



Meios de cultura para crescimento e esporulação de *Choanephora* spp. e avaliação de agentes de controle biológico in vitro

Gislaine de Souza OLIVEIRA¹, Solange Maria BONALDO^{1,2*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Federal de Mato Grosso, Sinop, MT, Brasil.

² Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Federal de Mato Grosso, Sinop, MT, Brasil.

E-mail: solange.bonaldo@ufmt.br

(ORCID: 0000-0003-2359-4764; 0000-0002-2240-2700)

Recebido em 04/09/2021; Aceito em 05/05/2022; Publicado em 03/06/2022.

RESUMO: *Choanephora* spp. causam podridão floral na cultura do algodão, murcha das folhas na cultura da soja e murcha das folhas, podridão floral e de caule em crotalaria. Devido à dificuldade de esporulação deste patógeno em meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (BDA), avaliou-se cinco meios de cultura (Batata Doce+BDA, Batata Cenoura Ágar, arroz, aveia e BDA) para desenvolvimento e esporulação de *Choanephora* spp., e em seguida verificou-se o potencial antagonista de fungos conidiais sapróbios da Amazônia Meridional, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma asperellum* e *Pichia* sp. no controle de *Choanephora* spp. in vitro. De acordo com as análises, os meios de cultura Batata Doce+BDA e Batata Cenoura Ágar apresentaram altas taxas de crescimento micelial e produção de esporos para o isolado de crotalaria, e Batata Cenoura Ágar, maiores valores de crescimento e esporos para o isolado de soja. Sendo estes, portanto, os melhores meios para o desenvolvimento in vitro de *Choanephora* spp. neste estudo. Nos ensaios de antagonismo *Ellisembia* sp., *Brachysporiella* sp. e *T. asperellum* apresentaram maior controle do patógeno, in vitro. Os tratamentos *Pichia* sp. e *Pichia* sp.+*B. subtilis* apresentaram halo de inibição que permaneceu durante 21 dias.

Palavras-chave: Fungos conidiais sapróbios; *Ellisembia* sp.; queima foliar de *Choanephora*; *Pichia* sp.

Culture media for growth and sporulation of *Choanephora* spp. and evaluation of biological control agents in vitro

ABSTRACT: *Choanephora* spp. affects cotton culture, causes leaf wilt in soybean and leaf wilt, floral and stem rot in crotalaria. Due to the difficulty of sporulation of this pathogen in a medium Potato Dextrose Agar (PDA), were evaluated five culture media (Sweet Potato+PDA, Potato Carrot Agar, Rice, Oats and PDA) for development and sporulation of the pathogen, and the antagonist potential of Saprobiic Conidial Fungi from the Southern Amazon, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma asperellum* and *Pichia* sp. in the control of *Choanephora* spp. in vitro. According to the analyzes, the culture media Sweet Potato+PDA and Potato Carrot Agar showed high rates of mycelial growth and spore production for the crotalaria isolate, and Potato Carrot Agar with higher growth values and spores in the soybean isolate. These, therefore, are the best means for the in vitro development of *Choanephora* spp. in this study. In the antagonism tests *Ellisembia* sp., *Brachysporiella* sp. and *T. asperellum* showed greater control of the pathogen in vitro. The treatments *Pichia* sp. and *Pichia* sp.+*B. subtilis* presented an inhibition halo in some repetitions that lasted for 21 days.

Keywords: Saprobiic conidial fungi, *Ellisembia* sp.; Leaf Blight *Choanephora*; *Pichia* sp.

1. INTRODUÇÃO

O patógeno *Choanephora* é extremamente agressivo, pouco estudado e encontra-se distribuído em diversas culturas de importância econômica no mundo. O gênero descrito por Currey (1873) possui duas espécies que são relatadas em diversos hospedeiros, entre elas *Choanephora cucurbitarum* ocorrendo em soja na Índia e Malásia (TURNER et al., 1971; JOSHI, 1981), algodão nos EUA (BAGGA, 1970) e, principalmente, em plantas da família Cucurbitaceae nos EUA; e *Choanephora infundibulifera* em plantas de soja nos EUA (ROY, 1993).

No Brasil, este patógeno afeta plantas de *Crotalaria spectabilis* causando murcha foliar e podridão de flores e caule, diminuindo, conseqüentemente, a produção de sementes (ALFENAS et al., 2018). Na cultura da soja os sintomas aparecem primeiro em folhas maduras e ocasionalmente em

folhas jovens no ápice da planta, causando a murcha das folhas, influenciada diretamente pela condição do ambiente, temperatura e umidade alta (LI et al., 2015).

Estudos têm demonstrado que este patógeno cresce e produz esporos em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), a exemplo, Park et al. (2016) observaram que isolados de *Choanephora* spp. (KUS-F27494 e F27538), extraídos de plantas de *Hibiscus syriacus* produziram grande quantidade de esporangiólos e esporangiósporos em BDA.

