

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**BIOLOGICAL CONTROL IN PEANUT CROP: THE
POTENTIAL OF *Trichoderma* spp. AND
ENTOMOPATHOGENIC FUNGI FOR PEST AND DISEASE
MANAGEMENT**

Fernando Bellesini Vigna

Engenheiro Agrônomo

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**BIOLOGICAL CONTROL IN PEANUT CROP: THE
POTENTIAL OF *Trichoderma* spp. AND
ENTOMOPATHOGENIC FUNGI FOR PEST AND DISEASE
MANAGEMENT**

Fernando Bellesini Vigna

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana G. de Macedo Lemos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em
Microbiologia Agropecuária.

2023

V678b Vigna, Fernando Bellesini
Biological control in peanut crop: the potential of TRICHODERMA
SPP. and entomopathogenic fungi for pest and disease management /
Fernando Bellesini Vigna. -- Jaboticabal, 2023

185 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

1. Fungos endofíticos. 2. Controle biológico de pragas. 3. Aflatoxina.
4. Fungos na agricultura. 5. Sistemas de controle biológico. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos
pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

impacto da pesquisa na sociedade, relacionado aos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS)

Impacto Potencial dessa Pesquisa:

A pesquisa desta tese promete um impacto abrangente nas práticas agrícolas sustentáveis do cultivo de amendoim, seja reduzindo o uso de pesticidas ou complementando-o com abordagens biológicas, assim contribuindo para a preservação ambiental. Ela se concentra na eficácia dos fungos entomopatogênicos endofíticos no controle de pragas larvais desfolhadoras. Além disso, a pesquisa destaca a combinação de *Trichoderma* com fungicidas, visando controlar as cercosporioses e aprimorar a produtividade e qualidade das colheitas. Além disso, demonstrar o uso de *Trichoderma* para reduzir aflatoxinas e tornar os amendoins mais seguros para o consumo humano, tendo um impacto altamente benéfico na saúde pública.

Potential Impact of this Research:

The research in this thesis promises a comprehensive impact on sustainable agricultural practices in peanut cultivation, either by reducing pesticide usage or complementing it with biological approaches, thereby contributing to environmental preservation. It focuses on the effectiveness of endophytic entomopathogenic fungi in controlling defoliating larval pests. Additionally, the research highlights the combination of *Trichoderma* with fungicides, aiming to control cercosporiosis and enhance crop productivity and quality. Furthermore, it demonstrates the use of *Trichoderma* to reduce aflatoxins, making peanuts safer for human consumption and resulting in a highly beneficial impact on public health.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: BIOLOGICAL CONTROL IN PEANUT CROP: THE POTENTIAL OF *Trichoderma* spp.
AND ENTOMOPATHOGENIC FUNGI FOR PEST AND DISEASE MANAGEMENT

AUTOR: FERNANDO BELLESINI VIGNA

ORIENTADORA: ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Microbiologia
Agropecuária, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

Prof. Dr. WAGNER BETTIOL (Participação Virtual)
Microbiologia Ambiental / Embrapa Meio Ambiente



Documento assinado digitalmente
WAGNER BETTIOL
Data: 18/08/2023 14:56:14-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Pesquisador Dr. DARTANHÃ JOSÉ SOARES (Participação Virtual)
Embrapa Algodão / Campina Grande/PB



Documento assinado digitalmente
DARTANHA JOSE SOARES
Data: 01/08/2023 13:25:41-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. RICARDO ANTONIO POLANCZYK (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV UNESP Jaboticabal



Documento assinado digitalmente
RICARDO ANTONIO POLANCZYK
Data: 31/07/2023 11:48:58-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. MARCOS DONISETI MICHELOTTO (Participação Virtual)
APTA Regional Centro-Norte / Pindorama/SP



Documento assinado digitalmente
MARCOS DONISETI MICHELOTTO
Data: 04/08/2023 08:10:24-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Jaboticabal, 27 de julho de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Fernando Bellesini Vigna – 23 de junho de 1990, em Sertãozinho – São Paulo, Brasil, filho de Adriano Henrique Vigna e Sirlei Bellesini Vigna. Em 2010, ingressou no curso de Engenharia Agrônômica do Centro Universitário Moura Lacerda (CUMML), Ribeirão Preto – SP, e formou-se em agosto de 2014. Durante a graduação, estagiou no grupo de laboratório de controle biológico 'GBio' por três anos, recebendo bolsa científica da mesma universidade. Nessa época, pesquisou o controle biológico de pragas, com ênfase no uso de parasitoides e fungos entomopatogênicos.

Iniciou sua pós-graduação, em nível de Mestrado, em janeiro de 2016, na Universidade de São Paulo (USP), campus Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz" (ESALQ), Piracicaba - SP, na área de Entomologia Agrícola, sob orientação do Prof. Dr. Ítalo Delalibera Jr, bolsista do CNPq. Defendeu sua dissertação em outubro de 2018 intitulada "Potencial de inoculação de fungos entomopatogênicos no plantio de soja para manejo de pragas". Em 23 de junho de 2019, ingressou no curso de pós-graduação em Biotecnologia na Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá - PR, sob orientação do Prof. Dr. Hélio Conte. Defendeu seu trabalho final em setembro de 2020 intitulado "Manejo de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Crambidae) através do controle biológico".

Em agosto de 2019 iniciou o Doutorado (Ph.D.) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/Unesp, Jaboticabal, na área de Microbiologia Agropecuária, como bolsista da CAPES, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Eliana G. de Macedo Lemos. Nesse período, desenvolveu pesquisas sobre controle microbiológico de pragas e doenças na cultura do amendoim.

Daher ist die Aufgabe nicht sowohl zu sehen was noch keiner gesehen
hat, als bei Dem was Jeder sieht, zu denken was noch Keiner gedacht
hat. (Arthur Schopenhauer)

So, the problem is not so much to see what nobody has yet seen, as to
think what nobody has yet thought concerning that which everybody sees.
(Arthur Schopenhauer)

DEDICAÇÃO

Aos meus amorosos pais, cuja crença inabalável em mim tem sido minha luz guia
nos momentos mais sombrios.

E, finalmente, a todos aqueles que ousam sonhar, que acreditam na busca do
conhecimento e na força da perseverança. Este trabalho é dedicado a você.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de expressar minha profunda gratidão a minha orientadora, Profa. Dra. Eliana De Macedo Lemos, por seu apoio inabalável, sugestões perspicazes e orientação encorajadora ao longo desta jornada de pesquisa. Sua experiência e dedicação à excelência foram inestimáveis.

Estendo meus sinceros agradecimentos aos membros do meu comitê de tese, Dr. Wagner Bettiol, Dr. Dartanha Soares, Dr. Ricardo Polanczyk e Dr. Marcos Michelotto por suas críticas perspicazes e feedback construtivo que melhoraram muito este trabalho.

Agradeço ao Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental da Universidade Estadual Paulista (UNESP) por proporcionar um ambiente acadêmico enriquecedor e os recursos necessários para a realização de minhas pesquisas. Agradecimentos especiais à equipe do Laboratório de Bioquímica e Microrganismos e de Plantas pela ajuda na manutenção do laboratório e pela assistência técnica necessária.

Quero agradecer aos professores Dr. Everlon Cid Rigobelo e Dra. Rita de Cássia Panizzi pelo estágio docente e todo apoio.

Agradeço a Cooperativa Agroindustrial (COPLANA), pela concessão das sementes de amendoim e todo o apoio nos experimentos realizados.

Gostaria de agradecer ao produtor Cesar Dândaro por ceder a área para desenvolver os experimentos e a Neide Graciano Zério do Laboratório de Biologia de Insetos da ESALQ/USP por ceder os insetos utilizados nos experimentos.

Também gostaria de expressar minha gratidão aos colegas de laboratório por sua camaradagem, discussões intelectuais e experiências compartilhadas que tornaram minha jornada mais agradável. Sou particularmente grato a meus parceiros de laboratório, Cinara Sales Ramos e Luis Angel Chicoma Rojas, por sua colaboração e pelas inúmeras sessões de “brainstorming” que foram cruciais para este projeto.

Agradeço de coração à minha família, em especial aos meus pais, que me deram apoio, amor e incentivo inabaláveis ao longo da minha vida e durante este período desafiador da minha carreira acadêmica. A crença deles em minhas habilidades sempre foi uma fonte de força para mim.

Por fim, tenho gratidão para com minha namorada e meus amigos, que me deram apoio moral, companheirismo e momentos de descontração tão necessários. Sua fé em mim e sua paciência durante meus longos períodos de ausência foram inestimáveis.

Esta tese não teria sido possível sem o apoio e incentivo coletivo de todos os mencionados acima. Eu sou eternamente grato.

Tive o apoio do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária. Este estudo foi parcialmente financiado pela “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	14
GENERAL ABSTRACT	15
CAPÍTULO I – Considerações gerais.....	16
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 A cultura do amendoim	18
2.2 Doenças do amendoim – Cercosporioses.....	20
2.3 Aflatoxinas no amendoim	24
2.4 Insetos pragas no amendoim.....	30
2.5 Agentes de Controle Biológico: Fungos entomopatogênicos	38
2.6 Agentes de Controle Biológico : Fungo <i>Trichoderma</i>	45
3. REFERÊNCIAS	54
CAPÍTULO II - Negative effects on the development of <i>Chrysodeixis</i> <i>inclusens</i> and <i>Spodoptera cosmioides</i> fed by peanut plants inoculated with entomopathogenic fungi¹	75
INTRODUCTION.....	76
MATERIALS AND METHODS.....	78
Fungal strains and inoculum preparation	78
Obtaining neonatal larvae	79
Peanut seed inoculation with entomopathogenic fungi	79
<i>S. cosmioides</i> and <i>C. inclusens</i> developmental test on peanut plants inoculated with entomopathogenic fungi	80
Colonization of entomopathogenic fungi on peanut plants and soil	82
Statistical analysis.....	83
RESULTS.....	83
DISCUSSION	90

CONCLUSIONS	95
REFERENCES	96

CAPÍTULO III – Eficácia do fungo *Trichoderma* associado ou não a fungicidas no manejo de cercosporioses na cultura do amendoim 103

1. INTRODUÇÃO	105
2. MATERIAL E MÉTODOS	107
2.1 Cepas fúngicas	107
2.2 Preparação do Inóculo Fúngico	108
2.3 Compatibilidade in vitro de cepas de <i>Trichoderma</i> com fungicidas	109
2.4 Local do experimento de campo	110
2.5 Primeira safra e avaliação das cercosporioses no campo	111
2.6 Avaliações de tripes	113
2.7 Segunda safra e avaliação das cercosporioses no campo	114
2.8 Análise estatística	116
3. RESULTADOS	117
3.1 Compatibilidade do fungo <i>Trichoderma</i> com fungicidas in vitro	117
3.2 Primeira avaliação do uso de <i>Trichoderma</i> associado ou não com fungicidas no manejo de cercosporioses no amendoim	118
3.3 Segunda avaliação do uso de <i>Trichoderma</i> associado ou não com fungicidas no manejo de cercosporioses no amendoim	127
4. DISCUSSÃO	137
5. CONCLUSÃO	145
6. REFERÊNCIAS	146

CAPÍTULO IV - Aplicação Pré-Colheita de *Trichoderma* para Manejo de Aflatoxinas na Cultura do Amendoim 152

1. INTRODUÇÃO	154
2. MATERIAL E MÉTODOS	155
2.1 Isolados fúngicos	155
2.2 Preparação do Inóculo Fúngico	155
2.3 Avaliação in vitro de espécies de <i>Trichoderma</i> quanto à atividade antagônica contra <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus niger</i>	156
2.4 Local experimento de campo	157
2.5 Determinação da concentração de Aflatoxina B ₁ em amendoim	159

2.6 Colonização de fungos nas plantas de amendoim	160
2.6 Análise estatística	161
3. RESULTADOS	162
3.1 Inibição do crescimento de <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus niger</i> em antagonismo in vitro com cepas de <i>Trichoderma</i> pela técnica de culturas pareadas	162
3.2 Concentração de Aflatoxina B ₁ no amendoim	164
3.3 Produtividade do amendoim	167
3.4 Colonização endofíticas em raízes de amendoim por <i>Aspergillus</i> , <i>Trichoderma</i> e outros microrganismos.....	170
4. DISCUSSÃO.....	172
5. CONCLUSÃO	177
6. REFERÊNCIAS	178
CAPÍTULO V – Considerações finais.....	181

CONTROLE BIOLÓGICO NA CULTURA DO AMENDOIM: O POTENCIAL DE *Trichoderma* spp. E FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O MANEJO DE PRAGAS E DOENÇAS

RESUMO GERAL

Esta tese de doutorado investigou o potencial e os desafios do uso de fungos entomopatogênicos e *Trichoderma* no manejo de pragas e doenças na cultura do amendoim. Com o objetivo de oferecer ferramentas sustentáveis e eficazes em conjunto ou não aos pesticidas químicos, este estudo apresenta três abordagens principais. No Capítulo II, foi investigado o uso de fungos entomopatogênicos, *Metarhizium*, *Beauveria* e *Cordyceps*, como endofíticos no controle de pragas larvais do amendoim. Descobrimos que a alimentação com plantas inoculadas com fungos resulta em uma menor taxa de crescimento larval, maior mortalidade e menores pesos larval e pupal em comparação com o controle, destacando o potencial desses fungos como agentes de controle biológico. No Capítulo III, foi avaliado a eficácia da combinação de *Trichoderma* com dois fungicidas comuns, Chlorothalonil e Difenconazole, no controle das cercosporioses no amendoim. Os resultados desse trabalho indicam que a combinação de *Trichoderma* com fungicidas proporcionaram um melhor controle de doenças e um rendimento de plantas superior em comparação com o uso isolado dos fungicidas. Este achado destaca o valor do *Trichoderma* no controle de doenças do amendoim, além de poder aumentar a eficiência da produtividade do amendoim associado aos fungicidas convencionais. Por fim, No Capítulo IV foi avaliado o uso de *Trichoderma* no controle da infecção pré-colheita de amendoins por *Aspergillus flavus*. A aplicação de *Trichoderma* resultou em uma menor contaminação por aflatoxinas comparado aos fungicidas, evidenciando seu potencial papel na garantia da segurança alimentar e aumento da produtividade da cultura do amendoim. Em conjunto, os resultados apresentados nesta tese destacam o papel crítico que os fungos entomopatogênicos e *Trichoderma* spp. podem desempenhar no manejo sustentável de pragas e doenças na cultura do amendoim, enquanto também apontam para os desafios que ainda precisam ser superados para a implementação eficaz dessas estratégias biológicas.

Palavras-chave: Biopesticidas, Amendoim, Micotoxinas, endofitismo.

BIOLOGICAL CONTROL IN PEANUT CROP: THE POTENTIAL OF *Trichoderma* spp. AND ENTOMOPATHOGENIC FUNGI FOR PEST AND DISEASE MANAGEMENT

GENERAL ABSTRACT

This doctoral thesis investigated the potential and challenges of using entomopathogenic fungi and *Trichoderma* in the management of pests and diseases in peanut cultivation. With the aim of providing sustainable and effective tools, either alone or in conjunction with chemical pesticides, this study presents three main approaches. In Chapter II, the use of entomopathogenic fungi, *Metarhizium*, *Beauveria*, and *Cordyceps*, as endophytes in controlling peanut larval pests was investigated. It was found that feeding on plants inoculated with fungi resulted in lower larval growth rates, higher mortality, and lower larval and pupal weights compared to the control, highlighting the potential of these fungi as biological control agents. In Chapter III, the effectiveness of combining *Trichoderma* with two common fungicides, Chlorothalonil and Difenoconazole, in controlling peanut cercosporiosis was evaluated. The results of this work indicate that the combination of *Trichoderma* with fungicides provided better disease control and higher plant yields compared to the use of fungicides alone. This finding underscores the value of *Trichoderma* in peanut disease control and its potential to enhance peanut productivity when used alongside conventional fungicides. Finally, in Chapter IV, the use of *Trichoderma* in controlling pre-harvest infection of peanuts by *Aspergillus flavus* was assessed. The application of *Trichoderma* resulted in lower aflatoxin contamination compared to fungicides, demonstrating its potential role in ensuring food safety and increasing peanut crop productivity. Taken together, the results presented in this thesis highlight the critical role that entomopathogenic fungi and *Trichoderma* spp. can play in the sustainable management of pests and diseases in peanut cultivation, while also pointing out the challenges that still need to be overcome for the effective implementation of these biological strategies.

Keywords: Biopesticides, Peanut, Mycotoxins, Endophytism.

CAPÍTULO I – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Amendoim (*Arachis hypogaea*) é uma fonte rica de proteína e uma cultura oleaginosa vital cultivada em mais de 100 países, com China, Índia e Estados Unidos liderando a produção (Faostat, 2023). O Brasil, principalmente em São Paulo, é um importante contribuinte na América do Sul (Conab, 2023).

Embora as lavouras de amendoim desempenhem um papel crucial na agricultura global, enfrentam desafios significativos devido a pragas e doenças que afetam tanto o rendimento quanto a qualidade (Waliyar et al., 2015).

Para atender à crescente demanda por alimentos, agricultores ainda dependem amplamente de fertilizantes químicos e pesticidas em práticas agrícolas intensivas (Sharma et al., 2020). No entanto, há uma crescente ênfase na busca por métodos de manejo de pragas e doenças mais sustentáveis e ecologicamente corretos na agricultura (Pretty, 2008).

O uso tradicional de produtos químicos para controlar esses problemas tem suscitado preocupações devido as questões ambientais e de saúde (Damalas e Eleftherohorinos, 2011). Por isso, tem havido um redirecionamento da atenção para métodos de controle biológico como alternativas sustentáveis (Kesavan e Swaminathan, 2008). Uma área de pesquisa promissora é a exploração do potencial de agentes de controle biológico, como fungos entomopatogênicos e *Trichoderma*, no manejo de pragas e doenças em lavouras de amendoim (Basu et al., 2021).

Entre as principais doenças que afetam as lavouras de amendoim, encontram-se as cercosporioses, conhecidas como mancha preta e mancha castanha, causadas por *Mycosphaerella arachidicola* e *Nothopassalora personata*, respectivamente. Essas doenças podem resultar em graves perdas de produtividade (Subrahmanyam et al., 1984). Além disso, pragas como *Enneothripes enigmaticus* e lagartas desfolhadoras representam ameaças significativas para a produtividade das lavouras de amendoim (Michelotto et al., 2012; Michelotto et al., 2015).

No entanto, devido à resistência das pragas aos produtos químicos, os

principais fabricantes de produtos químicos podem hesitar em investir no desenvolvimento de novos produtos devido ao tamanho relativamente pequeno do mercado de amendoim em comparação com outras culturas. Além disso, os custos iniciais de registro de produtos químicos e as restrições de resíduos de agroquímicos em mercados internacionais podem tornar essa abordagem insustentável a longo prazo.

Portanto, é necessário um esforço de pesquisa mais direcionado para aumentar o número e a acessibilidade de ferramentas sustentáveis no manejo integrado de pragas e doenças, garantindo a sustentabilidade a longo prazo dos sistemas de produção de amendoim. A dependência excessiva do controle químico pode tornar os sistemas de produção de amendoim vulneráveis a perdas de rendimento.

O fungo *Trichoderma* spp., por exemplo, demonstrou grande potencial como agente de controle biológico devido às suas propriedades antagonistas contra vários fitopatógenos do solo (Tyśkiewicz et al., 2022). Portanto, sua contribuição para o manejo de doenças em lavouras de amendoim é uma área de pesquisa em andamento (Zin e Badaluddin, 2020).

Além disso, fungos entomopatogênicos, especificamente dos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria*, têm a capacidade de colonizar plantas endofiticamente e protegê-las contra diversas pragas (Jaber e Enkerli, 2017; Vega et al., 2018).

Esta tese concentra-se na análise dos impactos desses fungos em pragas larvais desfolhadoras do amendoim, com ênfase nas diferenças nas taxas de crescimento larval, mortalidade, peso das pupas, consumo foliar e tempo de desenvolvimento larval.

Além disso, este estudo investiga a eficácia da combinação de *Trichoderma* spp. com fungicidas convencionais, Clorotalonil e Difenconazol, no controle de cercosporioses. Pesquisas anteriores reconheceram as propriedades de biocontrole do *Trichoderma* e seu potencial para melhorar a eficiência de fungicidas convencionais (Harman et al., 2004).

Outro aspecto crítico abordado nesta tese é o potencial do *Trichoderma* como agente de biocontrole na redução da infecção por *Aspergillus flavus* em amendoins durante a pré-colheita. *A. flavus* é conhecido por produzir aflatoxinas prejudiciais que representam riscos significativos para a saúde e a segurança alimentar (Kumar et al.,

2017).

Em resumo, esta tese visa explorar abrangentemente o potencial e os desafios do uso de fungos entomopatogênicos e *Trichoderma* spp. no manejo sustentável de pragas e doenças na cultura do amendoim.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do amendoim

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma planta oleaginosa de relevante importância econômica, podendo ser cultivada em todas as regiões do Brasil. Até o início dos anos 1970, o Brasil foi um importante produtor de amendoim, com São Paulo e Paraná sendo os principais estados produtores, responsáveis por 90% da produção nacional.

No entanto, na mesma década, vários fatores políticos e econômicos contribuíram para uma mudança na imagem da produção e consumo do amendoim no Brasil, com a expansão da soja ganhando destaque (Freitas et al., 2005; Freitas e Mendonça, 2016). O amendoim se encontra em ampla expansão no Brasil, principalmente pelas perspectivas de exportação, crescimento do mercado interno e ampliação das áreas de cana-de-açúcar para produção de etanol (Barreto, 2007).

A safra de 2021-2022 no Brasil produziu 746,7 mil toneladas de amendoim, um aumento de 149,8 mil toneladas em relação à safra anterior (Conab, 2023). O amendoim brasileiro possui destaque nas exportações. Em 2022, foram exportadas pouco mais de 285 mil toneladas de amendoim em grão, 11% a mais do volume registrado no ano anterior, representando US\$332 milhões, total 0,6% superior aos valores computados em 2021. (Conab, 2023).

O amendoim teve um impacto significativo na produção de óleo comestível do Brasil até que a safra de soja ganhou supremacia no mercado. Segundo dados da Seab (2023), O levantamento realizado em fevereiro de 2023, que foi o terceiro para a cultura do amendoim, apresentou resultados superiores aos da safra anterior, com um aumento de 6% na produtividade.

As estimativas mostraram que a área em produção estava 2,7% maior do que

na safra anterior, e a previsão de produção foi de 724,1 mil toneladas, com um aumento de 8,9% em relação à safra 2021/22. As cinco principais regiões de plantio nessa safra foram Tupã, Marília, Presidente Prudente, Jaboticabal e Assis, que representaram juntas 54,9% da produção paulista.

Devido ao sistema de produção rotativo, a maioria dos produtores de amendoim, incluindo pequenos e médios produtores, são arrendatários em áreas de renovação dos canaviais e pastagens. Nas áreas de produção de cana-de-açúcar, cerca de 15% a 20% da área plantada é destinada ao cultivo de amendoim a cada ano (Santos et al., 2021).

A cultura do amendoim tem despertado um crescente interesse econômico, uma vez que sua exploração comercial se mostra uma opção viável para a agricultura irrigada e possui um considerável potencial de expansão. O plantio do amendoim é recomendado além da renovação de canaviais, para recuperação de pastagens degradadas e integração lavoura-pecuária, o que o torna uma espécie com grande potencial no mercado agrícola (Macedo e Araujo, 2012).

Botanicamente, os amendoins são categorizados em três grupos principais: o tipo Virgínia abrange plantas com diferentes alturas de crescimento, incluindo baixas, semi-baixas e anãs, com colheita tardia e um ciclo longo de 120 a 140 dias, produzindo duas sementes por vagem.

Os tipos Valência e Espanhóis representam variedades que crescem de forma ereta ou semi-vertical e têm um período de desenvolvimento mais curto, cerca de 90 a 100 dias. As variedades do grupo Espanhol têm frutos com sementes de tamanho pequeno a médio, enquanto as vagens do grupo Valência contêm de 2 a 4 sementes em cada uma (Godoy et al., 2005).

De acordo com Santos et al. (2021), a planta do amendoim é herbácea, com hábito de crescimento ereto ou prostrado, anual, e seu ciclo varia entre 90 e 160 dias, com altura variando entre 15 e 50 cm, dependendo do hábito de crescimento. O amendoim é uma planta alotetraploide, que se reproduz principalmente por autopolinização (Santos et al., 2005).

A planta possui folhas compostas e pinadas, com dois pares de folíolos inseridos em um pecíolo de 4 a 9 cm. Os folíolos são dispostos de forma oposta e podem ter formas elípticas ou lanceoladas, dependendo da cultivar. Os estômatos

estão presentes nas duas superfícies das folhas, tanto na adaxial quanto na abaxial (Nogueira e Távora, 2005).

O amendoim é uma fonte versátil de nutrientes e tem várias aplicações, destacando-se o consumo in natura, seja na forma de grãos cozidos ou torrados. Além disso, é amplamente utilizado na produção de produtos como farinha, óleo e farelo, e também na indústria farmacêutica. Sua composição é rica em vitamina E e proteínas, tornando-o uma importante fonte de energia e aminoácidos na alimentação humana (Ramos e Barros, 2014).

2.2 Doenças do amendoim – Cercosporioses

As cercosporioses, representadas pelas doenças mancha castanha (*Cercospora arachidicola* Hori) e mancha preta (*Nothopassalora personata* - Berk. & M.A. Curtis) U. Braun, C. Nakash., Videira & Crous, são problemas fitossanitários que afetam significativamente a cultura do amendoim (*A. hypogaea* L.) (Meswaet et al., 2021).

As cercosporioses, também são conhecidas como manchas de cercospora, recebem diferentes nomes em regiões e países, como early e late leaf spots, pinta preta, mancha preta e castanha, viruela del mani, Tikka disease, Mycosphaerella leaf spots, entre outras denominações (Pio-Ribeiro et al., 2013).

A presença dessas doenças em áreas de cultivo pode acarretar prejuízos econômicos significativos de pelo menos 50% na produção em lavouras comerciais, e em campos de pesquisa, já foram relatadas perdas totais na produtividade de grãos devido à mancha-preta (Shokes e Culbreath, 1997).

Se o amendoim for continuamente cultivado na mesma área sem qualquer rotação de culturas, a gravidade dessas doenças pode aumentar significativamente, reduzindo o rendimento devido à queda de folhas (Parvin et al., 2022). Em alguns casos, a defoliação severa pode resultar em perdas de produção superiores a 70% (Parvin et al., 2022).

Ambas as doenças podem infectar qualquer parte da planta acima do solo, mas as manchas nas folhas são o sinal mais evidente. Os sintomas nas folhas geralmente aparecem entre 30 e 50 dias após o plantio, com manchas de cor castanha ou preta na superfície superior das folhas (Parvin et al., 2022).

Sob condições meteorológicas favoráveis, com elevadas precipitações pluviais e temperaturas adequadas na época de cultivo, esses patógenos tornam-se as mais importantes doenças da cultura, ocorrendo de forma generalizada em praticamente todos os campos de cultivo, variando em intensidade conforme o local e a época de plantio (Damicone, 2017).

Nas condições de cultivo em São Paulo, a cercosporiose tem se mostrado predominante e mais severa entre as doenças foliares do amendoim (Moraes e Godoy, 1997).

É raro encontrar uma cultura em fim de ciclo sem sintomas dessas doenças. Além disso, a desfolha precoce das plantas pode aumentar significativamente as perdas devido ao apodrecimento de vagens e ginóforos, especialmente em casos de atraso na colheita devido a excesso de chuvas, o que é relativamente comum no estado (Barreto, 2005).

A mancha-castanha e a mancha-preta conseguem sobreviver de um ciclo de cultivo ao outro por meio das chamadas "pontes verdes", que são tigueras de amendoim que nascem voluntariamente e permanecem na entressafra da cultura, permitindo que o fungo se alimente e se reproduza nesse período.

Além disso, as estruturas de sobrevivência desses fungos podem permanecer em vagens e sementes armazenadas. As infecções primárias têm origem nos conídios das tigueras, caules e outros tecidos contaminados, que são veiculados pela parte externa das sementes, servindo como meio de transporte (Pio-Ribeiro et al., 2013).

As infecções secundárias começam após a produção de inóculo pelas infecções primárias e sua subsequente disseminação. Essa disseminação ocorre através do vento, respingos de água, insetos e movimentação mecânica, como pessoas e maquinário agrícola.

Uma vez depositados na superfície da folha, os conídios germinam em aproximadamente 6 a 9 horas, formando tubos germinativos que penetram na folha por meio dos estômatos ou das células da epiderme. Dentro de 14 dias, os primeiros sintomas podem ser observados.

No controle das doenças na cultura do amendoim, entre outras medidas, são realizadas aplicações de fungicidas geralmente em intervalos de cerca de 15 dias, com início aos 40-45 dias após a semeadura. No entanto, essa abordagem tem gerado

problemas, como aplicações inadequadas em momentos cruciais para o controle das doenças (Ruas, 2014).

Segundo Moraes e Godoy (1997), o limite de 5 a 15% de folíolos infectados pela mancha-preta, obtidos por amostragens, pode ser usado como regra para indicar a data da primeira pulverização com fungicida.

No estudo conduzido por Ruas (2014) foi avaliado o fungicida Clorotalonil e uma combinação de Epoxiconazol + Piraclostrobina em intervalos de 15 dias em plantios localizados em Jaboticabal e Ibitinga, Estado de São Paulo. Concluiu-se que são necessárias pelo menos cinco aplicações de Epoxiconazol + Piraclostrobina, combinadas com Clorotalonil, para um controle eficiente das cercosporioses na cultura do amendoim.

No estudo realizado por Moraes et al. (2001), a eficácia de quatro fungicidas no controle da mancha preta e verrugose do amendoim foi avaliada. Foram testados tratamentos convencionais com quatro pulverizações fixas e um controle monitorado, onde as pulverizações ocorreram quando a incidência de doenças atingiu níveis específicos.

Os fungicidas triazóis (Tebuconazole, Difenconazole e Propiconazole) no controle monitorado reduziram significativamente o número de aplicações necessárias em comparação ao controle convencional, com resultados notáveis.

O Tebuconazole foi mais eficaz contra a mancha preta, enquanto o Difenconazole se destacou no controle da verrugose. Isso sugere que o controle monitorado com triazóis pode ser uma abordagem eficiente para reduzir o uso de fungicidas sem comprometer os rendimentos da cultura. Barreto et al. (2007) observaram, em ensaio realizado, que o fungicida Clorotalonil sozinho ou em mistura proporcionou melhor controle das cercosporioses e maior produção.

A caracterização dos patógenos causadores das cercosporioses é fundamental para um melhor entendimento da diversidade genética e da virulência desses fungos. Estudos moleculares têm sido realizados para identificar as espécies de *Cercospora* presentes nas plantações de amendoim (Orner et al., 2015).

Essas análises têm permitido aprofundar o conhecimento sobre a epidemiologia das cercosporioses e as estratégias de manejo mais adequadas.

No estudo de Souza (2018) foram testados fungicidas para o controle das

doenças mancha-castanha e mancha-preta no amendoim, incluindo Oxicloreto de Cobre SC, tanto isoladamente como em combinação com outros produtos.

Os resultados mostraram que o Oxicloreto de Cobre SC foi eficaz na inibição da germinação de conídios da mancha-preta, sendo comparável ao fungicida Chlorothalonil. No entanto, seu uso isolado não foi totalmente satisfatório.

Quando combinado com outros fungicidas em campo, o Oxicloreto de Cobre SC demonstrou ser uma medida complementar eficaz no controle das cercosporioses na cultura do amendoim.

Não foram observadas melhorias significativas com a adição de silício. O autor sugere que o uso estratégico do Oxicloreto de Cobre SC, em conjunto com outros fungicidas, pode ser útil no manejo dessas doenças, mas o controle eficaz requer abordagens múltiplas.

Em outro estudo conduzido por Oliveira et al. (2017) sobre as cercosporioses no amendoim, foram avaliadas em quatro genótipos de amendoim os tratamentos com os fungicidas Clorotalonil e Oxicloreto de Cobre, além de um grupo de controle sem fungicida. As avaliações revelaram que uma única aplicação de fungicida não foi eficaz para reduzir os danos causados pelas cercosporioses em todos os genótipos.

No entanto, o Clorotalonil teve um desempenho ligeiramente melhor do que o Oxicloreto de Cobre em um dos genótipos (2013-425 OL). Os autores destacam a dificuldade de controlar as cercosporioses com uma única aplicação de fungicida, sendo necessárias estratégias adicionais para gerenciar essas doenças.

Em outro estudo, Fonseca et al. (2020) testaram alguns adjuvantes em conjunto com fungicidas para controlar as cercosporioses. O programa que incluiu os adjuvantes Difere® e Oxiativo® resultaram nas maiores produtividades e mostraram-se eficazes no controle da doença. A adição de Oxiativo® as aplicações melhoraram o controle das cercosporioses no amendoim.

A suscetibilidade e resistência das cultivares de amendoim às cercosporioses também têm sido objeto de pesquisa. Ensaio em casa de vegetação e em campo têm demonstrado que algumas variedades são mais resistentes a essas doenças do que outras, indicando a possibilidade de selecionar genótipos com maior tolerância às infecções (Favero, et al., 2009). Essa abordagem pode ser útil no desenvolvimento de novas cultivares de amendoim que sejam menos afetadas pelas cercosporioses.

O manejo eficiente das cercosporioses no amendoim envolve a combinação de várias estratégias, visando reduzir a incidência e severidade das doenças. O uso de cultivares resistentes, práticas adequadas de manejo agrônomo, como a rotação de culturas e o controle de plantas voluntárias, além do uso de fungicidas e de agentes de controle biológico têm sido propostos como medidas de controle (Cerioni et al., 2015).

A combinação dessas estratégias pode contribuir para a redução do impacto das cercosporioses nas lavouras de amendoim. Além disso, a prevenção e monitoramento constante da presença das cercosporioses em áreas de cultivo são essenciais para uma intervenção rápida e eficaz.

A detecção precoce das doenças permite a adoção de medidas de controle adequadas, evitando a disseminação dos patógenos e minimizando os danos à cultura (Silva et al., 2019).

Em um cenário de mudanças climáticas e crescente pressão para a redução do uso de agroquímicos, o desenvolvimento de cultivares de amendoim mais resistentes às cercosporioses e o uso de práticas sustentáveis de manejo são estratégias fundamentais para a viabilidade e sustentabilidade da produção agrícola.

A pesquisa contínua nessa área é essencial para o desenvolvimento de novas tecnologias e abordagens eficazes no controle das cercosporioses no amendoim, garantindo a oferta de alimentos seguros e de qualidade para a população.

2.3 Aflatoxinas no amendoim

O amendoim é um dos hospedeiros mais suscetíveis ao *Aspergillus flavus*, resultando em contaminação por aflatoxinas. As aflatoxinas têm atraído atenção global devido aos seus efeitos toxicológicos em seres humanos e animais.

Elas podem causar defeitos no desenvolvimento, supressão do sistema imunológico, câncer e até mesmo morte em casos graves de exposição aguda (Nakai et al., 2008; Bhat et al., 2010; Michael et al., 2010).

Os fungos *A. flavus* e *Aspergillus parasiticus* são os principais produtores de aflatoxinas (Klich, 2007; Varga et al., 2011). A contaminação por aflatoxinas em amendoins pode ocorrer no campo antes da colheita, durante a colheita ou após a

colheita e é afetada por muitos fatores.

Os fatores de pré-colheita incluem cultivares de amendoim, tipo de solo, espécies de fungos, clima, condições climáticas, práticas agrícolas, produção de fitoalexinas, atividade da água e maturidade dos amendoins; o momento ideal de colheita e a secagem oportuna dos amendoins são os principais fatores durante a colheita; as condições de armazenamento e transporte são os principais fatores que resultam na contaminação por aflatoxinas após a colheita dos amendoins (Cotty e Jaime-Garcia, 2007).

Até o momento, foi identificado 18 variantes das aflatoxinas, sendo três delas particularmente significativas em relação à segurança alimentar: a série B (AFB1 e AFB2), a série G (AFG1 e AFG2) e a série M (AFM1 e AFM2). As aflatoxinas são produzidas principalmente por dois tipos de fungos, *A. flavus* e *A. parasiticus*.

A. flavus gera aflatoxinas da série B, enquanto *A. parasiticus* é responsável tanto pelas da série B quanto pelas da série G. A designação "B" e "G" está relacionada às cores de fluorescência azul e verde que essas aflatoxinas exibem quando expostas à luz ultravioleta (Norlia et al., 2019). Os números em subscrito indicam as aflatoxinas principais e secundárias, respectivamente (Dhanasekaran et al., 2011).

