Barbosa, J.G (2003) Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: A valuable component in botrytis blight management in commercial greenhouses. *Biological Control*, 26:311-317.
- Morandi, M.A.B.; Mattos, L.P.V.; Santos, R. & Bonugli R.C. (2007) Influence of application time on the establishment survival, and ability of *Clonostachys rosea* to suppress *Botrytis cinerea* sporulation on rose debris. *Crop Protection*, 27:77-83.
- Moreira, L.M.; May-De-Mio, L.L. & Valdebenito-Sanhueza, R.M. (2008). Fungos antagonistas e efeito de produtos químicos no controle da podridão parda em pomar de pessegueiro. *Summa Phytopathologica*, 34, (3):272-276.
- Nascimento, L.C. do., Nery A.R., Rodrigues L.N., (2008) Controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamoeiro, utilizando extratos vegetais, indutores de resistência e fungicida. *Acta Scientiarum Agronomy*, 30, (3): 313-319
- Nishijima, W. & Zhu, I.J. (2004) Developing a broad disease resistance in *Carica papaya* against fungal diseases. CTAHR/HARC Project Proposal. 30 p.
- Nishijima, W.T., Dickman, M.B., Ko, W.H. & Ooka, J.J. (1994) Papaya diseases caused by fungi. In: Ploetz, R.C., Zentmyer, G.A., Nishijima, W.T., Rohrbach,

- K.G. & Ohr, H.D. (Eds.) Compendium of tropical fruit diseases. St. Paul. APS Press.58-64 p.
- Nobre, S.A.M.; Maffia, L.A.; Mizubuti, E.S.G.; Cota, L.V. & Dias, A.P.S. (2005) Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 34:132-143.
- Oliveira, A. A. R. & Santos Filho, H. P (2000). Doenças. In: Ritzinger, C. H. S. P.; Souza, J. Da S. (Org.) Mamão: fitossanidade. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 37-46p.
- Oliveira, A. A. R (2005). Developing disease resistance in *Carica papaya* L. against fungal diseases. EMBRAPA/CNPMPF. Post-doctoral Report.47p.
- Park, Mi-Jeong; Han, Jae-Gu; Kim, Ju-Hee; Shin, H-D (2010). *Hansfordia pulvinata* hyperparasiting *Passalora fulva* on organic tomato plants. *The Plant Pathology Journal*. 26, (4):425-425.
- Parra, J.R.P., Botelho, P.S.M., Corrêa-Ferreira, B.S & Bento, J.M. (2002) Controle biológico: terminologia. In: Parra, J.R.P., Botelho, P.S.M., Corrêa-Ferreira, B.S & Bento, J.M (Ed) Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo: Manole,.1-16p
- Paulus, G.; Müller, A.M. & Barcellos, L.A.R (2000). Agroecologia aplicada: práticas e métodos para uma agricultura de base ecológica. Porto Alegre: EMATER-RS, 67-69 p.
- Perdomo, H.; Sutton, D.A.; García, D.; Fothergill, A.W.; Cano, J.; Gené, J.; Summerbell, R.C.; Rinaldi, M.G. & Guarro, J. (2011) Spectrum of clinically relevant *Acremonium* species in the United States. *Journal of Clinical Microbiolog* 49, (1):243-256,.
- Peresse, M. & Le Picard, D. (1980) *Hansfordia pulvinata*, mycoparasite destructeur du *Cladosporium fulvum*. *Mycopathologia*, 71:23-30.
- Poling, M.S.; Wicklow, T.D.; Rogers, D.K. & Gloer, B.J. (2008) *Acremonium zeae*, a protective endophyte of maize, produces dihydroresorcylic acid and 7-Hydroxydihydroresorcylic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, (9):3006-3009.