Porém, trabalhando com isolados deste patógeno, oriundos do estado de Mato Grosso, em laboratório, observou-se rápido crescimento micelial em BDA à temperatura de 25 °C, entretanto com baixa formação de esporos. Cunningham (1879) ao estudar o comportamento in vitro, observou que *Choanephora* sp. produzia esporos em menor quantidade quando cultivadas em meios muito

nutritivos, além disso, o mesmo autor descreve que colônias do patógeno perderam capacidade de formar esporos após três transferências sucessivas em meios de cultura, comportamento semelhante ao observado neste trabalho.

Produção de esporos de *Choanephora* spp. é importante para realização de pesquisas que auxiliam, principalmente, na caracterização do patógeno, manejo e controle da doença, como por exemplo, estudos morfológicos, de comportamento em condições de temperatura e umidade variáveis, patogenicidade, e controle biológico (CURRY, 1873; SIDDIQUI et al., 2008; LI et al., 2015).

O controle biológico tem ganhado espaço no âmbito da agricultura sustentável. Pesquisas com antagonistas para controle de *Choanephora* spp. vêm apresentando bons resultados, como observado por Chandrakala (2016) ao constatar que quatro isolados de *Trichoderma* spp. inibiram o crescimento de *C. cucurbitarum*.

Estudos comprovam que a ação de fungos sapróbios sobre fitopatógenos pode decorrer da liberação de compostos voláteis, antibiose e competição por espaço e nutrientes. Compostos voláteis produzidos pelos fungos sapróbios da Amazônia, *Brachysporiella* sp., *Dictyochoaeta* sp. e *Gonytrichum* sp., reduziram a germinação de esporos de *Colletotrichum musae* e *Fusarium* sp. (OLIVEIRA et al., 2019).

O gênero *Bacillus* também compõe o grupo dos agentes de biocontrole que auxiliam na proteção de plantas contra fitopatógenos, devido a capacidade de formar endósporos e a atividade de seus antibióticos (CAVAGLIERI et al., 2005). Ikediugwu et al. (1994) utilizaram isolados de *Bacillus subtilis* no controle do patógeno *C. cucurbitarum* em plantas de *Amaranthus hybridus*. A aplicação da bactéria nas plantas um dia antes da inoculação do patógeno, impediu o desenvolvimento da doença e inibiu o crescimento micelial e germinação de conídios in vitro.

Uma das abordagens mais recentes e promissoras no âmbito do controle biológico é a utilização de leveduras que

têm apresentado resultados satisfatórios quanto ao controle de fitopatógenos, pois atuam impedindo o crescimento micelial e germinação de esporos (BAUTISTA-ROSALES et al., 2013).

Portanto, diante da problemática de obtenção de esporos e, visando o estudo do controle de doenças de plantas com baixo impacto ambiental, objetivou-se com este trabalho avaliar meios de cultura para desenvolvimento e produção de esporos, e verificar o potencial antagonista de fungos conidiais sapróbios da Amazônia Meridional, *B. subtilis*, *T. asperellum* e *Pichia* sp. no controle de *Choanephora* spp. in vitro.

2. MATERIAL E METODOS

2.1. Crescimento e esporulação de *Choanephora* spp. in vitro

2.1.1. Preparo dos meios de cultura

Colônias monohifais de dois isolados de *Choanephora* spp. coletados de plantas sintomáticas (crotalaria e soja), cultivados em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) e mantidos em câmara de crescimento a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram submetidas a cinco meios de cultura para seu desenvolvimento (Tabela 1).

Meios de cultura foram preparados conforme descrição na Tabela 1, e autoclavados a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 atm. durante 20 minutos. Em seguida, discos de micélio do patógeno (7 mm Ø) foram transferidos para placas de Petri (9 cm Ø) com o meio de cultura correspondente. O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado constituído por cinco tratamentos e cinco repetições para cada isolado.

Na determinação da quantidade de esporos, 20 mL de água destilada foram adicionados na superfície das colônias e raspou-se superficialmente, sendo o resultante filtrado em gaze e a contagem de esporos realizada com o auxílio de câmara de Neubauer.

Tabela 1. Meios de cultura e suas respectivas composições para o desenvolvimento e esporulação de *Choanephora* spp.

Table 1. Culture media and their respective compositions for the development and sporulation of *Choanephora* spp.