Dentre essas aflatoxinas, a AFB1 é classificada como um carcinógeno do Grupo 1 pela IARC (1993) devido às sólidas evidências de sua capacidade de causar câncer em seres humanos. Quando os animais consomem alimentos contaminados com AFB1 e AFB2, essas substâncias são metabolizadas em seus corpos, resultando na presença de derivados hidroxilados, conhecidos como AFM1 e AFM2, no leite produzido por esses animais (Norlia et al., 2019).

Na década de 1980, muitos pesquisadores tentaram encontrar cultivares de amendoim resistentes à contaminação por *A. flavus* e à formação de aflatoxinas, mas falharam devido à complexidade dos fatores que influenciam o crescimento e a distribuição do fungo e a formação de aflatoxinas (Azaizeh et al., 1989). Nos últimos anos, a tecnologia transgênica tem sido amplamente utilizada para melhorar as cultivares. Amendoins transgênicos contendo o gene Bt (*Bacillus thuringiensis*) apresentaram níveis significativamente mais baixos de aflatoxinas do que amendoins não transgênicos em análises preliminares de dados transformados em logaritmo

(Ozias-Akins et al., 2002).

Guo et al. (2008) identificaram os genes relacionados à resistência em amendoins contra a infecção por *A. parasiticus* e subsequente contaminação por aflatoxinas, e desenvolveram um “microarray” de amendoim para identificar genes candidatos que conferem resistência à infecção por *A. flavus* (Guo et al., 2011). Além disso, a melhoria das cultivares na resistência a doenças pode reduzir significativamente a incidência de contaminação fúngica em comparação com as variedades não melhoradas (Mutegi et al., 2012).

As plantas de amendoins podem crescer em diferentes tipos de solo, como solo arenoso leve e solos mais pesados. O solo arenoso leve beneficia a rápida proliferação de *A. flavus*, especialmente em condições de seca no período de crescimento posterior. Por outro lado, solos mais pesados podem reduzir o nível de contaminação por aflatoxinas em amendoins cultivados devido à maior capacidade de retenção de água (Torres et al., 2014).

O solo é um reservatório de diversos microrganismos, incluindo fungos, e os amendoins estão em contato direto com populações de fungos aflatoxigênicos (Horn e Pitt, 1997). Fungos contaminantes comuns de amendoins incluem espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Youssef et al., 2008). Muitos estudos relataram que *A. flavus* e *A. parasiticus* são as duas espécies de fungos intimamente relacionadas que invadem amendoins e subsequentemente os contaminam com aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (Vaamonde et al., 2003; Mutegi et al., 2012).

A presença de outros fungos, como espécies de *Penicillium* e *Fusarium*, reduz a produção de aflatoxinas devido à inibição competitiva (Horn e Dorner, 1998). Além disso, diferentes tipos morfológicos da mesma espécie também afetam a contaminação por aflatoxinas em amendoins, como *A. flavus*, que possui dois tipos, as cepas S e L. A incidência da cepa S de *A. flavus* tem uma forte relação com a contaminação de amendoins por aflatoxinas, enquanto a cepa L não apresentou correlação positiva com os níveis totais de aflatoxinas em amendoins (Mutegi et al., 2012).

Marsh e Taylor (1958) relataram que a contaminação por aflatoxinas ocorreu na maioria das áreas de cultivo, mas a incidência mais alta de aflatoxinas estava nas regiões mais quentes e úmidas e seguia o mesmo padrão geográfico.

O fungo *A. flavus* pode ser isolado do solo em todas as zonas climáticas, sendo isolado com mais frequência em zonas de temperatura mais elevada do que em zonas tropicais ou de temperatura mais fria. É bastante raro em latitudes acima de 45° (Klich, 2002). Portanto, a contaminação por aflatoxinas em amendoins é frequentemente encontrada em latitudes abaixo de 35° (Logrieco e Visconti, 2004).

Sanders e colegas (1985) descobriram que a contaminação por aflatoxinas nem sempre está diretamente correlacionada com a incidência de invasão por *A. flavus*. Cole et al. (1985) sugeriram que, após a invasão de fungos aflatoxigênicos, o crescimento dos fungos e a produção de aflatoxinas só podem ocorrer quando um mecanismo de resistência natural se quebra como resultado do estresse ambiental (seca e alta temperatura). A seca e o estresse térmico são fatores comuns na contaminação por aflatoxinas em amendoins (Craufud et al., 2006).

Cole et al. (1984) relataram que o estresse por seca e a temperatura do solo de 29 °C próximo aos 100 dias resultaram no maior número de amendoins comestíveis colonizados e altos níveis de aflatoxinas. O estresse de final de temporada e a temperatura do solo elevada são mais benéficos para a promoção da contaminação por aflatoxinas (Bankole et al., 2006).

A razão para isso é que o estresse por seca induz um aumento significativo do aminoácido prolina nas plantas, o que pode aumentar a produção de aflatoxinas (Payne e Hagler, 1983). Portanto, a precipitação adequada pode controlar ou reduzir a produção de aflatoxinas em amendoins. Além disso, a contaminação foi encontrada principalmente em áreas onde os amendoins são cultivados sob condições de chuva em comparação com aqueles cultivados sob irrigação (Reddy et al., 2003).

Práticas agrícolas inadequadas, incluindo rotação de culturas, preparo do solo, data de plantio, irrigação e fertilização, também podem aumentar a incidência de *A. flavus* e a contaminação por aflatoxinas em amendoins (Torres et al., 2014). A contínua cultura de amendoins na mesma terra pode resultar na alta infecção por fungos e contaminação por aflatoxinas (Ortiz et al., 2011).

A rotação de culturas pode reduzir a taxa de sobrevivência entre safras de diferentes espécies/cepas, especialmente se envolver culturas que não são hospedeiras para espécies de *Aspergillus* (Mutegi et al., 2012). No entanto, os efeitos da rotação de culturas na contaminação por aflatoxinas dependem do ambiente de

plantio; por exemplo, em um ambiente semiárido, as populações de *Aspergillus* podem ser muito altas, e a rotação de culturas pode ter pouca influência na atividade fúngica (CAC, 2004).

Em áreas não inoculadas e não pulverizadas com inseticidas, uma população densa de plantas ou a redução da fertilização parecem ter uma influência positiva na incidência de contaminação por aflatoxinas (Anderson et al., 1995).

Os insetos podem desempenhar um papel importante na contaminação por aflatoxinas, pois quase todas as aflatoxinas foram encontradas em áreas danificadas por insetos. Os insetos danificam o tecido dos amendoins, criando portais de entrada para o fungo e, em seguida, levam à produção elevada de aflatoxinas nos amendoins (Anderson et al., 1995).

Muitos estudos relataram que alguns inseticidas e fungicidas podem inibir o crescimento de fungos aflatoxigênicos e subsequente biossíntese de aflatoxinas no campo (D'Mello et al., 1998; Lee et al., 2001; Dorner et al., 2003). Bowen e Mack (1993) utilizaram inseticida para tratar amendoins durante o cultivo e reduziram os níveis de infecção por *A. flavus* e contaminação por aflatoxinas.

Além disso, o plantio precoce no momento ideal, o plantio racional, a fertilização científica e uma gestão adequada do campo são necessários para reduzir a contaminação por aflatoxinas em amendoins.

Fitoalexinas são substâncias antimicrobianas sintetizadas por plantas que se acumulam rapidamente em áreas de infecção por patógenos. Embora a natureza química das fitoalexinas não tenha sido determinada, foi demonstrado que os amendoins produzem fitoalexinas quando desafiados por várias espécies de fungos, incluindo *A. flavus* (Aguamah et al., 1981; Wotton e Strange, 1985).

Foi verificado já em 1972 que a resistência de vagens imaturas de amendoim a fungos era devida a fitoalexinas produzidas em grandes quantidades em resposta à infecção por fungos (Vidhyasekaran et al., 1972).

Enquanto os amendoins tiverem a capacidade de produzir fitoalexinas, eles não serão contaminados com aflatoxinas (Dorner et al., 1989). Em amendoins imaturos, as aflatoxinas não se formam até que a produção de fitoalexinas cesse em plantas estressadas pela seca (Dorner et al., 1989).

A atividade da água (*aw*) dos grãos de amendoim parece ser o fator mais

importante no controle da capacidade dos grãos de produzir fitoalexinas. Os amendoins produzem fitoalexinas suficientes em aw elevada ($> 0,97$) para inibir o crescimento de *A. flavus* e subsequente contaminação por aflatoxinas.

À medida que a aw dos grãos diminui, devido à seca prolongada, a capacidade desses grãos de produzir fitoalexinas também diminui e, eventualmente, se perde (aw $< 0,95$) (Dorner et al., 1989).

A contaminação de pré-colheita aparece primeiro e é mais concentrada em grãos menores e imaturos. Vários estudos mostraram consistentemente que os níveis de invasão por *A. flavus* e contaminação por aflatoxinas são mais altos em grãos menores e mais imaturos do que em grãos maduros (Hill et al., 1983; Cole et al., 1985; Sanders et al., 1985).

Os amendoins imaturos perdem a capacidade de produzir fitoalexinas mais rapidamente do que os amendoins maduros, levando à contaminação precoce. Além disso, os amendoins maduros têm resistência sustentada à contaminação por aflatoxinas, mesmo após o desaparecimento da produção de fitoalexinas (Dorner et al., 1989). A contaminação por aflatoxinas pode ocorrer se os amendoins não forem colhidos a tempo ou se forem colhidos mecanicamente (Cole et al., 1995; Torres et al., 2014).

O momento da colheita depende da maturidade dos amendoins e das condições climáticas durante a colheita. Vagens muito maduras ou imaturas na colheita podem levar à alta contaminação por aflatoxinas no produto final. A colheita em clima seco não resulta em contaminação por aflatoxinas, mas é frequentemente encontrada em clima muito úmido (Kabak et al., 2006).

Danos mecânicos aos grãos durante a escavação e debulha dos amendoins os tornam muito mais vulneráveis à invasão de fungos e subsequente contaminação por aflatoxinas (Heathcote e Hibbert, 1978).

Em geral, teores de umidade nos grãos de 10% ou mais em amendoins pós-colheita estão sujeitos à produção de aflatoxinas. A secagem oportuna e a manutenção em níveis seguros de umidade podem controlar eficazmente a contaminação por aflatoxinas de amendoins após a colheita (Torres et al., 2014).

Diener e Davis (1970) descobriram que a produção de aflatoxinas pode ser

prevenida por meio de secagem rápida para ou abaixo de a_w de 0,83 para amendoins, ou armazenamento a um teor de umidade abaixo de 10%, com $a_w < 0,78$ (Dorner et al., 1989). Portanto, o controle eficaz da contaminação por aflatoxinas em amendoins deve incluir secagem e armazenamento adequados.

Aflatoxinas não são degradadas pelo cozimento ou processamento normal de amendoins, e produtos processados, como óleo de amendoim, pasta de amendoim e produtos de panificação, podem conter aflatoxinas (Norlia et al., 2019). Portanto, é importante realizar análises de aflatoxina em produtos processados de amendoim para garantir a segurança alimentar.

2.4 Insetos pragas no amendoim

O amendoim (*A. hypogaea* L.) é uma cultura amplamente cultivada e de grande importância econômica, porém, enfrenta inúmeros desafios relacionados ao ataque de pragas, as quais podem causar desde danos pontuais até a completa destruição das plantas, resultando em perdas significativas na produção.

Dentre as pragas relatadas, mais de 360 espécies de insetos têm sido identificadas afetando a cultura do amendoim em diferentes localidades e períodos (Michelotto e Carrega, 2019).

No Brasil, cerca de 20 espécies de insetos são citadas como pragas que atacam o amendoim em distintas fases de desenvolvimento das plantas. As perdas decorrentes da presença desses insetos podem ocorrer tanto de forma direta como indireta. Na interferência direta, os insetos se alimentam das folhas, caules, raízes, vagens ou sementes, comprometendo o crescimento, desenvolvimento e, consequentemente, a produtividade da cultura (Michelotto e Carrega, 2019).

De fato, é comum que os insetos, ao se alimentarem das partes das plantas, causem perdas consideráveis no rendimento do amendoim, podendo alcançar valores superiores a 50%. No entanto, além desses danos diretos, alguns insetos podem atuar como vetores de vírus ou doenças, amplificando os prejuízos.

Um exemplo notável é a ocorrência do inseto tripes transmitindo as espécies Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) e Groundnut ringspot tospovirus (GRSV) em áreas comerciais de cultivo de amendoim no Brasil (Michelotto e Carrega, 2019). A

presença dessa doença ocasionou perdas estimadas de até 38% na produtividade quando afetou cerca de 40% das plantas cultivadas.

Nesse contexto, o controle das pragas torna-se essencial para mitigar os impactos negativos na produção de amendoim. Estratégias integradas de manejo, envolvendo medidas preventivas, monitoramento eficiente e a aplicação criteriosa de métodos de controle adequados, são cruciais para reduzir os danos e garantir a sustentabilidade da cultura.

Além disso, é fundamental o contínuo estudo e aprimoramento das práticas de manejo para enfrentar os desafios emergentes no controle de pragas, contribuindo para a viabilidade e competitividade do cultivo de amendoim no cenário agrícola brasileiro e global.

2.4.1 Tripes

Cerca de três espécies de insetos pertencentes à família Thripidae ocorrem com mais frequência na cultura do amendoim no Brasil, entre eles, *Caliothrips brasiliensis*, *Frankliniella schultzei* e *Enneothrips enigmaticus* sp. n. (Thysanoptera: Thripidae), conhecido erroneamente como *Enneothrips flavens* Moulton, conforme descrito por Lima et al. (2022).

Esses insetos são pequenos, com corpo alongado e asas franjadas, não ultrapassando 2 mm de comprimento. As formas jovens são amareladas, enquanto os adultos possuem coloração escura. Eles habitam folíolos fechados e se alimentam raspando e sugando a seiva. As fêmeas colocam os ovos no interior dos tecidos das folhas, completando seu ciclo em 13 dias.

A espécie *E. enigmaticus*, encontrada nos ponteiros do amendoim, é responsável por causar estrias e deformações nos folíolos, causando grandes prejuízos à cultura. Por outro lado, *C. brasiliensis* é frequentemente encontrada na face superior das folhas, provocando pequenas pontuações, mas aparentemente não possui importância econômica significativa em condições de campo devido à facilidade com que é lavada pelas chuvas.

O *E. enigmaticus* é uma praga significativa na indústria brasileira de amendoim. A espécie é normalmente encontrada na parte superior das plantas de amendoim e é responsável pelas estrias e deformações nas folhas, causando danos significativos à

cultura. São insetos minúsculos, com comprimento máximo de 2 mm. Enquanto os adultos são pretos e possuem asas plumosas, as versões jovens são amareladas. Eles sobrevivem nas folhas fechadas, raspando e sugando a seiva que flui.

De acordo com Mound e Teulon (1995), o ciclo de vida de *E. enigmaticus* dura cerca de 13 dias. Ele inclui estágios de ovo colocados dentro dos tecidos das folhas, duas fases juvenis que se alimentam ativamente (ninfas I e II), duas fases quiescentes (pré-pupa e pupa) e a fase adulta. Quando perturbadas, tanto as pré-pupas quanto as pupas podem migrar.

Nas gemas apicais das plantas de amendoim, tanto as ninfas quanto os adultos da espécie *E. enigmaticus* se alojam, resultando em estrias prateadas e deformações nas folhas e causando danos graves à cultura (Rossetto et al., 1968).

A variação de impacto no amendoim para essa praga conforme relatado na literatura, é de 10 a 75%. Observou-se que a espécie *E. enigmaticus* é mais prejudicial nas safras de amendoim "das águas" em comparação com as safras "da seca". O período crítico em que o tripes tem maior impacto na cultura do amendoim ocorre entre 25 e 60 dias após o plantio.

Entre os cultivares estudados, foram identificados alguns como resistentes ao ataque de *E. enigmaticus*, incluindo IAC-Poitara, IAC-Oirã, IAC-Tupã, IAC-Caiapó, IAC-Jumbo, Botutatu e Tatu. Notavelmente, os cultivares IAC-Caiapó e IAC-Jumbo apresentaram a menor infestação, sugerindo a presença de resistência a *E. enigmaticus* nessas variedades (Gabriel, 2016).

Os tripes atacam as folhas jovens das pontas das plantas, raspando-as e se alimentando da seiva que exsuda, criando deformações e estrias que se refletem em perdas de produção, de acordo com Gallo et al. (2002). A literatura apresenta dados contraditórios (variando de 10 a 75%) sobre o efeito dos tripes prateados no rendimento do amendoim.

No entanto, concordam que a praga é bastante importante do ponto de vista econômico. Os inseticidas, que podem precisar ser aplicados de quatro a sete vezes, dependendo do nível de infestação e cultivar, são o principal método de controle de pragas. O uso de variedades resistentes a insetos é a melhor estratégia de controle, pois mantém a praga abaixo dos níveis que causam danos econômicos, não polui o meio ambiente, não cria desequilíbrios e reduz o custo do tratamento fitossanitário

(Lara, 1991).

A forma mais eficaz de controlar pragas é usando plantas resistentes a insetos e ácaros; no entanto, para serem eficazes, essas cultivares devem ser competitivas no mercado (Campbell e Wynne, 1980).

Segundo Campbell e Wynne (1980), plantas de amendoim com baixa resistência podem reduzir o dano causado por insetos em 10 a 35% em comparação com uma cultivar suscetível, enquanto plantas com resistência moderada podem reduzir o dano de 35 a 65%, e plantas com alta resistência podem apresentar reduções de mais de 65%.

Segundo Godoy et al. (1999), a resistência de genótipos aos tripes prateados ainda não foi investigada, pois o inseto (*E. enigmaticus*) não é amplamente considerado uma praga economicamente significativa em muitos outros países, como é no Brasil. Em outras nações, espécies de tripes contribuem para danos indiretos, atuando como vetores virais em amendoim, mesmo que não contribuam significativamente para o dano direto.

Lynch e Mack (1995) incluíram várias publicações que avaliaram a resistência dos cultivares ou acessos de germoplasma aos tripes. O tripe *F. schultzei* (Trybom), mostrou resistência à cultivar Robut 33-1 na Índia. A resistência viral dessa cultivar foi testada por meio de cruzamentos.

Nos Estados Unidos, Leuck et al. (1967) estudaram o controle de tripes por meio de cultivares resistentes. Eles descobriram que, entre as cultivares testadas, aquelas dos grupos espanhol, argentino e Starr foram pouco atacadas em comparação com as outras cultivares testadas. Eles foram mais resistentes ao ataque de *F. fusca* do que o grupo Virginia.

Poucos esforços foram feitos no Brasil para criar uma cultivar resistente aos tripes. A pesquisa busca detectar resistência em cultivares de amendoim previamente comercializadas. De acordo com Gabriel et al. (1996), variedades precoces como Tatu são mais suscetíveis ao ataque de tripes e, conseqüentemente, precisam de um manejo mais cuidadoso contra tripes do que os tipos de ciclo longo, como IAC Caiapó e IAC Jumbo.

Os genótipos Makap e Altika tiveram as menores infestações de *E. enigmaticus*, de acordo com Boiça Junior et al. (2012), provavelmente devido a

características de resistência a insetos. Ao comparar cultivares de amendoim no campo, Moraes et al. (2005) e Boiça Junior et al. (2012) descobriram que a cultivar IAC Caiapó apresentava resistência a tripes do tipo "tolerância".

Os autores Janini et al. (2011) estudaram a ocorrência e os danos causados por *E. enigmaticus* em diferentes acessos de espécies silvestres, anfidiplóides e um cultivar comercial de amendoim em condições de campo. Foram realizadas avaliações periódicas da presença do inseto e dos danos nas plantas ao longo do período do experimento. Os genótipos de espécies silvestres e alguns anfidiplóides mostraram menor infestação e danos causados pelo tripes, enquanto o anfidiplóide KG 30097 X V 15076 e a cultivar IAC Runner 886 apresentaram os maiores níveis de infestação e danos da praga.

De modo geral, plantas de amendoim com baixa resistência a insetos podem reduzir o dano de 10 a 35% em comparação com uma cultivar suscetível; plantas com resistência moderada a insetos podem reduzir o dano de 35 a 65%; e plantas com alta resistência a insetos podem apresentar reduções superiores a 65% (Campbell e Wynne, 1980).

Segundo Godoy et al. (1999), a resistência de genótipos aos tripes prateados ainda não foi investigada, pois o inseto (*E. enigmaticus*) não é amplamente considerado uma praga economicamente significativa em muitos outros países, como é no Brasil.

No contexto do controle de *E. enigmaticus*, diversas estratégias têm sido adotadas para mitigar seus danos em plantações de amendoim. O uso de defensivos tem se mostrado eficaz, podendo incluir tratamentos de sementes com Tiametoxan ou Imidacloprid, seguidos de pulverizações foliares quinzenais com defensivos do grupo Neonicotinóides ou organofosforados, iniciando aproximadamente 30 dias após a semeadura (Godoy et al., 2014).

Ademais, monitoramento regular das plantações e amostragem das injúrias nos folíolos permitem identificar a presença do inseto e possibilitam a tomada de decisão sobre a necessidade de realizar pulverizações químicas. Recomenda-se realizar a aplicação quando aproximadamente 30% dos folíolos estiverem infestados para o amendoim rasteiro, e 40% para o amendoim ereto (Godoy et al., 2014).

Essas medidas são fundamentais para o manejo eficiente da praga e garantia

da produtividade do cultivo do amendoim. Souza (2019) avaliou algumas estratégias de controle para *E. enigmaticus* no amendoim. Observou-se que os tratamentos com silício via foliar e nível de controle de 30% de infestação reduziram a aplicação de inseticidas e aumentaram a produtividade nas cultivares IAC 503 e IAC Top Verde.

A cultivar Runner IAC 886 foi mais suscetível à infestação. Outros autores, Nogueira et al. (2019) avaliaram o impacto do *E. enigmaticus* em quatro cultivares de amendoim de crescimento rasteiro e cinco de crescimento ereto durante a safra das águas em dois anos. Foram adotadas medidas de infestação e danos causados pela praga, bem como a produtividade das plantas.

Os resultados indicaram que independentemente do cultivar, as maiores infestações de *E. enigmaticus* ocorreram por volta dos 60 aos 67 dias após o plantio. As cultivares IAC Caiapó e IAC Runner 886 apresentaram as menores infestações da praga.

2.4.2 Lagartas desfolhadoras

No Brasil, a cultura do amendoim é afetada por diversos lepidópteros desfolhadores, e a espécie *Stegasta bosqueella* (Chambers) (Lepidoptera: Gelechiidae) é a mais comum, outras espécies que normalmente ocorrem são *Anticarsia gemmatalis* Hueb., 1818 (Lepidoptera, Noctuidae), *Stylopalpia costalimai* Almeida, 1960 (Lepidoptera, Pyralidae), *Chrysodeixis includens*, Mocis latipes (Guen., 1852) (Lepidoptera, Noctuidae), *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) e lagartas do gênero *Spodoptera* Guenée, Lepidoptera: Noctuidae), que são consideradas importantes devido aos prejuízos causados, ocorrência generalizada e elevados níveis populacionais (Calcagnolo et al., 1974; Gallo et al., 2002; Janini et al., 2010; Janini, 2011; Gabriel, 2016).

Em outros países, indivíduos do gênero *Spodoptera* também aparecem em grandes populações e merecem atenção.

Por exemplo, nos Estados Unidos, altas infestações de *Spodoptera exigua* (Hübner), *Spodoptera omithogalli* (Guenée), *Spodoptera litura* (Fab.) e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) foram relatadas (Kharboutli e Mack, 1993; Nigude et al., 2018), e na Índia, o inseto mais prejudicial à cultura de

amendoim é *S. litura* (Tiwari et al., 2008).

A presença de indivíduos do gênero *Spodoptera* na cultura sugere que, embora secundários, surtos podem ocorrer ocasionalmente. Queiroz (2013) estudou a resistência de cultivares de amendoim à praga *S. frugiperda*. O estudo foi dividido em duas etapas: na primeira, foram avaliados a atratividade e a não-preferência alimentar de lagartas recém-eclodidas em sete cultivares de amendoim, sendo observado que alguns cultivares apresentaram compostos deterrentes que conferiram resistência do tipo não-preferência à praga.

Na segunda etapa, foram realizados estudos da biologia de *S. frugiperda* em seis cultivares de amendoim, constatando-se que alguns cultivares foram mais atrativos e suscetíveis à praga, enquanto outros apresentaram mecanismos de resistência do tipo antibiose.

Os resultados indicaram que IAC-Caiapó e IAC-Tatú-ST foram os cultivares mais atrativos e de maior preferência para alimentação, enquanto IAC 505 e Iapar 25 (Tição) apresentaram menor atratividade e não-preferência para alimentação devido a compostos deterrentes. Os cultivares Runner IAC 886 e IAC-Caiapó mostraram mecanismo de resistência moderada do tipo antibiose a *S. frugiperda*.

Em outro estudo, Bello (2015) avaliou fatores que influenciam a alimentação de *Spodoptera albula* em diferentes genótipos de amendoim, buscando identificar possíveis fontes de resistência do tipo não preferência para alimentação e antibiose. Foram conduzidos testes de desempenho alimentar com e sem chance de escolha, utilizando lagartas de primeiro e terceiro ínstar de *S. albula*.

Os resultados indicaram que os genótipos testados não apresentaram resistência do tipo não preferência para alimentação, mas os genótipos IAC Tatu e IAC Caiapó mostraram possíveis fontes de resistência do tipo antibiose.

O controle biológico tem sido pouco explorado no cultivo do amendoim, e a espécie *S. albula*, uma das pragas da cultura do amendoim, tem causado danos significativos nas lavouras. A falta de produtos específicos para o controle dessa praga pode levar ao uso indiscriminado de defensivos químicos ineficientes.

Nesse contexto, o controle biológico utilizando o agente *Bacillus thuringiensis* (Bt) tem se mostrado uma alternativa viável. O Bt produz toxinas que causam toxicidade no intestino das larvas de *S. albula*, e Gonçalves et al. (2018)

demonstraram a eficácia de bioinseticidas formulados a partir do Bt no controle dessa praga.

Embora haja variação entre os produtos avaliados, Gonçalves et al. (2018) mostraram potencial para controlar até 100% das larvas de *S. albula*. Os autores recomendaram o desenvolvimento de um produto específico para essa espécie, incorporando outros fatores de virulência, como esporos e toxinas Vip, para aumentar sua eficácia.

Os bioinseticidas à base de Bt são uma ferramenta promissora para o manejo de pragas emergentes no amendoim, sendo compatíveis com os princípios do manejo integrado de pragas (MIP) e podendo ser utilizados em conjunto com outros agentes de controle biológico e defensivos químicos (Gonçalves et al., 2018).

A lagarta-do-pescoço-vermelho (*S. bosqueella*) é um inseto de importância no cultivo do amendoim devido aos danos que causa às plantas. Seu ciclo biológico abrange diferentes estágios larvais e fase pupal, totalizando cerca de 20 dias (Matuo, 1973).

Na fase de larva, esses insetos possuem um aparelho bucal sugador-maxilar e alimentam-se de néctar das flores e água presente em gotas (Forti et al., 2016). As lagartas se abrigam e se alimentam de ramos e folíolos novos fechados do amendoim, deixando lesões e orifícios cercados de detritos escuros (Gabriel, 2016).

Quando perturbadas, as lagartas tendem a locomover-se rapidamente em busca de abrigo nas folhas ou brotos das plantas (Manley, 1961). À medida que progridem em seus instares larvais, alimentam-se do folíolo e, ao chegar ao quinto instar, migram para a parte inferior da planta, onde empupam no solo (Manley, 1961).

O entendimento desses aspectos biológicos é fundamental para compreender a ecologia da praga e desenvolver estratégias adequadas para seu manejo no cultivo do amendoim.

O controle da *S. bosqueella* e outras lagartas desfolhadoras é frequentemente realizado através da aplicação de defensivos à base de piretróides ou organofosforados. Para determinar o momento adequado para a aplicação desses defensivos, é realizado o monitoramento da praga.

Esse monitoramento pode ser feito visualizando os ponteiros ou verificando os folíolos ainda fechados, e recomenda-se a pulverização quando, em média, uma

lagarta é encontrada em cinco brotos (20%), indicando que o nível de controle recomendado foi atingido (Godoy et al., 2014).

Outra abordagem de controle alternativo e ecologicamente benéfico é a utilização de variedades resistentes a insetos. Esse método é ideal pois além de reduzir os níveis de danos econômicos, não causa poluição ambiental nem desequilíbrios e ainda diminui o custo de tratamentos fitossanitários (Lara, 1991).

Quando a cultivar comercial não é altamente resistente às pragas, uma opção é o uso de silício como indutor de resistência nas plantas. O silício tem se mostrado eficiente ao proporcionar maior grau de resistência aos insetos em diversas plantas (Marschner, 1995; Epstein, 2001). Essas estratégias de manejo são fundamentais para garantir a sanidade das culturas de amendoim e a sustentabilidade do meio ambiente.

O autor Souza (2019) analisou diferentes abordagens para o controle de *S. bosqueella* no amendoim. Os tratamentos com silício via foliar e nível de controle de 20% de infestação reduziram a aplicação de inseticidas e aumentaram a produtividade nas cultivares IAC 503 e IAC Top Verde. A cultivar Runner IAC 886 foi mais suscetível à infestação.

2.5 Agentes de Controle Biológico: Fungos entomopatogênicos

Microrganismos conhecidos como fungos entomopatogênicos são organismos parasitas capazes de infectar e matar artrópodes (Litwin et al., 2020).

Embora alguns deles também sejam utilizados em processos biotecnológicos, sua principal aplicação é como biopesticidas na agricultura ecológica, representando uma alternativa segura aos inseticidas químicos nocivos (Jaihan et al., 2016; Rios-Moreno et al., 2016). O fungo entomopatogênico foi uma das primeiras espécies a serem utilizadas no controle biológico de pragas.

A introdução do pássaro-mainá (*Acridothores tristis*) da Índia para Maurício em 1762, visando controlar o gafanhoto vermelho da cana-de-açúcar, *Nomadacris septemfasciata*, deu início à conhecida história de sucesso do controle biológico (Litwin et al., 2020).

Os fungos entomopatogênicos oferecem uma solução sustentável para o

Manejo Integrado de Pragas (MIP) devido à sua ampla presença global e variedade de espécies. Esses entomopatógenos são recomendados para o controle de insetos em diferentes fases de seus ciclos de vida, devido à sua ecologia amigável e persistência (Litwin et al., 2020).

Uma ampla variedade de espécies fúngicas de diversos tipos podem infectar insetos. Essas espécies patogênicas de insetos podem infectar seres humanos de diversas maneiras, incluindo infecções obrigatórias e facultativas.

De acordo com Samson et al. (1988) e Humber (1998), Zygomycota, Ascomycota e Deuteromycota contêm fungos entomopatogênicos. Entomophthorales em Zygomycota ou Hyphomycetes em Deuteromycota abrigam muitas das espécies de potenciais fungos entomopatogênicos.

A biologia e ecologia dos fungos entomopatogênicos têm sido amplamente estudadas (Steinhaus, 1964; Samson et al., 1988; Balazy, 1993). Não existe um único grupo monofilético de fungos entomopatogênicos. De acordo com Litwin et al. (2020), as espécies mais prevalentes na natureza são Ascomycota e Entomophthoromycota.

Sinha et al. (2016) afirmam que Ascomycota e Deuteromycota são subfilos. O número de gêneros entomopatogênicos são grandes, entre eles, incluindo *Aspergillus*, *Cordyceps*, *Metarhizium*, *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Paecilomyces* entre outros.

Os fungos entomopatogênicos são seres diversos e ecologicamente importantes. Por exemplo, espécies dos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria*, frequentemente encontradas no solo, controlam populações naturais de artrópodes e estabelecem conexões complexas com as plantas.

De acordo com Jaber e Enkerli (2017), eles podem ser endófitos que vivem nas raízes, caules e folhas das plantas. *Metarhizium* e *Beauveria*, demonstraram fornecer nitrogênio às plantas que é absorvido durante a colonização de insetos (Behie e Bidochka, 2014), promovendo assim o desenvolvimento das plantas (Rios-Moreno et al., 2016). *B. bassiana* foi registrado em associação endofítica com cerca de 25 espécies de plantas, suprimindo pragas e doenças (McKinnon et al., 2017; Vega, 2018).

B. bassiana pode colonizar raízes, folhas e brotos das plantas como endófito e epífito, tornando as plantas mais resistentes a insetos (Klieber e Reineke, 2016; Ramakuwela et al., 2020); ele também defende as plantas com sucesso contra

patógenos microbianos, reduzindo agentes causadores de doenças ou estimulando respostas de defesa das plantas (Moonjely et al., 2016).

Da mesma forma, *Lecanicillium* também protege as plantas contra doenças ao invadir as raízes das plantas e crescer na superfície das folhas, restringindo a disponibilidade de nutrientes e produzindo substâncias antimicrobianas. Isso também desencadeia respostas nas plantas. O fungo *C. fumosorosea*, por sua vez, não parece ter interações notáveis com as plantas dentre os fungos entomopatogênicos.

Isso é possível porque as espécies de *Cordyceps* são sensíveis a substâncias químicas liberadas pelas plantas e fazem parte do mecanismo de defesa das plantas contra doenças (Lacey et al., 2015; Zimmermann, 2008).

Alguns isolados de *C. fumosorosea* têm sido relatados como eficazes contra o nematoide das raízes *Meloidogyne javanica*, porém com taxas de infecção baixas, menores que 40%. Em laboratório, estufa ou campo, esse fungo entomopatogênico é principalmente utilizado para o controle biológico de insetos.

Fungos e bactérias que crescem dentro dos tecidos das plantas sem manifestar sinais de doença no hospedeiro são chamados endófitos (Wilson, 1995). É importante observar que, embora os fungos endofíticos sejam comuns em espécies de plantas, suas características e grau de colonização variam dependendo do tipo de tecido da planta (Mantzoukas e Eliopoulos, 2020).

Para a proteção de cultivos agrícolas, os papéis ecológicos desses fungos, que estão relacionados à sua atividade endofítica e competência na rizosfera, podem ser de imenso valor. Numerosos estudos demonstraram que os fungos entomopatogênicos são eficazes contra pragas de insetos e ácaros, além de melhorar a capacidade das plantas de responder a outros estressores bióticos.

Essa melhoria ocorre quando diversas ações biocidas produzem produtos químicos como inseticidas, antifúngicos, herbicidas e antivirais, ou quando a resistência sistêmica é induzida.

Esses mecanismos também proporcionam benefícios para situações de estresse abióticos, como o estresse salino (Tan e Zou, 2001) e a deficiência de ferro (Vega, 2018; Liao et al., 2014), além de fornecer vantagens para a nutrição das plantas (Qiu et al., 2014; Skinner et al., 2012), desenvolvimento das raízes (Vega, 2008; Tan e Zou, 2001; Strobel, 2003) e promoção do crescimento (Liao et al., 2014, Behie and

Bidochka, 2014, Sánchez-Rodríguez et al., 2016).

Os fungos entomopatogênicos endofíticos reduzem o dano às plantas por meio de uma variedade de métodos. Os exemplos mais frequentes documentados incluem a desaceleração do desenvolvimento da praga (Akutse et al., 2013; Akello e Sikora, 2012; Jaber e Araj, 2018), a diminuição da ingestão de alimentos pelos insetos (Russo et al., 2019; Russo et al., 2018; Manoussopoulos et al., 2019; McGee, 2002), menor sobrevivência das larvas (Quesada-Moraga et al., 2009; Vidal e Jaber, 2015; Batta, 2013) e menor taxa de reprodução (González-Mas et al., 2019a; González-Mas et al., 2019b).

No entanto, deve-se observar que diversos processos pouco estudados podem estar atuando nessas complexas relações tritróficas (fungo entomopatogênico - planta - inseto).

Dado que certos compostos são liberados durante a colonização endofítica de fungos entomopatogênicos, tanto pela planta hospedeira quanto pelos endófitos, essa interação não é acidental (Mantzoukas e Eliopoulos, 2020).

Em resposta à possível colonização endofítica, que é vista, pelo menos em seus estágios iniciais, como uma potencial ameaça patogênica, as plantas produzem diversos metabólitos secundários, como alcaloides, flavonoides, fenólicos e outros (Zaynab et al., 2018). Esses compostos também atuam como um mecanismo de defesa contra infecções por patógenos.

Portanto, os metabólitos secundários servem como uma barreira à colonização fúngica endofítica. Os fungos endofíticos criam enzimas de detoxificação e degradação para contornar essa barreira, como 1,3-glucanases, quitinases, amilases, lacases e celulasas.

As interações entre o fungo e seu hospedeiro inseto, incluindo aquelas relacionadas à patogenicidade, também são significativamente influenciadas pelos metabólitos fúngicos. Eles atuam como mediadores para comunicação intra ou interespecífica, ou como ferramentas para reduzir estressores bióticos e abióticos (Charnley et al., 2007).