- Rathaiah, Y. & Pavgi, M. (1971) A species of *Hansfordia* mycoparasitic on *Cercospora*. *Revista di Patologia Vegetale*, 7:203-211.
- Rezende J.A.M. & Martins, M.C (2005). Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.). In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. (Eds.). *Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*. Agronômica Ceres, São Paulo, p. 435-443.
- Rodrigues, A.M. (2002) Influência da luz, do pH e de aditivos químicos sobre o crescimento micelial e esporulação de *Dicyma pulvinata* (Berk & M.A Curtis) Arx [Syn. *Hansfordia pulvinta* (Berk & Curt)] *in vitro*. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá. 39p.
- Sales-Campos C.; de Andrade M.C.N. (2010) Temperatura e meio de cultura mais favoráveis ao crescimento micelial de uma linhagem de *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, 77, (3) :539-543*
- Santos Filho, H.P.; Oliveira, A.A.R.; Noronha, A.C.S.; Sanches, N.F.; Lopes, F.F.; Andrade, P.R.O.; Osorio, A.C.B.; Souza, J.A.; Oliveira, A.M.G. & Santos, M.J (2007). Monitoramento e controle da Pinta Preta do mamoeiro *Asperisporium caricae* (Speg.) Maubl. In: Martins (Ed.) *Papaya Brasil: Manejo, Qualidade e Mercado e inovações tecnológicas para o mamão*. Vitória: Incaper.. p.472-475.
- Santos, M.C. & Barreto, M. (2003) Estudo epidemiológico da varíola do mamoeiro em cultivares submetidos a tratamento com fungicidas. *Summa Phytopathologic*, 29, (2) :141-146,.
- Seifert, K.; Morgan-Jones, G.; Gams, W.; Kendrick (2011). *The Genera of Hyphomycetes*. CBS Biodiversity, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Netherlands. 9:1–997
- Serrano, L.A.L. & Cattaneo, L.F. (2010) O cultivo do mamoeiro no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, 32(3):0-0*
- Shaw, D.E. (1988) *Verticillium lecanii* a hyperparasite on the coffee rust pathogen in Papua New Guinea. *Australasian Plant Pathology, Adelaide, 17,(1) 0-0*
- Sherf, A.F. (1943) A method for maintaining *Phytopomonas sepedonica* for long periods without transfer. *Phytopathology*, 33: 30-32.

- Silva, A.M.S.; Carvalho, A.O.; Sudo, S.; Martelleto, C.D.I.; Akiba, F.; Pereira, A.J. & Ribeiro, R.L.D. (1999) *Cephalosporium* sp. Colonizando lesões da varíola (*Asperisporium cariae*) do mamoeiro. Fitopatologia Brasileira, .24 (suplemento), p. 328,
- Silva, L.G. (2010) Isolamento e crescimento de *Asperisporium caricae* e sua relação filogenética com *Mycosphaerellaceae*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 58p
- Silvera-Pérez, A.E.; Valdebenito-Sanhueza, R.M.; Duarte, V.; Santos, H.P. & Felippeto, J. (2010) Controle do mofo cinzento com *Clonostachys rosea* na produção de mudas de fúcsia. Tropical Plant Pathology, 35, (3):163-169.
- Sivanesan, A. (1990) List of sets, index of species, and list of accepted names for some obsolete species names in CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, Mycopathologia, 111:91-108.
- Slininger, P.J.; Behle, R.W.; Jackson, M.A. & Schiler, D.A. (2003) Discovery and development of biological agents to control crop pests. Neotropical Entomology, 32:183-195.
- Srivastava, A. K., D. B. Singh, and B. Rai. (1981). Colony interaction and mycoparasitism between *Acremonium furcatum* and *Aspergillus* spp. Plant Soil 59: 353-356.
- Stevens, H.E. (1939) Papaya diseases. Proceedings of The Florida State Horticultural Society, 52:57-63.
- Sudo, S. (1989) Biocontrole de *Catacauma torrendiella* e *Coccostroma palmicola*, agentes causadores da lixa preta do coqueiro. In: Reunião brasileira sobre controle biológico de doenças de plantas.. Piracicaba. Anais Piracicaba: USP/EMBRAPA. p.57-59.
- Summerbell, R.C.; Gueidan, C.; Schroers, H-J.; de Hoog, G.S.; Starink, M.; Arocha Rosete, Y.; Guarro, J. & Scott. J.A (2011). *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. Studies in Mycology v.68, p.139–162.
- Sutton, B.C. (1980) The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England, 696p.