Meio de Cultura	Composição	Referência
Batata Dextrose Ágar (BDA)	7,8 g de BDA Acumedia® + 200 mL de água destilada	Manual Difco (1984)
Batata Cenoura Ágar (BCA)	50 g de batata + 50g de cenoura + 4 g de ágar + 200 mL de água destilada	Modificado de Tuite (1969)
Batata Doce + BDA (BD + BDA)	24 g de batata doce + 7,8 g de BDA Acumedia® + 200 mL de água	*Soares (2018)
Aveia Ágar	20 g de aveia em flocos + 4 g de ágar + 200 mL de água destilada	Modificado de Tuite (1969)
Arroz Ágar	28 g de arroz cozido + 4 g de ágar + 200 mL de água destilada	Soares (2018)

*Comunicação pessoal de Elielbert Coura Soares, em 14 de novembro de 2018, recebida por correio eletrônico.

2.2. Controle biológico

2.2.1. Ensaio de Antagonismo I: confronto direto por pareamento entre *Choanephora* spp. e fungos conidiais sapróbios

Quatro isolados de Fungos Conidiais Sapróbios foram obtidos através de cultura direta de serrapilheira de duas áreas da Amazônia Meridional no estado de Mato Grosso: *Gonytrichum* sp. (CNMTf43); *Brachysporiella* sp. (CNMTf41) da Fazenda São Nicolau em Cotriguaçu e *Pseudobotrytis terrestris*; *Ellisembia* sp. (CNMTf41) oriundos do Parque Estadual do

Cristalino no município de Novo Mundo. Os sapróbios foram colocados em lâminas permanentes, identificados utilizando microscópio ótico e tombados no herbário Centro-Norte Mato-Grossense (CNMTf). Os esporos coletados de galhos (*Brachysporiella* sp., *Ellisembia* sp. e *Gonytrichum* sp.) e folhas (*Pseudobotrytis terrestris*) foram isolados, preservados em meio de cultura BDA e incubados em câmara de crescimento a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ no Laboratório de Microbiologia/Fitopatologia da Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Sinop.

Neste ensaio, três isolados de *Choanephora* spp. coletados de plantas sintomáticas (algodão e soja), e sementes infectadas (crotalária), foram cultivados em meio de cultura BDA e incubados em câmara de crescimento a 25 °C ± 2 °C/escuro.

Para isto, discos de micélio dos fungos sapróbios foram repicados dois dias antes da repicagem dos fitopatógenos e colocados a distância de aproximadamente 1,0 cm da borda, em posições opostas. As placas foram incubadas em câmara de crescimento, com temperatura de 25° ± 2°C/escuro.

O ensaio foi constituído por cinco tratamentos: quatro tratamentos de confronto direto entre fungos sapróbios e fitopatógeno e um tratamento com fitopatógeno sozinho (controle negativo), cada tratamento composto por cinco repetições. O confronto direto foi avaliado aos 21 dias após a instalação do experimento através de escala descritiva, adaptada de Bell et al. (1982) modificada por Nascimento (2016).

2.2.2. Ensaio de Antagonismo II: confronto direto por pareamento entre *Choanephora* spp., *Pichia* sp., *Bacillus subtilis* e *Trichoderma asperellum*

Pichia sp., *T. asperellum* e *Bacillus subtilis* foram colocados em confronto direto com os fitopatógenos, sob mesmas condições de desenvolvimento utilizados no primeiro ensaio de antagonismo I.

O experimento constituiu-se de cinco tratamentos: quatro tratamentos de confronto direto entre *Pichia* sp.; *T. asperellum*; *B. subtilis*; e *Pichia* sp.+*B. subtilis*, frente isolados de algodão, soja e crotalária, e um tratamento com fitopatógeno sozinho (controle negativo), sendo cada tratamento composto por cinco repetições.

2.2.3. Avaliação e análise estatística

A avaliação do crescimento radial do micélio iniciou-se 24 horas após incubação por meio da média entre duas medições diametralmente opostas (X e Y), até um dos tratamentos atingir 6 cm (2/3 da placa).

Avaliou-se o crescimento micelial (CM) através da fórmula: crescimento do fungo no eixo horizontal (cm)/crescimento do fungo no eixo vertical (cm) menos o diâmetro do furador (cm); e com os dados obtidos calculou-se a taxa de crescimento (TC) com a fórmula de regressão linear de variação do crescimento micelial nos intervalos de tempo das análises: $\hat{y}=a+b.x$. Na esporulação utilizou-se fator de multiplicação 20.000 para calcular a quantidade de esporos por repetição.

O confronto direto, para os ensaios de antagonismo, foi avaliado aos 21 dias após instalação do experimento através de escala descritiva adaptada de Bell et al. (1982), em que: 1-patógeno cresce por toda a placa; 1,5- antagonista cresce 12,5%; 2,0- antagonista cresce 25%; 2,5- antagonista cresce 37,5%; 3,0- antagonista cresce 50%; 3,5- antagonista cresce 62,5%; 4,0- antagonista cresce 75%; 5- antagonista cresce 100%.