Além disso, os endófitos criam uma variedade de metabólitos secundários amplamente utilizados como agroquímicos, antibióticos, antiparasitários e antioxidantes (Strobel, 2003).

Esses compostos incluem benzopirononas, ácidos fenólicos, quinonas e esteroides, que possuem uma estrutura bioativa distinta específica para cada espécie (Tan e Zou, 2001).

A síntese de metabólitos nas plantas hospedeiras cria oportunidades para a fabricação de produtos farmacêuticos à base de plantas. Embora isso tenha impulsionado descobertas terapêuticas baseadas em produtos naturais, nenhum endófito foi explorado até o momento como uma fonte substituta de metabólitos de plantas, já que a síntese in vitro desses compostos pelos fungos logo diminui.

O estudo das interações entre os endófitos, as plantas hospedeiras e os endófitos pode permitir que os endófitos produzam metabólitos vegetais por um período prolongado, reduzindo sua dependência das plantas para essas substâncias bioativas (Dash et al., 2018; Pava-Ripoll et al., 2011).

Os conídios dos fungos entomopatogênicos primeiro se desenvolvem em tubos germinativos, que posteriormente se desenvolvem em hifas. Com enzimas e/ou pressão mecânica, os fungos entram nas plantas através de aberturas naturais ou diretamente através das paredes celulares epidérmicas.

As hifas se desenvolvem assim que alcançam a planta, às vezes até mesmo nas veias do xilema ou nos espaços entre as células do parênquima (Mantzoukas e Eliopoulos, 2020).

Na maioria das vezes, ainda não foram encontradas evidências de mutualismo entre os endófitos e as plantas hospedeiras. No entanto, sem essa simbiose, é provável que as comunidades de plantas sejam incapazes de se adaptar a diversas pressões ambientais (Mantzoukas e Eliopoulos, 2020).

A possibilidade de alguns entomopatógenos terem uma fase endofítica em seu ciclo de vida é indicada pelo fato de que alguns deles foram isolados de materiais vegetais esterilizados na superfície. Os endófitos entomopatogênicos podem não estar presentes em todas as espécies de uma planta específica, embora alguns, como *B. bassiana*, tenham uma variedade de hospedeiros vegetais.

Além disso, a presença de fungos entomopatogênicos na natureza como endófitos implica que esses fungos possuem ciclos de vida complexos que podem ser concluídos em invertebrados, solo ou plantas (Vega et al., 2009; Mantzoukas et al., 2015; Jaber e Araj, 2018; Manoussopoulos et al., 2019; McGee, 2002, Vidal e Jaber,

2015; González-Mas et al., 2019a).

Para suprimir pragas, a colonização endofítica de plantas com os fungos entomopatogênicos estabelecidos artificialmente também tem sido estudada (Omkar, 2016; Morales Ramos et al., 2014; Ravensberg, 2015).

Mais precisamente, a colonização endofítica pode proporcionar às plantas defesas sistêmicas contra pragas, pois esses organismos são impactados adversamente pelas mudanças químicas que o endófito causa na planta, bem como pelos compostos secundários gerados pelo fungo (Akello e Sikora, 2012, Castillo-Lopez et al., 2014; Gurulingappa et al., 2010).

Devido à sua incapacidade de se adaptar ao ambiente saudável dentro da planta, nem todos os fungos podem colonizar as plantas, pelo menos não ao longo de todo o seu ciclo de vida (Mercado-Blanco e Lugtenberg, 2014). Devido à quantidade de propágulos nas folhas, uma relação fúngica/planta temporária pode persistir por alguns dias após um tratamento de pulverização (Mantzoukas e Lagogiannis, 2019; Mantzoukas et al., 2015).

Outras condições ambientais, como temperatura e umidade relativa, além dos microrganismos do solo (Bing e Lewis, 1991), têm impacto na colonização endofítica de fungos nas plantas.

A idade e a espécie da planta, o meio de cultivo, a densidade de conídios e a espécie do fungo, bem como o método de inoculação utilizado, foram demonstradas como determinantes essenciais na inoculação de fungos entomopatogênicos nos tecidos vegetais (Bing e Lewis, 1991; Posada et al., 2007, Tefera e Vidal, 2009, Parsa et al., 2013, Muvea et al., 2014).

Muitas técnicas e metodologias experimentais têm sido empregadas para introduzir fungos endofíticos em plantas agrícolas. Entre elas, temos a pulverização de suspensão de conídios nas folhas, o embeber de sementes em suspensão de conídios, a injeção de inoculante fúngico nos caules, o mergulhar das raízes das mudas em suspensão de conídios e embeber o solo em suspensão de conídios (Mantzoukas e Eliopoulos, 2020).

A produção de alcaloides tóxicos e endófitos foliares pode reduzir a população de insetos (Tan e Zou, 2001, Strobel, 2003). A abordagem mais popular, com numerosos resultados encorajadores, é a pulverização foliar (Mantzoukas e

Eliopoulos, 2020).

No entanto, algumas questões documentadas precisam ser seriamente consideradas. O problema principal dessa abordagem é a colonização extremamente restrita, frequentemente limitada às partes foliares da planta e sem fungos nos caules e raízes (Tefera e Vidal, 2009; Qayyum et al., 2015).

Além disso, a efetividade limitada de penetração das hifas nos tecidos foliares foi documentada (Posada et al., 2007; Muvea et al., 2014), o que pode estar relacionado à baixa densidade de pontos naturais de entrada para infecção fúngica, como por exemplo os estômatos.

Outra forma de inoculação que tem sido eficaz em várias culturas importantes é embeber as sementes em uma solução de conídios antes da propagação. No entanto, há estudos que indicam que a inoculação por meio da semente não resultou em colonização significativa do caule ou das folhas (Tefera e Vidal, 2009; Qayyum et al., 2015). Isso foi atribuído ao impacto prejudicial dos microrganismos do solo que podem afetar adversamente os fungos entomopatogênicos.

Uma técnica de inoculação que também foi estudada com sucesso é a injeção de fungos em diferentes plantas através do caule (Bing e Lewis, 1991, Posada et al., 2007).

Comparando essa forma de inoculação com a pulverização foliar ou embeber as sementes no solo, a inoculação de *Beauveria* produziu a maior recuperação pós-inoculação em mudas de café de acordo com Posada et al. (2007) e proporcionou um controle efetivo de *H. armigera* em plantas de tomate, segundo Qayyum et al. (2015).

Embora os resultados tenham sido frequentemente inconclusivos em comparação com outras abordagens, como a pulverização foliar ou tratamento de sementes, a imersão das raízes em uma solução de conídios foi demonstrada como um método de inoculação eficiente (Russo et al., 2015).

Numerosos estudos avaliaram os fungos endofíticos como agentes de controle biológico e mostraram que eles protegem efetivamente as plantas hospedeiras de infestações de pragas (Vega, 2018). Muitos gêneros de fungos comumente aplicados, como *Beauveria*, *Cordyceps* e *Metarhizium*, ocorrem naturalmente como endófitos e têm sido registrados como protetores adequados contra insetos herbívoros (Vega, 2018).

Beauveria, o fungo mais estudado, demonstrou capacidade de colonizar uma ampla variedade de cultivos, incluindo milho, trigo, algodão, soja, tomate, videira, sorgo e citros, e de reduzir infestações causadas por pragas nocivas, como larvas de mariposas e pulgões.

Na maioria dos casos, a presença de fungos endofíticos resulta em uma considerável diminuição tanto da população de pragas quanto dos danos às plantas. No entanto, relatos de desempenho insatisfatório também surgiram, destacando a complexidade dessas interações entre insetos, plantas e fungos (Akello e Sikora, 2012, Clifton et al., 2018; Jensen et al., 2019).

2.6 Agentes de Controle Biológico : Fungo *Trichoderma*

Trichoderma é um gênero de fungos filamentosos da família Hypocreaceae capaz de se alimentar de outros fungos e é um colonizador ubíquo em quase todos os ambientes, incluindo agrícola, solo, matéria vegetal, vegetação morta, madeira, floresta, montanha, campo, ecossistemas desérticos e águas doces e marinhas (Tyśkiewicz et al., 2022).

Este fungo prevalece em qualquer biótopo e tem uma ampla distribuição geográfica em todo o mundo. O gênero é amplamente distribuído em ecossistemas de raízes e solo, detritos vegetais e se reproduz de forma livre, global, facultativamente anaeróbica, filamentosa e assexuada (Tyśkiewicz et al., 2022).

Reconhecido há muito tempo como um agente de biocontrole microbiano que pode substituir fungicidas químicos contra diversas doenças fúngicas que causam apodrecimento das raízes, doenças do solo e doenças foliares (Harman et al., 2012), bem como para promover o desenvolvimento de raízes e brotos, produtividade das culturas, resistência a estresses abióticos e absorção de nutrientes (Tyśkiewicz et al., 2022), este fungo agora está sendo estudado em maior profundidade.

As espécies de *Trichoderma* crescem rapidamente em vários substratos e são prolíficas produtoras de esporos, facilmente reconhecidas pela presença de conídios verdes abundantes.

O sucesso das espécies pertencentes ao gênero *Trichoderma* como agentes de biocontrole nos ecossistemas resulta de sua capacidade de crescimento rápido, da possibilidade de utilizar uma variedade de substratos e da resistência a muitas

substâncias químicas tóxicas, incluindo fungicidas, herbicidas e outros poluentes orgânicos (Cocaign et al., 2013; De Padua & Dela Cruz, 2021; Zin, 2020; Escudero-Leyva et al., 2022).

Além disso, foi descoberto que o *Trichoderma* degrada alguns contaminantes tóxicos por meio de enzimas envolvidas na degradação da celulose/lignina, que têm potencial para metabolizar xenobióticos (Escudero-Leyva et al., 2022).

O potencial das espécies de *Trichoderma* como agentes biológicos de proteção de plantas foi descrito pela primeira vez no início da década de 1930. O pesquisador Weindling (1932) relatou a ação do fungo *Trichoderma* em proteger mudas de citros contra o patógeno *Rhizoctonia solani* por meio do mecanismo de micoparasitismo necrotrófico.

Desde então, as propriedades de biocontrole do *Trichoderma* têm sido extensivamente estudadas para o controle de doenças causadas por inúmeros fitopatógenos do solo (Kumar & Sharma, 2016).

Os mecanismos pelos quais o *Trichoderma* reduz a ocorrência de doenças de plantas incluem a competição por nutrientes e espaço, a síntese de metabólitos antifúngicos, o micoparasitismo, a produção de enzimas líticas que degradam as paredes celulares de fitopatógenos fúngicos, além da indução de resistência das plantas (Saravanakumar et al., 2016; Błaszczuk et al., 2017; Ghorbanpour et al., 2018).

Entre os mecanismos citados, os mais comuns são a identificação de invasão de patógenos semelhantes a fungos, como patógenos de plantas, por meio da perturbação das paredes celulares e absorção de nutrientes, ou micoparasitismo (Bhat, 2017); Indução da resistência das plantas às doenças, alterando a arquitetura das raízes durante as interações com os patógenos (Kumar et al., 2019); combate os nematóides de galhas e cisto nas raízes (Zin e Badaluddin, 2020).

Esses mecanismos, diretos e indiretos, podem responder efetivamente durante o evento de biocontrole, dependendo da cepa de *Trichoderma*, patógeno-alvo, cultura cultivada e condições ambientais, incluindo pH, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes (Zin e Badaluddin, 2020).

A maioria dos efeitos deles nas culturas é semelhante; no entanto, existem relações específicas de espécies e cepas. Produtos comercialmente disponíveis geralmente contêm uma ou mais espécies de *Trichoderma*, como *T. viride*, *T. virens*

e *T. harzianum*. A eficiência de produtos contendo várias espécies ou cepas pode variar em condições de campo e clima semelhantes (Zin e Badaluddin, 2020).

Os produtos mais amplamente utilizados de *Trichoderma* spp. são formulados em pós solúveis ou grânulos. Noventa por cento das cepas de *Trichoderma* são aplicadas nas culturas para o controle de doenças de plantas devido às suas características antagonistas contra fitopatógenos.

O impacto do uso desses agentes de biocontrole no campo é avaliado em relação ao custo e à produtividade das culturas (Zin e Badaluddin, 2020). Como resultado, descobriu-se que o uso desses agentes é econômico e de baixo custo em comparação com insumos sintéticos (Masso et al., 2016).

Por algum motivo, os agricultores podem usar insumos sintéticos em excesso (como fertilizantes e pesticidas sintéticos) por serem mais baratos, o que não gera lucros significativos. Os agricultores enfrentam perdas econômicas se o equilíbrio entre os custos de insumos e a produtividade das culturas não for adequado.

O *Trichoderma* spp., além de reduzir as perdas de colheita, também aumenta o rendimento das culturas, aumentando a receita. De acordo com Imran et al. (2020), a aplicação adequada deste agente junto com composto em campos agrícolas pode substituir ou reduzir a necessidade de fertilizantes químicos caros.

Do ponto de vista da manutenção da saúde do solo, o uso de *Trichoderma* é uma excelente abordagem sustentável. Pesquisadores relataram que o *Trichoderma* spp. suprime o crescimento de organismos fitopatogênicos, como *Pythium arrhenomanes*, *R. solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria tenuis* e *Botrytis cinerea*.

As propriedades de biocontrole e biostimulação do *Trichoderma* se traduzem diretamente em sua ampla aplicação na agricultura. Devido ao maior número de compostos bioativos antifúngicos isolados, o *Trichoderma* é identificado como o gênero com o maior potencial de biocontrole (Vishwakarma et al., 2020; Rush et al., 2021). De acordo com Rush et al. (2021), as espécies de *Trichoderma* representam em até 60% dos agentes de biocontrole fúngicos.

Os fungos do gênero *Trichoderma* utilizam vários mecanismos diretos ou indiretos complexos contra patógenos fúngicos, que geralmente interagem juntos no fenômeno de biocontrole (Ghorbanpour et al., 2018).

O impacto direto sobre os patógenos inclui a produção de enzimas de

degradação da parede celular, síntese de antibióticos, competição por espaço e nutrientes (principalmente carbono, nitrogênio e ferro) e estabelecimento de uma relação parasitária direta com o patógeno fúngico (Druzhinina et al., 2011; Rai et al., 2016).

Por outro lado, o *Trichoderma* induz indiretamente a resistência local ou sistêmica das plantas por meio de produtos (elicitores) liberados das paredes celulares do hospedeiro vegetal (endoelicitores) e do microrganismo infectante (exoelicitores) (Saravanakumar et al., 2016).

O tipo de mecanismos envolvidos geralmente é uma característica da cepa e depende do tipo de interação entre o microrganismo antagonista, o patógeno e a planta hospedeira (Benítez et al., 2004; Ghorbanpour et al., 2018).

Os fungos do gênero *Trichoderma* são em sua maioria classificados como micoparasitas necrotróficos (Seidl-Seiboth et al., 2014). Muitas espécies de *Trichoderma* com alto potencial micoparasitário já foram descritas (Druzhinina et al., 2011).

O efeito micoparasitário dos necrotróficos de *Trichoderma* sobre os patógenos fúngicos inclui a detecção e quimiotaxia da presa, aderência ao hospedeiro e ataque físico por meio de ramificação intensa e enrolamento ao redor das hifas do hospedeiro.

Além disso, o *Trichoderma* pode formar estruturas de penetração semelhantes a apressórios, homólogas aos de patógenos (Mukherjee et al., 2012; Moreno-Ruiz et al., 2020).

O ataque químico e a degradação da parede celular do patógeno por enzimas hidrolíticas e compostos antifúngicos produzidos pelo *Trichoderma* são a última etapa da interação micoparasitária, levando finalmente à morte do hospedeiro (Seidl-Seiboth et al., 2014; Mukherjee et al., 2012).

A produção de enzimas degradantes da parede celular é uma parte integral da etapa final do micoparasitismo (Ghorbanpour et al., 2018). A parede celular fúngica é composta principalmente por 90% de polissacarídeos: quitina, β -(1,3) -, β -(1,4) - e β -(1,6) -glucanos, α -glucanos, quitosana, manana e galactomanana, além de proteínas (Kang et al., 2018; Ribeiro et al., 2019; Sood et al., 2020).

As cepas de *Trichoderma* são principalmente caracterizadas pela capacidade de secretar um conjunto de enzimas extracelulares, incluindo quitinases, β -(1,3) -, β -

(1,6) -glucanases e proteases, que hidrolisam os principais componentes da parede celular do patógeno (Ghorbanpour et al., 2018; Alizadehet al., 2020).

As quitinases são o grupo mais importante de enzimas líticas sintetizadas por fungos *Trichoderma*, hidrolisando as ligações β -glicosídicas entre o carbono C1 e C4 de duas N-acetilglicosaminas adjacentes na cadeia de quitina (Loc et al., 2020).

As enzimas glucanases degradam as paredes celulares de fungos patogênicos por meio de dois conjuntos de enzimas, exo- β -glucanases e endo- β -glucanases (De Marco & Felix, 2007; Sood et al., 2020).

Além das quitinases e glucanases, um papel decisivo no processo de mico parasitismo é desempenhado pelas enzimas proteolíticas, catalisando a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas (De Souza et al., 2015).

O *Trichoderma* é considerado uma das fontes mais ricas de peptídeos tipo peptaibols. Os peptaibols são definidos como antibióticos polipeptídicos (Neumann et al., 2015). As espécies de *Trichoderma* foram identificadas como produtoras de centenas de metabólitos secundários, dos quais pertencem a diferentes classes de compostos químicos com fortes propriedades antagonistas (Ghorbanpour et al., 2018; Błaszczuk et al., 2014; Eslahi et al., 2021).

A maioria das cepas de *Trichoderma* produz compostos orgânicos voláteis e não voláteis, sendo os mais importantes os peptaibols e os poliquetídeos (Sood et al., 2020).

Além disso, as espécies de *Trichoderma* também demonstram a capacidade de produzir poliquetídeos, um grupo estruturalmente diverso de compostos biologicamente ativos derivados de bactérias, fungos e plantas (Zeilinger et al., 2016). Os poliquetídeos incluem antibióticos, micotoxinas e pigmentos (Delgado-Jarana et al., 2002).

Os fungos antagonistas podem privar os patógenos de espaço e nutrientes ao colonizar um habitat comum, ou seja, tecidos de plantas, rizosferas ou filosferas (Ghorbanpour et al., 2018). Isso depende de suas propriedades, do grau de colonização da planta hospedeira e da adaptação às condições ambientais em que vivem (Ghorbanpour et al., 2018, Sood et al., 2020).

Para competir com sucesso com os patógenos por nichos e nutrientes, o *Trichoderma* deve ter estratégias eficazes de colonização de plantas e ser abundante

em um nicho onde a competição com outros fungos ocorra (Ghorbanpour et al., 2018).

As espécies deste gênero são amplamente conhecidas por seu crescimento rápido e são consideradas competidores agressivos. Elas colonizam rapidamente vários substratos e eliminam patógenos de crescimento mais lento (Oszust et al., 2020).

Os fungos *Trichoderma* são caracterizados por uma taxa de crescimento especialmente alta em glicose e sacarose (Jaroszuk-Ścisł et al., 2019). Ao mesmo tempo, vale ressaltar que existe uma ampla gama de substratos que esses fungos podem utilizar como única fonte de carbono e energia, o que lhes permite usar eficazmente uma variedade de compostos rizodepositados, tanto açúcares simples quanto carboidratos poliméricos que são componentes das paredes celulares (Jaroszuk-Ścisł et al., 2019; Sood et al., 2020).

As espécies de *Trichoderma* têm uma capacidade muito melhor de mobilizar e absorver nutrientes do solo em comparação com outros microrganismos (Gajera et al., 2013).

Esse processo está relacionado à biossíntese de ácidos orgânicos como o glicônico, cítrico e fumárico, que reduzem o pH do solo e aumentam a solubilização de fosfatos e microelementos (ferro, manganês ou magnésio) (Vinale et al., 2008).

A maior importância em relação ao fenômeno de competição no *Trichoderma* é atribuída aos sideróforos, compostos quelantes de baixo peso molecular com alta afinidade pelo ferro (Fe), produzidas sob estresse de deficiência de ferro (Khan et al., 2018; Zhao et al., 2020).

Os íons de Fe são cofatores para muitas enzimas e são um fator importante para o crescimento e desenvolvimento adequado de plantas, bem como de muitos microrganismos (Miethke, 2013). A capacidade das cepas de *Trichoderma* de colonizar as raízes das plantas e estabelecer uma relação robusta e estável com elas é particularmente crucial na proteção biológica de plantas.

Fungos deste gênero podem afetar indiretamente os microrganismos patogênicos através das plantas, induzindo seus mecanismos de defesa locais ou sistêmicos (Sood et al., 2020; Zeilinger et al., 2016).

A indução de resistência nas plantas é uma consequência da ação de diversos elicitores (indutores da resposta de defesa) liberados das células dos microrganismos

(exoelicitors) e dos tecidos das plantas (endoelicitors).

Diferentes classes de elicitors foram caracterizadas, incluindo oligossacarídeos, proteínas e peptídeos, glicopeptídeos e glicoproteínas, glicolipídeos e compostos lipofílicos (Montesano et al., 2003; Thakur et al., 2013).

Diversas espécies de plantas, tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas, mostram um aumento na atividade da resposta imunológica na presença de fungos não patogênicos do gênero *Trichoderma* (Harman et al., 2004).

A presença de *Trichoderma* na rizosfera e nos tecidos das plantas leva a uma maior tolerância das plantas tanto a estresses bióticos quanto abióticos (Verma et al., 2021). Os estresses ambientais mais prejudiciais à produção de culturas incluem a seca, salinidade, acumulação de metais pesados e temperaturas extremas (Poveda, 2020; Abdullah et al., 2021).

Numerosas cepas de *Trichoderma* foram desenvolvidas como agentes de biocontrole contra doenças de plantas causadas por bactérias, nematoides e insetos (Abdullah et al., 2021; Ferreira & Musumeci, 2021).

A atividade antibacteriana do *Trichoderma* é mais frequentemente atribuída à secreção de metabólitos secundários, dos quais os mais importantes são os peptaibols, gliotoxina, poliquetídeos, gliovirina e pironas (Khan et al., 2020; Vinale et al., 2014).

Estudos recentes demonstraram que o *Trichoderma* pode melhorar a proteção das plantas contra pragas de insetos, como pulgões, tripses, mariposas e lagartas (Coppola et al., 2019).

O *Trichoderma* afeta diretamente as pragas por meio de mecanismos antagonistas, dos quais os mais importantes são o parasitismo e a produção de metabólitos secundários inseticidas, compostos antialimentares e repelentes.

Além disso, o *Trichoderma* tem sido relatado como capaz de reduzir diretamente o efeito prejudicial desses patógenos pela ativação dos mecanismos de defesa das plantas (Poveda, 2021).

O *T. longibrachiatum* mostrou um efeito entomopatogênico no desenvolvimento de *Leucinodes orbonalis*, uma das principais pragas da *Solanum melongena* (Ghosh & Pal, 2016).

Exames posteriores indicaram um crescimento parasítico intenso das hifas de

T. gamsii sobre o abdômen inferior e o ostíolo respiratório da larva de *Delia radicum* (Razinger et al., 2014).

Além disso, o *T. harzianum*, o *T. asperellum* e o *T. hamatum* demonstraram potencial patogênico contra a *Cetarovacuna lanigera*, uma praga destrutiva da cana-de-açúcar responsável pela redução da qualidade, rendimento e teor de açúcar (Islam et al., 2022).

O *Trichoderma* é frequentemente associado aos ecossistemas de raízes das plantas hospedeiras. Portanto, o *Trichoderma* é geralmente definido como o gênero de microrganismos simbióticos, oportunistas e avirulentos que colonizam as raízes e estimulam o crescimento das plantas por meio de mecanismos semelhantes aos usados pelos fungos micorrízicos (Benítez et al., 2004).

Os efeitos benéficos das espécies de *Trichoderma* nas plantas incluem a promoção de seu crescimento, melhoria da estrutura e condição das raízes, aumento da germinação e viabilidade das sementes, bem como maior eficiência da fotossíntese, floração e qualidade do rendimento (Halifu et al., 2019).

O fator de estímulo mais importante em quase todas as etapas do crescimento e desenvolvimento das plantas é a síntese de fitohormônios e fitoreguladores (Cai et al., 2016).

O *Trichoderma* spp. é um endófito devido à sua interação simbiótica com as raízes das plantas, conforme evidenciado pela colonização das superfícies das raízes e penetração na superfície das raízes. Em seguida, eles secretam uma variedade de metabólitos secundários bioativos, que desempenham uma função positiva na saúde de suas plantas hospedeiras. Esse fungo endofítico também causa alterações metabólicas e genômicas no hospedeiro da planta durante o estabelecimento das raízes (Ghaffari et al., 2016). Portanto, a capacidade das plantas de se defenderem contra insetos e doenças de plantas cresce.

Mais recentemente, *Spodoptera frugiperda*, um herbívoro de plantas, fornecido por *T. atroviride*, foi encontrado para ser resistente ao milho (*Zea mays*), de acordo com Contreras-Cornejo et al. (2018). Descobriu-se nesse estudo que, após serem injetados em plantas de milho, o *T. atroviride* aumentou o crescimento das plantas, diminuiu a herbivoria e alterou o comportamento de alimentação dos insetos.

A acumulação de ácido jasmônico e o aumento na concentração de terpenos

voláteis gerados por esse fungo benéfico, *T. atroviride*, estimularam as respostas de defesa contra a herbivoria. Em particular, o octanol e a 6-amyl-alpha-pirona foram os compostos terpenos que alteraram o comportamento de alimentação de *S. frugiperda* e reduziram o consumo de tecido foliar.

As doenças de plantas têm um impacto significativo na produção e disponibilidade de alimentos. Para reduzir o uso de pesticidas na agricultura, é essencial desenvolver medidas eficazes de controle de doenças.

Um dos melhores métodos para alcançar isso é o uso de agentes de controle biológico, como o *Trichoderma* spp.

Recentemente, foi demonstrado que o *Trichoderma* spp. pode metabolizar vários pesticidas (Zafra et al., 2015; Vázquez et al., 2015).

Em campos como arroz, frutas e vegetais, e oleaginosas, pesticidas como Mancozebe e Carbendazim inibem infecções fúngicas (Singh e Sharma, 2018; Didwania et al., 2019). No entanto, o uso excessivo e recorrente desses dois fungicidas gera preocupação, pois prejudicam seres vivos próximos (Tiwari et al., 2016).

É amplamente reconhecido em todo o mundo que cepas de *Trichoderma* são agentes de biocontrole eficazes contra várias bactérias fitopatogênicas. Além disso, pesquisas recentes mostraram que esses fungos melhoram a resistência, o crescimento e o desenvolvimento das plantas, aumentando a produção de colheitas.

Antibióticos, micoparasitismo, competição por nutrientes e promoção de resistência sistêmica das plantas são mecanismos típicos. As espécies de *Trichoderma* têm sido empregadas recentemente em sistemas de manejo de doenças sustentáveis para combater doenças de plantas.

3. REFERÊNCIAS

- Abdullah NS, Doni F, Mispan MS, Saiman MZ, Yusuf YM, Oke MA, Suhaimi NSM (2021) Harnessing *Trichoderma* in agriculture for productivity and sustainability. **Agronomy** 11:2559. doi:10.3390/agronomy11122559
- Aguamah GE, Langcake P, Leworthy DP, Page JA, Pryce RJ, Strange RN (1981) Two novel stilbene phytoalexins from *Arachis hypogaea*. **Phytochemistry** 20:1381-1383. doi:10.1016/0031-9422(81)80044-1
- Akello J, Sikora R (2012) Systemic acropetal influence of endophyte seed treatment on *Acyrtosiphon pisum* and *Aphis fabae* offspring development and reproductive fitness. **Biol Control** 61:215-221. doi: 10.1016/j.biocontrol.2012.02.008
- Akutse KS, Maniania NK, Fiaboe KK, Van den Berg J, Ekesi S (2013) Endophytic colonization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) by fungal pathogens and their effects on the life-history parameters of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). **Fungal Ecol** 6:293-301. doi: 10.1016/j.funeco.2012.11.003
- Alizadeh M, Vasebi Y, Safaie N (2020) Microbial antagonists against plant pathogens in Iran: A review. **Open Agric**, 5: 404-440. doi:10.1515/opag-2020-0023
- Anderson WF, Holbrook CC, Wilson DM, Matheron ME (1995) Evaluation of preharvest aflatoxin contamination in several potentially resistant peanut genotypes. **Peanut Sci** 22:29-32. doi:10.3146/pnut.22.1.0007
- Azaizeh HA, Pettit RE, Smith OD, Taber RA (1989) Reaction of peanut genotypes under drought stress to *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Peanut Sci** 16:109-113. doi:10.3146/i0095-3679-16-2-12
- Balazy S (1993) Entomophthorales, Flora of Poland (Flora Polska), Fungi (Mycota), vol. 24. Polish Acad Sci W. **Szafer Inst Botany** 1:356.
- Bankole S, Schollenberger M, Drochner W (2006) Mycotoxins in food systems in Sub Saharan Africa: a review. **Mycotoxin Research** 22:163-169. doi:10.1007/BF02959270
- Barreto M (2005) Doenças do amendoim. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo IEA (Eds.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, p. 65-77.

Barreto M, Scaloppi EAG, Matrangolo Júnior E (2007) Controle químico das doenças foliares do amendoim. **Fitopatologia Brasileira** 32:15.

Basu A, Prasad P, Das SN, Kalam S, Sayyed RZ, Reddy MS, El Enshasy H (2021) Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects. **Sustainability** 13:1140. doi:10.3390/su13031140

Batta, YA (2013) Efficacy of endophytic and applied *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) against larvae of *Plutella xylostella* L. (Yponomeutidae: Lepidoptera) infesting *Brassica napus* plants. **Crop. Prot.**, 44:128–134.

Behie, SW, Bidochka MJ (2014) Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. **Appl Environ Microbiol**, 80:1553-1560. <https://doi.org/10.1128/AEM.03338-13>

Bello MM (2015) **Metodologia de pesquisa e avaliação da resistência de genótipos de amendoim a *Spodoptera albula* (walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração: Entomologia Agrícola) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Benítez T, Rincón, MA, Limón, CM, Codón, CA (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **Int. Microbiol.** 7:249–260.

Bhat R, Rai RV, Karim AA (2010) Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 9:57-81. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00094.x>

Bhat KA (2017) A new agar plate assisted slide culture technique to study mycoparasitism of *Trichoderma* sp. on *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporium*. **Int. J. Cur. Microbiol. Appl. Sci.** 6:3176-3180.

Bing LA, Lewis LC (1991) Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. **Environ. Entomol.** 20:1207–1211.

Błaszczuk L, Siwulski M, Sobieralski K, Lisiecka J, Jędryczka M (2014) *Trichoderma* spp.—Application and prospects for use in organic farming and industry. **J. Plant Prot. Res.** 54, 309–317.

Błaszczuk L, Basińska-Barczak A, Ćwiek-Kupczyńska H, Gromadzka K, Popiel D, Stępień Ł. (2017) Suppressive effect of *Trichoderma* spp. on toxigenic *Fusarium* species. **Pol. J. Microbiol.** 66:85–100.

Boiça Junior AL, Chagas Filho NR, Godoy IJ, de Lourenção AL, Souza JR (2012) Avaliação de resistência de cultivares de amendoim de hábito de crescimento rasteiro a *Enneothrips flavens* Moulton (Thysanoptera: Thripidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, 79:33-38.

Bowen KL, Mack TP. (1993) Relationship of damage from the lesser cornstalk borer to *Aspergillus flavus* contamination in peanuts. **Journal of Entomological Science** 28:29-42.

CAC - Codex Alimentarius Commission. (2004) Code of Practice for the prevention and reduction of aflatoxin contamination in peanuts. CAC/RCP 55.

Cai WJ, Ye TT, Wang Q, Cai BD, Feng YQ (2016) A rapid approach to investigate spatiotemporal distribution of phytohormones in rice. **Plant Methods**, 12: 47.

Calcagnolo G, Rensi AA, Gallo JR (1974) Efeitos da infestação do tripes nos folíolos do amendoimzeiro *Enneothrips* (*Enneothripella*) *flavens* Moulton, 1941, no desenvolvimento das plantas, na qualidade da produção de uma cultura “das águas”. **O Biológico** 40:241-42.

Campbell WV, Wynne JC (1980) Resistance of groundnuts to insects and mites. In: **Proceedings of the International Workshop on ground-nuts Patancheru**, 1980. Patancheru, India, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics-ICRISAT, 149-157.

Castillo-Lopez D, Zhu-Salzman K, Ek-Ramos MJ, Sword GA (2014) The entomopathogenic fungal endophytes *Purpureocillium lilacinum* (formerly *Paecilomyces lilacinus*) and *Beauveria bassiana* negatively affect cotton aphid reproduction under both greenhouse and field conditions. **PLoS ONE**, 9:1038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103891>

Charnley AK, Collins SA (2007) Entomopathogenic Fungi and Their Role in Pest Control. In: Kubicek CP, Druzhininna IS (Eds.). **Environmental and Microbial Relationships**. Springer: Cham, Switzerland, 4:159–187.

Clifton EH, Jaronski ST, Coates BS, Hodgson EW, Gassmann AJ (2018) Effects of endophytic entomopathogenic fungi on soybean aphid and identification of *Metarhizium* isolates from agricultural fields. **PLoS ONE**, 13:815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194815>

Cocaign A, Bui LC, Silar P, Chan Ho Tong L, Busi F, Lamouri A, Mougin C, Rodrigues-Lima F, Dupret JM, Dairou J (2013) Biotransformation of *Trichoderma* spp. and their tolerance to aromatic amines, a major class of pollutants. **Appl. Environ. Microbiol.** 79:4719–4726. doi: 10.1128/AEM.00989-13.

Cole RJ, Blankenship PD, Hill RA, Sanders TH (1984) Effect of geocarposphere temperature on preharvest colonisation of drought stressed peanuts by *Aspergillus flavus* and subsequent aflatoxin contamination. In H. Kurata & Y. Ueno (Eds), **Toxigenic Fungi–Their Toxins and Health Hazard** (pp. 44-52). Tokyo: Kodansha Ltd.

Cole RJ, Sanders TH, Hill RA, Blankenship PD (1985) Mean geocarposphere temperatures that induce preharvest aflatoxin contamination of peanuts under drought stress. **Mycopathologia** 91:41-46. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00437286>

Cole RJ, Dorner JW, Holbrook CC (1995) Advances in mycotoxin elimination and resistance. In H. E. Pattee & H. T. Stalker (Eds.), **Advances in peanut science** (pp. 456-474). Stillwater, OK, USA: American Peanut Research Educational Society.

Conab. Companhia Nacional de Abastecimento. (2023) **Acompanhamento da safra brasileira, 12º Levantamento - Safra 2021/22**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 01 jun. 2023.

Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Del-Val E, Larsen J (2018) The root endophytic fungus *Trichoderma atroviride* induces foliar herbivory resistance in maize plants. **Appl. Soil Ecol** 124:45-53.

Coppola M, Cascone P, Di Lelio I, Woo SL, Lorito M, Rao R, Pennacchio F, Guerrieri E, Digilio MC (2019) *Trichoderma atroviride* P1 colonization of tomato plants enhances both direct and indirect defense barriers against insects. **Front. Physiol.**, 10:813.

Cotty PJ, Jaime-Garcia R (2007) Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology* 119: 109-115. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.060>

Craufurd PQ, Prasad PVV, Waliyar F, Taheri A (2006) Drought, pod yield, preharvest *Aspergillus* infection and aflatoxin contamination on peanut in Niger. **Field Crops Research**, 98, 20-29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2005.12.001>

D'Mello JPF, Macdonald AMC, Postel D, Dijksma WTP, DuJardin A, Placinta CM (1998) Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. **European Journal of Plant Pathology** 104:741-751. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008621505708>

Damalas CA, Eleftherohorinos IG (2011) Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 8:1402-1419.

Damicone JP (2017) Foliar Diseases of Peanut. Oklahoma Cooperative Extension Service.

Dash CK, Bamisile BS, Keppanan R, Qasim M, Lin Y, Islam SUI, Hussain M, Wang L (2018) Endophytic entomopathogenic fungi enhance the growth of *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) and negatively affect the development and reproduction of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Microb. Pathog.** 125:385–392.

Delgado-Jarana J, Rincón AM, Benítez T (2002) Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: Cloning and characterization. **Microbiology**, 148:1305–1315.

De Marco JL, Felix CR (2007) Purification and characterization of a β -glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 50:21–29.

De Padua JC, Dela Cruz TEE (2021) Isolation and characterization of nickel-tolerant *Trichoderma* strains from marine and terrestrial environments. **J. Fungi** 7:591.