- Suzuki, M.S., Zambolim, L. & Liberato, J.R. (2007) Progresso de doenças fúngicas e correlações com variáveis climáticas em mamoeiro. *Summa Phytopathologica*. 23, (2):167-177.
- Tarantino, P.; Caiazza, R.; Carella, A. & Lahoz, E. (2007) Control of *Rhizoctonia solani* in a tobacco-float using low rates of iprodione- and iprodione-resistant strains of *Gliocladium roseum*. *Crop Protection*, 26:298-1302.
- Tavares, E.T.; Tigano, M.S.; Mello, S.C.M.; Martins, I. & Cordeiro, C.M.T. (2004) Molecular characterization of Brazilian *Dicyma pulvinata* isolates. *Fitopatologia Brasileira*, 29:148-154.
- Tirilly, Y.; Kloosterman, J.; Sipma, G. & Kettenes-van den Bosch J.J (1983).. A fungitoxic sesquiterpene from *Hansfordia pulvinata*. *Phytochemistry* 22:2082-2083.
- Trindade, A.V (2000). Mamão produção: aspectos técnicos. Cruz das Almas BA: EMBRAPA. Comunicação para Transferência de Tecnologia. p9-53.
- Valdebenito-Sanhueza, R.M.; Sutton, J.C.; Perazzolo, I. & Czermainski, A.B.C (1997). Controle biológico de *Botrytis cinerea* em morangueiros cultivados em estufa. *Fitopatologia Brasileira*, 22:69-73.
- Vandermeer, J., Perfecto, I., Lierea, H,. (2009) Evidence for hyperparasitism of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) by the entomogenous fungus, *Lecanicillium lecanii* through a complex ecological web. *Plant Pathology* 58:636–641.
- Vázquez, M.J.; Roa, A.M.; Reyes, F.; Vega, A.; Rivera-Sagredo, A.; Thomas, D.R.; Díez, E.; Hueso-Rodríguez, J.A. (2003) A novel ergot alkaloid as a 5-HT1A inhibitor produced by *Dicyma* sp. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46:5117-5120,
- Verhaar, M.A. & Hijwegen, T. (1993) Efficient production of phialoconidia of *Verticillium lecanii* for biocontrol of cucumber powdery mildew, *Sphaeroteca fuliginea*. *European Journal of Plant Pathology*, Wageningen, 99, (2):101-103.
- Vieira, B.S and Barreto, R.W. (2010)Liquid culture production of chlamydospores of *Lewia chlamydosporiformans* (Ascomycota: Pleosporales), a mycoherbicide candidate for wild poinsettia. *Australasian Plant Pathology*, 39:154-160,.

- Vivas, J.M.S.; Vivas, M. & Silveira, S.F. (2011) Primeiro relato de *Dicyma* sp. micoparasitando *Asperisporium caricae* agente causador da pinta-preta do mamoeiro. In: V Simpósio do Papaya Brasileiro, 2011, Porto Seguro, BA. Anais do V Simpósio do Papaya Brasileiro. p. 1-4
- Vivas, M. (2009) Avaliação de germoplasma e híbridos de mamoeiro quanto a resistência à doenças causadas pelos fungos *Asperisporium caricae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Oidium caricae* e *Phoma caricae-papayae*, Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 111p.
- Vivas, M. (2012) Melhoramento genético do mamoeiro visando resistência a pinta-preta, mancha-de-phoma e oídio. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 133p.
- Vivas, M.; Silveira, S.F.; Vivas, J.M.S. & Pereira, M.G. (2012) Patometria, parâmetros genéticos e reação de progênies de mamoeiro à pinta-preta. *Bragantia*, São Paulo, 71:235-238.
- Ward, N.( 2011) Effects of field inoculations of soybeans with the mycophilic fungus *Simplicillium lanosoniveum* on *Phakopsora pachyrhizi* and soybean rust. Final Report. 2011. Disponível em: <http://mysare.sare.org/mySARE/ProjectReport.aspx?do=viewRept&pn=GS09-085&y=2011&t=1>.
- Warwick, D.R.N. (2001) Colonização de estromas de *Sphaerodothis acrocomiae* Agente causal da lixa grande do coqueiro por *Acremonium persicinum*. *Fitopatologia Brasileira*, 26, (2):220.
- Warwick, D.R.N. (2007) Índices de parasitismo de lixa-grande do coqueiro pelos fungos hiperparasitas: *Acremonium cavaraeanum* e *Dicyma pulvinata* Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 13p.
- Watanabe, T.; Kawano, Y. & Nakamura, K. (2003) New records of *Ardhachandra*, *Dicyma*, and *Sibirina* species from basidiomata of *Aphylllophorales* (*Basidiomycetes*) in Japan. *Mycoscience*, .44:411–414.

- Wicklow, D.T.; Roth, S.; Deyrup, S.T. & Gloer, J.B. (2005) A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research*, 109:610-618
- Weisenborn J L.F., Kirschner R., Piepenbring M. (2010) A new darkly pigmented and keratinolytic species of *Acremonium* (Hyphomycetes) with relationship to the Plectosphaerellaceae from human skin and nail lesions in Panama Nova Hedwigia, 90, (12):457-468
- Zare, R.; Gams. W.; Starink-Willemse, M. & Summerbell, R.C. (2007) *Gibellulopsis*, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and *Musciellium*, a new genus for *V. theobromae*. *Nova Hedwigia*, .85:463–489.
- Zare, R.; Gams, W. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium*. *Nova Hedwigia*. 73(1-2):1-50