Valores de CM, TC, esporulação e escala descritiva foram submetidos a ANOVA, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

3.1. Crescimento e esporulação de *Choanephora* spp. in vitro

3.1.1. Crescimento micelial e taxa de crescimento

O meio de cultura Batata Doce+BDA apresentou, maiores valores de CM para *Choanephora* sp. isolado de crotalária e soja, seguido de BDA e BCA (Tabela 2). O maior valor estatístico de TC diário para *Choanephora* sp., isolado de crotalária, foi no meio BCA, e para soja BDA (Tabela 2).

BDA obteve TC estatisticamente superior para o isolado de soja, comparado aos demais meios de cultura, e em crotalária apresentou segunda maior taxa significativa, correspondendo aos resultados de outros trabalhos que também testaram diferentes meios de cultura para desenvolvimento de diferentes espécies de *Choanephora*.

Tabela 2. Crescimento micelial e taxa de crescimento dos isolados de *Choanephora* spp. de crotalária e soja, sob diferentes meios de cultura. Table 2. Mycelial growth and growth rate of *Choanephora* spp. of sunn hemp and soybean under different culture media.

Meio de Cultura	Crescimento Micelial (cm)		Taxa de Crescimento (cm)	
	<i>Choanephora</i> sp. isolado crotalária	<i>Choanephora</i> sp. isolado soja	<i>Choanephora</i> sp. isolado crotalária	<i>Choanephora</i> sp. isolado soja
BDA	6,98 b	6,52 a	2,38 bc	1,04 a
BD+BDA	7,50 a	5,36 b	2,18 c	0,84 ab
AVEIA	6,50 b	2,70 c	2,66 b	0,96 ab
BCA	5,84 d	5,40 b	3,16 a	0,80 b
ARROZ	3,16 e	3,00 b	1,10 d	0,22 c
*C.V.%	4,00	6,04	8,38	13,71

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *CV (coeficiente de variância).

3.1.2. Esporulação

Todos os meios de cultura testados apresentaram boas taxas de esporulação para o isolado de crotalária, entretanto BCA apresentou maior quantidade de esporos. Para o isolado de soja, apenas os meios BCA e arroz estimularam a produção de esporos do patógeno (Tabela 3).

3.2. Ensaios de antagonismo

3.2.1. Crescimento micelial

Dados os valores de CM, observou-se que o patógeno cresceu rapidamente sobre o meio de cultura, sendo que,

entre 48 e 72h a testemunha atingiu 2/3 da placa. Portanto, neste período, os antagonistas não apresentaram ação de controle sob o patógeno (Tabelas 4).

3.2.2. Taxa de Crescimento

A média de crescimento diário foi igual para todos os tratamentos nos três isolados. No segundo ensaio, *T. asperellum* apresentou menor taxa de crescimento comparado aos demais tratamentos, seguido de *Pichia* sp. no isolado de algodão (Tabela 4).

3.2.3. Nota de Bell

Ellisembia sp. e *Brachysporiella* sp. apresentaram ação antagonica contra todos isolados de *Choanephora* spp., colonizando hifas do patógeno. Demais fungos sapróbios também demonstraram ação antagonica, porém com menor potencial (Tabela 5).

T. asperellum apresentou ação antagonica frente os três isolados de *Choanephora* spp., diferindo dos demais tratamentos que não impediram o desenvolvimento do patógeno. Este antagonista cresceu sobre cerca de 75% das colônias do fitopatógeno, com notas 4,0; 3,80; e 4,60 para os isolados de algodão, soja e crotalaria, respectivamente (Tabela 5). *Pichia* sp. e demais tratamentos não demonstraram, estatisticamente, potencial antagonista apresentando média de nota de Bell 1,0 significando que o patógeno colonizou toda a placa de Petri.

Pichia sp.; *Bacillus subtilis* e; *Pichia* sp.+*B. subtilis* não apresentaram, estatisticamente, ação antagonica. Porém, duas repetições do tratamento *Pichia* sp.+*B. subtilis* frente o isolado de algodão apresentaram halo de inibição de 1,3 e 0,8 cm, e

uma repetição do tratamento com *Pichia* sp. em confronto com o isolado de crotalaria, apresentou 0,5 cm de halo.

Tabela 3. Esporulação de isolados de *Choanephora* spp. de crotalaria e soja sob diferentes meios de cultura.

Table 3. Sporulation of *Choanephora* spp. of sunn hemp and soybean under different culture media.

Meio de Cultura	Esporos/mL	
	<i>Choanephora</i> sp. isolado crotalaria	<i>Choanephora</i> sp. isolado soja
BDA	1.766.000 b	1 b
BCA	20.920.000 a	260.000 a
BD+BDA	2.900.000 b	1 b
ARROZ	616.000 b	2000 b
AVEIA	104.000 b	1 b
C.V.%	24,15	86,97

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para análise estatística, os dados foram transformados em $\sqrt{x + 1}$.