De Souza PM, De Assis Bittencourt ML, Caprara CC, De Freitas M, De Almeida RPC, Silveira D, Fonseca YM, Ferreira Filho EX, Pessoa Junior A, Megalhães PO (2015) A biotechnology perspective of fungal proteases. **Braz. J. Microbiol.** 46:337–346.

Dhanasekaran D, Shanmugapriya S, Thajuddin N, Panneerselvam A (2011) “Aflatoxins and aflatoxicosis in human and animals,” in Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology.

Didwania N, Gupta KN, Gupta S, Bisen R (2019) Bio-intensive approaches in the management of fungal diseases of oil yielding crops. In: M.R. Khan, et al. (eds.), **Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi**. Fungal Biol., vol. 3, Springer, Cham.

Diener UL, Davis ND. (1970) Limiting temperature and relative humidity for aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in stored peanuts. **Journal of American Oil Chemical Society** 47:347-351. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02639000>

Dorner JW, Cole RJ, Sanders TH, Blankenship PD (1989) Interrelationship of kernel water activity, soil temperature, maturity, and phytoalexin production in preharvest aflatoxin contamination of drought-stressed peanuts. **Mycopathologia**, 105:117-128. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00444034>

Dorner JW, Cole RJ, Connick WJ, Daigle DJ, Mcguire MR, Shasha BS (2003) Evaluation of biological control formulations to reduce aflatoxin contamination in peanuts. **Biological Control**, 26:318-324. [http://dx.doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00139-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00139-1)

Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, Mukherjee PK, Zeilinger S, Grigoriev IV, Kubicek CP (2011) *Trichoderma*: The genomics of opportunistic success. **Nat. Rev. Microbiol.** 9:749–759.

Epstein E. (2001) Silicon in plants: facts vs concepts. In: DATNOFF, L.E.; SNYDER, G.H.; KORNDÖRFER, G.H.(Eds.). **Silicon in agriculture**. The Netherlands: Elsevier Science.

Escudero-Leyva E, Alfaro-Vargas P, Muñoz-Arrieta R, Charpentier-Alfaro C, Granados-Montero MM, Valverde-Madrigal KS, Pérez-Villanueva M, Méndez-Rivera M, Rodríguez-Rodríguez CE, Chaverri P (2022) Tolerance and biological removal of fungicides by *Trichoderma* species isolated from the endosphere of wild Rubiaceae plants. **Front. Agron.** 3:2170.

Eslahi N, Kowsari M, Zamani MR, Motallebi M (2021) Correlation study between biochemical and molecular pathways of *Trichoderma harzianum* recombinant strains on plant growth and health. **J. Plant Growth Regul.**, 1–17.

FAOSTAT. **Área colhida, rendimento e produção nos principais países produtores de amendoim**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 19 Apr. 2023.

Fávero AP, Moraes SA, Garcia AAF, Valls JFM, Vello NA (2009) Characterization of rust, early and late leaf spot resistance in wild and cultivated peanut germplasm. **Scientia Agricola**, 66:110-117. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162009000100015>

Ferreira FV, Musumeci MA (2021) *Trichoderma* as biological control agent: Scope and prospects to improve efficacy. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 37:90.

Fonseca AE, Almeida LFZ, Ramos MF, Paulo Júnior J, da Silva TMR (2020) Programas de aplicação associados ou não ao adjuvante Oxiativo® no controle de mancha preta na cultura do amendoim. **South American Sciences** 1:2077. <https://doi.org/10.17648/sas.v1i2.77>

Forti LC, Baldin ELL, Almeida MC, Fujihara, RT (2016) Insetos de importância econômica: guia ilustrado para identificação de famílias. Botucatu: FEPAF, Ed, 2º, pp.391

Freitas SM, Martins SS, Nomi AK, Campos AF (2005) Evolução do mercado brasileiro de amendoim. In: SANTOS, R.C. dos. **O agronegócio do amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, p. 451.

Freitas RE, Mendonça MAA (2016) Expansão Agrícola no Brasil e a Participação da Soja: 20 anos. **Rev. Econ. Sociol. Rural**, vol.54, n3, p.497-516. <http://dx.doi.org/10.1590/1234-56781806-94790540306resr>

Gabriel D, Novo JPS, Godoy IJ, Barboza JP (1996) Flutuação populacional de *Enneothrips flavens* Moulton em cultivares de amendoim. **Bragantia**, 55:253-257.

Gabriel D (2016). Pragas do Amendoim. Instituto Biológico, 2016. (Documento técnico, 26).

Gajera H, Domadiya R, Patel S, Kapopara M, Golakiya B (2013) Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system—A review. **Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.** 1:133–142.

Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Batista GC, Berti Filho E, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramin JD, Marchini LC, Lopes JRS, Omoto C. Entomologia Agrícola. Piracicaba SP. FEALQ. 2002.

Ghaffari MR et al. (2016) Metabolic and transcriptional response of central metabolism affected by root endophytic fungus *Piriformospora indica* under salinity in barley. **Plant Mol. Biol.** 90:699-717.

Ghorbanpour M, Omidvari M, Abbaszadeh-Dahaji P, Omidvar R, Kariman K (2018) Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. **Biol. Control** 117:147–157.

Ghosh SK, Pal S (2016) Entomopathogenic potential of *Trichoderma longibrachiatum* and its comparative evaluation with malathion against the insect pest *Leucinodes orbonalis*. **Environ. Monit. Assess.** 188:37.

Godoy IJ, Moraes AS, Siqueira WJ, Pereira JCVA, Martins ALM, Paulo EM (1999) Produtividade, estabilidade e adaptabilidade de cultivares de amendoim em três níveis de controle de doenças foliares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 34:1183-1191

Godoy IJ, Moraes SA, Zanotto MD, Santos RC (2005). Melhoramento em Amendoim. In: BORÉM, A. **Melhoramento de Espécies Cultivadas** Ed. Viçosa: UFV.

Godoy IJ, Santos JF, Carvalho CRL, Michelotto MD, Bolonhezi D, Freitas RS, Ticelli M, Finoto EL, Martins ALM (2014) IAC OL3 e IAC OL4: new Brazilian peanut cultivars with the high oleic trait. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 14: 200-203.

Gonçalves KC, Boiça Júnior AL, Duarte RT, Moreira LF, Nascimento J, Polanczyk RA (2018) *Spodoptera albula* susceptibility to *Bacillus thuringiensis* - based biopesticides. **Journal of Invertebrate Pathology** 157: 147-149.

González-Mas N, Cuenca-Medina M, Gutiérrez-Sánchez F, Quesada-Moraga E (2019a). Bottom-up effects of endophytic *Beauveria bassiana* on multitrophic interactions between the cotton aphid, *Aphis gossypii*, and its natural enemies in melon. **J. Pest. Sci.**, 92: 1271–1281.

González-Mas N, Sánchez-Ortiz A, Valverde-García P, Quesada-Moraga E (2019b) Effects of Endophytic Entomopathogenic Ascomycetes on the Life-History Traits of *Aphis gossypii* Glover and its Interactions with Melon Plants. **Insects**, 10: 165.

Guo BZ, Chen XP, Dang P, Scully BT, Liang XQ, Holbrook CC, Yu JJ (2008). Peanut gene expression profiling in developing seeds at different reproduction stages during *Aspergillus parasiticus* infection. **BMC Developmental Biology**, 4:8-12.

Guo BZ, Fedorova ND, Chen XP, Wan CH, Wang W, Nierman WC, Yu JJ (2011). Gene expression profiling and identification of resistance genes to *Aspergillus flavus* infection in peanut through EST and microarray strategies. **Toxins**, 3:737-753.

Gurulingappa P, Sword GA, Murdoch G, McGee PA (2010). Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. **Biol. Control**, 55: 34–41.

Halifu S, Deng X, Song X, Song R. (2019) Effects of two *Trichoderma* strains on plant growth, rhizosphere soil nutrients and fungal community of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* annual seedlings. **Forests** 10:758.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M (2004). *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, 2(1), 43–56.

Harman GE, Herrera-Estrella AH, Horwitz BA, Lorito M (2012) Special issue: *Trichoderma*—From basic biology to biotechnology. **Microbiology** 158:1–2.

Heathcote JG, Hibbert JR (1978). Aflatoxin chemical and biological aspects. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.

Hill RA, Blankenship PD, Cole RJ, Sanders TH (1983). Effect of soil moisture and temperature on preharvest invasion of peanuts by the *Aspergillus flavus* group and subsequent aflatoxin development. **Applied and Environmental Microbiology**, 45: 628-633.

Horn BW, Pitt JI (1997). Yellow mold and aflatoxin. In N. Kokalis-Burelle D. M., Porter, R., Rodriguez-Kabana D. H. Smith & Subrahmanyam (Eds.), Compendium of peanut diseases (pp. 44-49). St. Paul. MN, USA: Am. **Phytopathol. Soc.**

Horn BW, Dorner JW (1998). Soil populations of *Aspergillus* species from section Flavi along a transect through peanut growing regions of the United States. **Mycologia**, 90:767-776.

Humber RA (1998) ARS collection of entomopathogenic fungal cultures. In: Lichtenfels, J.R., Kirkbride Jr., J.H., Chitwood, D.J. (Eds.), **Systematic Collections of the Agricultural Research Service**. USDA-ARS Misc. Publ. 1343, pp. 8–12

IARC (1993). “Aflatoxins,” in some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins,” in **Proceedings of the IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans**.

Islam MS, Subbiah VK, Siddiquee S (2022) Efficacy of entomopathogenic *Trichoderma* isolates against sugarcane woolly aphid, *Ceratovacuna lanigera* Zehntner (Hemiptera: Aphididae). **Horticulturae** 8:2.

Jaber LR, Araj SE 2018. Interactions among endophytic fungal entomopathogens (Ascomycota: Hypocreales), the green peach aphid *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae), and the aphid endoparasitoid *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae). **Biol. Control**, 116: 53–61.

Jaber LR, Enkerli J. (2017) Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth? **Biocontrol Sci Technol**, 27:28–41.

Jaihan P, Sangdee K, Sangdee A. (2016) Selection of entomopathogenic fungus for biological control of chili anthracnose disease caused by *Colletotrichum* spp. **Eur J Plant Pathol**, 146: 551–564.

Janini JC, Boiça Júnior AL, Godoy IJ, Michelotto MD, Favero AP (2010) Avaliação de espécies silvestres e cultivares de amendoim para resistência a *Enneothrips flavens* Moulton. **Bragantia**, 69:31-38.

Janini JC (2011). **Resistência de germoplasma silvestre de amendoim (Arachis spp.) a Enneothrips flavens Moulton, 1941 (Thysanoptera: Thripidae) e Stegasta bosquella (Chambers, 1875) (Lepidoptera: Gelechiidae)**. 112 f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Jaboticabal.

Jaroszuk-Ścisł J, Tyśkiewicz R, Nowak A, Ozimek E, Majewska M, Hanaka A, Tyśkiewicz K, Pawlik A, Janusz G (2019) Phytohormones (auxin, gibberellin) and ACC deaminase in vitro synthesized by the mycoparasitic *Trichoderma* DEMTkZ3A0 strain and changes in the level of auxin and plant resistance markers in wheat seedlings inoculated with this strain conidia. **Int. J. Mol. Sci.** 20:4923.

Jensen RE, Enkegaard A, Steenberg T (2019). Increased fecundity of *Aphis fabae* on *Vicia faba* plants following seed or leaf inoculation with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **PLoS ONE**, 14:3616.

Kabak B, Dobson ADW, Var I (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 46, 593-619.

Kang X, Kirui A, Muszyński A, Dickwella Widanage MC, Chen A, Azadi P, Wang P., Mentink-Vigier F., Wang T (2018) Molecular architecture of fungal cell wall revealed by solid-state NMR. **Nat. Commun.** 9:2747.

Khan A, Singh P, Srivastava A (2018) Synthesis, nature and utility of universal iron chelator—Siderophore: A review. **Microbiol. Res.** 212–213.

Khan RAA, Najeeb S, Mao Z, Ling J, Yang Y, Li Y, Xie B. (2020) Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic bacteria and root-knot nematode. **Microorganisms** 8:401.

Kharboutli MS, Mack TP (1993). Comparison of three methods for sampling arthropod pests and their natural enemies in peanut fields. **Journal of Economic Entomology**, 86:1802-1810.

Kesavan PC, Swaminathan MS (2008) Strategies and Models for Agricultural Sustainability in Developing Asian Countries. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 363:877-891.

Klich MA (2002). Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, 94:21-27.

Klich MA (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Molecular Plant Pathology**, 8:713-722.

Klieber J, Reineke A. (2016) The entomopathogen *Beauveria bassiana* has epiphytic and endophytic activity against the tomato leaf miner *Tuta absoluta*. **J Appl Entomol**, 140:580–589.

Kumar MA, Sharma P (2016) Morphological characterization of biocontrol isolates of *Trichoderma* to study the correlation between morphological characters and biocontrol efficacy. **Int. Lett. Nat. Sci.** 55:57–67.

Kumar P, Mahato DK, Kamle M, Mohanta TK, Kang SG. (2017). Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. **Frontiers in Microbiology**, 7:2170.

Kumar RK, Kumari KC, Hembram L, Kandha BK (2019). Expression of an endo α -1,3-Glucanase gene from *Trichoderma harzianum* in rice induces resistance against sheath blight. **J. Plant Biochem. Biotechnol.** 28: 84-90.

Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI et al. (2015) Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, 132:1–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>

Lara FM. (1991) Princípios de resistência de plantas a insetos. São Paulo: Ícone, 336p.

Lee SE, Campbell BC, Molyneux RJ, Hasegawa S, Lee HS (2001). Inhibitory effects of naturally occurring compounds on aflatoxin B1 biotransformation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49:5171-5177. <http://dx.doi.org/10.1021/jf010454v>

Leuck DB, Hammons LW, Harvey JE (1967) Insect preference for peanut varieties. **Journal of Economic Entomology**, 6:1546-1549.

Liao X, O'Brien TR, Fang W, Leger RJS (2014). The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98:7089–7096.

Lima ÉFB, Alencar ÁRS, Nanini F, Michelotto MD, Corrêa AS (2022) "Unmasking the Villain": Integrative Taxonomy Reveals the Real Identity of the Key Pest (Thysanoptera: Thripidae) of Peanuts (*Arachis hypogaea* L.) in South America. **Insects** 13:120. doi: 10.3390/insects13020120.

Litwin A, Nowak M, Różalska S (2020). Entomopathogenic fungi: unconventional applications. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, 19:23–42. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09525-1>

Loc NH, Huy ND, Quang HT, Lan TT, Ha TTT (2020). Characterization and antifungal activity of extracellular chitinase from a biocontrol fungus, *Trichoderma asperellum* PQ34. **Mycology**, 11:38–48.

Logrieco A, Visconti A (2004). An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe. Dordrecht Netherlands: **Kluwer Academic Publishers**. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-2646-1>

Lynch RE, Mack TP. (1995) Biological and biotechnical advances for insect management in peanut. In: PATTEE, H.E.; STALKER, H.T. (Eds). **Advances in Peanut Science**. American Peanut Research and Education Society. p. 95-159.

Macedo MCM, Araujo AR (2012) Sistemas de integração lavoura-pecuária: alternativas para recuperação de pastagens degradadas. In: EMBRAPA GADO DE CORTE. **Integração lavoura-pecuária-floresta em pastagens: oportunidades e desafios para a sustentabilidade**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte.

Manley CV (1961) **The Biology of Stegasta bosqueella (Chambers) (Lepidoptera, Gelechiidae)**. PhD Thesis. Oklahoma State University. 34p.

Manoussopoulos Y, Mantzoukas S, Lagogiannis I, Goudoudaki S, Kambouris M (2019). Effects of Three Strawberry Entomopathogenic Fungi on the Prefeeding Behavior of the Aphid *Myzus persicae*. **Journal of Insect Behavior**, 32:99–108.

Mantzoukas S, Eliopoulos PA (2020). Endophytic Entomopathogenic Fungi: A Valuable Biological Control Tool against **Plant Pests**. **Applied Sciences**, 10:360. <https://doi.org/10.3390/app10010360>

Mantzoukas S, Lagogiannis I (2019). Endophytic Colonization of Pepper (*Capsicum annuum*) controls Aphids (*Myzus persicae* Sulzer). **Applied Sciences**, 9: 2239.

Mantzoukas S, Chondrogiannis C, Grammatikopoulos G (2015). Effects of three endophytic entomopathogens on sweet sorghum and on the larvae of the stalk borer *Sesamia nonagrioides*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 154:78–87.

Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. 2.ed. London: Academic, 1995. 889p.

Masso C, Mukhongo M, Thuita R, Abaidoo J, Ulzen G, Kariuki M (2016). Biological Inoculants for Sustainable Intensification of Agriculture in Sub-Saharan Africa Smallholder Farming Systems. In: **Climate change and multi-dimensional sustainability in African agriculture**. Springer, Cham, p. 639-658.

McGee PA (2002). Reduced growth and deterrence from feeding of the insect pest *Helicoverpa armigera* associated with fungal endophytes from cotton. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 42:995–999.

McKinnon AC, Saari S, Moran-Diez ME et al. (2017). *Beauveria bassiana* as an endophyte: a critical review on associated methodology and biocontrol potential. **Biocontrol**, 62:1–17. <https://doi.org/10.1007/s10526-016-9769-5>

Mercado-Blanco J, Lugtenberg B. (2014). Biotechnological applications of bacterial endophytes. **Current Biotechnology**, 3:60–75.

Meswaet Y, Mangelsdorff R, Yorou NS, Piepenbring M. (2021). Unravelling unexplored diversity of cercosporoid fungi (Mycosphaerellaceae, Mycosphaerellales, Ascomycota) in tropical Africa. **MycKeys**, 81:69-138. doi: 10.3897/mycokeys.81.67850.

Michelotto MD, Godoy IJ, Fávero AP, Carrega WC, Finoto EL. (2012). Occurrence of *Enneothrips flavens* moulton and *Stegasta bosquella* (Chambers) and its effects on agronomic traits of wild arachis accessions. **Biosci. J.** 29:115–124.

Michelotto MD, Santos JF, Godoy IJ, Busoli AC (2015). “Resistência a pragas e doenças em amendoim,” in **Tópicos em entomologia agrícola, vol. VIII**. (Jaboticabal - SP, Brazil: Multipress), 8:105–116.

Michelotto MD, Carrega WC, Pirotta MZ, De Godoy IJ, Lourenção AL, Martins, ALM (2019). Control of thrips (*Enneothrips flavens* Moulton.) with synthetic and biological insecticides in different peanut genotypes. **Australian Journal of Crop Science**, 13:1074-1082.

Miethke M (2013). Molecular strategies of microbial iron assimilation: From high-affinity complexes to cofactor assembly systems. **Metallomics**, 5:15–28.

Moonjely SS, Barelli L, Bidochka MJ. (2016). Insect pathogenic fungi as endophytes. In: Lovett B, Leger RJS (eds) **Advances in genetics**. Elsevier, Amsterdam, pp 107–135.

Montesano M, Brader G, Palva ET (2003). Pathogen derived elicitors: Searching for receptors in plants. **Molecular Plant Pathology**, 4:73–79.

Moraes SA, Godoy IJ (1997) Amendoim: controle de doenças. In: Zambolim L, Vale FXR (Eds.) **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: Suprema, 553 p.

Moraes AS, Godoy IJ, Pezzopane JRM, Pereira JCVNA, Silveira LCP (2001). Eficiência de fungicidas no controle da mancha preta e verrugose do amendoim por método de monitoramento. **Fitopatologia Brasileira**, 26:2. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582001000200003>.

Moraes ARA, De Lourenção AL, Godoy IJ, Teixeira GC (2005). Infestation by *Enneothrips flavens* Moulton and yield of peanut cultivars. **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, 62(5), 469-472.

Morales Ramos JÁ, Rojas MG, Shapiro Ilan D (2014). Mass production of Beneficial Organisms Invertebrates and Entomopathogens. Academic Press: Cambridge, MA, USA.

Moreno-Ruiz D, Lichius A, Turra D, Di Pietro A, Zeilinger S (2020). Chemotropism assays for plant symbiosis and mycoparasitism related compound screening in *Trichoderma atroviride*. **Frontiers in Microbiology**, 11, 601251.

Mukherjee PK, Horwitz BA, Kenerley CM (2012). Secondary metabolism in *Trichoderma*—a genomic perspective. **Microbiology**, 158, 35-45.

Mutegi CK, Ngugi HK, Hendriks SL, Jones RB (2012). Factors associated with the incidence of *Aspergillus* section Flavi and aflatoxin contamination of peanuts in the Busia and Homa bay districts of western Kenya. **Plant Pathology**, 61:1143-1153. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02597.x>

Michael JT, John OD, Melissa MC, Ahmedin J, Elizabeth MW (2011). The global burden of cancer: priorities for prevention. **Carcinogenesis**, 31:100-110.

Marsh PB, Taylor EE (1958). The geographical distribution of fiber-containing fluorescent spots associated with *Aspergillus flavus* in the United States cotton crop of 1957. **Plant Disease Reporter**, 42:1368-1371.

Muvea AM, Meyhöfer R, Subramanian S, Poehling HM, Ekesi S, Maniania NK (2014). Colonization of onions by endophytic fungi and their impacts on the biology of *Thrips tabaci*. **PLoS ONE**, 9:242.

Nakai V, de Oliveira Rocha L, Goncalvez E, Fonseca H, Ortega E, Corrêa B (2008). Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. **Food Chemistry**, 106:285-290. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.087>

Neumann NK, Stoppacher N, Zeilinger S, Degenkolb T, Bruckner H, Schuhmacher R (2015) The peptaibiotics database—A comprehensive online source. **Chem. Biodivers.** 12:743–751.

Nigude VK, Patil SA, Mohite PB, Bagade AS (2018). Seasonal incidence of tobacco leaf eating caterpillar and leaf miner of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 7:562–565.

Nogueira L, Almeida ACS, Godoy IJ, Boiça Júnior AL, Jesus FG (2019). Caracterização de cultivares de amendoim quanto ao dano de *Enneothrips flavens* (Thysanoptera: Thripidae). **Agrarian**, 12:1–7. <https://doi.org/10.30612/agrarian.v12i43.3837>

Nogueira RJM, Távora FJAF (2005) Ecofisiologia do amendoim. In: DOS SANTOS, R.C.O **agronegócio do amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, p.71-122.

Norlia M, Jinap S, Nor-Khaizura MAR, Radu S, Samsudin NIP and Azri FA (2019) *Aspergillus* section Flavi and Aflatoxins: Occurrence, Detection, and Identification in Raw Peanuts and Peanut-Based Products Along the Supply Chain. **Front. Microbiol.** 10:2602. doi: 10.3389/fmicb.2019.02602

Oliveira BN, Heuert J, Martins KBB, Costa LC, Suassuna TMF (2017) Controle químico reduzido das cercosporioses em genótipos de amendoim. **Anais... e Proceedings de eventos**, Embrapa Algodão

Omkar KK (2016). Ecofriendly Pest Management for Food Security. Academic Press: Cambridge, MA, USA; Elsevier: Cambridge, MA, USA.

Orner VA, Cantonwine EG, Wang XM, Abouelleil A, Bochicchio J, Nusbaum C, Culbreath AK, Abdo Z, Arias RS (2015) Draft Genome Sequence of *Cercospora arachidicola*, Causal Agent of Early Leaf Spot in Peanuts. **Genome Announc.** 5:12-15. doi: 10.1128/genomeA.01281-15.

Ortiz MP, Barros GG, Reynoso MM, Torres AM, Chulze SN, Ramirez ML (2011). Soil populations of *Aspergillus* section Flavi from the main and new peanut growing areas in Argentina. ISM Conference 2011 “Strategies to reduce the impact of mycotoxins in Latin America in a global context”. Abstract Book

Oszust K, Cybulska J, Frąc M (2020) How do *Trichoderma* genus fungi win a nutritional competition battle against soft fruit pathogens? A report on niche overlap nutritional potentiates. **Int. J. Mol. Sci.** 21:4235.

Ozias-Akins P, Yang H, Perry E, Akasaka Y, Niu C, Holbrook C, Lynch RE (2002). Transgenic peanut for preharvest aflatoxin reduction. **Mycopathologia**, 155: 98.

Parsa S, Ortiz V, Vega FE (2013) Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. **J Vis Exp**. 11:360. doi: 10.3791/50360.

Parvin MS, Haque MDE, Akhter F, Shafin MS (2022) Integrated Management of Peanut Foliar Diseases by Cercospora, Alternaria and Web Blotch. **Ann Agric Crop Sci**, 7:1108.

Pava-Ripoll M, Angelini C, Fang W, Wang S, Posada FJ, St Leger R. (2011). The rhizosphere-competent entomopathogen *Metarhizium anisopliae* expresses a specific subset of genes in plant root exudate. **Microbiology**, 157: 47–55.

Payne GA, Hagler WM (1983). Effect of specific amino acids on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in defined media. **Applied and Environmental Microbiology**, 46:805-812.

Pinto JRL (2018) **Aspectos bioecológicos e manejo de Stegasta bosqueella (Chambers, 1875) (Lepidoptera: Gelechiidae) na cultura do amendoim com uso de atrativo alimentar para adultos**. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Entomologia Agrícola) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Pio-Ribeiro G, Andrade GP, Moraes SA (2013) Principais doenças do amendoim e seu controle. In: Santos RC, Freire RM, Lima LM (Eds.) **O agronegócio do amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, p. 257–260; 264–265.

Posada F, Aime MC, Peterson SW, Rehner SA, Vega FE (2007). Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). **Mycol. Res.**, 111:748–757.

Poveda J. (2020) *Trichoderma parareesei* favors the tolerance of rapeseed (*Brassica napus* L.) to salinity and drought due to a chorismate mutase. **Agronomy** 10:118.

Poveda J (2021) *Trichoderma* as biocontrol agent against pests: New uses for a mycoparasite. **Biol. Control**.159:4634.

Pretty J (2008). Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. Philosophical Transactions of the Royal Society B: **Biological Sciences**, 363:447–465.

Qayyum MA, Wakil W, Arif MJ, Sahi ST, Dunlap CA (2015). Infection of *Helicoverpa armigera* by endophytic *Beauveria bassiana* colonizing tomato plants. **Biol. Control**, 90: 200–207.

Qiu Z, Tan H, Zhou S, Cao L (2014) Enhanced phytoremediation of toxic metals by inoculating endophytic *Enterobacter* sp. CBSB1 expressing bifunctional glutathione synthase. **J. Hazard. Mat.**, 267: 17–20.

Queiroz MDS (2013) **Avaliação da resistência de cultivares de amendoim de hábitos de crescimento ereto e rasteiro a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)** 60 f. Dissertação (Mestre em Agronomia – Área de Concentração: Sistemas de Produção – Faculdade de Engenharia - UNESP - Câmpus de Ilha Solteira, Ilha Solteira.

Quesada-Moraga E, Munoz-Ledesma FJ, Santiago-Alvarez C (2009). Systemic protection of *Papaver somniferum* L. against *Iraella luteipes* (Hymenoptera: Cynipidae) by an endophytic strain of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). **Environ. Entomol.**, 38: 723–730.

Rai S, Kashyap PL, Kumar S, Srivastava AK, Ramteke PW (2016) Identification, characterization and phylogenetic analysis of antifungal *Trichoderma* from tomato rhizosphere. **SpringerPlus** 5:1939.

Ramakuwela T, Hatting J, Bock C et al. (2020) Establishment of *Beauveria bassiana* as a fungal endophyte in pecan (*Carya illinoensis*) seedlings and its virulence against pecan insect pests. **Biol Control**, 140:10410. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104102>

Ramos GA, Barros MAL (2021) Sistema de Produção de Amendoim. Janeiro de 2021. Disponível em: Link. Acesso em: 24 ago. 2023.

Ravensberg WJ (2015). Commercialisation of microbes: Present situation and future prospects. In **Principles of Plant-Microbe Interactions**. Lugtenberg, B., Ed. Springer International Publishing: Heidelberg, Germany, pp. 309–317.

Razinger J, Lutz M, Schroers HJ, Urek G, Grunder J (2014) Evaluation of insect associated and plant growth promoting fungi in the control of cabbage root flies. **J. Econ. Entomol.** 107:1348–1354.

Reddy TY, Sulochanamma BN, Subramanyam A, Balaguravaiah D. (2003). Influence of weather, dry spells and management practices on aflatoxin contamination in groundnut. **Indian Phytopathology**, 56:262-265.

Reddy KRN, Salleh B, Saad B, Abbas HK, Abel CA, Shier WT (2010) An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. **Toxin Rev.** 29:3–26.

Ribeiro MS, de Paula RG, Voltan AR, de Castro RG, Carraro CB, de Assis LJ, Steindorff AS, Goldman GH, Silva RN, Ulhoa CJ, et al. (2019) Endo β 1,3 glucanase (GH16 family) from *Trichoderma harzianum* participates in cell wall biogenesis but is not essential for antagonism against plant pathogens. **Biomolecules**. 9:781. doi: 10.3390/biom9120781.

Ríos-Moreno A, Garrido-Jurado I, Resquín-Romero G et al. (2016) Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonisation of *Solanum tuberosum*. **Biocontrol Sci Technol**, 26:1574–1585. <https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1223274>

Rossetto CJ, Ribeiro IJA, Pompeu AS, Igue T (1968) Interação entre tripes, a verrugose e variedades de amendoimzeiro. *Ciência e Cultura* 20:255.

Ruas AR (2014) **Número mínimo de aplicações de fungicidas no controle das cercosporioses da cultura do amendoim**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinárias).

Rush TA, Shrestha HK, Gopalakrishnan Meena M, Spangler MK, Ellis JC, Labbé JL, Abraham PE (2021) Bioprospecting *Trichoderma*: A systematic roadmap to screen genomes and natural products for biocontrol applications. **Front. Fungal Biol.** 2021, 2:6511

Russo ML, Scorsetti AC, Vianna MF, Cabello M, Ferreri N, Pelizza S. (2019). Endophytic effects of *Beauveria bassiana* on corn (*Zea mays*) and its herbivore, *Rachiplusia nu* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insects**, 10: 110.

Russo ML, Scorsetti AC, Vianna MF, Allegrucci N, Ferreri NA, Cabello MN, Pelizza SA (2018). Effects of endophytic *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) on biological, reproductive parameters and food preference of the soybean pest *Helicoverpa gelotopoeon*. **J. King Saud Univ. Sci.** 31: 1077-1082.

Russo ML, Pelizza SA, Cabello MN, Stenglein SA, Scorsetti AC (2015). Endophytic colonisation of tobacco, corn, wheat and soybeans by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales). **Biocontrol. Sci. Technol.**, 25: 475–480.

Samson RA, Evans HC, Latg JP (1998) Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer, Berlin Heidelberg, New York.

Sánchez-Rodríguez AR, Barrón V, Del Campillo MC, Quesada-Moraga E. (2016). The entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum*: A tool for alleviating Fe chlorosis. **Plant Soil.**, 406: 295–310.

Sanders TH, Cole RJ, Blankenship PD, Hill RA (1985). Relation of environmental stress duration to *Aspergillus flavus* invasion and aflatoxin production in preharvest peanuts. **Peanut Science**, 12:90-93. <http://dx.doi.org/10.3146/pnut.12.2.0011>

Santos RC, Gody JI, Fávero AP (2005) Melhoramento do amendoim. In: Santos, R. C. O agronegócio do amendoim no Brasil. Embrapa, Campina Grande, p 193-244.

Santos AAC, Oliveira AJ, Oliveira TC, Cruz AKN, Almici MS (2021) A cultura do *Arachis hypogaea* L.: Uma revisão. **Research, Society and Development**, 10:1-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12719>.

Saravanakumar K, Yu C, Dou K, Wang M, Li Y, Chen J. (2016) Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. **Biol. Control**, 94: 37–46.

SEAB - Secretaria do Estado da Agricultura e Abastecimento. **Câmara setorial do amendoim** - Ata 24.02.2023, fevereiro 2023. Auditório da Intertek Brasil - Mirassol. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS>. Acesso em: 24 jul. 2023.

Seidl-Seiboth V, Ihrmark K, Druzhinina IS, Karlsson M (2014) Molecular evolution of *Trichoderma* chitinases. In **Biotechnology and Biology of Trichoderma**; Gupta, V.K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R.S., Druzhinina, I., Tuohy, M.G., Eds.; Elsevier: Oxford, UK, pp. 67–78.

Skinner M, Gouli S, Frank CE, Parker BL, Kim JS (2012). Management of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) with granular formulations of entomopathogenic fungi. **Biol. Control**, 63: 246–252.

Sharma A, Shukla A, Attri K, Kumar M, Kumar P, Suttie A, Singh G, Barnwal RP, Singla N. (2020) Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives. **Ecotoxicol Environ Saf.** 201:812. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110812.

Shokes FM, Culbreath AK (1997) Early and late leaf spots. In: Kokalis-Burelle N, Porter DM, Rodrigues-Kábana R, Smith DH, Subramanyan P (Eds.). Compendium of peanut diseases. 2. ed. St. Paul: **The American Phytopathological Society – APS Press**, p. 17–20.

Silva PH, Silva TMR, Fonseca AE, Junior P, Lopes MV, Barreto M. Fungicidas no manejo de cercosporioses e ferrugem na cultura do amendoim. **Anais... DO XVI Encontro sobre a cultura do amendoim**. Jaboticabal, Brasil, 2019.

Singh D, Sharma RR (2018) Postharvest diseases of fruits and vegetables and their management. In: **Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables**, Academic Press, p. 1-52, 2018.

Sinha KK, Choudhary AK, Kumari P. (2016) Chapter 15 - Entomopathogenic Fungi. In: Omkar (Editor). **Ecofriendly Pest Management for Food Security**. Academic Press, pp. 475-505, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803265-7.00015-4>.

Sood M, Kapoor D, Kumar V, Sheteiwy MS, Ramakrishnan M, Landi M, Araniti F, Sharma A (2020) *Trichoderma*: The “secrets” of a multitasking biocontrol agent. **Plants** 9:762.

Souza MB (2018). **Eficácia de fungicida cúprico no controle das cercosporioses na cultura do amendoim**. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Souza TM (2019) **Estratégias para controle de *Enneothrips flavens* Moulton, 1941 (Thysanoptera: Thripidae) e *Stegasta bosqueella* (Chambers, 1875) (Lepidoptera: Gelechiidae) em amendoim**. 2019. 82 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração: Entomologia Agrícola) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Steinhaus EA (1964) Microbial disease of insects. In: Debach, P. (Ed.), **Biological Control of Insect Pest and Weeds**. Chapman and Hall, London, pp. 515–547.

Strobel GA (2003). Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect.*, 5: 535–544.

Subrahmanyam P, McDonald D, Waliyar F, Reddy LJ, Nigam SN, Gibbons RW Smith DH (1984). Screening methods and sources of resistance to rust and late leaf spot of peanut. Information Bulletin no. 23. Patancheru, A.P. 502 324, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.

Tan R, Zou W (2001) Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites. **Natural Product Reports**, 18:448-459. <https://doi.org/10.1039/b100918o>

Tefera T, Vidal S (2009). Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **BioControl**, 54: 663–669.

Thakur M, Sohal BS Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A review. *ISRN Biochem.* 2013, 762412.

Tiwari S, Mishra DK, Singh A, Singh PK, Tuli R. (2008). Expression of a synthetic cry1EC gene for resistance against *Spodoptera litura* in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Cell Reports**, 27:1017–1025.

Tiwari RK, Singh S, Pandey RS, Sharma B. (2016) Enzymes of earthworm as indicators of pesticide pollution in soil. **Advances in Enzyme Research**, 4:113-124.

Torres AM, Barros GG, Palacios SA, Chulze SN, Battilani P (2014). Review on pre- and post-harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination. **Food Research International**, 62:11-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.023>

Tyśkiewicz R, Nowak A, Ozimek E, Jaroszek-Ścisł J. (2022) *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. **International Journal of Molecular Sciences**, 23:2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>

Vaamonde G, Patriarca A, Pinto VF, Comerio R, Degrossi C. (2003). Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section Flavi from different substrates in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, 88:79-84. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00101-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00101-6)

Varga, J., Frisvad, J., & Samson, R. (2011). Two new aflatoxin producing species and an overview of *Aspergillus* section Flavi. *Studies in Mycology*, 69, 57-80. <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2011.69.05>

Vázquez, MB, Barrera V, Bianchinotti, V. (2015) Molecular identification of three isolates of *Trichoderma harzianum* isolated from agricultural soils in Argentina, and their abilities to detoxify in vitro metsulfuron methyl. **Bot.**, 93:793-800.

Vega FE (2018). The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: A review. **Mycologia**, 110:4–30.

Vega FE, Goettel MS, Blackwell M, Chandler D, Jackson MA, Keller S, Koike M, Maniania NK, Monzón A, Ownley BH et al. (2009) Fungal entomopathogens: New insights on their ecology. **Fungal Ecol.**, 2:149–159.

Vega, F.E.; Posada, F.; Aime, M.C.; Pava-Ripoll, M.; Infante, F.; Rehner, S.A (2008) Entomopathogenic fungal endophytes. **Biological Control**, 46:72–82.

Vidhyasekaran, P., Lalithakumari, D., & Govindaswamy, C. V. (1972). Production of a phytoalexin in groundnut due to storage fungi. **Indian Phytopathology**, 25:240-245.

Vishwakarma, K.; Kumar, N.; Shandilya, C.; Mohapatra, S.; Bhayana, S.; Varma, A. Revisiting plant–microbe interactions and microbial consortia application for enhancing sustainable agriculture: A review. **Front. Microbiol.** 2020, 11:406.

Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E.L.; Marra, R.; Woo, S.L.; Lorito, M. (2008) *Trichoderma*-plant pathogen interactions. **Soil Biol. Biochem.** 40:1–10.

Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Woo SL, Nigro M, Marra R, Lombardi N, Pascale A, Ruocco M, Lanzuise S et al. (2014) *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. **Open Mycol. J.**, 8:127–139.

Verma H, Kumar D, Kumar V, Kumari M, Singh SK, Sharma VK, Droby S, Santoyo G, White JF, Kumar A. (2021) The potential application of endophytes in management of stress from drought and salinity in crop plants. **Microorganisms** 9: 1729.

Waliyar F, Kumar KK, Ntare BR, Monyo E, Nigam SN, Reddy AS, Osiru M, Diallo AT. (2015). Post-harvest management of aflatoxin contamination in peanut. **World Mycotoxin Journal**, 8:245–252.

Weindling R (1932) *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. **Phytopathology** 22:837–845.

Wilson D (1995). Endophyte—the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73: 274–276.

Wotton HR, Strange RN (1985). Circumstantial evidence for phytoalexin involvement in the resistance of peanuts to *Aspergillus flavus*. **Journal of General Microbiology**, 131:487-494.

Youssef MS, El-Maghraby OMO, Ibrahim YM (2008). Mycobiodata and mycotoxins of Egyptian peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds. **International Journal of Botany**, 4:349-360. <http://dx.doi.org/10.3923/ijb.2008.349.360>

Zaynab M, Fatima M, Abbas S, Sharif Y, Umair M, Zafar MH, Bahadar K (2018). Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. **Microb. Pathog.**, 124: 198–202.

Zafra GA, Moreno-Montaña AE, Absalón DV (2015) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, 22:1034-1042.

Zimmermann G. (2008) The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. **Biocontrol Sci Technol**, 18:865–901. <https://doi.org/10.1080/09583150802471812>

Zin NA, Badaluddin NA (2020) Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 65, n. 2, p. 168-178. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003>.

Zeilinger, S.; García-Estrada, C.; Martín, J.-F. (2015) Fungal secondary metabolites in the “OMICS” era. In **Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites**, 2nd ed.; Zeilinger, S., Martín, J.-F., García-Estrada, C., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2015; pp. 1–12.

Zhao, L.; Wang, Y.; Kong, S. (2020) Effects of *Trichoderma asperellum* and its siderophores on endogenous auxin in *Arabidopsis thaliana* under iron-deficiency stress. **Int. Microbiol.** 23:501–509.

CAPÍTULO II - Negative effects on the development of *Chrysodeixis includens* and *Spodoptera cosmioides* fed by peanut plants inoculated with entomopathogenic fungi¹

Abstract - Recent studies have shown that entomopathogenic fungi, as endophytes, can have beneficial effects on plants, protecting them from defoliating insects. The potential of endophytic association by entomopathogenic fungi with the peanut crop has been little explored. In our study, we conducted experiments by inoculation of peanut seeds through a soil drench method with nine strains/species of entomopathogenic fungi of the genera *Metarhizium*, *Beauveria* and *Cordyceps*, subsequently these plants were consumed by two larval pests, *Chrysodeixis includens* and *Spodoptera cosmioides*. The parameters of larval growth rates, mortality, foliar consumption and larval period were observed during the development of larvae. In addition, the endophytic capacity of these fungi in peanut plants and their persistence in soil were investigated. In two replicate greenhouse trials for each larva, peanut plants were inoculated with fungi by the soil-drench method. We evaluated the performance of *C. includens* and *S. cosmioides* feeding on inoculated peanut plants starting at the 2nd larval instar. The larval and pupal weights of *C. includens* and *S. cosmioides* were significantly different among the fungal treatment groups, where insects feeding on control plants exhibited higher larval and pupal weights than insects feeding on treated plants. The differences in larval period showed that Control larvae pupated faster than the larvae fed on fungal-inoculated plants, fungal treatments had a larval period of 3 to 5 days more than the control. The mortality rates of *C. includens* and *S. cosmioides* were significantly different among the fungal treatment groups, insects fed on Control plants exhibited higher survival than insects fed on fungal-inoculated plants. The persistence of all *Metarhizium* fungi was higher in the soil compared to other fungi, and only *Metarhizium* and *B. bassiana* IBCB215 emerged from the phyllosphere of peanut plants. Although the fungus *Cordyceps* presented the worst performance among the fungal treatments. Overall, our results demonstrate the negative effects on the development of *C. includens* and *S. cosmioides* that were fed on fungal-inoculated peanut plants, the best results recorded were for *Metarhizium* strains and the fungus *B. bassiana* IBCB215.

Keywords: biological control (CB), entomopathogen, peanut (*A. hypogaea* L.), hypocreales, Lepidoptera

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico publicado na revista Frontiers in Fungal Biology. Aceito em: 15 de Dezembro de 2022, <https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.9685>

INTRODUCTION

The peanut (*Arachis hypogaea* L.) is an economically important oil seed crop that can be grown as a food resource, cover crop, green manure, forage, intercrop and hay (Akram et al., 2018). The peanut is important because it is the fourth most planted oilseed in the world, whose grains represent an important source of carbohydrates, protein and oil. In addition, it is rich in vitamins and amino acids and is considered a high-calorie food (Davis et al., 2016).

Brazil produced more than 700.5 mt of peanuts in 2021/22 and occupies the 11th position among the world's largest producers, being the second largest exporter in Latin America (USDA, 2021). The largest concentration of Brazilian production is in the southeast, with the state of São Paulo being the largest producer in the country (Conab, 2022).

Nevertheless, the high agricultural cost due to the need for frequent applications of pesticides for pest control puts the viability of peanut agribusiness at risk (Santos et al., 2013; Pirota et al., 2017). Michelotto et al. (2015) estimate that approximately 30% of the total cost of production of a hectare is spent on the control of pests and diseases affecting the crop. In addition, frequent applications of pesticides have caused negative effects on the populations of natural enemies, leading to unbalanced agrosystems and pest population outbreaks (Moscardi et al., 2011).

Due to concerns about the influence of pesticides on the environment and human safety, it is necessary to push forward the development of environmentally friendly and economically viable and reliable strategies (Mantzoukas and Eliopoulos, 2020).

Among the main pests that occur in peanuts, the lepidopterous genera *Stegasta*, *Spodoptera*, *Chrysodeixis* and *Helicoverpa* are the most important (Michelotto et al., 2012; Pinto et al., 2020; Virk et al., 2021; Costa et al., 2022). In addition to lepidoptera, the peanut crop is severely attacked by thrips, especially the honeysuckle thrips *Enneothrips flavens* Molton (Lourenção et al., 2007; Calore et al., 2012; Michelotto et al., 2012).

Entomopathogenic fungi have emerged as a sustainable alternative in agroecosystems, as they can infect a large number of arthropods and maintain the pest population in balance through the field as a safe alternative to toxic chemical insecticides (Alves, 1998; Litwin et al., 2020). In Brazil, several national and multinational companies have been marketing entomopathogenic fungi as biopesticides for the control of major agricultural pests (Mascarin et al., 2019).

In addition to their use as biological insecticides, there is growing evidence that many species of entomopathogenic fungi can colonize the tissues of certain plants (Vega et al., 2008; Bamisile et al., 2018). Although only a few species have been reported as natural endophytes, there have been many successful attempts to artificially introduce the entomopathogenic fungi into plants using different techniques (Vega, 2018). This natural or artificial colonization can have several beneficial effects on plants, such as promotion of plant growth (Sasan and Bidochka, 2012), improved nutrient acquisition (Behie and Bidochka, 2014) and protection against phytopathogens and pests (Jaber and Enkerli, 2017; Vega, 2018).

Endophytic fungi can have significantly longer efficacy periods than nonendophytic organisms, since many are able to survive for at least the entire growing season of an annual crop (Harman et al., 2008). Endophytic strains of fungi, which colonize trees, can settle on the shoots, roots, or stems of perennial plants (Worapong et al., 2002; Hanada et al., 2008). Therefore, the use of entomopathogenic fungi as endophytes provides a new alternative for the biological control of pests and phytopathogens (Vidal and Jaber, 2015).

Most studies with entomopathogenic endophytic fungi have been conducted on annual and perennial crops of agronomic importance; however, studies with peanut plants are nonexistent (Vega, 2018; Mantzoukas et al., 2022). In this context, our study evaluated the effects of several species of entomopathogenic fungi on the development and plant consumption of *Spodoptera cosmioides* and *Chrysodeixis includens* in inoculated peanut plants.

MATERIALS AND METHODS

Fungal strains and inoculum preparation

Nine isolates of the fungi *B. bassiana*, *M. anisopliae* and *C. fumosorosea* were obtained from the Mycological Collection of EMBRAPA, CFI - Invertebrate Fungi (CG, Brasília, DF, Brazil) and Instituto Biológico (IBCB, Campinas, SP, Brazil) and used in bioassays (see Table 1).

TABLE 1. Origin of entomopathogenic fungi used in the bioassays.

Isolates	Strains	Origin	Host
IBCB215	<i>Beauveria bassiana</i>	Ribeirão Preto - SP	Soil
IBCB66	<i>Beauveria bassiana</i>	São José do Rio Pardo SP	<i>Hypothenemus hampei</i>
CG1126	<i>Metarhizium brunneum</i>	Flores da Cunha - RS	<i>Eurhizococcus brasiliensis</i>
CG814	<i>Metarhizium humeri</i>	Dom Aquino - MT	<i>Scaptocoris castanea</i>
CG1123	<i>Metarhizium alvesii</i>	Quixerê - CE	Soil
IBCB425	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Iporanga - SP	Soil
IBCB348	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Araras - SP	<i>Mahanarva fimbriolata</i>
IBCB 130	<i>Cordyceps fumosorosea</i>	Florínia-SP	Soil
IBCB 867	<i>Cordyceps fumosorosea</i>	Palmeiras de Goiás-GO	<i>Helicoverpa armigera</i>
Control	-	-	-

CG = Mycological Collection of EMBRAPA, CFI - Invertebrate Fungi, Brasília, DF, Brazil.

IBCB = "Oldemar Cardim Abreu" Collection of Entomopathogen Cultures, Instituto Biológico, Campinas, São Paulo, Brazil.

Fungal isolates were grown on Petri dishes with potato-dextrose-agar (PDA; KASVI) medium and incubated in a B.O. D (Bio-Oxygen Demand) incubator in the dark at $26 \pm 2^\circ\text{C}$ for 10 days.

Subsequently, solid fermentation was performed to increase the amount of inoculum used for the experiments. For solid fermentation, 250 ml borosilicate glass bottles (Schott bottles) containing 50 g of parboiled rice were used. Initially, the substrate was hydrated with 100 ml of distilled water and kept at room temperature for 50 min. Then, the rice was sieved to remove excess water and returned to the Schott bottles to be autoclaved at 120°C for 20 min.

The inoculum of each fungal isolate was prepared by scraping the conidia present in the PDA culture medium and diluting with sterilized distilled water with 0.01% (v/v) Tween 80®. Inoculation of Schott bottles was performed in an aseptic laminar flow

chamber by adding 5 ml of conidia suspension of each isolate, and then all flasks were kept in B.O.D. in the dark at $26 \pm 2^\circ\text{C}$ for 10 days.

After the proliferation of fungal isolates, a conidial suspension was prepared by washing the rice grains with 150 ml of 0.01% (v/v) Tween 80® in each flask, and the conidial concentration was adjusted to 1×10^8 conidia/ml by counting in a Neubauer hemocytometer (KASVI) with an optical microscope (LEICA DMLB).

To confirm the viability of the fungi used in the experiments, conidia germination was determined by the direct counting method in 4 ml of PDA adjusted to 0.001% (v/v) Derosal® 500 SC (Carbendazim, Bayer CropScience, SP, Brazil) in Rodac® plates incubated with suspensions of 1×10^6 conidia/ml for each fungal species (Oliveira et al., 2015).

Subsequently, the Petri plates were kept in B.O.D. for 22 h in the dark at $26 \pm 2^\circ\text{C}$. The number of germinated and nongerminated conidia was quantified under an optical microscope, estimating the percentage of germinated conidia. The suspensions were used only if germination rates were greater than 90%.

Obtaining neonatal larvae

The larvae of *C. includens* and *S. cosmioides* were obtained from the Insect Biology Laboratory of the Department of Entomology and Acarology of ESALQ-USP, Piracicaba, State of São Paul, Brazil. The eggs of both species were placed in plastic jars (500 ml) containing moist filter paper and kept in a B.O.D. chamber at $26 \pm 1^\circ\text{C}$ for 12 h of photophase. First instar neonates were fed on control (uninoculated) peanut until they reached the 2nd instar to acclimate larvae to feed on live plants versus artificial diet.

Peanut seed inoculation with entomopathogenic fungi

Peanut seeds of the variety IAC OL-3 were obtained from COPLANA - Agroindustrial Cooperative, Jaboticabal, SP, Brazil. The seeds were transferred to plastic pots (0.7 L) containing a non-sterilized soil mixture of clay loam soil and sand (2:1). Four seeds per cup were sown at a depth of 2 cm.

The inoculation of fungal isolates and the control treatment were performed by

direct application of the conidia suspension on the seed (soil drenching) according to the methodology of Parsa et al. (2013). The inoculation of each treatment was performed by applying 2 ml of the suspension with 1×10^8 conidia/ml on the seed after sowing. The control treatment was inoculated with 2 ml of sterile aqueous solution with 0.01% (v/v) Tween 80® without adding fungal inoculum.

All inoculated plants were grown in a greenhouse for 30 days at $\sim 27 \pm 3^\circ\text{C}$, with a natural photoperiod (10.5 to 13.5 hours) for the duration of the experiment. Pots were placed in a completely randomized design, watered as needed and fertilized biweekly with 3 g/dm³ of Osmocote® slow-release pelletized fertilizer (N; P₂O₅; K₂O - 14-14-14) per pot.

***S. cosmioides* and *C. includens* developmental test on peanut plants inoculated with entomopathogenic fungi**

We conducted two experiments, repeated twice in time, for each larva to check the effects of nine entomopathogenic fungi, *Metarhizium*, *B. bassiana* and *C. fumosorosea*, on the survival and development of *S. cosmioides* and *C. includens*. *S. cosmioides* larval infestation times were March 5, 2020, for the first assay and August 15th, 2021, for the second assay. *C. includens* larvae were set up on April 3, 2020, and September 21, 2021, for the first and second assays, respectively.

For each experiment, 30-day-old peanut plants were inoculated with the entomopathogenic fungi described in Table 1 and the control treatment, and in each pot, a plastic layer was placed on the soil surface to isolate the larvae by direct contact with the conidia in the soil.

It was necessary to avoid contamination by conidia to accurately assess the indirect effects of leaf and stem consumption by larvae (Figure 1).

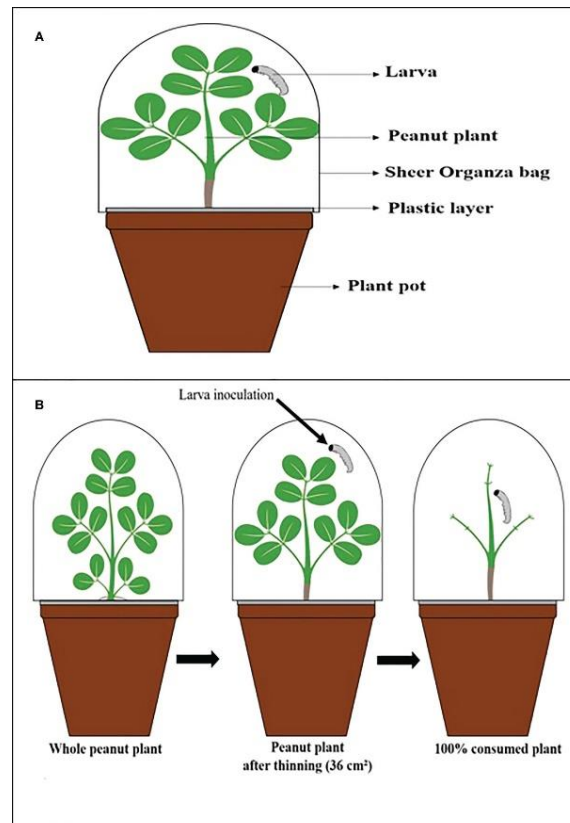


FIGURE 1. Illustrative scheme. **(A)** The vessel used in the experiments. **(B)** Thinning process of peanut plants, inoculation, and after being consumed by the larva.

Each plant was infested with a 2nd instar larva and covered with a sheer Organza bag (7 in x 9 in: 0.3 oz) to prevent larvae from escaping and allow airflow. The *C. includens* larvae were observed for 27 days and *S. cosmioides* for 30 days because each larval species has a different developmental period starting from the first instar.

Each larva within each plant was considered a repetition, and each treatment had 30 repetitions, totaling 30 infested pots per treatment. Larvae were weighed every 3 days on a high-precision scale. Mortality was recorded daily, and days to pupation, pupal weight and foliar consumption from control and treated plants were also recorded during both greenhouse trials.

If the plant reached a high level of defoliation, it was replaced by a new plant of the same treatment to continue the experiment until the larvae reached the pupal stage. For the replacement of fungal-inoculated peanut plants, new plants were sown throughout the experiments. The sowing dates of the new lots were consecutive, to

always have plants of the same age and not lack food for both larvae.

The estimate of leaf area consumed was analyzed with LeafByte mobile application (Getman-Pickering et al., 2020). Twenty-five plants 30 days old were collected and pricked, leaving only 3 pairs of 4 leaflets, and the leaves were measured to generate an estimate of leaf area for each plant.

The average was determined at 36.6 cm² for each plant. The entire consumption of a plant was considered when the larvae ate all the leaves (Figure 1), and then it was replenished with a new inoculated plant with the same age characteristics and fungal inoculation.

Colonization of entomopathogenic fungi on peanut plants and soil

Peanut plants inoculated with fungal treatments were whole washed in distilled water to remove surface dirt on leaves and the soil at the roots 30 days after inoculation. Subsequently, the plant material (roots, stems and leaves) was cut with scissors into fragments.

For each treatment, 5 plants were randomly selected, totaling 60 plant fragments per treatment (20 roots, 20 stems and 20 leaves). These samples were superficially sterilized by immersion in 70% ethanol for 1 min, 1% sodium hypochlorite (NaOCl) for 2 min, and 70% ethanol for 1 min again, rinsed three times in sterile distilled water and dried on sterile filter paper. Sterilization efficacy was confirmed by plating 100 µl of the last rinse water on PDA media, and the absence of fungal or bacterial growth was considered indicative of a successful sterilization technique (Parsa et al., 2013), and each leaf section was printed on PDA media before and after sterilization (Greenfield et al., 2016).

Plant samples were then individually placed in Petri dishes (90×15 mm) containing 20 ml of PDA with 0.5 g/L cycloheximide, 0.2 g/L chloramphenicol, 0.5 g/L Diodine (65%) and 0.01 g/L Crystal Violet (Behie et al., 2015). Petri dishes were incubated in the dark at 24°C for 15 days. Prepared suspensions of the soil where the plants grew were also seeded on the same selective medium at the following four concentrations after serial dilution in distilled water + 0.05% Tween 80®: 1×10^0 , 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , and 1×10^{-3} .

Petri dishes were incubated in the dark at 24°C for 15 days, and the presence

of colonies (CFU) was quantified at each concentration after the incubation period. The presence of entomopathogenic fungi in plant tissues and diluted soil was confirmed by observing the growth of colonies of each fungal species on the culture medium and observing the reproductive structures under an optical microscope (morphological visualization), according to the taxonomic keys described by Humber (2012). The colonization frequency was estimated as the number of fragments colonized by entomopathogenic fungi in comparison to the total number of plant fragments and expressed as a percentage.

Statistical analysis

For larval weight, period, and foliar consumption, as well as per pupal weight, homogeneity of variance was performed using the Kolmogorov-Smirnov test, which showed that the data were normally distributed. For the mortality variable, the homogeneity of variance test was performed using the Shapiro-Wilk test.

To assess *S. cosmioides* and *C. includens* mortality, larval weight, pupal weight, larval period and larval foliar consumption, an analysis of variance (ANOVA) was performed in the software R Studio® (library used “ExpDes.pt”, “agricolae” “nortest”) in a completely randomized design (CRD) (R Core Team, 2020). When a significant result was detected, the means were compared using Tukey’s test at 5% probability for mortality and Scott-Knott’s test at 5% probability for all other variables.

To compare the permanence of fungi, the quantification of colony forming units (CFU) per gram of soil was used. The log-transformed values were submitted to one-way ANOVA, considering a confidence level of 95%. Given the existence of differences, the means of the groups were compared pairwise using the Tukey honest significant difference (Tukey-HSD) test at a 5% significance level (p value < 0.05).

Statistical tests were conducted in R software (R Core Team, 2020) using native functions and the “HSD.test” function of the “agricolae” package (Mendiburu, 2021). The graphical representation of the comparison of means was obtained with the “ggplot2” package (Wickham, 2016).

RESULTS

***S. cosmioides* and *C. includens* larval and pupal weights**

The weight of *S. cosmioides* larvae was recorded for 27 days and *C. includens* for 24 days, but due to discrepancies in weight values, delays in larval development and occasional deaths, analyses of larval weights were made 15 days after the experiments were installed.

The weights of *S. cosmioides* and *C. includens* larvae fed on fungal-inoculate plants differed from the control, with the *Metarhizium* strains (CG814, CG1123, CG1126 and IBCB348) causing the lowest larval weights for both insect species (see Table 2).

TABLE 2. *S. cosmioides* and *C. includens* larval weights after feeding for 15 days on peanut plants inoculated with entomopathogenic fungi and uninoculated control.

Treatment	Larval weight on 15 th day (mg)	
	<i>Spodoptera cosmioides</i>	<i>Chrysodeixis includens</i>
Control	238.56 ± 5.30 a	261.04 ± 2.04 a
<i>Beauveria bassiana</i> IBCB66	191.35 ± 5.20 c	231.42 ± 2.41 b
<i>Cordyceps fumosorosea</i> IBCB130	207.59 ± 3.67 b	231.39 ± 4.80 b
<i>Beauveria bassiana</i> IBCB215	189.57 ± 7.23 c	207.81 ± 3.55 c
<i>Cordyceps fumosorosea</i> IBCB867	192.15 ± 4.12 c	192.25 ± 4.55 d
<i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB425	180.19 ± 5.70 c	192.11 ± 3.34 d
<i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB348	173.44 ± 5.91 d	188.41 ± 4.68 d
<i>Metarhizium brunneum</i> CG1126	161.11 ± 4.93 d	179.65 ± 4.88 e
<i>Metarhizium alvesii</i> CG1123	163.90 ± 3.77 d	176.15 ± 4.16 e
<i>Metarhizium humeri</i> CG814	163.96 ± 5.99 d	173.32 ± 4.59 e
p value	2.2 x 10 ⁻¹⁶	2.2 x 10 ⁻¹⁶
Normality Kolmogorov-Smirnov	0.09107	0.6996

Means followed by the same letter are not significantly different (Scott-Knott 5%).

For the *S. cosmioides* trial, a maximum weight of 238.56 ± 5.30 mg and a minimum weight of 161.11 ± 4.93 mg were recorded, corresponding to the control and CG1126 treatments, respectively. For the *C. includens* assay, the maximum and minimum weights were 261.04 mg and 173.32 ± 4.59 mg, respectively, corresponding to the treatment with strain CG814 (see Table 2).

In both assays, there were significant differences, and their probabilities of significance (p value) were 2.2 x 10⁻¹⁶ for both larvae. The normality values of the data, calculated by the Kolmogorov-Smirnov test, were 0.09107 for *S. cosmioides* and 0.6996 for *C. includens*.

All pupal weight treatments of both larvae were significantly different from the control,

with the exception of IBCB130 and CG1123, which had no significant differences from the control for *C. includens* treatments. *S. cosmioides* individuals from fungi-inoculated treatments (CG1123, CG1126, IBCB215 and IBCB425) had the lowest pupal weights (see Table 3).

TABLE 3. *S. cosmioides* and *C. includens* pupal weights after feeding on peanut plants inoculated with entomopathogenic fungi and uninoculated control.

Treatment	Pupal weight (mg)	
	<i>Spodoptera cosmioides</i>	<i>Chrysodeixis includens</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB425	281.69 ± 2.58 c	273.97 ± 1.55 a
<i>Cordyceps fumosorosea</i> IBCB130	289.67 ± 1.93 b	272.07 ± 2.02 a
<i>Metarhizium alvesii</i> CG1123	280.77 ± 2.33 c	271.88 ± 1.30 a
<i>Cordyceps fumosorosea</i> IBCB867	286.14 ± 1.86 b	269.84 ± 2.01 b
<i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB348	282.8 ± 2.50 c	269.67 ± 1.26 b
<i>Beauveria bassiana</i> IBCB215	281.16 ± 2.60 c	264.55 ± 2.23 b
<i>Metarhizium humeri</i> CG814	285.94 ± 2.13 b	268.52 ± 0.71 b
<i>Metarhizium brunneum</i> CG1126	278.92 ± 2.77 c	268.51 ± 0.99 b
<i>Beauveria bassiana</i> IBCB66	292.56 ± 2.35 b	266.66 ± 2.16 b
Control	327.26 ± 3.49 a	268.74 ± 2.00 b
p value	8.51 x 10 ⁻⁴⁵	0.015023
Normality Kolmogorov-Smirnov	0.1055	0.5418

Means followed by the same letter are not significantly different (Scott-Knott 5%).

The lowest pupal weights for *C. includens* individuals with fungi inoculated treatments were IBCB215, IBCB66, CG1126 and CG814. The fungi *B. bassiana* IBCB215 and *Metarhizium* CG1126 were observed to show the significantly lowest pupal weight for both larvae *S. cosmioides* and *C. includens*.

The maximum and minimum average weights of *S. cosmioides* pupae were 327.26 ± 3.49 mg and 278.92 ± 2.77 mg, corresponding to the CG1126 and control treatments, respectively. However, *C. includens* treatments IBCB425 and IBCB215 recorded a weight of 273.97 ± 1.55 mg (max.) and 264.55 ± 2.23 mg (min.) (see Table 3).

The probability values (p values) for the *S. cosmioides* and *C. includens* tests were 8.51 x 10⁻⁴⁵ and 0.015023, respectively, and the normality of the data, according to the Kolmogorov-Smirnov test at 5%, was 0.1055 and 0.5418 for *S. cosmioides* and *C. includens*, respectively.

***S. cosmioides* and *C. includens* larval period and foliar consumption**

The larval periods of the *S. cosmioides* and *C. includens* treatments were significantly different from the larval period of the control, with the exception of IBCB130, which had no significant difference from the *S. cosmioides* control treatment (see Table 4).

TABLE 4. *S. cosmioides* and *C. includens* larval period after feeding on peanut plants inoculated with entomopathogenic fungi and uninoculated control.

Treatment	Larval period (days)	
	<i>Spodoptera cosmioides</i>	<i>Chrysodeixis includens</i>
<i>Metarhizium alvesii</i> CG1123	28.44 ± 0.29 a	25.60 ± 0.27 a
<i>Metarhizium humeri</i> CG814	28.32 ± 0.30 a	25.81 ± 0.25 a
<i>Metarhizium brunneum</i> CG1126	28.07 ± 0.28 a	24.84 ± 0.30 b
<i>Beauveria bassiana</i> IBCB215	27.26 ± 0.32 b	23.36 ± 0.36 c
<i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB348	27.09 ± 0.35 b	24.50 ± 0.22 b
<i>Cordyceps fumosorosea</i> IBCB867	26.4 ± 0.19 c	23.87 ± 0.38 c
<i>Beauveria bassiana</i> IBCB66	26.35 ± 0.19 c	21.51 ± 0.31 d
<i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB425	26.25 ± 0.22 c	23.48 ± 0.31 c
<i>Cordyceps fumosorosea</i> IBCB130	25.67 ± 0.27 d	21.87 ± 0.43 d
Control	24.97 ± 0.31 d	20.30 ± 0.24 e
p value	2,48 x 10 ⁻²³	2,20 x 10 ⁻¹⁶
Normality Kolmogorov-Smirnov	0.0661	0.1240

Means followed by the same letter are not significantly different (Scott-Knott 5%).

Pairwise comparisons showed that control larvae pupated faster than the larvae fed on fungal-inoculated plants. The *Metarhizium* fungi treatments CG1123, CG814 and CG1126 had the longest *S. cosmioides* and *C. includens* larval periods. The fungi *Metarhizium* treatments CG1123 and CG814 showed the significantly longest larval delay for both larvae *S. cosmioides* and *C. includens*.

The *S. cosmioides* treatments CG1123 and Control recorded the maximum (28.44 ± 0.29 days) and minimum (24.97 ± 0.31 days) larval periods; thus, there was a larval delay of approximately 3 days for fungal-inoculated plants in comparison to the control (see Table 4). For the *C. includens* treatments CG814 and Control, the maximum (25.81 ± 0.25 days) and minimum (20.30 ± 0.24 days) larval periods were recorded, exhibiting a larval delay of approximately 5 days for fungal-inoculated plants in comparison to the control.

The mean area of leaves consumed by both larvae differed significantly among treatments (*S. cosmioides*, $p = 2.2 \times 10^{-16}$ and *C. includens*, $p = 0.000176$) (see Table 5). The control and CG814 treatments for the *S. cosmioides* and *C. includens* assays recorded the maximum (261.05 ± 5.76 cm²; 165.06 ± 6.43 cm²) and minimum (1st = 173.32 ± 7.94 cm²; 122.24 ± 7.93 cm²) leaf consumption values, respectively (see Table 5).

TABLE 5. Cumulative foliar consumption (cm²) of *S. cosmioides* and *C. includens* fed with peanut plants inoculated with entomopathogenic fungi and uninoculated control.

Treatment	Foliar consumption (cm ²)	
	<i>Spodoptera cosmioides</i>	<i>Chrysodeixis includens</i>
Control	261.05 ± 5.76 a	165.06 ± 6.43 a
<i>Beauveria bassiana</i> IBCB66	231.42 ± 5.29 b	143.83 ± 7.68 a
<i>Cordyceps fumosorosea</i> IBCB130	231.40 ± 4.82 b	150.06 ± 6.02 a
<i>Beauveria bassiana</i> IBCB215	207.81 ± 7.14 c	122.61 ± 9.95 b
<i>Cordyceps fumosorosea</i> IBCB867	192.26 ± 5.40 d	142.74 ± 6.79 a
<i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB425	192.12 ± 6.58 d	154.45 ± 6.63 a
<i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB348	188.42 ± 7.61 d	139.81 ± 7.29 a
<i>Metarhizium brunneum</i> CG1126	179.65 ± 7.38 e	127.00 ± 8.20 b
<i>Metarhizium alvesii</i> CG1123	176.15 ± 7.75 e	126.63 ± 8.37 b
<i>Metarhizium humeri</i> CG814	173.32 ± 7.94 e	122.24 ± 7.93 b
p value	2.2 x 10 ⁻¹⁶	0.000176
Normality Kolmogorov-Smirnov	0.4032	00.69

Means followed by the same letter are not significantly different (Scott-Knott 5%).

The normality values of the data, calculated by the Kolmogorov-Smirnov test, were 0.4032 for the *S. cosmioides* test and 00.69 for the *C. includens* test. The fungal *Metarhizium* strains CG1126, CG1123, and CG814 presented lower foliar consumption by both larval species.

***S. cosmioides* and *C. includens* mortality**

Comparisons showed that control individuals lived longer on average than the individuals on fungal-treated plants. *Metarhizium* strains CG1126, CG814, CG1123 and *B. bassiana* IBCB215 caused the highest mortalities on both insect species (see Table 6).

TABLE 6. Mortality (%) of *S. cosmioides* and *C. includens* fed peanut plants inoculated with entomopathogenic fungi and the uninoculated control.

Treatment	Mortality (%)	
	<i>Spodoptera cosmioides</i>	<i>Chrysodeixis includens</i>
<i>Metarhizium brunneum</i> CG1126	46 ± 5.36 ab	38 ± 5.21 a
<i>Metarhizium humeri</i> CG814	50 ± 2.82 a	38 ± 5.93 a
<i>Metarhizium alvesii</i> CG1123	46 ± 4.56 ab	34 ± 3.57 ab
<i>Beauveria bassiana</i> IBCB215	34 ± 4.56 abc	34 ± 6.69 ab
<i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB348	32 ± 4.38 abc	18 ± 5.93 abc
<i>Beauveria bassiana</i> IBCB66	16 ± 3.57 cd	18 ± 1.78 abc
<i>Cordyceps fumosorosea</i> IBCB867	20 ± 2.82 cd	18 ± 3.34 abc
<i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB425	28 ± 4.38 bcd	12 ± 5.21 bc
<i>Cordyceps fumosorosea</i> IBCB130	14 ± 4.56 cd	8 ± 5.21 c
Control	8 ± 3.34 d	6 ± 2.19 c
p value	5.12 x 10 ⁻⁰⁸	7.31 x 10 ⁻⁰⁵
Normality Shapiro-Wilk	0.1912	0.06140

Means followed by the same letter are not significantly different (Tukey 5%).

The highest mortality rates for both larvae were reported for the CG814 treatment, with 50 ± 2.82% for *S. cosmioides* and 38 ± 5.93% for *C. includens*. The lowest mortality rate in fungal treatments was recorded in IBCB130, 14 ± 4.56% for *S. cosmioides* and 8 ± 5.21% for *C. includens* (see Table 6).

The probability of significance (p value) for *S. cosmioides* and *C. includens* trials was 5.12 x 10⁻⁰⁸ and 7.31 x 10⁻⁰⁵, respectively. Additionally, the normality of the data was estimated using the Shapiro-Wilk test, obtaining values of 0.1912 and 0.06140.

Occurrence of entomopathogenic fungi in soil and peanut plants

Metarhizium (CG814, CG112, CG11236, IBCB348) and *B. bassiana* IBCB215 isolates became endophytic with relatively low colonization levels at 30 days after peanut seed inoculation (see Table 7). For *Metarhizium*, roots and leaves were colonized, while *B. bassiana* colonized stems and leaves (see Table 7).

TABLE 7. Occurrence (%) of entomopathogenic fungi in peanut plant fragments at 30 days after inoculation.

S. cosmioides and C. includens			
Treatments	Root (%)	Stem (%)	Leaf (%)
<i>Beauveria bassiana</i> IBCB215	0	20	10
<i>Beauveria bassiana</i> IBCB66	0	0	0
<i>Metarhizium brunneum</i> CG1126	25	0	10
<i>Metarhizium humeri</i> CG814	25	0	10
<i>Metarhizium alvesii</i> CG1123	20	0	15
<i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB425	10	0	0
<i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB348	15	0	5
<i>Cordyceps fumosorosea</i> IBCB 130	0	0	0
<i>Cordyceps fumosorosea</i> IBCB 867	0	0	0
Control	0	0	0

None of the target fungi were recovered from the plant tissue in the control treatment, *C. fumosorosea* isolates (IBCB 130, IBCB 867) and *B. bassiana* IBCB66. Occasionally, other unidentified fungi were grown from the plant tissues but with no apparent relationship to the treatment.

In general, the presence of all entomopathogenic fungi was higher in the soil than in the phyllosphere. For instance, the presence of some *Metarhizium* strains was significantly higher in soil (CG814 7.7×10^6 CFU/g, CG1126 6.2×10^6 CFU/g, CG1123 4.0×10^6 CFU/g and IBCB 348 9.5×10^5 CFU/g), followed by *B. bassiana* IBCB215 (1.6×10^5 CFU/g) and *M. anisopliae* IBCB425 (3.1×10^5 CFU/g) (see Figure 2).