Tabela 4. Médias de crescimento micelial (cm) e taxa de crescimento (cm) de isolados de *Choanephora* spp. de algodão, crotalaria e soja, em confronto direto com antagonistas em meio BDA.

Table 4. Mean mycelial growth (cm) and growth rate (cm) of *Choanephora* spp. of cotton, sunn hemp and soybean, in direct confrontation with antagonists in PDA medium.

Antagonista	Ensaio de Antagonismo I					
	<i>Choanephora</i> sp. isolado algodão		<i>Choanephora</i> sp. isolado crotalaria		<i>Choanephora</i> sp. isolado soja	
	CM	TC	CM	TC	CM	TC
Testemunha	5,64 a	1,12 a	5,96 a	1,86 a	5,50 a	1,84 a
<i>Gonytrichum</i> sp.	5,34 ab	1,00 a	4,60 b	1,94 a	5,16 a	2,30 a
<i>Brachysporiella</i> sp.	5,34 ab	0,84 a	5,50 a	1,62 a	5,44 a	1,76 a
<i>Ellisembia</i> sp.	5,00 ab	0,70 a	5,40 a	1,40 a	5,22 a	1,78 a
<i>Pseudobotrytis terrestris</i>	4,62 b	0,52 a	5,44 a	1,84 a	5,34 a	2,12 a
C.V. (%)	9,20	39,38	7,20	35,60	4,90	22,36

Antagonista	Ensaio de Antagonismo II					
	<i>Choanephora</i> sp. isolado algodão		<i>Choanephora</i> sp. isolado crotalaria		<i>Choanephora</i> sp. isolado soja	
	CM	TC	CM	TC	CM	TC
Testemunha	5,78 a	1,54 a	5,70 a	0,86 a	5,66 a	1,76 a
<i>Bacillus subtilis</i>	5,36 a	1,14 ab	5,46 ab	0,78 a	5,64 ab	1,70 a
<i>Pichia</i> sp. + <i>B. subtilis</i>	5,34 a	1,40 ab	5,46 ab	0,88 a	5,72 a	1,72 a
<i>Trichoderma asperellum</i>	5,32 a	0,92 b	5,26 ab	0,60 a	5,4 ab	1,20 a
<i>Pichia</i> sp.	5,2 a	1,16 ab	5,12 b	0,66 a	5,24 b	1,38 a
C.V. (%)	9,73	26,58	5,24	44,07	3,97	27,06

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 5. Médias da nota de Bell, confronto direto entre antagonistas e isolados de *Choanephora* spp. de algodão, crotalaria e soja.

Table 5. Bell grade averages, direct confrontation between antagonists and *Choanephora* spp. cotton, sunn hemp and soy.

Antagonista	Nota de Bell-Ensaio I		
	<i>Choanephora</i> sp. isolado algodão	<i>Choanephora</i> sp. isolado crotalaria	<i>Choanephora</i> sp. isolado soja
<i>Ellisembia</i> sp.	3,60 a	3,80 a	3,80 ab
<i>Brachysporiella</i> sp.	3,20 ab	3,30 ab	3,30 b
<i>Pseudobotrytis terrestris</i>	3,0 ab	2,60 b	3,90 a
<i>Gonytrichum</i> sp.	2,40 b	2,50 b	2,20 c
C.V. (%)	15,77	17,96	9,58

Antagonista	Nota de Bell-ensaio II		
	<i>Choanephora</i> sp. isolado algodão	<i>Choanephora</i> sp. isolado crotalaria	<i>Choanephora</i> sp. isolado soja
<i>Trichoderma asperellum</i>	4,0 a	3,80 a	4,60 a
<i>Pichia</i> sp.	1,0 b	1,20 b	1,0 b
<i>Bacillus subtilis</i>	1,10 b	1,0 b	1,0 b
<i>Pichia</i> sp. + <i>B. subtilis</i>	1,20 b	1,0 b	1,0 b
C.V. (%)	9,69	27,11	14,41

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

Fungos da ordem Mucorales produzem composto volátil chamado trisporóides, responsável pela formação de estruturas reprodutivas (BURGEFF, 1924), que são derivados do betacaroteno (GOODAY, 1968). Neste contexto, estima-se que o meio BCA tenha promovido esta esporulação devida essas condições. Kuo et al. (1999) testaram 12 meios de cultura para desenvolvimento e esporulação de um isolado de *C. cucurbitarum* extraído de planta sintomática de feijão-lima (*Phaseolus limensis*) e, também observaram formação máxima de esporângios do patógeno no meio cenoura ágar.

O meio BDA apresentou valor significativo de esporulação para o isolado obtido de crotalária (Tabela 3). Verma (2010) ao estudar o efeito da esporulação de *C. infundibulifera* sob diferentes meios, constatou que melhores taxas de esporulação foram em meio BDA. Outros trabalhos também relatam que *Choanephora* spp. tem crescimento rápido e formação de esporangiola e esporângio em BDA (CHANDRAKALA, 2010; KNOW; JIN-HYCUK, 2005; PARK et al., 2016).

BDA, BD+BDA e aveia não estimularam a formação de esporos do isolado de soja, entretanto apresentaram altos valores de CM. Meios de cultura favorecem o crescimento micelial e/ou a esporulação de patógenos, ou seja, esta produção pode não ocorrer de forma simultânea (PEREIRA et al., 2006).

Não foi observado produção de esporângios em nenhum dos meios testados. Cunningham (1879) ao descrever o gênero *Choanephora*, relata que os esporângios são produzidos através da utilização de meios de cultura pobres em nutrientes, como por exemplo, ágar água.

A produção de compostos voláteis não foi investigada neste estudo, entretanto alguns trabalhos relatam que fungos sapróbios inibem o crescimento de patógenos através da produção destes compostos, pois os fitopatógenos *Colletotrichum truncatum*, *Colletotrichum musae* e *Fusarium* sp. quando expostos a compostos voláteis de *Brachysporiella* sp., *Diclyochaeta* sp. e *Gonytrichum* sp. apresentaram esporos inviáveis após 3 e 7 dias de exposição (OLIVEIRA et al., 2019).

TC manteve-se igual, estatisticamente, em todos os tratamentos. Porém, *Ellisembia* sp. e *Brachysporiella* sp. proporcionaram menores médias de crescimento diário no primeiro ensaio. Solino et al. (2017) ao avaliarem o efeito de filtrados de fungos sapróbios sobre o crescimento micelial de *Alternaria solani*, verificaram que *Curvularia inaequalis* e *Curvularia eragrostidis* reduziram o CM na concentração de 20%.

Com relação ao isolado de crotalária, estes sapróbios poderão servir de alternativa de controle para a doença no campo, pois não são descritos ou registrados fungicidas para esta cultura. Além do mais, Alfenas et al. (2018) apenas relataram a ocorrência do patógeno no Brasil, e não testaram nenhum método de controle, este fato presume a necessidade da implantação de medidas de controle da doença em crotalária.

No segundo ensaio *T. asperellum* apresentou hiperparasitismo no confronto com os três isolados de *Choanephora* spp. Chandrakala (2016) realizou estudos sobre *Choanephora cucurbitarum* em pimenta (*Capsicum frutescens*) na Índia, e testou a eficiência de quatro isolados de *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole no desenvolvimento do patógeno in vitro. O estudo revelou que todos os isolados de

Trichoderma spp. inibiram o crescimento micelial de *C. cucurbitarum*, exibindo pouco mais de 62 % de inibição.

Siddiqui et al. (2008) estudaram o efeito de extratos de palha de arroz e composto de dendezeiro enriquecidos com *Trichoderma harzianum*, no controle da podridão molhada causada por *C. cucurbitarum* em plantas de quiabo (*Abelmoschus esculentus*) na Malásia. Foi observado que a aplicação de extratos controlou 85,04% da doença, além de atrasar a infecção em plantas inoculadas, desempenho similar ao fungicida Dithame M-45® também utilizado para controlar a doença.

Verificou-se competição por espaço e nutriente entre *T. asperellum* e isolados de *Choanephora* spp., assim como relataram Siddiqui et al. (2009) ao utilizarem extratos de compostos de chá no controle de *C. cucurbitarum*, e observaram que os extratos produziram compostos voláteis, metabólitos antifúngicos, antibióticos e sideróforos através de *Pseudomonas fluorescens* e outros microrganismos presentes, que possibilitaram a competição por espaço e nutrientes com o fitopatógeno.

Algumas repetições com *Pichia* sp. e *B. subtilis* apresentaram halo de inibição, fato importante para futuros estudos acerca destes organismos. Bettiol (2008) relata que no controle biológico pode ocorrer interações positivas, negativas e neutras, devido relações específicas entre antagonista e fitopatógeno, e essas interações complexas são fundamentais para o sucesso do controle.

O resultado do confronto direto entre os isolados de *Choanephora* spp. e fungos conidiais sapróbios *Ellisembia* sp.; *Brachysporiella* sp. e; *T. asperellum*, demonstram que microrganismos podem ser utilizados no controle deste fitopatógeno. Essa abordagem de controle biológico tem potencial de reduzir perdas nas lavouras ocasionadas por fungos, e é economicamente vantajosa ao reduzir danos causados por fungicidas, principalmente, relacionados a saúde humana e ambiente.