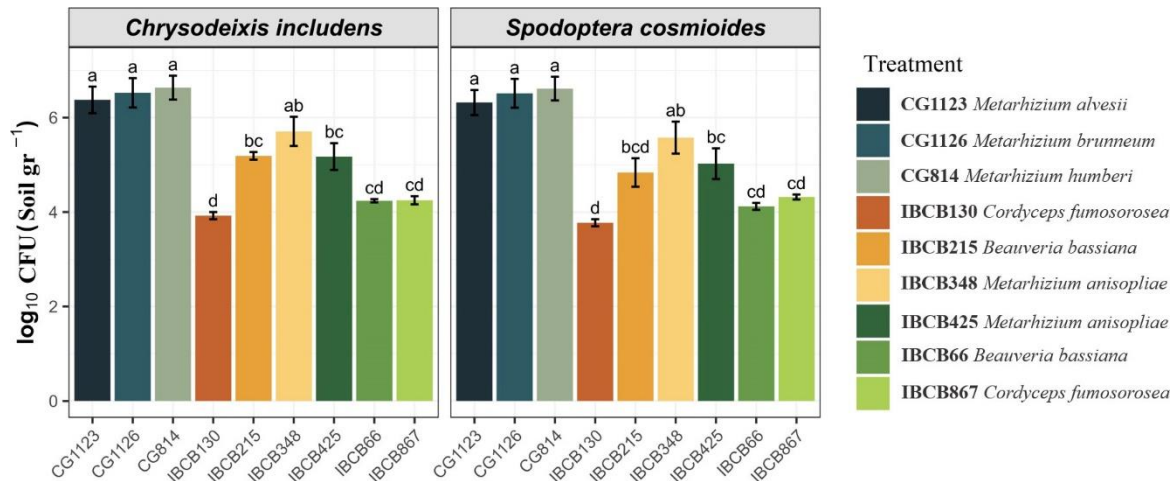


FIGURE 2. Presence of entomopathogenic fungi in CFU/g soil on peanut plants 30 days after inoculation.

DISCUSSION

Most studies of entomopathogenic fungi in agriculture over time have focused on their pathogenicity to insects by spraying formulated products on plants. However, recent studies of the ecological interaction of these fungi in soils and plants are providing a novel alternative for the management of insect pests, such as the potential of the endophytic relationship of these fungi with plants (Bamisile et al., 2018; Vega et al., 2018; Mantzoukas et al., 2022).

The ability to minimize attack from lepidopterous larvae has widely been reported by Vega et al. (2018) for many crops, but to date, no studies have been conducted with peanut plants in this sense.

Our results provide the first report on survivorship and performance parameters for *S. cosmioides* and *C. includens* fed inoculated peanut plants with entomopathogenic fungi (*Metarhizium*, *Beauveria* and *Cordyceps*).

Fungal endophytes can provide protection for crop plants against insect attack. However, some fungal and plant endophytic associations do not necessarily protect the plant from pest attacks, and only a few species associations function as defensive mutualism (Bamisile et al., 2021).

Several studies investigating the role of endophytes in protecting different crops against lepidopteran species did not measure insect performance parameters; however, they observed a reduction in the damage caused by pests (Jaber, L. R., Enkerli, J. (2017); Bamisile et al., 2018; Vega et al., 2018).

Environmental factors play a vital role in entomopathogenic fungi survival. Generally, entomopathogenic fungi survive well in nature between 10°C and 30°C, and the ideal temperature and higher humidity with frequent water spray observed in our study area could favor the activity of the fungal pathogens, as reported by Mc Coy et al. (1988).

Studying the persistence of entomopathogenic fungal pathogens is essential for their successful application and efficacy in the soil (Enkerli et al., 2004). In our study, the fungus *B. bassiana* was found in stems and leaves, while *Metarhizium* was mostly found within the plant roots and leaves.

Our results are similar to those obtained by Behie et al. (2015), who reported that *B. bassiana* and *Pochonia chlamydosporia* were localized within the stems and leaves, while *Metarhizium* spp. was mostly found within the plant roots. According to Tefera and Vidal (2009), colonization by *B. bassiana* is more widespread in leaves and stems than in roots.

Our study used the soil-drench technique to inoculate the fungi in peanut plants. Russo et al. (2019) demonstrated the effectiveness of three fungal inoculation methods (leaf spray, seed immersion and root immersion) to establish the fungus *B. bassiana* as an endophyte in soybeans, and the leaf spray inoculation method was the most successful.

However, other authors, such as Parsa et al. (2013), obtained good results in colonizing bean plants using the method performed in our study, and according to these authors and Bamisile et al. (2018), the specific outcome of endophytic colonization may depend on the target crop species or variety, the strain or isolate of entomopathogenic fungi species used, and the plant growth conditions.

Our study showed that *Metarhizium* strains had greater endophytic capacity and greater presence in the soil than the other fungi tested. Jaber and Enkerli (2017) described that fungal entomopathogens may colonize particular host plants more efficiently than others, which might consequently influence the level of plant protection

by the colonizing fungi.

A limitation of many studies is that they did not measure the consumption of plant material by larvae feeding on plants inoculated with fungi or control plants, which could show possible inhibition or compensatory feeding behavior by larvae. Measuring the leaf area of whole plants is a difficult task, but in our study, we tested a method using peanut plants of the same age and the same number of leaves after trimming, so it was possible to perform a predetermined average of the whole plants.

Our study showed that the foliar consumption of *S. cosmioides* and *C. includens* larvae was drastically lower for some fungal treatments than for the control. In a similar study, Barta (2018) described that *Cameraria ohridella* larvae that fed on horse-chestnut leaves inoculated with *Beauveria* presented leaf areas up to 5 times smaller than the leaf areas of control plants.

Cabezas et al. (2013) demonstrated that *S. cosmioides* larvae consumed a daily average of 5.58 cm² to 15.3 cm² on castor and barbados nut leaves during development from the third instar to the pupal stage, while Bueno et al. (2011) mentioned that *C. includens* larvae can consume average values of 64 cm² to 200 cm² during the larval cycle. These results are similar to our study based on control treatment for both larvae.

We observed that the consumption of larvae that fed on plants with fungus was reduced by approximately 88 cm² for *S. cosmioides* and 43 cm² for *C. includens*.

The weights of *S. cosmioides* and *C. includens* larvae and pupae were significantly different between the fungal treatment groups in our greenhouse trials. Similar results were obtained in some studies.

The authors McGee (2002); Powell et al. (2009); Leckie et al. (2008) found an effect of endophytes on the gained weight of lepidopteran species *H. armigera*, *H. punctigera* and *H. zea*. However, these effects were observed by incorporating fungal broth extracts of the endophytes into artificial diets rather than evaluating effects on insect growth via in planta feeding assays.

Some studies similar to ours that utilized in planta feeding assays (Jallow et al., 2004; Jaber and Vidal, 2010) found a significant decrease in the relative growth rate of *H. armigera* larvae feeding on *A. strictum*-inoculated plants, but they did not observe a difference in pupal weights among treatments.

Additionally, Barta (2018) found that *C. ohridella* larvae fed horse chestnut leaves had lower pupal weights than larvae fed control leaves (without fungus). Lopez and Sword (2015) did not observe a difference in pupal and larval weights of *H. zea* larvae feeding on cotton-inoculated plants.

Our results showed significant larval mortality rates for *S. cosmioides* and *C. includens* of the fungal endophyte treatment on peanut plants; almost all strains of *Metarhizium* and only one strain of *B. bassiana* in our study showed the highest rates of mortality. However, the strains of *C. fumosorosea* (IBCB 130 and IBCB 867) and *B. bassiana* IBCB66 did not show high rates of larval mortality compared to other fungi.

Other studies showed similar results with different fungal isolates, plants and insects, including the study conducted by Resquín-Romero et al. (2016), who tested the effects of inoculating the fungi *B. bassiana* and *M. brunneum* on alfalfa, tomato and melon plants on *Spodoptera littoralis* larvae.

The results showed that *S. littoralis* fed on inoculated plants had mortalities ranging from 41.7 to 76.6%. Another study by Peña-peña et al. (2015) showed mortality rates of 50% in *Anomala cincta* larvae that fed on corn plants inoculated with *M. pingshaense*.

Mantzoukas et al. (2015) also showed larval mortality rates of 70 to 100% in *Sesamia nonagrioides* feeding on sorghum plants inoculated with the fungi *B. bassiana*, *M. robertsii* and *I. fumosorosea*. Leckie (2002); Powell et al. (2009) and Lopez and Sword (2015) reported a reduction in the damage caused and mortality of *H. zea* in tomato plants after treatment with *B. bassiana*.

Another study by Sánchez-Rodríguez et al. (2018) showed that 30-57% of *S. littoralis* larvae died after consuming endophytically colonized wheat leaves. Klieber and Reineke (2016) additionally recorded 50% mortality of all larval instars and reduced longevity of *Tuta absoluta* larvae fed with *B. bassiana* colonized with tomato leaves.

In this context, according to Bamisile et al. (2018), entomopathogenic fungal endophytes activate the production of plant defense proteins in their colonizing hosts. Thus, the induced systemic responses produced by fungal endophytes are related to the amplification of expressed genes in pathogenesis (Fadiji and Babalola, 2020).

Their capacity to increase the production of important metabolites, proteins and

other defense enzymes in peanuts has been demonstrated by Senthilraja et al. (2013) in peanut seedlings inoculated with *B. bassiana* and *Pseudomonas fluorescens*. In another study, a similar combination of *B. bassiana* and *P. fluorescens* strains significantly reduced damage caused by leafminer (*Aproaerema modicella* Deventer) on peanuts (Senthilraja et al., 2010)

Our study demonstrated developmental delay up to the pupal stage for both larvae that fed on peanut plants inoculated with fungi, and the differences in larval delay in fungi treatments relative to the control reached an average of 3 to 5 days. A similar delay in pupation was observed by Jaber and Vidal (2010), who showed that *H. armigera* feeding on endophyte-treated plants in planta trials exhibited slower larval and prepupal developmental times than individuals feeding on control plants.

In contrast, Leckie et al. (2008), using *H. zea* individuals feeding on *B. bassiana* broth extracts incorporated into an artificial diet, showed that larvae feeding on endophyte treatments pupated faster than the control (13 vs. 15 days). Lopez and Sword (2015) also observed any difference in days to pupation of *H. zea* consuming cotton plants inoculated with *B. bassiana* endophyte in greenhouse trials, but they observed that control insects reached the adult stage faster than the *B. bassiana* endophyte treatment. In our study, we did not evaluate the time from pupa to adult stage of insects.

In conclusion, the manipulation of endophytic fungi has the potential to protect plants from insect herbivores. Our study demonstrated for the first time the positive effects of the endophytic entomopathogens *Metarhizium* and *B. bassiana* in peanut plants. We observed negative effects on the survival and development of two herbivorous insect pests, *S. cosmioides* and *C. includens*. Importantly, although these effects were shown in greenhouse trials, more tests need to be done to achieve field conditions using a simple seed treatment inoculation.

Similarly, a variety of other studies have reported the successful manipulation of fungal endophytes in plants with positive effects against lepidopteran insects under greenhouse and field conditions (Vakili, 1990; Bing and Lewis, 1991; Bing and Lewis, 1992a; Bing and Lewis, 1992b; Cherry et al., 1999; Cherry et al., 2004; Powell et al., 2007; Powell et al., 2009; Reddy et al., 2009; Batta, 2013; Castillo Lopez et al., 2014; Lopez and Sword, 2015; Mantzoukas et al., 2015; Qayyum et al., 2015; Shrivastava et

al., 2015; Vidal and Jaber, 2015; Klieber and Reineke, 2016; Ramírez-Rodríguez and Sánchez-Peña, 2016; Resquín-Romero et al., 2016; Sánchez-Rodríguez et al., 2018; Silva et al., 2020).

Finally, these results continue to highlight the viability of incorporating the use of fungal endophytes as functional components of integrated pest management (IPM) practices to protect plants from pests. More evaluation under field conditions is necessary to maximize efficacy when trying to incorporate fungal entomopathogens as endophytes within IPM program.

CONCLUSIONS

Our research demonstrated the potential of entomopathogenic fungi, including *Metarhizium*, *Beauveria*, and *Cordyceps* species, as effective biocontrol agents for managing larval pests in peanut crops. We observed that larvae of *C. includens* and *S. cosmioides* feeding on fungal-inoculated plants showed lower growth rates, higher mortality, and longer larval periods compared to those on control plants.

Metarhizium strains and *B. bassiana* IBCB215 showed the most promising results, with high persistence in soil and emergence from the peanut plant phyllosphere, while *Cordyceps* performed least effectively. These findings underscore the potential of entomopathogenic fungi as sustainable alternatives to traditional pesticides in peanut farming.

REFERENCES

- Akram N. A., Shafiq F., Ashraf M. (2018). Peanut (*Arachis hypogaea* L.): A prospective legume crop to offer multiple health benefits under changing climate. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17, 1325–1338. doi: 10.1111/1541-4337.12383
- Alves S. B. (1998). Controle microbiano de insetos (Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários).
- Bamisile B. S., Akutse K. S., Siddiqui J. A., Xu Y. (2021). Model application of entomopathogenic fungi as alternatives to chemical pesticides: Prospects, challenges, and insights for next-generation sustainable agriculture. *Front. Plant Sci.* 12. doi: 10.3389/fpls.2021.741804
- Bamisile B. S., Dash C. K., Akutse K. S., Keppanan R., Wang L. (2018). Fungal endophytes: Beyond herbivore management. *Front. Microbiol.* 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.00544
- Barta M. (2018). In planta bioassay on the effects of endophytic *Beauveria* strains against larvae of horse-chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella*). *Biol. Control* 121, 88–98. doi: 10.1016/j.biocontrol.2018.02.013
- Batta Y. A. (2013). Efficacy of endophytic and applied *Metarhizium anisopliae* (Metch.) sorokin (Ascomycota: Hypocreales) against larvae of *Plutella xylostella* L. (Yponomeutidae: Lepidoptera) infesting brassica napus plants. *Crop Prot.* 44, 128–134. doi: 10.1016/j.cropro.2012.11.001
- Behie S. W., Bidochka M. J. (2014). Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1553–1560. doi: 10.1128/AEM.03338-13
- Behie S. W., Jones S. J., Bidochka M. J. (2015). Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecology* 13, 112–119. doi: 10.1016/J.FUNECO.2014.08.001
- Bing L. A., Lewis L. C. (1991). Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin. *Environ. Entomol.* 20, 1207–1211. doi: 10.1093/ee/20.4.1207
- Bing L. A., Lewis L. C. (1992a). Temporal relationships between *Zea mays*, *Ostrinia nubilalis* (Lep.: Pyralidae) and endophytic *Beauveria bassiana*. *Entomophaga* 37, 525–536. doi: 10.1007/BF02372322
- Bing L. A., Lewis L. C. (1992b). Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin in corn: the influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Biocontrol Sci. Technol.* 2, 39–47. doi: 10.1080/09583159209355216

Bueno R. C. O. F., Bueno A. F., Moscardi F., Parra J. R. P., hoffmann-Campo C. B. (2011). Lepidopteran larvae consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions. *Pest Manage. Sci.* 67, 170–174. doi: 10.1002/ps.2047

Cabezas M. F., Nava D. E., Geissler L. O., Melo M., Garcia M. S., Krüger R. (2013). Development and leaf consumption by *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) reared on leaves of agroenergy crops. *Neotrop. entomol.* 42, 588–594. doi: 10.1007/s13744-013-0169-6

Calore R. A., Boiça Júnior A. L., Chagas Filho N. R., de Souza J. R. (2012). Determinação do nível de controle econômico de *Enneothrips flavens* Moulton 1941 (Thysanoptera: Thripidae) em cultivar de amendoim de porte ereto. *Arq. Inst. Biol.* 79, 263–272. doi: 10.1590/S1808-16572012000200015

Castillo Lopez D., Zhu-Salzman K., Ek-Ramos M. J., Sword G. A. (2014). The entomopathogenic fungal endophytes *Purpureocillium lilacinum* (Formerly *Paecilomyces lilacinus*) and *Beauveria bassiana* negatively affect cotton aphid reproduction under both greenhouse and field conditions. *PLoS ONE* 9, 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0103891

Cherry A. J., Banito A., Djegui D., Lomer C. (2004). Suppression of the stem-borer *Sesamia calamistis* (Lepidoptera; noctuidae) in maize following seed dressing, topical application and stem injection with African isolates of *Beauveria bassiana*. *Int. J. Pest Manage.* 50, 67–73. doi: 10.1080/09670870310001637426

Cherry A. J., Lomer C. J., Djegui D., Shulthess F. (1999). Pathogen incidence and their potential as microbial control agents in IPM of maize stem borers in West Africa. *BioControl* 44, 301–327. doi: 10.1023/A:1009991724251

Conab (2022) Safra brasileira de grãos. Available at: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4503-sao-paulo-producao-de-amendoim-aumenta-14-7-em-relacao-a-safra-anterior> (Accessed March 14, 2022).

Costa E. N., de Souza B. H. S., Eduardo W. I. (2022). Effects of peanut cultivars and neem oil on the feeding preference, growth and mortality of fall armyworm and velvet bean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). *Phytoparasitica.* 50, 1059–1073. doi: 10.1007/s12600-022-00995-3

Davis J. P., Price K. M., Dean L. L., Sweigart D. S., Cottonaro J. M., Sanders T. H. (2016). Peanut oil stability and physical properties across range of industrially relevant oleic acid/linoleic acid ratios. *Peanut Sci.* 43, 1–11. doi: 10.3146/0095-3679-43.1.1

Enkerli J., Widmar F., Keller S. (2004). Long-term field persistence of *Beauveria brongniartii* strains applied as biocontrol agents against European cockchafer larvae in Switzerland. *Biol. Control* 29, 115–123. doi: 10.1016/S1049-9644(03)00131-2

Fadiji A. E., Babalola O. O. (2020). Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8. doi: 10.3389/fbioe.2020.00467

Getman-Pickering Z. L., Campbell A., Aflitto N., Grele A., Davis J., Ugine T. A., et al. (2020). LeafByte: A mobile application that measures leaf area and herbivory quickly and accurately. *Methods Ecol. Evol.* 11, 215–221. doi: 10.1111/2041-210X.13340

Greenfield M., Gómez-Jiménez M. I., Ortiz V., Vega F. E., Kramer M., Parsa S. (2016). *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biol. Control* 95, 40–48. doi: 10.1016/j.biocontrol.2016.01.002

Hanada R. E., de Jorge Souza T., Pomella A. W. V., Hebbar K. P., Pereira J. O., Ismaiel A., et al. (2008). *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. *Mycol. Res.* 112, 1335–1343. doi: 10.1016/j.mycres.2008.06.022

Harman G. E., Björkman T., Ondik K., Shores M. (2008). Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. *Outlooks Pest Manage.* 19, 24. doi: 10.1564/19feb08

Humber R. A. (2012). “Humber Identification of entomopathogenic fungi,” in *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Ed. Lacey L. A. (USA: Academic Press), 151–187.

Jaber L. R., Enkerli J. (2017). Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth? *Biocontrol Sci. Technol.* 27, 28–41. doi: 10.1080/09583157.2016.1243227

Jaber L. R., Vidal S. (2010). Fungal endophyte negative effects on herbivory are enhanced on intact plants and maintained in a subsequent generation. *Ecological Entomology* 35, 25–36. doi: 10.1111/j.1365-2311.2009.01152.x

Jallow F. A., Cunningham J. P., Zalucki M. P. (2004). Intra-specific variation for host plant use in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): implications for management. *Crop Protect.* 23, 955–964. doi: 10.1016/j.cropro.2004.02.008

Klieber J., Reineke A. (2016). The entomopathogen *Beauveria bassiana* has epiphytic and endophytic activity against the tomato leaf miner *Tuta absoluta*. *Journal of Applied Entomology* 140, 580–589. doi: 10.1111/jen.12287

Leckie B. M. (2002). Effects of *Beauveria bassiana* mycelia and metabolites incorporated into synthetic diet and fed to larval *Helicoverpa zea*; and detection of endophytic *Beauveria bassiana* in tomato plants using PCR and ITS primers. [dissertation/master's thesis]. (Knoxville, TN: University of Tennessee).

Leckie B. M., Ownley B. H., Pereira R. M., Klingeman W. E., Jones C. J., Gwinn K. D. (2008). Mycelia and spent fermentation broth of *Beauveria bassiana* incorporated into synthetic diets affect mortality, growth and development of larval *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 18, 697–710. doi: 10.1080/09583150802262906

Litwin A., Nowak M., Różalska S. (2020). Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 19, 23–42. doi: 10.1007/s11157-020-09525-1

Lopez D. C., Sword G. A. (2015). The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). *Biological Control* 89, 53–60. doi: 10.1016/J.BIOCONTROL.2015.03.010

Lourenção A. L., de Moraes A. R. A., Godoy I. J., Ambrosano G. M. B. (2007). Efeito da infestação de *Enneothrips flavens* moulton sobre o desenvolvimento de cultivares de amendoim. *Bragantia* 66, 623–636. doi: 10.1590/S0006-87052007000400013

Mantzoukas S., Chondrogiannis C., Grammatikopoulos G. (2015). Effects of three endophytic entomopathogens on sweet sorghum and on the larvae of the stalk borer *Sesamia nonagrioides*. *entomol. Exp. Appl.* 154, 78–87. doi: 10.1111/eea.12262

Mantzoukas S., Eliopoulos P. A. (2020). Endophytic entomopathogenic fungi: A valuable biological control tool against plant pests. *Appl. Sci.* 10, 360. doi: 10.3390/app10010360

Mantzoukas S., Kitsiou F., Natsiopoulos D., Eliopoulos P. A. (2022). Entomopathogenic fungi: Interactions and applications. *Encyclopedia* 2, 646–656. doi: 10.3390/encyclopedia2020044

Mascarin G. M., Lopes R. B., Delalibera Í. Jr., Fernandes É. K. K., Luz C., Faria M. (2019). Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *J. Invertebr. Pathol.* 165, 46–53. doi: 10.1016/j.jip.2018.01.001

Mc Coy C. W., Samson R. A., Boucies D. G. (1988). “Entomogenous fungi”. In: *Handbook of Natural Pesticides*, Vol. V, Microbial Insecticides. Ed. Ignoffo C. M., Mandava N. B. (Boca Raton, FL: CRC Press), 296, 151–236.

McGee P. A. (2002). Reduced growth and deterrence from feeding of the insect pest *Helicoverpa armigera* associated with fungal endophytes from cotton. *Aust. J. Exp. Agric.* 42, 995–999. doi: 10.1071/EA01124

Mendiburu F. d. (2021) *Agricolae: Statistical procedures for agricultural research*. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae> (Accessed

March 15, 2022).

Michelotto M. D., Godoy I. J., Fávero A. P., Carrega W. C., Finoto E. L. (2012). Occurrence of *Enneothrips flavens* moulton and *Stegasta bosquella* (Chambers) and its effects on agronomic traits of wild arachis accessions. Biosci. J. 29, 115–124.

Michelotto M. D., Santos J. F., Godoy I. J., Busoli A. C. (2015). “Resistência a pragas e doenças em amendoim,” in Tópicos em entomologia agrícola, vol. VIII. (Jaboticabal - SP, Brazil: Multipress). 105–116.

Moscardi F., Souza M. L., Castro M. E. B., Moscardi M. L., Szewczyk B. (2011). “Baculovirus pesticides: present state and future perspectives,” in Pichtel. microbes and microbial technology. Eds. Ahmad I., Ahmad F. (New York: Springer), 415–445.

Oliveira D. G. P., Pauli G., Mascarin G. M., Delalibera I. (2015). A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. J. Microbiol. Methods 119, 44–52. doi: 10.1016/j.mimet.2015.09.021

Parsa S., Ortiz V., Vega F. E. (2013). Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. J. Vis. Exp. 74, 50360. doi: 10.3791/50360

Peña-peña A. J., Santillán-galicia M. T., Hernández-lópez J., Guzmán-Franco A. W. (2015). *Metarhizium pingshaense* applied as a seed treatment induces fungal infection in larvae of the white grub *Anomala cincta*. J. Invertebr. Pathol. 130, 9–12. doi: 10.1016/j.jip.2015.06.010

Pinto J., Powell S., Peterson R., Rosalen D., Fernandes O. (2020). Detection of defoliation injury in peanut with hyperspectral proximal remote sensing. Remote Sens. 12, 3828. doi: 10.3390/rs12223828

Pirotta M. Z., Silva F. M., Michelotto M. D., Fávero A. P., Godoy I. J., Unêda-travisoli S. H. (2017). Resistance to *Enneothrips flavens* moulton and genetic parameters estimation in interspecific genotypes of peanut. Acta Sci. Agron. 39, 339–348. doi: 10.4025/actasciagron.v39i3.32776

Powell W. A., Klingeman W. E., Ownley B. H., Gwinn K. D. (2009). Evidence of endophytic *Beauveria bassiana* in seed treated tomato plants acting as a systemic entomopathogen to larval *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Entomol. Sci. 44, 391–396. doi: 10.18474/0749-8004-44.4.391

Powell W. A., Klingeman W. E., Ownley B. H., Gwinn K. D., Dee M., Flanagan P. C. (2007). Endophytic *Beauveria bassiana* in tomato yields mycosis in tomato fruitworm larvae. HortScience 42, 933.

Qayyum M. A., Wakil W., Arif M. J., Sahi S. T., Dunlap C. A. (2015). Infection of *Helicoverpa armigera* by endophytic *Beauveria bassiana* colonizing tomato plants.

Biol. Control 90, 200–207. doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.04.005

Ramírez-Rodríguez D., Sánchez-Peña S. (2016). Endophytic *Beauveria bassiana* in zea mays: pathogenicity against larvae of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. Southwest. Entomol. 41, 875–878. doi: 10.3958/059.041.0330

R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing (Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing). Available at: <https://www.R-project.org/> (Accessed March 15, 2022).

Reddy N. P., Ali Khan A. P., Devi U. K., Sharma H. C., Reineke A. (2009). Treatment of millet crop plant (*Sorghum bicolor*) with the entomopathogenic fungus (*Beauveria bassiana*) to combat infestation by the stem borer, *Chilo partellus* swinhoe (Lepidoptera: Pyralidae). J. Asia-Pacif. Entomol. 12, 221–226. doi: 10.1016/j.aspen.2009.06.001

Resquín-Romero G., Garrido-Jurado I., Delso C., Ríos-Moreno A., Quesada-Moraga E. (2016). Transient endophytic colonizations of plants improve the outcome of foliar applications of mycoinsecticides against chewing insects. J. Invertebr. Pathol. 136, 23–31. doi: 10.1016/j.jip.2016.03.003

Russo M. L., Pelizza S. A., Vianna M. F., Allegrucci N., Cabello M. N., Toledo A. V., et al. (2019). Effect of endophytic entomopathogenic fungi on soybean *Glycine max* (L.) merr. growth and yield. J. King Saud Univ. 31, 728–736. doi: 10.1016/j.jksus.2018.04.008

Sánchez-Rodríguez A. R., Raya-Díaz S., Zamarreño Á. M., García-Mina J. M., Del Campillo M. C., Quesada-Moraga E. (2018). An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae. Biol. Control. 116, 90–102. doi: 10.1016/j.biocontrol.2017.01.012

Santos R.C.d., Freire R. M. M., Lima L. M. (2013). O Agronegócio do amendoim no brasil (Brasília, DF: Embrapa).

Sasan R. K., Bidochka M. J. (2012). The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. Am. J. Bot. 99, 101–107. doi: 10.3732/ajb.1100136

Senthilraja G., Anand T., Durairaj C., Raguchander T., Samiyappan R. (2010). Chitin-based bioformulation of *Beauveria bassiana* and *Pseudomonas fluorescens* for improved control of leafminer and collar rot in peanut. Crop Prot. 29, 1003–1010. doi: 10.1016/j.cropro.2010.06.002

Senthilraja G., Anand T., Kennedy J., Raguchander T., Samiyappan R. (2013). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and entomopathogenic fungus bioformulation enhance the expression of defense enzymes and pathogenesis-related proteins in peanut plants against leafminer insect and collar rot pathogen. Physiol. Mol.

Plant Pathol. 82, 10–19. doi: 10.1016/j.pmpp.2012.12.002

Shrivastava G., Ownley B. H., Augé R. M., Toler H., Dee M., Vu A., et al. (2015). Colonization by arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi enhanced terpene production in tomato plants and their defense against a herbivorous insect. *Symbiosis* 65, 65–74. doi: 10.1007/s13199-015-0319-1

Silva A. C. L., Silva G. A., Abib P. H. N. (2020). Endophytic colonization of tomato plants by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for controlling the south American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. *CABI Agric. Biosci.* 1, 3. doi: 10.1186/s43170-020-00002-x

Tefera T., Vidal S. (2009). Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *BioControl* 54, 663–669. doi: 10.1007/s10526-009-9216-y

USDA (2021) Oilseeds and products annual. foreign agricultural service. Available at: https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Oilseeds%20and%20Products%20Annual_Brasilia_Brazil_04-01-2021 (Accessed January 10, 2022).

Vakili N. G. (1990). “Biocontrol of stalk rot in corn,” in Proceedings of the Forty-fourth Annual Corn and Sorghum Industry Research Conference, Chicago, IL. Washington, DC, December 6–7, 1989, American Seed Trade Association. 87–105.

Vega F. E. (2018). The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. *Mycologia* 110, 4–30. doi: 10.1080/00275514.2017.1418578

Vega F. E., Posada F., Aime M. C., Pava-Ripoll M., Infante F., Rehner S. A. (2008). Entomopathogenic fungal endophytes. *Biol. Control* 46, 72–82. doi: 10.1016/j.biocontrol.2008.01.008

Vidal S., Jaber L. R. (2015). Entomopathogenic fungi as endophytes: plant–endophyte–herbivore interactions and prospects for use in biological control. *Curr. Sci.* 109, 46–54. doi: 10.1038/jstor.org/stable/24905690

Virk S. S., Prostko E. P., Kemerait R. C., Abney M. R., Rains G. C., Powell C. T., et al. (2021). On-farm evaluation of nozzle types for peanut pest management using commercial sprayers. *Peanut Science.* 48, 87–96. doi: 10.3146/PS21-2.1

Wickham H. (2016) *ggplot2: Elegant graphics for data analysis* (New York: Springer-Verlag). Available at: <https://ggplot2.tidyverse.org> (Accessed March 15, 2022).

Worapong J., Strobel G., Daisy B., Castillo U. F., Baird G., Hess W. M. (2002). *Muscodor roseus* anam. sp. nov., an endophyte from *Grevillea pteridifolia*. *Mycotaxon* 81, 463–475.

CAPÍTULO III – Eficácia do fungo *Trichoderma* associado ou não a fungicidas no manejo de cercosporioses na cultura do amendoim

RESUMO - As cercosporioses, também conhecidas como Mancha Castanha (*Passalora arachidicola*) e Mancha Preta (*Nothopassalora personata*), são doenças fúngicas altamente prejudiciais para as lavouras de amendoim em todo o mundo. Atualmente, o uso de fungicidas é a principal estratégia para o controle dessas doenças em plantações de amendoim. No entanto, a eficácia da combinação do *Trichoderma*, um agente de controle biológico, com fungicidas ainda não foi amplamente explorada nesse contexto. Este estudo tem como objetivo investigar a eficácia da combinação de *Trichoderma* com dois fungicidas amplamente utilizados, o Clorotalonil e o Difenconazol, no controle das cercosporioses em plantações de amendoim. Inicialmente, foi realizado um experimento *in vitro* para selecionar as cepas de *Trichoderma* mais compatíveis com os fungicidas escolhidos. Duas avaliações de campo foram conduzidas nas safras de 2020 e 2021 para avaliar a eficácia de diferentes cepas de *Trichoderma* quando associadas aos fungicidas ou aplicadas de forma isolada em sete pulverizações foliares contra as cercosporioses. Além disso, foram registradas as infestações de tripes, o custo operacional total e a produtividade do amendoim. Na primeira avaliação (safra 2020), foram selecionadas as cepas de *Trichoderma* mais promissoras, que foram posteriormente utilizadas na segunda avaliação (safra 2021). Nesta segunda avaliação, foram realizadas algumas alterações, como o número de pulverizações ao longo do ciclo do amendoim (5 ou 7). Os resultados demonstraram que os tratamentos com *Trichoderma* isolado apresentaram uma redução significativa na severidade das cercosporioses e um aumento na produtividade em comparação ao controle, embora tenham sido menos eficazes do que os tratamentos combinando *Trichoderma* com fungicidas ou os fungicidas isolados. Entre os tratamentos com fungicidas, as cepas *Trichoderma* sp. JAB 02 + F e *T. harzianum* USP 19 + F apresentaram os melhores resultados, com redução significativa da severidade das cercosporioses ($p < 0,05$) e uma produtividade notavelmente superior em comparação com os outros tratamentos. A população de tripes atingiu seu pico 68 dias após o plantio em ambas as avaliações, sendo que os tratamentos com *Trichoderma* sp. JAB 02 + F, *T. harzianum* USP 19 + F e fungicidas isolados demonstraram as menores infestações de tripes em comparação com os demais tratamentos. No geral, os resultados indicam que a combinação de *Trichoderma* com fungicidas resultou em um controle mais eficaz das cercosporioses do que o uso isolado de fungicidas. Essas descobertas destacam o potencial da combinação *Trichoderma*-fungicidas como uma estratégia promissora para o manejo de doenças e o aumento da produtividade nas plantações de amendoim. Esse estudo também ressalta a importância do *Trichoderma* como uma ferramenta sustentável para o controle de doenças na agricultura do amendoim.

Palavras-chave: combinações de fungicidas, biocontrole, resistência induzida, antagonismo, amendoim.

¹Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista *Frontiers in Plant Science* e encontra-se em avaliação para publicação.

Efficacy of *Trichoderma* associated or not with fungicides against scab and leaf spots disease in peanut

ABSTRACT - Early Leaf Spot (ELS) (*Passalora arachidicola*), Late Leaf Spot (LLS) (*Nothopassalora personata*), and Scab (*Sphaceloma arachidis*) are harmful fungal diseases for peanut crops worldwide. Fungicides are still the primary tool to control diseases in peanuts. Previous studies have shown that *Trichoderma* has the potential to control plant diseases. However, the efficacy of *Trichoderma* in combination with fungicides has not been extensively studied in peanut crops. Our study investigates the efficacy of combining *Trichoderma* with two commonly used fungicides, Chlorothalonil and Difenconazole, in controlling peanut leaf spots (LS) and scab diseases. Before the field experiments, an in vitro experiment was carried out to select compatible *Trichoderma* strains with the fungicides. Two field evaluations were conducted during the seasons of 2020 and 2021 to evaluate the efficacy of different *Trichoderma* strains in association with fungicides or not applied by seven foliar sprays against Leaf spots (LS) and scab disease. In addition, Thrips infestation, total cost operation, and peanut yield were also recorded. In the first evaluation, we selected the most promising strains and replicated them in the second evaluation with changes in the number of sprays, comparing the expenses with the sprays. Treatments with *Trichoderma* sp. JAB 02 + F (Fungicides) and *T. harzianum* USP 19 + F exhibited significant ($p < 0.05$) lowest LS and scab severity scores. These treatments also produced the highest peanut yield. The thrips population peaked 68 days after planting for both evaluations, and we hypothesize a slight relationship between this pest and scab disease. The results indicated that combining *Trichoderma* with either of the fungicides provided better disease control than the fungicides alone. The combination treatment also enhanced plant yield compared to the fungicides alone. Our findings contribute to the progress in the research discipline of plant disease management by highlighting the potential of the *Trichoderma*-fungicide combination as an effective disease management strategy for peanut cultivation. The results reveal the potentiality of *Trichoderma* as a biocontrol resource against peanut diseases and underline the importance of *Trichoderma* in sustainable management.

Keywords: fungicide combinations, biocontrol, induced resistance, antagonism, peanut

1. INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma leguminosa anual de extrema importância, sendo a quarta oleaginosa mais relevante e a 13^a cultura alimentar mais significativa em todo o mundo (Andrés et al., 2016).

Entretanto, essa cultura é vulnerável a diversas doenças causadas por fungos, principalmente em ambientes favoráveis ao desenvolvimento dos patógenos (Andrés et al., 2016).

Dentre as doenças fúngicas que afetam as plantas de amendoim, destacam-se as manchas foliares, entre elas a mancha castanha, causada por *Passalora arachidicola* (Hori) Braun (sin. *Cercospora arachidicola*), e a mancha preta, causada por *Nothopassalora personata* (Berk and M.A. Curtis) U. Braun, C. Nakash., Videia e Crous (sin. *Cercosporidium personatum*), que podem resultar em perdas significativas de rendimento (Moraes et al., 2006; Ijaz et al., 2008; Anco et al., 2020).

As manchas foliares comprometem seriamente o cultivo do amendoim, levando à desfolha das plantas e interrompendo o processo de fotossíntese. Isso resulta em vagens de menor qualidade e pode reduzir o rendimento em até 40 a 50%, caso nenhum fungicida seja aplicado para controle (Giordano et al., 2021).

Atualmente, em fazendas comerciais, é adotado um programa de aplicação de múltiplos fungicidas, juntamente com práticas culturais como rotação de culturas, remoção de resíduos de colheitas e controle de plantas daninhas, para o manejo das manchas foliares (Kemerait et al., 2005; Cantonwine et al., 2006; Kemerait et al., 2020; Giordano et al., 2021). No entanto, torna-se necessário desenvolver estratégias adicionais de controle, a fim de evitar a formação de populações fúngicas resistentes aos fungicidas (Waliyar et al., 2000).

Os fungicidas químicos têm sido a principal abordagem para o controle das manchas foliares, mas seu uso pode apresentar riscos ambientais e para a saúde humana (Raffa e Chiampo, 2021).

Estudos apontam que as manchas foliares são um grande obstáculo para a expansão da produção de amendoim, podendo resultar em perdas de rendimento de até 70% em algumas áreas, como observado na Nigéria, onde foram registradas incidências de 43,34% em 2011 e 45,36% em 2012 (Richard et al., 2018).

O *Trichoderma*, um gênero de fungo reconhecido por sua eficácia como agente de biocontrole contra diversos fitopatógenos (Brotman et al., 2010), tem emergido nos últimos anos como uma promissora abordagem para o manejo de várias doenças, seja isoladamente ou em combinação com fungicidas (Srivastava et al., 2016; Ons et al., 2020; Sánchez-Montesinos et al., 2021).

Produtos à base de *Trichoderma* estão disponíveis em diversos países, protegendo diferentes culturas contra uma variedade de fitopatógenos, promovendo o crescimento vegetal e aumentando os rendimentos sob várias condições ambientais (Woo et al., 2014; Meyer et al., 2019).

O aumento no uso combinado de *Trichoderma* com fungicidas pode estar relacionado à tolerância de algumas cepas desse fungo a produtos químicos (Chaparro et al., 2011; Widmer, 2019), que são conhecidas por produzir enzimas e metabólitos secundários envolvidos na degradação das paredes celulares dos fungos fitopatógenos, inibindo assim seu crescimento (Meyer et al., 2019). Contudo, poucos estudos têm investigado o potencial das espécies de *Trichoderma* no controle das manchas foliares em amendoins.

Em um estudo conduzido por Faisal e Tiwari (2015), a aplicação de duas cepas de *Trichoderma* não resultou em redução significativa da severidade das manchas foliares nas plantas de amendoim.

Em contraste, outro estudo conduzido por Hasan et al. (2014) mostrou que a aplicação de *Trichoderma*, tanto no tratamento de sementes quanto na aplicação foliar, resultou em melhor desempenho no controle das manchas foliares, aumentando o rendimento de vagens em 53,61%, em comparação com o tratamento controle em campo. Além disso, o tratamento com *Trichoderma* promoveu maior comprimento e peso de brotos e raízes, assim como um índice de vigor superior ao controle.

Yakubu et al. (2019) relataram que a aplicação de *T. harzianum* aumentou o rendimento e reduziu a severidade da ferrugem em feijão-caupi e as manchas foliares no amendoim.

De forma semelhante, Kumar et al. (2017) observaram que a pulverização foliar de *T. viride* em amendoim resultou em significativa redução da intensidade das manchas foliares (22,19%), comparado com o tratamento com o fungicida Carbendazim (21,90%) e o controle (42,02%). Além disso, o tratamento com

Trichoderma resultou em elevado rendimento de amendoim (q/ha) de 27,07, enquanto os tratamentos com o fungicida Carbendazim e o controle obtiveram rendimentos de 27,90 e 20,12, respectivamente.

A utilização de *Trichoderma* em combinação com fungicidas para o manejo das manchas foliares em amendoins representa uma abordagem promissora e sustentável, capaz de auxiliar os agricultores na redução de perdas nas culturas e na melhoria dos rendimentos e da qualidade, oferecendo um método de controle adicional que é tanto eficiente quanto ecologicamente amigável em conjunto com os fungicidas químicos.

Vale ressaltar que a lucratividade da produção de amendoim é limitada pelo alto custo do uso de defensivos agrícolas, principalmente os fungicidas destinados ao controle das doenças foliares (Partridge et al., 2006).

De acordo com Ons et al. (2020), o *Trichoderma*, quando combinado com fungicidas, pode aumentar a eficácia desses produtos, reduzindo seus impactos negativos no meio ambiente e na saúde humana. Assim, a combinação de um agente de biocontrole, como o *Trichoderma*, com um fungicida demonstra ser uma ferramenta eficaz para complementar o manejo de fitopatógenos.

Neste contexto, o presente estudo avaliou o efeito de várias cepas de *Trichoderma* em associação ou não com fungicidas no manejo das manchas foliares em amendoins, investigando também a relação entre o clima e a ocorrência dessas doenças, bem como a interação desses fungos com a população de tripses.

Além disso, foi realizado uma análise minuciosa do custo-benefício dessa associação, buscando demonstrar a viabilidade econômica desse complemento no contexto da produção de amendoins.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cepas fúngicas

As espécies de *Trichoderma* utilizadas neste estudo foram obtidas a partir da coleção de fungos da Amazônia, Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz, Brasil, e incluíram *Trichoderma gamsii* (número de acesso: CFAM 0044), *Trichoderma tawa* (CFAM 0149), *Trichoderma koningii* (CFAM 0358), *Trichoderma reesei* (CFAM 1162) e

Trichoderma koningiopsis (CFAM 0810). Além disso, foram utilizadas outras espécies provenientes de outros bancos de coleções de fungos, entre eles, *Trichoderma harzianum* (USP19) proveniente da coleção de fungos do departamento de biologia da Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP), Brasil, e os *Trichoderma* sp. JAB01 e *Trichoderma* sp. JAB02, provenientes da coleção de fungos do departamento de biotecnologia da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP-FCAV), Brasil.

2.2 Preparação do Inóculo Fúngico

Os isolados fúngicos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de batata-dextrose-ágar (PDA; KASVI) e incubados em uma incubadora B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio) no escuro a 26 ± 2 °C por 10 dias. Posteriormente, foi realizada a fermentação sólida para aumentar a quantidade de inóculo utilizado nos experimentos.

Para a fermentação sólida, foram utilizados sacos de polipropileno (35 cm de comprimento $\times$ 22 cm de largura) contendo 300 g de arroz parboilizado. Inicialmente, o arroz foi hidratado com 200 ml de água destilada e mantido à temperatura ambiente por 50 minutos. Em seguida, o arroz foi peneirado para remover o excesso de água e autoclavado a 120 °C por 20 minutos.

O inóculo de cada isolado de *Trichoderma* foi preparado raspando os conídios presentes no meio de cultura BDA dentro dos sacos de polipropileno contendo arroz; o procedimento foi realizado em uma câmara de fluxo laminar asséptico e, em seguida, foi mantido na incubadora B.O.D. no escuro a 26 ± 2 °C por 10 dias.

Após a proliferação dos isolados fúngicos, uma suspensão de conídios foi preparada lavando os grãos de arroz com 500 ml de 0,01% (v/v) de Tween 80® em cada saco, e a concentração de conídios foi ajustada para 1×10^9 conídios/ml por contagem em um hemocitômetro de Neubauer (KASVI) com um microscópio óptico (LEICA DMLB).

Para confirmar a viabilidade dos fungos utilizados nos experimentos, a germinação de conídios foi determinada pelo método de contagem direta em 4 ml de PDA ajustado com 0,001% (v/v) de Derosal® 500 SC (Carbendazim, Bayer CropScience, S.P., Brasil) em placas Rodac® incubadas com suspensões de 1×10^6 conídios/ml para cada espécie fúngica (Oliveira et al., 2015).

Posteriormente, as placas de Petri foram mantidas na incubadora B.O.D. por 22 horas, no escuro a 26 ± 2 °C. O número de conídios germinados e não germinados foi quantificado sob um microscópio óptico, estimando a porcentagem de conídios germinados. As suspensões foram utilizadas apenas se as taxas de germinação fossem superiores a 85%.

2.3 Compatibilidade in vitro de cepas de *Trichoderma* com fungicidas

Os fungicidas utilizados nos experimentos de campo (Clorotalonil e Difenconazol) foram previamente testados em laboratório quanto à sua compatibilidade com diferentes isolados do fungo *Trichoderma*. Esses fungicidas foram escolhidos por serem amplamente utilizados no Brasil e apresentarem menores chances de desenvolver resistência aos fitopatógenos, de acordo com Ghini et al. (2000).

Para verificar a compatibilidade das cepas de *Trichoderma* com os fungicidas, uma solução foi preparada com a mistura dos fungicidas mais *Trichoderma*, simulando artificialmente a situação em um tanque de trator no campo. Soluções estoque dos fungicidas, Clorotalonil (0,2%) e Difenconazol (0,2%), foram preparadas dissolvendo as quantidades necessárias em água destilada estéril.

Foi preparada uma suspensão de cada isolado de *Trichoderma* contendo 1×10^9 conídios/ml. A suspensão final consistiu na mistura do *Trichoderma* com os fungicidas. As dosagens dos fungicidas foram baseadas na recomendação da bula de descrição do produto para a cultura do amendoim, enquanto o fungo *Trichoderma* foi baseado em 1L/ha.

Em frascos Erlenmeyer de 250 mL, as soluções foram misturadas completamente agitando os frascos em um agitador orbital por 1 hora, 2 horas e 4 horas; a agitação foi ajustada para 120 rpm. Em cada período de 1h, 2h e 4h, foram retiradas amostras e gotas de 10 µL das misturas e foram inoculadas em placas de Petri contendo meio BDA. Foram mantidas quatro réplicas para cada tratamento, e as placas inoculadas foram incubadas a 28 ± 2 °C em uma incubadora B.O.D. Após 12 horas, 100 conídios foram contados, entre germinados e não germinados, presentes em três gotas por tratamento. A porcentagem de germinação foi calculada para cada

cepa de *Trichoderma* nas diferentes soluções.

2.4 Local do experimento de campo

Sementes de amendoim da variedade IAC OL-3 foram obtidas da COPLANA - Cooperativa Agroindustrial, Jaboticabal, SP, Brasil. Dois experimentos de campo foram conduzidos durante as safras de amendoim de 2020-21 e 2021-22 na fazenda Cesar Dandaro, em Sertãozinho, no estado de São Paulo, Brasil.

A área de cultivo está localizada entre 21° 5' 2,737" de latitude Sul e 48° 0' 41,498" de longitude Oeste. A área apresenta histórico de alta incidência de manchas foliares, com sucessivos plantios de amendoim por mais de sete anos.

As datas de semeadura dos amendoins nas safras de 20/21 e 21/22 foram 3 de dezembro de 2020 e 5 de outubro de 2021, respectivamente. Os dados climáticos da região foram coletados durante os experimentos (Tabela 1). Para a safra de 2020-21, a precipitação acumulada de setembro a abril foi de 828,7 mm e para a safra de 2021-22 foi de 1324,4 mm, respectivamente.

Tabela 1. Dados climáticos mensais das estações 20/21 e 21/22 em Sertãozinho-SP.

Ano	Mês	Temperatura (°C)			UR (%)	Precipitação (mm)
		Mínimo	Média	Máxima		
2020	Setembro	18.0	26.1	34.9	42.8	16.5
	Outubro	20.2	26.3	34.5	54.6	77.0
	Novembro	18.1	24.9	33.0	56.8	94.8
	Dezembro	20.2	24.5	31.4	76.7	312.4
2021	Janeiro	20.7	25.2	31.8	63.6	138.8
	Fevereiro	19.7	24.6	31.4	61.4	91.7
	Março	19.8	24.8	31.5	58.2	65.2
	Abril	17.8	23.6	29.6	55.2	32.3
2021	Setembro	19.5	27.5	35.2	46.0	40.5
	Outubro	18.5	25.0	37.5	70.5	272.5
	Novembro	18.7	25.2	36.1	62.4	147.9
	Dezembro	19.0	24.9	34.0	70.1	210.9
2022	Janeiro	20.3	24.2	31.1	79.3	283.8
	Fevereiro	20.0	24.6	31.2	76.2	199.2
	Março	20.4	25.4	32.3	71.0	91.9
	Abril	17.7	23.4	30.8	70.4	77.7

2.5 Primeira safra e avaliação das cercosporioses no campo

O experimento foi conduzido no campo em um delineamento em blocos completos casualizados, constituído por doze tratamentos (Tabela 2) e quatro repetições. Cada repetição foi constituída por quatro linhas de plantas, com comprimento de 5,0 metros e largura de 3,6 metros, resultando em área útil de 18 m² por repetição.

Os corredores entre as parcelas e as repetições tinham 1 m e 1,5 m, respectivamente. Ao todo, foram 48 unidades experimentais, e a área total do estudo foi de 21,6 m × 40 m = 864 m².

O genótipo de amendoim utilizado foi o IAC-OL3, cuja semeadura foi realizada em 3 de dezembro de 2020, e a densidade de plantio foi de 20 sementes por metro linear.

As pulverizações de fungicidas e *Trichoderma* foram iniciadas 30 dias após a germinação do amendoim e foram até os 118 dias após o plantio, com intervalos de 14 dias entre as pulverizações. As pulverizações foram feitas usando um atomizador costal pressurizado com CO₂, com 60 lb/in², utilizando bicos do tipo D2.

Uma barra com quatro bicos vazios do tipo cone foi acoplada ao atomizador. O volume médio de pulverização utilizado foi de 250 litros por hectare, garantindo uma pulverização uniforme das plantas.

Tabela 2. Detalhes dos tratamentos na avaliação da primeira safra.

Nº Tratamento	Tratamentos	Dosagem (L ha ⁻¹)	Pulverizações
1	Controle	-	-
2	<i>Trichoderma tawa</i> CFAM 0149	1	7
3	<i>Trichoderma koningiopsis</i> CFAM 810	1	7
4	<i>Trichoderma</i> sp. JAB 01	1	7
5	<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02	1	7
6	<i>Trichoderma harzianum</i> USP 19	1	7
7	<i>T. tawa</i> CFAM 0149 + Fungicidas	1 + (2.0/0.35)	7
8	<i>T. koningiopsis</i> CFAM 810 + Fungicidas	1 + (2.0/0.35)	7
9	<i>Trichoderma</i> sp. JAB 01 + Fungicidas	1 + (2.0/0.35)	7
10	<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02 + Fungicidas	1 + (2.0/0.35)	7
11	<i>T. harzianum</i> USP 19 + Fungicidas	1 + (2.0/0.35)	7
12	Fungicidas (Clorotalonil ¹ + Difenconazol ²)	2.0 + 0.35	7

¹ Clorotalonil (Concentração do produto - 720g/L)

² Difenconazol (Concentração do produto - 250g/L)

Todas as sementes utilizadas nos experimentos foram submetidas a tratamento químico com Pyraclostrobin, Metil Tiophanate e Fipronil (Standak® TOP, BASF S.A.) na dosagem de 300 mL/100 kg de sementes.

Para os tratamentos com *Trichoderma*, além do tratamento descrito acima, em cada tratamento, a própria cepa de *Trichoderma* foi inoculada; a inoculação foi realizada por meio da aplicação direta da suspensão de conídios (5 ml com 1×10^7 conídios/ml) na semente pelo método de “Soil Drench”, de acordo com a metodologia de Parsa et al. (2013).

O controle de insetos pragas, como tripes e o complexo de lagartas desfolhadoras, foram realizados ao longo do experimento; os inseticidas foram aplicados em todos os tratamentos, usando o Clorantpriliprole (200 g/L) e o Metomil (Metomil) (215 g/L) com dosagens de 0,6 mL e 1,6 mL/L, respectivamente.

As avaliações de severidade das manchas foliares foram realizadas aos 40, 54, 68, 82, 96 e 110 dias após a semeadura (DAS) utilizando uma escala modificada de 9 pontos descrita na Tabela 3 (Subrahmanyam et al., 1995).

Tabela 3. Escala de notas modificada para avaliação de campo da severidade das cercosporioses no amendoim.

Doença Notas	Descrição dos sintomas
1	Nenhuma doença.
2	As lesões estão presentes principalmente nas folhas inferiores; sem desfolhamento.
3	As lesões estão presentes principalmente nas folhas inferiores, muito poucas nas folhas intermediárias; desfolhamento de alguns folíolos evidente nas folhas inferiores.
4	Lesões nas folhas inferiores e médias, mas severas nas folhas inferiores; desfolhamento de alguns folíolos evidente nas folhas inferiores.
5	Lesões presentes em todas as folhas inferiores e médias; mais de 50% de desfolhamento das folhas inferiores.
6	Lesões severas nas folhas inferiores e médias; lesões presentes, mas menos severas nas folhas superiores; extensa desfolha das folhas inferiores; desfolhamento de algum folíolo evidente nas folhas médias.
7	Lesões em todas as folhas, mas menos severas nas folhas superiores; desfolhamento de todas as folhas inferiores e algumas intermediárias.
8	Desfolhamento de todas as folhas inferiores e médias; lesões severas nas folhas superiores; alguma desfolha das folhas superiores evidente.
9	Quase todas as folhas desfolhadas, deixando caules nus, alguns folíolos podem permanecer, mas apresentam manchas foliares severas.

(Subrahmanyam et al., 1995)

Para calcular a incidência da doença, o número total de plantas de amendoim e de plantas infectadas na parcela foi contado. Essas observações foram usadas para

calcular a média da incidência da doença usando a seguinte fórmula (KANADE et al., 2015):

$$\text{Incidencia da doença \%} = \frac{\text{Número de plantas apresentando sintomas de doença}}{\text{Nº total de plantas observadas}} \times 100$$

Para avaliar a severidade e incidência das manchas foliares, as plantas das duas linhas centrais de cada tratamento foram monitoradas, com 14 plantas por parcela por tratamento, totalizando 56 plantas por tratamento. Com base nos dados calculou-se a área abaixo da curva do progresso da doença - AACPD.

2.6 Avaliações de tripes

As infestações de tripes foram registradas nas duas safras, uma vez que a área tinha histórico de ataques graves por esta praga. Para avaliar o nível populacional, foi utilizado a metodologia descrita por (Lourenção et al., 2007).

Amostras de tripes foram coletadas iniciando aos 40 dias após a semeadura (DAS), repetindo a cada 14 dias até 110 DAS. Dez brotos apicais no estágio de folheto fechado foram amostrados aleatoriamente em cada parcela por tratamento. As amostras foram colocadas em sacos plásticos semipermeáveis e armazenadas em uma câmara fria a 12°C para preservação temporária.

Cada amostra corretamente identificada foi removida do armazenamento refrigerado para contar os tripes e colocada em uma placa de Petri. Um único folheto fechado foi retirado de cada broto e avaliado sob um microscópio estereoscópico; considerando a variação de tamanho entre os quatro folhetos, o folheto mais desenvolvido foi removido.

O folheto foi colocado sob o microscópio e aberto com uma pinça; o número total de tripes foi registrado.

2.7 Segunda safra e avaliação das cercosporioses no campo

A mesma metodologia descrita na primeira avaliação foi utilizada para a segunda avaliação. No entanto, apenas as cepas de *Trichoderma* que apresentaram os melhores resultados (*Trichoderma* sp. JAB 02 e *T. harzianum* USP 19) foram selecionadas (Tabela 5).

A semeadura foi realizada em 13 de novembro de 2021. Além disso, foram testadas menos pulverizações, comparando o volume de 5 e 7 pulverizações (Tabela 5). A intenção de reduzir as pulverizações era comparar se os resultados poderiam ser economicamente satisfatórios com menos pulverizações de fungicidas quando associados ao *Trichoderma*. Para sete pulverizações, as aplicações de fungicidas e *Trichoderma* começaram 30 dias após a germinação do amendoim e duraram até os 118 dias do ciclo do amendoim, com intervalos de 14 dias entre as pulverizações; para sete pulverizações e 15 dias para 5 pulverizações.

Tabela 4. Detalhes dos tratamentos na segunda avaliação.

Tratamentos	Dosagem (L ha ⁻¹)	Pulverizações
Controle	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02	1	7
<i>Trichoderma harzianum</i> USP 19	1	7
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02 + Fungicidas	1 + (2/0.35)	5
<i>Trichoderma harzianum</i> USP 19 + Fungicidas	1 + (2/0.35)	5
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02 + Fungicidas	1 + (2/0.35)	7
<i>T. harzianum</i> USP 19 + Fungicidas	1 + (2/0.35)	7
Fungicidas (Clorotalonil ¹ + Difenconazol ²)	2 + 0.35	7

¹ Clorotalonil (Concentração do produto - 720g/L)

² Difenconazol (Concentração do produto - 250g/L)

Custo operacional total, lucro e rendimento do amendoim na segunda avaliação

A colheita do amendoim foi realizada entre 130 DAP com a ajuda de um trator em ambas as safras dos experimentos. As parcelas foram mantidas invertidas por quatro dias para completar o processo de secagem (secagem ao sol) no campo.

Após a secagem, foram coletados 4 metros de plantas das duas linhas centrais de cada bloco/tratamento. As vagens foram colhidas manualmente das plantas e ensacadas para posterior pesagem. O peso por parcela foi extrapolado para a escala

de quilogramas por hectare para obter a média da produção de vagens por hectare. Os dados de produção foram transformados em produção de vagens (kg/ha), peso de 100 sementes (g) P100S e sacas (25 kg).

Para a análise econômica da produção de amendoim, considerou-se o preço médio recebido pelo produtor na safra 2021/2022. O custo de produção pode variar dependendo de vários fatores, como o sistema de cultivo, disponibilidade de insumos e suporte técnico, disponibilidade de mão de obra, custo de arrendamento de terras e precificação de insumos no mercado internacional.

A simulação dos valores de lucro e renda obtidos foi realizada usando a metodologia proposta por Barbosa et al. (2014), obtendo o Custo Operacional Efetivo (COE) e o Custo Operacional Total (COT). O COE consiste em despesas diretas, como operações mecanizadas, operações manuais, material consumido e despesas com serviços terceirizados e contratos de trabalho.

O COT foi obtido adicionando outras despesas e o valor do arrendamento ao valor do COE. Os valores de cada item, referentes ao ano de 2021, foram calculados da seguinte forma: Custo horário da máquina e implementos: foram considerados os gastos com combustível, além do valor estimado para reparos e manutenção, garagem e taxa de seguro.

A depreciação foi calculada usando o método linear, considerando o valor residual do trator igual a 20% do valor novo. Já para os implementos, o valor residual foi considerado zero, dados obtidos junto a produtores e cooperativas da região.

Foram considerados os valores praticados na região de Sertãozinho, SP, para despesas com insumos de produção e operações manuais. Para outras despesas (Transporte Externo, Despesas Administrativas, armazenamento, Assistência Técnica, CESSR (Contribuição Especial para a Seguridade Social Rural), Juros de Custeio, Seguro do Capital Fixo e Remuneração Esperada sobre Capital Fixo), foi considerada a taxa de 5% sobre o COE.

Os seguintes indicadores de rentabilidade foram estimados usando os ganhos brutos (GB) menos o preço médio de sacas de amendoim (25 kg) recebido pelos agricultores.

2.8 Análise estatística

Todos os dados foram avaliados por meio de análise de variância de um fator (ANOVA), com um nível de significância de valor $p \leq 0,05$, para investigar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos tratamentos.

Em todos os ensaios, a significância estatística foi determinada usando o teste post-hoc de Scott-Knott para realizar comparações em pares das médias com um nível de significância de valor $p \leq 0,05$, e posteriormente agrupadas de acordo.

As escalas de notas das cercosporioses foram transformadas em porcentagem de acordo com Subrahmanyam et al. (1995) e os resultados das avaliações (ASCPD) foram transformados em $\sqrt{X}$. As Áreas Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPDs) foram calculadas usando a função AUDPC do pacote R epifitter v.0.3.0 (Alves e Del Ponte, 2021). Para realizar esta análise, foi utilizado a função "SK" do pacote "ScottKnott" (Jelihovschi et al., 2014), que está implementado no software estatístico R (R Core Team, 2020). Representações gráficas foram geradas utilizando o pacote R "ggplot2" (Wickham, 2016).

3. RESULTADOS

3.1 Compatibilidade do fungo *Trichoderma* com fungicidas in vitro

Na avaliação de compatibilidade, apenas viabilidades superiores a 80% foram consideradas aceitáveis. Produtos comerciais à base do fungo *Trichoderma* geralmente apresentam viabilidades acima desse valor para estarem em boas condições (Kumar, 2014).

Entre as oito cepas de *Trichoderma*, cinco cepas excederam 80% de germinação na primeira e segunda horas de exposição (Tabela 5). Por outro lado, os tratamentos *Trichoderma* sp JAB 02 e *T. harzianum* USP 19, na quarta hora de exposição, foram os únicos a exceder essa porcentagem de germinação, com valores de 82% e 83,25%, respectivamente (Tabela 5). *T. harzianum* USP 19 foi o tratamento que obteve a maior germinação, com percentuais de 88,25%, 86,75% e 83,25% na primeira, segunda e quarta hora de exposição, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Compatibilidade in vitro dos fungicidas (Clorotalonil e Difenconazol) com diferentes cepas de *Trichoderma* após 1, 2 e 4 horas de exposição

Tratamentos	Germinação conídios (%)		
	Horas		
	H1 ¹	H2 ²	H4 ³
<i>T. gamsii</i> CFAM 0044	75.25 (± 4.92) b	72.50 (± 4.20) b	51.75 (± 1.70) e
<i>T. koningii</i> CFAM 0358	75.25 (± 6.29) b	72.50 (± 5.74) b	52.25 (± 1.70) e
<i>T. reesei</i> CFAM 1162	76.00 (± 3.74) b	75.00 (± 4.16) b	59.75 (± 2.21) d
<i>T. tawa</i> CFAM 0149	84.75 (± 2.50) a	83.25 (± 2.50) a	73.00 (± 1.82) c
<i>T. koningiopsis</i> CFAM 810	86.25 (± 1.50) a	83.75 (± 1.50) a	76.50 (± 2.38) b
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 01	83.75 (± 1.70) a	82.00 (± 2.16) a	76.50 (± 1.29) b
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02	88.00 (± 0.81) a	86.50 (± 1.29) a	82.00 (± 1.63) a
<i>T. harzianum</i> USP 19	88.25 (± 0.95) a	86.75 (± 0.95) a	83.25 (± 1.70) a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (5%).

¹H1 - 1 hora após a exposição; ²H2 - 2 horas após a exposição; ³H4 - 4 horas após a exposição

3.2 Primeira avaliação do uso de *Trichoderma* associado ou não com fungicidas no manejo de cercosporioses no amendoim

A primeira avaliação da doença, conduzida aos 40 DAP, foi crucial para compreender o impacto dos diferentes tratamentos no controle da cercosporiose (Tabela 6). Comparados ao tratamento controle com 2.85% ($\pm$ 2.49), todos os tratamentos apresentaram reduções significativas na severidade da doença (Tabela 6).

Notavelmente, tratamentos que envolveram a combinação das cepas de *Trichoderma* com fungicidas exibiram as menores porcentagens de severidade da cercosporiose, com diferenças entre os tratamentos estatisticamente significativas (p-valor <0.001) (Tabela 6).

Embora não tenham sido identificadas diferenças estatísticas significativas entre o uso isolado do *Trichoderma* ou sua associação com fungicidas, a aplicação conjunta dessas estratégias de manejo exerceu um efeito conjunto mais pronunciado.

Aos 54 DAP, foi observado uma continuação da tendência de redução na severidade da cercosporiose (Tabela 6). Entretanto, não foram identificadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos isolados com as diferentes espécies de *Trichoderma* ou quando combinados com fungicidas.

Os resultados aos 68 DAP, apresentaram similaridades em relação à avaliação realizada aos 40 DAP (Tabela 6). Mais uma vez, todos os tratamentos associados com as cepas de *Trichoderma*, em conjunto com os fungicidas isolados, demonstraram as menores severidades da doença.

Uma exceção notável foi identificada nos tratamentos *Trichoderma asperelum* JAB 02 e *T. harzianum* USP 19, que não exibiram diferenças estatisticamente significativas quando comparados aos tratamentos associados aos fungicidas (Tabela 6).

Ao atingir os 82 DAP, os tratamentos que combinaram as cepas de *Trichoderma* com fungicidas ou utilizaram apenas os fungicidas isolados apresentaram as menores severidades da doença (Tabela 6). Esses resultados mantiveram sua robustez estatística (p-valor <0.001).

Prosseguindo para os 96 DAP, a tendência de redução na severidade da cercosporiose permaneceu constante. Novamente, os tratamentos que envolviam as cepas de *Trichoderma* e fungicidas, ou apenas os fungicidas, demonstraram as menores severidades da doença (Tabela 6).

Ao alcançarmos o ponto crítico dos 110 DAP, os resultados elucidaram de maneira clara a eficácia dos tratamentos que envolviam a aplicação isolada dos fungicidas ou sua combinação com as cepas de *Trichoderma* (Tabela 6).

É interessante notar que os tratamentos *Trichoderma asperelum* JAB 02 + F e *T. harzianum* USP 19 + F alcançaram as menores porcentagens, 6.339% (± 2.234) e 6.161% (± 2.13), respectivamente. Estas porcentagens diferiram estatisticamente do uso isolado do fungicida, que apresentou 8.48% (± 2.32) (Tabela 6).

Em contraste, o tratamento controle, que não recebeu intervenções, exibiu a maior porcentagem de doença, com 70.714% (± 10.065), sublinhando um nível substancial de infecção (Tabela 6).

A análise de variância (ANOVA) revelou diferenças altamente significativas (P-valor <0.001) entre os tratamentos, destacando a influência significativa da escolha do tratamento na severidade da cercosporiose aos 110 DAP (Tabela 6).

A Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) emergiu como um parâmetro crítico para avaliar o desenvolvimento da doença ao longo do tempo. Este estudo claramente destacou a eficácia de determinados tratamentos na redução da progressão da cercosporiose em comparação com o grupo de controle não tratado (Tabela 6).

O tratamento controle apresentou a maior AACPD, com um valor de 93.03 (± 10.10), indicando uma progressão intensa da doença sem intervenções para seu controle (Tabela 6).

A abordagem que combinou diferentes cepas de *Trichoderma* com fungicidas resultou nas menores AACPDs. Essa associação demonstrou ser altamente eficaz em retardar a progressão da doença. Entre esses tratamentos, *T. harzianum* USP 19 + F exibiu a menor AACPD, com um valor de 16.07 (± 4.00), seguido por *T. asperelum* JAB 02 + F e *T. viride* JAB 01 + F (Tabela 6). Esses resultados enfatizaram a importância da abordagem combinada no controle eficaz da doença.

Tratamentos individuais utilizando diferentes cepas de *Trichoderma* também

resultaram em reduções significativas na AACPD em comparação com o controle. *T. asperelum* JAB 02, *T. harzianum* USP 19 e *T. viride* JAB 01 apresentaram AACPDs menores, indicando a eficácia desses tratamentos em controlar a progressão da doença. No entanto, o uso isolado do *Trichoderma* não superou o uso isolado ou associado aos fungicidas.

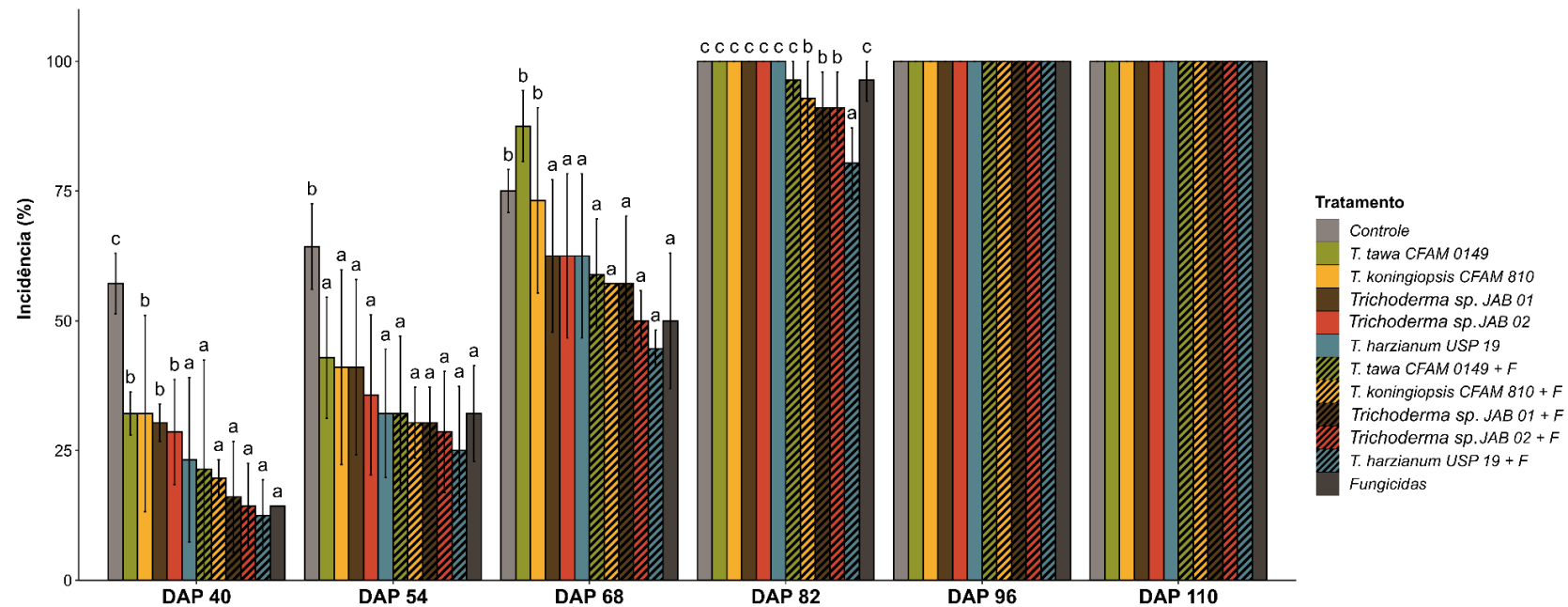
Tabela 6. Resultados médios da primeira avaliação da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), obtidos a partir de seis avaliações da severidade de Cercosporiose registradas a cada 14 dias em plantas de amendoim.

Tratamento	DAP 40	DAP 54	DAP 68	DAP82	DAP 96	DAP 110	AACPD
% Severidade							
Controle	2.85 (± 2.49) c	3.21 (± 2.41) b	5.08 (± 3.63) b	14.82 (± 5.04) e	34.82 (± 5.71) d	70.71 (± 10.06) e	93.03 (± 10.10) d
<i>T. tawa</i> CFAM 0149	1.60 (± 2.35) b	2.14 (± 2.49) a	4.82 (± 2.32) b	10.98 (± 3.97) d	20.17 (± 7.00) c	30.89 (± 6.11) d	55.71 (± 7.36) c
<i>T. koningiopsis</i> CFAM 810	1.60 (± 2.35) b	2.05 (± 2.48) a	4.10 (± 2.87) b	10.17 (± 3.15) c	19.28 (± 8.70) c	30.53 (± 5.85) d	52.14 (± 9.08) c
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 01	1.51 (± 2.32) b	2.05 (± 2.48) a	3.92 (± 3.53) b	9.73 (± 1.13) c	19.10 (± 9.2) c	30.17 (± 7.00) d	50.00 (± 8.88) c
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02	1.42 (± 2.27) b	1.78 (± 2.41) a	3.57 (± 3.12) a	8.66 (± 2.23) b	17.67 (± 4.66) c	28.21 (± 3.86) c	46.96 (± 5.64) b
<i>T. harzianum</i> USP 19	1.16 (± 2.13) a	1.60 (± 2.35) a	3.39 (± 2.87) a	8.57 (± 2.27) b	15.26 (± 5.17) b	27.85 (± 4.14) c	43.57 (± 4.87) b
<i>T. tawa</i> CFAM 0149 + F	1.07 (± 2.07) a	1.60 (± 2.35) a	3.03 (± 2.64) a	5.62 (± 2.14) a	7.76 (± 2.50) a	8.30 (± 2.38) b	22.85 (± 7.12) a
<i>T. koningiopsis</i> CFAM 810 + F	0.98 (± 2.00) a	1.51 (± 2.32) a	2.94 (± 2.65) a	5.00 (± 1.90) a	7.58 (± 2.52) a	8.12 (± 2.44) b	21.07 (± 5.06) a
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 01 + F	0.80 (± 1.85) a	1.52 (± 2.32) a	2.85 (± 2.49) a	4.91 (± 2.02) a	7.32 (± 2.51) a	7.85 (± 2.49) b	20.53 (± 5.97) a
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02 + F	0.71 (± 1.76) a	1.42 (± 2.27) a	2.50 (± 2.52) a	4.55 (± 1.43) a	6.16 (± 2.13) a	6.33 (± 2.23) a	18.92 (± 4.56) a
<i>T. harzianum</i> USP 19 + F	0.62 (± 1.66) a	1.25 (± 2.18) a	2.23 (± 2.50) a	4.37 (± 2.53) a	5.98 (± 2.00) a	6.16 (± 2.13) a	16.07 (± 4.00) a
Fungicidas	0.71 (± 1.76) a	1.60 (± 2.35) a	2.50 (± 2.52) a	5.35 (± 1.87) a	8.03 (± 2.46) a	8.48 (± 2.32) b	21.96 (± 4.61) a
Coeficiente de variação - CV (%)	172.65	132.54	86.36	53.47	69.34	85.27	59.21
p-valor (ANOVA)	<0.001	0.002	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (5%).