A Amazônia concentra a maior reserva em termos de biodiversidade do planeta, e muitas dessas riquezas são inexploradas, seja por falta de conhecimento ou recursos disponíveis. Fungos conidiais sapróbios da Amazônia demonstram resultados satisfatórios no controle de fitopatógenos (OLIVEIRA et al., 2019), sendo, portanto, necessário mais estudos acerca deste potencial.

Os sapróbios e a levedura *Pichia* sp. utilizados neste trabalho são do mesmo bioma que os isolados dos fitopatógenos, portanto, estão adaptadas as mesmas condições de ambiente, principalmente, temperatura e umidade. Esta condição pode facilitar o incremento de estudos sobre o comportamento desses organismos, visando, principalmente, a obtenção de metodologias de controle eficientes e com menor impacto ambiental. Haja visto que a premissa do controle biológico é a utilização de inimigos naturais no controle de pragas e doenças, pois não deixam resíduos nos alimentos e são inofensivos à saúde humana e ao ambiente (GHINI, 2017).

5. CONCLUSÕES

O meio de cultura BCA foi o melhor para produção de esporos no isolado de crotalária e soja. No crescimento micelial destacaram-se BD+BDA para o isolado de crotalária e BDA para isolado de soja. Sendo estes, portanto, os melhores meios para o desenvolvimento in vitro de *Choanephora* sp., neste estudo.

Os fungos conidiais sapróbios apresentaram competição por espaço e nutrientes, e hiperparasitismo aos 21 dias, sendo *Ellisembia* sp. e *Brachysporiella* sp. mais eficientes no controle do fitopatógeno.

T. asperellum apresentou maior controle do patógeno no segundo ensaio de antagonismo. Os tratamentos *Pichia* sp. e *Pichia* sp.+*Bacillus subtilis* apresentaram halo de inibição em algumas repetições que permaneceu durante 21 dias.

6. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e da Universidade Federal de Mato Grosso.

7. REFERÊNCIAS

- ALFENAS, R. F.; BONALDO, S. M.; SILVA, R. A. F.; COLARES, M. R. N. First report of *Choanephora cucurbitarum* on *Crotalaria spectabilis*: a highly aggressive pathogen causing a flower and stem blight in Brazil. **Plant Disease**, v. 102, p. 1456, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1610-PDN>
- BAGGA, H. S. Fungi associated with cotton boll rot in the Yazoo-Mississippi Delta. **Plant Disease Reporter**, v. 54, p. 796–798, 1970.
- BAUTISTA-ROSALES, P. U.; CALDERON-SANTOYO, M.; SERVÍN-VILLEGAS, R.; OCHOA-ÁLVAREZ, N. A.; RAGAZZO-SÁNCHEZ, J. A. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. **Biological control**, v. 65, n. 3, p. 293-301, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.03.010>
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982. DOI: 10.1094/Phyto-72-379.
- BETTOL, W. **Impacto potencial das mudanças climáticas sobre o controle biológico de doenças de plantas**. Embrapa Meio Ambiente, 2008, cap.18, p. 301-321.
- BOTREL, D. A.; LABORDE, M. C. F.; MEDEIROS, F. H. V. D.; RESENDE, M. L. V. D.; RIBEIRO JÚNIO, P. M.; PASCHOLATI, S. F.; GUSMÃO, L. F. P. Saprobic fungi as biocontrol agents of halo blight (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) in coffee clones. **Coffee Science**, v. 13, n. 3, p. 283-291, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v13i3.1438>
- BURGEFF, H. **Untersuchungen uber Sexualitat und Parasitismus bei Mucorineen I**. Bot. Abh, Alemanha, p. 1-135, 1924.
- CAVAGLIERI, L.; ORLANDO, J.; RODRÍGUEZ, M. I.; CHULZE, S.; ETCHEVERRY, M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 5-6, p. 748-754, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.03.001>
- CHANDRAKALA, J. **Studies on Choanephora twig blight (Choanephora cucurbitarum (berk & rav.) thaxt. of chilli (Capsicum frutescens l.) and its**. 2016. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências da Agricultura). Professor Jayashankar Telangana State Agricultural University, Rajendranagar, Hyderabad, Telegana.
- CUNNINGHAM, D. D. XXIII. On the occurrence of conidial fructification in the *Mucorini*, illustrated by *Choanephora*. Transactions of the Linnean Society of London. 2nd Series: **Botany**, v. 1, p. 409-422, 1879. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1879.tb00141.x>
- GHINI, R. **Controle biológico de doenças de plantas: Integração do controle biológico com outros métodos de controle de doenças de plantas**. Embrapa Meio Ambiente, 1991, cap.13, p. 201-217.
- GOGOI, R.; KULANTHAIVEL, S.; RAI, S. N. AHUJA, D. B. Leaf rot disease of cauliflower caused by *Choanephora cucurbitarum* in India. **Australasian Plant Pathology Society**, v. 11, p.27, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13314-016-0214-5>
- GOODAY, G. W. Hormonal control of sexual reproduction in *Mucor mucedo*. **New Phytologist**, v. 67, p. 815-821, 1968. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1968.tb06397.x>
- IKEDIUGWU, F. E. O.; EMOGHENE, A. O.; AJIODO, P. O. Biological control of the shoot disease of *Amaranthus hybridus* caused by *Choanephora cucurbitarum* with *Bacillus subtilis*. **Journal of horticultural science**, v. 69, n. 2, p. 351-356, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1080/14620316.1994.11516464>
- JOSHI, M. C. *Choanephora cucurbitarum* on two new hosts. Note. **Indian Phytopathology**, 1981.
- KUO, C. H.; CHUNG, W. C.; CHANG, C. A. Characterization of the pathogen causing Choanephora wet rot of lima bean in Taiwan. **Plant Pathology Bulletin**, v. 6, p. 413-418, 1999.
- KWON, JIN-HYCUK; JEE, HYCONG-JIN. Soft rot of eggplant (*Solanum melongena*) caused by *Choanephora cucurbitarum* in Korea. **Mycobiology**, v. 33, p. 163-165, 2005. DOI: <https://doi.org/10.4489/MYCO.2005.33.3.163>
- LABORDE, M. C. F.; BOTELHO, D. M. D. S.; RODRIGUEZ, G. A. A.; RESENDE, M. L. V. D.; QUEIROZ, M. V. D.; BATISTA, A. D.; MEDEIROS, F. H. V. D. *Phialomyces macrosporus* reduces *Cercospora coffeicola* survival on symptomatic coffee leaves. **Coffee Science**, v. 14, n. 1, p. 1-11, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v14i1>
- LI, S.; CHEN, P.; HARTMAN, G. L. **Choanephora Leaf Blight. Compendium of Soja Disease and Pests**. 5 ed. American Phytopathological Society Press, Saint Paul, p. 41, 2015.
- MANUAL DIFICO. **Dehydrated culture media and reagents for microbiology and clinical laboratory procedures**. 9 ed. Detroit 1, Michigan, 1984, v. 214, 350p.
- NASCIMENTO, S. R. C.; SILVA, F. H. A.; CRUZ, B. L. S.; DANTAS, A. M. M.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SENHOR, R. F. Sobrevivência de estrutura de resistência de *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotium rolfsii* em solo tratado biologicamente. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 10, n. 1, p. 50-56, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v10i1.2947>
- OLIVEIRA, S. A. B. D.; BARBOSA, F. R.; ANDRADE, E. A.; FERRARINI, S. R.; BONALDO, S. M. Compostos voláteis de fungos conidiais sapróbios da Amazônia Meridional no controle in vitro de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 45, n. 3, p. 302-307, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/178478>

- PARK, J. H.; CHO, S. E.; HONG, S. H.; SHIN, H. D. Identification and characterization of *Choanephora* spp. causing Choanephora flower rot on *Hibiscus syriacus*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 146, p.1278, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0972-0>
- PEREIRA, L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 572-578, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582006000600006>
- ROY, K. W. First Report of Choanephora Leaf Blight of Soybean in Mississippi. **Plant Disease**, v. 77, n. 12, p. 1262-1262, 1993. Disponível em: <https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1993Abstracts/PD_77_1262E.htm>. Acesso em: 14 mar 2019.
- SIDDIQUI, Y.; MEON, S.; ISMAIL, M. R.; ALI, A. *Trichoderma*-fortified compost extracts for the control of Choanephora wet rot in okra production. **Crop Protection**, v. 27, n. 3-5, p. 385-390, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.07.002>
- SIDDIQUI, Y.; MEON, S.; ISMAIL, R.; RAHMANI, M. Bio-potential of compost tea from agro-waste to suppress *Choanephora cucurbitarum* L. the causal pathogen of wet rot of okra. **Biological Control**, v. 49, n. 1, p. 38-44, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.11.008>
- SOLINO, A. J. S.; OLIVEIRA, J.B.S.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; MARIANNA, S. R. A.; RIBEIRO, L. M. Potencial antagonista e controle in vitro de *Alternaria solani* por fungos sapróbios. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 3, p. 199-204, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-21252017v30n429rc>
- TUITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria**. Minneapolis, 1969. 239p.
- TURNER, G. J. Fungi and plant disease in Sarawak. **Phytopathological Papers**, v. 13, p. 55, 1971.
- VERMA, K. K. “**Studies on Choanephora Leaf Blight (*Choanephora infundibulifera* (Currey sacc.) of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill)**”. 2010. 119 f. Tese (Doutorado em ciência na agricultura). Faculdade de Agricultura Indira Gandhi Krishi Kishwavidyalaya, Raipur.