Com relação à incidência de cercosporiose, observou-se variação até os 82 dias após o plantio (Figura 1). Os tratamentos que envolveram o uso de *Trichoderma* em combinação com fungicidas exibiram as menores taxas de plantas infectadas pela cercosporiose, com exceção do tratamento que utilizou *T. tawa* CFAM 0149 (Figura 1). No entanto, aos 96 dias após o plantio, é demonstrado a evidente infecção em todas as plantas na área pela doença (Figura 1). Dessa maneira, conclui-se de que a cercosporiose afetou 100% da área avaliada, embora tenham ocorrido diferenças significativas na sua severidade entre os tratamentos.

Figura 1. Resultados médios da incidência de cercosporiose obtidos a partir de seis avaliações registradas a cada 14 dias em plantas de amendoim.



Durante as avaliações, as condições climáticas se revelaram altamente propícias para o surgimento de sintomas da doença, especialmente devido às frequentes precipitações no mês de plantio. Registrou-se um acúmulo de mais de 300 mm de chuva nos 40 dias que precederam o aparecimento dos primeiros sintomas (Tabela 1; Figura 2).

No tratamento controle, a incidência da doença atingiu próximo aos 75%, enquanto os demais tratamentos que apresentaram taxas inferiores a 25% foram aqueles que utilizaram a combinação de *Trichoderma* com fungicidas e/ou uso isolado de fungicidas (Tabela 1; Figura 2).

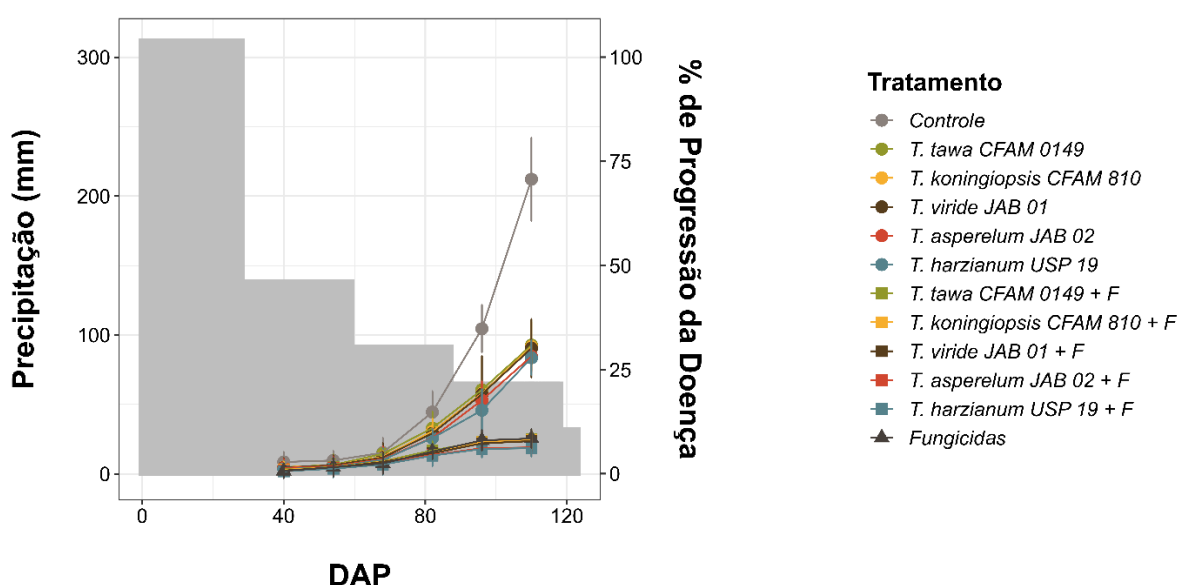


Figura 2. Correlação entre os dados médios de precipitação pluviométrica e a progressão da cercosporiose nas plantas de amendoim durante todo período da primeira avaliação.

3.2.1 Primeira avaliação das infestações de tripes

A maior ocorrência de tripes no cultivo de amendoim foi registrada aos 68 DAS (Tabela 7). Os tratamentos que apresentaram os valores mais elevados foram *T. tawa* CFAM 0149 (6,425), *T. koningiopsis* CFAM 810 (6,025) e *Trichoderma sp.* JAB 01 (5,925). Por outro lado, os tratamentos com *T. harzianum* USP 19 + F (4,85) e *Trichoderma sp.* JAB 02 + F (4,9) demonstraram as taxas mais baixas de infestação de tripes nas plantas (Tabela 7).

As plantas submetidas aos tratamentos com *Trichoderma sp.* JAB 01 + F, *Trichoderma sp.* JAB 02 + F e *T. harzianum* USP 19 + F apresentaram incidências de tripes estatisticamente semelhantes às aquelas tratadas apenas com fungicida (Tabela 7).

Tabela 7. Número médio de tripes por planta registrado a cada 14 dias.

Tratamentos	DAP 40	DAP 54	DAP 68	DAP 82	DAP 96	DAP 110
Controle	1.92 ($\pm$ 0.26) b	4.42 ($\pm$ 0.93) b	6.27 ($\pm$ 0.78) c	3.17 ($\pm$ 1.03) b	2.02 ($\pm$ 0.42) b	1.77 ($\pm$ 0.42) b
<i>T. tawa</i> CFAM 0149	2.02 ($\pm$ 0.35) b	4.75 ($\pm$ 1.14) b	6.42 ($\pm$ 0.95) c	3.25 ($\pm$ 0.92) b	2.12 ($\pm$ 0.33) b	1.87 ($\pm$ 0.33) b
<i>T. koningiopsis</i> CFAM 810	1.95 ($\pm$ 0.45) b	4.72 ($\pm$ 1.03) b	6.02 ($\pm$ 1.07) b	3.10 ($\pm$ 0.81) b	2.07 ($\pm$ 0.41) b	1.80 ($\pm$ 0.40) b
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 01	1.90 ($\pm$ 0.44) b	4.47 ($\pm$ 0.87) b	5.92 ($\pm$ 1.20) b	3.05 ($\pm$ 1.66) b	1.87 ($\pm$ 0.33) a	1.77 ($\pm$ 0.42) b
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02	1.70 ($\pm$ 0.51) a	4.10 ($\pm$ 0.44) a	5.20 ($\pm$ 0.88) a	2.85 ($\pm$ 1.42) a	1.87 ($\pm$ 0.33) a	1.72 ($\pm$ 0.45) b
<i>T. harzianum</i> USP 19	1.70 ($\pm$ 0.56) a	3.95 ($\pm$ 1.13) a	5.15 ($\pm$ 0.77) a	2.80 ($\pm$ 1.09) a	1.85 ($\pm$ 0.36) a	1.67 ($\pm$ 0.47) a
Fungicidas	1.67 ($\pm$ 0.47) a	3.92 ($\pm$ 0.94) a	4.92 ($\pm$ 0.47) a	2.55 ($\pm$ 0.74) a	1.77 ($\pm$ 0.42) a	1.65 ($\pm$ 0.48) a
<i>T. tawa</i> CFAM 0149 + F	1.72 ($\pm$ 0.45) a	4.45 ($\pm$ 0.87) b	5.92 ($\pm$ 1.28) b	3.17 ($\pm$ 0.67) b	1.90 ($\pm$ 0.30) a	1.80 ($\pm$ 0.40) b
<i>T. koningiopsis</i> CFAM 810 + F	1.65 ($\pm$ 0.48) a	4.47 ($\pm$ 0.50) b	5.77 ($\pm$ 0.86) b	3.10 ($\pm$ 0.59) b	1.85 ($\pm$ 0.36) a	1.72 ($\pm$ 0.45) b
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 01 + F	1.72 ($\pm$ 0.45) a	4.45 ($\pm$ 0.50) b	5.97 ($\pm$ 0.86) b	2.97 ($\pm$ 0.76) b	1.90 ($\pm$ 0.30) a	1.67 ($\pm$ 0.47) a
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02 + F	1.58 ($\pm$ 0.49) a	3.85 ($\pm$ 1.02) a	4.90 ($\pm$ 0.59) a	2.50 ($\pm$ 0.67) a	1.71 ($\pm$ 0.45) a	1.56 ($\pm$ 0.49) a
<i>T. harzianum</i> USP 19 + F	1.55 ($\pm$ 0.50) a	3.82 ($\pm$ 1.05) a	4.85 ($\pm$ 0.53) a	2.47 ($\pm$ 0.71) a	1.72 ($\pm$ 0.45) a	1.55 ($\pm$ 0.50) a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (5%).

3.2.2 Primeira avaliação de produtividade do amendoim

A avaliação da produtividade de amendoim na primeira safra revelou diferenças significativas entre os diversos tratamentos, fornecendo “insights” valiosos sobre o desempenho agrônômico das diferentes abordagens de manejo.

Quando avaliados em relação ao peso de 100 sementes (P100s), os tratamentos apresentaram variações que refletiram diferenças sutis na produção. Notavelmente, o tratamento controle demonstrou o menor peso, registrando uma média de 73.27 g (± 0.92) (Tabela 8).

Tabela 8. Produtividade de amendoim na primeira safra avaliada.

Tratamentos	P100s (g)	Pod yield (kg/ha)	Sacas/ha (25kg)
Controle	73.27 (± 0.92) f	2741.66 (± 236.49) g	109.66 (± 9.46) g
<i>T. tawa</i> CFAM 0149	76.50 (± 0.60) e	3444.44 (± 125.76) f	137.77 (± 5.03) f
<i>T. koningiopsis</i> CFAM 810	79.90 (± 1.09) c	3770.83 (± 66.60) e	150.83 (± 2.66) e
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 01	78.42 (± 2.32) d	3861.11 (± 70.82) e	154.44 (± 2.83) e
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02	80.32 (± 1.59) c	3954.86 (± 45.88) d	158.19 (± 1.83) d
<i>T. harzianum</i> USP 19	80.37 (± 0.62) c	4059.02 (± 30.79) d	162.36 (± 1.23) d
Fungicidas (F)	85.15 (± 1.03) b	5013.88 (± 43.92) c	200.55 (± 1.75) c
<i>T. tawa</i> CFAM 0149 + F	81.60 (± 0.70) c	5086.80 (± 83.62) c	203.47 (± 3.34) c
<i>T. koningiopsis</i> CFAM 810 + F	85.62 (± 0.91) b	5326.38 (± 115.92) b	213.05 (± 4.63) b
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 01 + F	85.77 (± 0.33) b	5263.88 (± 104.55) b	210.55 (± 4.18) b
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02 + F	88.97 (± 0.57) a	5704.86 (± 63.52) a	228.19 (± 2.54) a
<i>T. harzianum</i> USP 19 + F	89.25 (± 0.73) a	5819.44 (± 137.96) a	232.77 (± 5.51) a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (5%). ¹P100s: Peso de 100 sementes

Os tratamentos que incluíram a aplicação de *Trichoderma* associado a fungicidas mostraram incrementos significativos no peso dos grãos, com os maiores valores observados para *Trichoderma* sp. JAB 02 + F (88.97 g $\pm$ 0.57) e *T. harzianum* USP 19 + F (89.25 g $\pm$ 0.73) (Tabela 8). Esses resultados indicaram que a intervenção por meio da combinação de *Trichoderma* com fungicidas teve um impacto positivo na produtividade das sementes.

A avaliação da produtividade em quilogramas por hectare apresentou tendências semelhantes às aquelas observadas na análise de P100s (Tabela 8). O tratamento controle registrou a menor produtividade, com um valor médio de 2741.66

kg/ha (± 236.49) (Tabela 8).

Novamente, os tratamentos que combinaram *Trichoderma* com fungicidas exibiram incrementos notáveis na produtividade, com *Trichoderma* sp. JAB 02 + F (5704.86 kg/ha ± 63.52) e *T. harzianum* USP 19 + F (5819.44 kg/ha ± 137.96) liderando essa categoria (Tabela 8).

Estes resultados reforçam a influência positiva da abordagem conjunta de *Trichoderma* + Fungicidas no aumento da produtividade, pois o tratamento isolado com fungicidas foi significativamente inferior aos tratamentos combinados com *Trichoderma* (Tabela 8).

Para a avaliação da produtividade em termos de sacas por hectare, utilizando como base 25 kg por saca, foram transformados aos valores em kg/ha em sc/ha. O tratamento controle demonstrou o menor número de sacas, registrando uma média de 109.66 sacas/ha (± 9.46).

Os tratamentos *Trichoderma* sp. JAB 02 + F (228.19 sacas/ha ± 2.54) e *T. harzianum* USP 19 + F (232.77 sacas/ha ± 5.51) obtiveram os melhores resultados (Tabela 8).

3.3 Segunda avaliação do uso de *Trichoderma* associado ou não com fungicidas no manejo de cercosporioses no amendoim

Na primeira avaliação aos 40 DAP, o tratamento controle exibiu a maior taxa de severidade de 2.94% (± 2.48) entre os tratamentos (Tabela 9). Destes, os tratamentos com *Trichoderma* sp. JAB 02 + F7 e *Trichoderma harzianum* USP 19 + F7 se destacaram com 0.44% (± 1.43) e 0.35% (± 1.29) respectivamente, indicando uma eficácia notável na redução da doença (Tabela 9).

À medida que o tempo avançava, a tendência de redução da severidade da cercosporiose persistiu. Os tratamentos que combinaram *Trichoderma* com fungicidas continuaram a demonstrar resultados superiores.

Em todas as avaliações, *Trichoderma* sp. JAB 02 + F7 e *Trichoderma harzianum* USP 19 + F7 mantiveram as menores percentagens de severidade. Notavelmente, aos 110 DAP, esses tratamentos apresentaram 9.64% (± 1.29) e 9.28% (± 1.76) de severidade, respectivamente, destacando a eficácia consistente em relação ao controle com 73.57% (± 9.42) (Tabela 9).

A comparação entre as pulverizações de fungicidas, F5 e F7, sugere que a estratégia de 7 pulverizações pode ter proporcionado uma redução mais pronunciada na severidade da doença em comparação com 5 pulverizações. Isso pode estar relacionado à frequência aumentada de aplicação, potencialmente resultando em uma maior eficácia no controle da cercosporiose (Tabela 9).

Além da comparação entre os tratamentos com e sem fungicidas, a utilização isolada do *Trichoderma* também se destacou. Os tratamentos com *Trichoderma sp.* JAB 02 e *Trichoderma harzianum* USP 19 mostraram eficácia considerável na redução da severidade em comparação com o controle (Tabela 9).

Isso ressalta o papel positivo do *Trichoderma* no manejo da cercosporiose. Os resultados iniciais revelaram que o tratamento controle exibiu a maior AACPD, com um valor de 98.39 ($\pm$ 8.35) (Tabela 9). Estes resultados indicaram uma alta taxa de progressão da doença ao longo do tempo na ausência de intervenções. Os tratamentos que envolveram as cepas de *Trichoderma* apresentaram reduções significativas na AACPD em comparação com o controle (Tabela 9). Tanto o *Trichoderma sp.* JAB 02 quanto o *Trichoderma harzianum* USP 19 demonstraram eficácia em retardar a progressão da doença, com valores de AACPD de 52.14 ($\pm$ 5.35) e 49.82 ($\pm$ 6.53) respectivamente (Tabela 9).

A adição de fungicidas também desempenhou um papel importante na redução da AACPD. Os tratamentos com combinações de *Trichoderma* e fungicidas (F5 e F7) mostraram resultados mais favoráveis. *Trichoderma sp.* JAB 02 + F7 e *Trichoderma harzianum* USP 19 + F7 destacaram-se com valores de AACPD de 21.78 ($\pm$ 3.72) e 20.53 ($\pm$ 3.69) respectivamente, demonstrando uma clara eficácia no controle da doença (Tabela 9).

Comparando as AACPDs entre F5 e F7, observamos que a estratégia de 7 pulverizações proporcionou uma redução mais acentuada na progressão da doença. Isso sugere que a frequência aumentada de aplicação de fungicidas pode ser mais eficaz no controle da cercosporiose (Tabela 9).

Tabela 9. Resultados médios da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), obtidos a partir de seis avaliações da severidade de Cercosporiose registradas a cada 14 dias em plantas de amendoim.

Tratamento	DAP 40	DAP 54	DAP 68	DAP82	DAP 96	DAP 110	AACPD
	Severidade (%)						
Controle	2.94 (± 2.48) c	3.39 (± 2.35) b	6.33 (± 2.23) d	15.71 (± 4.99) d	36.07 (± 4.92) d	73.57 (± 9.42) d	98.39 (± 8.35) d
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02	1.42 (± 2.27) b	2.05 (± 2.48) a	4.28 (± 2.76) c	9.46 (± 1.56) c	19.82 (± 5.21) c	30.35 (± 1.87) c	52.14 (± 5.35) c
<i>T. harzianum</i> USP 19	1.16 (± 2.13) b	1.96 (± 2.46) a	4.10 (± 2.54) c	9.37 (± 1.66) c	19.64 (± 5.03) c	30.17 (± 1.33) c	49.82 (± 6.53) c
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02 + F5	0.71 (± 1.76) a	1.69 (± 2.38) a	3.30 (± 2.38) b	7.05 (± 2.48) b	14.28 (± 4.99) b	21.96 (± 4.00) b	36.78 (± 7.55) b
<i>T. harzianum</i> USP 19 + F5	0.62 (± 1.66) a	1.60 (± 2.35) a	3.03 (± 2.46) b	6.96 (± 2.46) b	13.92 (± 4.92) b	21.60 (± 3.70) b	37.14 (± 4.79) b
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02 + F7	0.44 (± 1.43) a	1.25 (± 2.18) a	2.32 (± 2.51) a	4.91 (± 0.66) a	7.76 (± 2.50) a	9.64 (± 1.29) a	21.78 (± 3.72) a
<i>T. harzianum</i> USP 19 + F7	0.35 (± 1.29) a	1.07 (± 2.07) a	2.05 (± 2.48) a	4.82 (± 2.12) a	7.67 (± 2.51) a	9.28 (± 1.76) a	20.53 (± 3.69) a
Fungicidas	0.62 (± 1.66) a	1.51 (± 2.32) a	2.58 (± 2.52) a	5.44 (± 1.72) a	8.30 (± 2.38) a	10.26 (± 2.00) a	23.39 (± 4.66) a
CV (%) - Coeficiente de variação	195.6	132.38	79.82	52.76	61.87	78.15	58.25
p-valor (ANOVA)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (5%). F (5) – Cinco pulverizações; F (7) – Sete Pulverizações

Em relação à incidência de cercosporiose, observou-se variação ao longo de 82 DAP, sendo notável apenas no tratamento com *T. harzianum* USP 19 + F (7) (Figura 3). Os tratamentos que incluíram a aplicação de *Trichoderma* em conjunto com fungicidas demonstraram as taxas mais baixas de plantas infectadas pela cercosporiose até os 68 DAP (Figura 3). Entretanto, aos 96 DAP, a infecção havia se disseminado completamente, atingindo 100% de todas as plantas na área avaliada (Figura 3). Conclui-se, portanto, que a cercosporiose afetou a totalidade da área sob avaliação, embora tenham sido observadas diferenças significativas na sua severidade durante os primeiros meses.

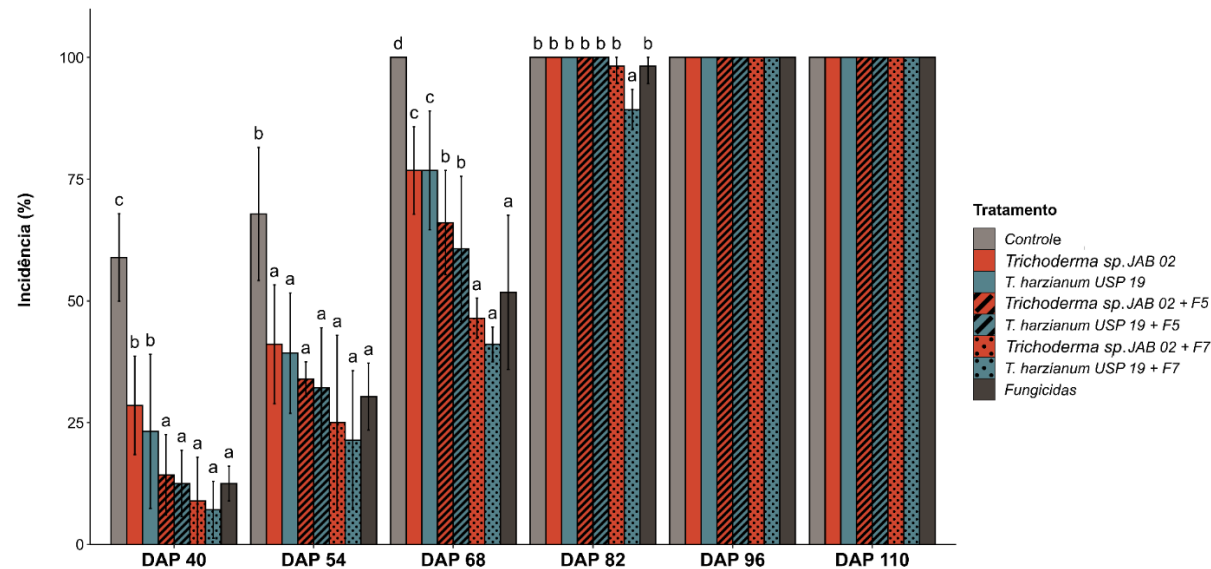


Figura 3. Resultados médios da incidência de cercosporiose obtidos a partir de seis avaliações registradas a cada 14 dias em plantas de amendoim

Durante o período da segunda avaliação, as condições climáticas se mostraram altamente propícias para o desenvolvimento de sintomas da doença, devido principalmente às chuvas frequentes. A quantidade de chuva acumulada nos 40 dias que antecederam o aparecimento dos primeiros sintomas foi próxima de 300 mm, semelhante à primeira avaliação (Tabela 1; Figura 4). No entanto, nas avaliações subsequentes, foi observado um aumento significativo na quantidade de precipitação acumulada em comparação com a primeira avaliação, o que naturalmente contribuiu para uma maior expressão da doença (Tabela 1; Figura 4).

No tratamento controle, a incidência da doença atingiu cerca de 75%, enquanto os demais tratamentos que utilizaram a combinação de *Trichoderma* com fungicidas e/ou o uso isolado de fungicidas apresentaram taxas inferiores a 25%. Notavelmente, os tratamentos que envolveram sete pulverizações ao longo do ciclo demonstraram os menores índices de progressão da doença (Tabela 1; Figura 4).

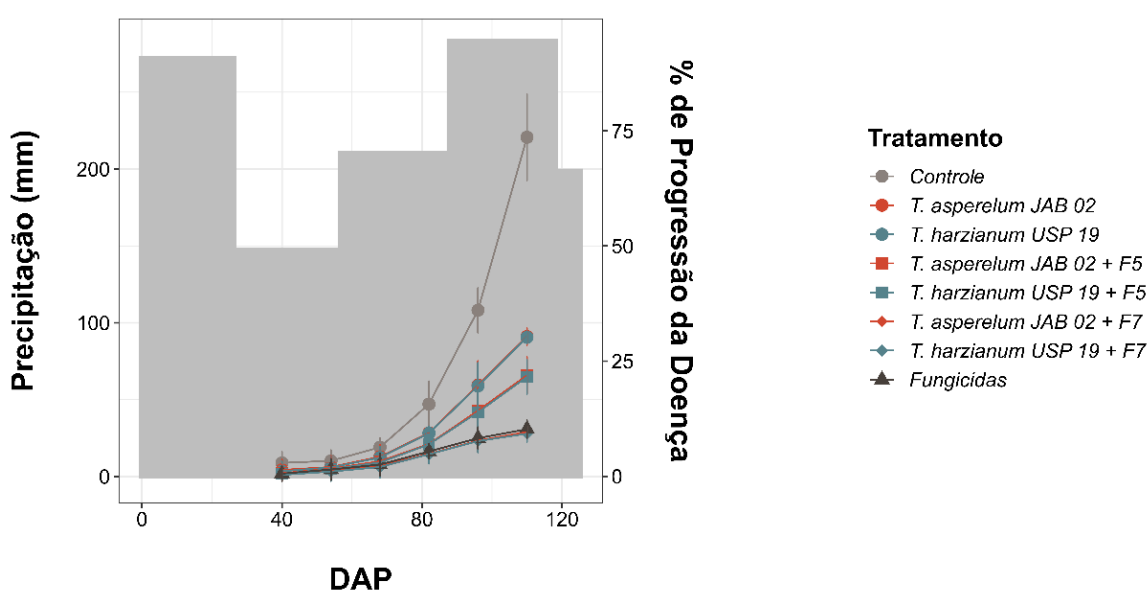


Figura 4. Correlação entre os dados médios de precipitação pluviométrica e a progressão da cercosporiose nas plantas de amendoim durante todo período da segunda avaliação.

3.3.1 Segunda avaliação das infestações de tripes

A maior incidência de tripes foi semelhante à primeira avaliação, também registrada aos 68 DAP (Tabela 10). Notavelmente, o tratamento controle apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais tratamentos, com o tratamento *Trichoderma sp.* JAB 02 + F7 exibindo as taxas mais baixas de presença de tripes nas plantas (Tabela 10).

À medida que o tempo avançou após os 68 DAP, a infestação por tripes gradualmente diminuiu. Os tratamentos que mantiveram as menores médias ao longo de todo o ciclo foram *Trichoderma sp.* JAB 02 + F7, *T. harzianum* USP 19 + F7 e o uso exclusivo de fungicidas. No primeiro registro (40 DAP), o número de tripes registrado no controle e no tratamento que utilizou apenas fungicidas não apresentou diferenças estatísticas, ambos diferindo dos demais tratamentos (Tabela 10).

Além disso, aos 110 DAS, as plantas que registraram menor número de tripes foram aquelas submetidas ao tratamento com fungicidas, *Trichoderma sp.* JAB 02 + F7 e *T. harzianum* USP 19 + F7, com valores de 0,725, 0,625 e 0,75, respectivamente. Esses tratamentos mostraram-se estatisticamente diferentes dos demais, embora não tenham demonstrado diferenças significativas entre si (Tabela 10).

Tabela 10. Número médio de tripes por planta registrado a cada 14 dias.

Tratamentos	DAP 40	DAP 54	DAP 68	DAP 82	DAP 96	DAP 110
Controle	1.90 ($\pm$ 0.30) b	4.52 ($\pm$ 1.15) b	5.95 ($\pm$ 1.19) b	2.55 ($\pm$ 0.95) b	1.92 ($\pm$ 0.65) b	1.05 ($\pm$ 0.87) b
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02	1.72 ($\pm$ 0.45) a	3.97 ($\pm$ 0.89) a	4.97 ($\pm$ 2.38) a	2.57 ($\pm$ 1.19) b	1.80 ($\pm$ 0.56) b	1.12 ($\pm$ 0.56) b
<i>T. harzianum</i> USP 19	1.67 ($\pm$ 0.47) a	3.95 ($\pm$ 1.17) a	4.95 ($\pm$ 2.98) a	2.65 ($\pm$ 0.86) b	1.87 ($\pm$ 0.33) b	1.02 ($\pm$ 0.48) b
Fungicidas (F)	1.82 ($\pm$ 0.38) b	3.60 ($\pm$ 1.12) a	4.75 ($\pm$ 1.82) a	2.22 ($\pm$ 0.83) a	1.62 ($\pm$ 0.49) a	0.72 ($\pm$ 0.59) a
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02 + F (5)	1.63 ($\pm$ 0.4) a	3.72 ($\pm$ 1.08) a	4.52 ($\pm$ 1.75) a	2.57 ($\pm$ 0.67) b	1.70 ($\pm$ 0.46) a	0.85 ($\pm$ 0.53) a
<i>T. harzianum</i> USP 19 + F (5)	1.67 ($\pm$ 0.47) a	3.70 ($\pm$ 1.09) a	4.45 ($\pm$ 1.01) a	2.50 ($\pm$ 0.75) b	1.80 ($\pm$ 0.40) b	0.95 ($\pm$ 0.50) b
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02 + F (7)	1.63 ($\pm$ 0.48) a	3.50 ($\pm$ 1.17) a	4.25 ($\pm$ 1.23) a	2.17 ($\pm$ 0.78) a	1.57 ($\pm$ 0.50) a	0.62 ($\pm$ 0.58) a
<i>T. harzianum</i> USP 19 + F (7)	1.67 ($\pm$ 0.47) a	3.62 ($\pm$ 1.12) a	4.67 ($\pm$ 1.36) a	2.07 ($\pm$ 0.85) a	1.65 ($\pm$ 0.62) a	0.75 ($\pm$ 0.58) a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (5%).

F (5) – Cinco pulverizações; F (7) – Sete Pulverizações

3.3.2 Segunda avaliação de produtividade do amendoim e levantamento de custos de produção

Os tratamentos com *Trichoderma* sp. JAB 02 + F e *T. harzianum* USP 19 + F com sete pulverizações apresentaram a maior produtividade de amendoim em comparação com os outros tratamentos (Tabela 11). O tratamento *T. harzianum* USP 19 + F (7) produziu 119 sacas de amendoim a mais do que o controle, e 27 sacas a mais do que o tratamento isolado com fungicida (Tabela 11).

O segundo tratamento mais produtivo foi com o *Trichoderma* sp. JAB 02 + F (7), que produziu 112 sacas de amendoim a mais do que o controle e 20 sacas a mais do que o tratamento apenas com fungicida (Tabela 11).

Tabela 11. Produtividade de amendoim na segunda safra avaliada.

Tratamento	¹ P100s (g)	Pod yield (kg/ha)	Sacas/ha (25 kg)
Controle	73.27 (± 0.92) d	2692.36 (± 249.60) e	107.69 (± 9.98) e
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02	80.32 (± 1.59) c	3781.25 (± 81.28) d	151.25 (± 3.25) d
<i>T. harzianum</i> USP 19	80.37 (± 0.62) c	3892.36 (± 71.15) d	155.69 (± 2.84) d
Fungicidas	86.22 (± 0.37) b	4996.52 (± 122.33) b	199.86 (± 4.89) b
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02 + F (5)	86.60 (± 0.33) b	4270.83 (± 132.97) c	170.83 (± 5.31) c
<i>T. harzianum</i> USP 19 + F (5)	86.95 (± 0.12) b	4409.72 (± 286.32) c	176.38 (± 11.45) c
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02 + F (7)	88.02 (± 1.22) a	5486.11 (± 179.30) a	219.44 (± 7.17) a
<i>T. harzianum</i> USP 19 + F (7)	87.90 (± 0.35) a	5659.72 (± 132.97) a	226.38 (± 5.31) a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (5%). ¹P100s: Peso de 100 sementes
(5) – Cinco pulverizações; (7) – Sete Pulverizações

O COT do plantio à colheita do amendoim na safra de 2021 está descrito na Tabela 12. Na safra de 2021/22, o custo médio por hectare foi de R\$ 12.614,62 e o ganho bruto de R\$ 16.198,00 para a região de Sertãozinho - SP.

O custo médio do *Trichoderma* foi considerado como R\$ 106,08 por pulverização, totalizando R\$ 742,56 em sete pulverizações. O valor médio de cada saca de amendoim (25 kg) contabilizado em 2021 foi de R\$ 91,98.

Tabela 12. Custo Operacional Total de um hectare de amendoim na região de Sertãozinho, SP, safra 2021/22.

Descrição	R\$/ha
Materiais	
Fertilizantes e corretivos	R\$1.875,96
Sementes	R\$ 2.359,62
Herbicidas	R\$ 670,85
Fungicidas	R\$1.272,44
Inseticidas	R\$ 745,10
Adjuvantes	R\$ 51,81
Total Materiais	R\$6.978,34
Operações mecanizadas	
Preparo de solo	R\$816,76
Plantio	R\$278,66
Cultivation	R\$412,56
Colheita	R\$1189,34
Total de operações mecanizadas	R\$2.697,34
Custo Operacional Efetivo (COE)	R\$9.675,69
Transporte	R\$247,26
Arrendamento	R\$2.080
Depreciação	R\$127,92
Outros gastos	R\$483,75
Custo Operacional Total (COT)	R\$12.614,62

Os tratamentos com o *Trichoderma* sp. JAB 02 + F e *T. harzianum* USP 19 + F com sete pulverizações apresentaram a maior relação custo-benefício para o produtor, uma vez que o gasto com o *Trichoderma* associado ao fungicida foi inferior ao lucro obtido, alcançando uma produtividade muito maior do que o uso do fungicida isolado (Tabela 13).

A utilização de menos pulverizações de fungicida (5 pulverizações) não foi adequada para o controle das doenças, portanto, a produtividade foi muito inferior em comparação com os outros tratamentos (Tabela 13).

Tabela 13. Produtividade, despesas e rentabilidade do amendoim na safra 2021/22.

Tratamentos	Pulverizações	COT	Sacas (25kg) /ha	GB ¹	Lucro
Controle	0	R\$ 11.342,18	107.69	R\$ 9.907,45	R\$ -1.434,73
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02	7	R\$ 12.084,74	151.25	R\$ 13.914,99	R\$ 1.830,24
<i>T. harzianum</i> USP 19	7	R\$ 12.084,74	155.69	R\$ 14.323,50	R\$ 2.238,75
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02 + F	5	R\$ 12.425,45	170.80	R\$ 15.713,62	R\$ 3.288,16
<i>T. harzianum</i> USP 19 + F	5	R\$ 12.425,45	176.38	R\$ 16.226,96	R\$ 3.801,51
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02 + F	7	R\$ 13.357,18	219.40	R\$ 20.184,78	R\$ 6.827,60
<i>T. harzianum</i> USP 19 + F	7	R\$ 13.357,18	226.38	R\$ 20.826,93	R\$ 7.469,74
Fungicidas (F)	7	R\$ 12.614,62	199.80	R\$ 18.381,58	R\$ 5.766,95

¹GB – Ganhos Brutos

4. DISCUSSÃO

O amendoim é uma cultura de extrema importância, amplamente cultivada em todo o mundo. No entanto, as plantas de amendoim são altamente suscetíveis a diversas doenças causadas por fungos, destacando-se as cercosporioses. Essas enfermidades podem acarretar perdas consideráveis na produtividade e qualidade das safras, provocando de foliações severas e podendo reduzir os rendimentos em mais de 50%.

Muitos dos problemas fitopatológicos comercialmente relevantes em plantações de amendoim são controlados pelos agricultores por meio do uso de fungicidas químicos (Jordan et al., 2020). De acordo com Marinelli et al. (2017), as cercosporioses podem ser identificadas pelo aparecimento de manchas necróticas irregulares, com diâmetros de 2 a 7 mm, nas folhas.

No entanto, a aplicação excessiva de fungicidas é um método de controle que enfrenta restrições crescentes, conforme observado por Jordan et al. (2020), devido à resistência desenvolvida por muitas doenças a esses produtos químicos. Além disso, a indústria de defensivos agrícolas reluta em investir em novos produtos devido ao tamanho relativamente pequeno do mercado de amendoim em comparação com outras culturas, somado aos custos significativos de registro de novos produtos químicos. Isso ocorre, apesar da demanda dos compradores e processadores de amendoim que buscam acessar mercados internacionais com restrições mais rigorosas em relação aos resíduos de agroquímicos (Jordan et al., 2020).

Conciliar o aumento da produção de amendoim com a preservação do meio ambiente e dos recursos naturais, é crucial adotar uma abordagem de manejo sustentável (Giordano et al., 2021). Portanto, torna-se essencial desenvolver estratégias alternativas, como a integração de agentes de controle biológico, entre os quais se destaca o fungo *Trichoderma*, a fim de reduzir a dependência ou complementar o uso de fungicidas químicos.

O fungo *Trichoderma* é encontrado em diversos ecossistemas e é reconhecido por sua capacidade de controlar doenças em plantas por meio de abordagens biológicas (Ruano-Rosa et al., 2016). No entanto, é importante ressaltar que nem

todas as cepas selvagens desse fungo aumentam os rendimentos ou oferecem eficácia no controle de fitopatógenos. Conforme destacado por Harman et al. (2021), apenas algumas cepas específicas de *Trichoderma* demonstram benefícios significativos para as plantas. Portanto, a identificação de cepas eficazes é de suma importância.

No contexto brasileiro, é prevalente o uso excessivo de fungicidas no cultivo de amendoim. Os agricultores costumam aplicar fungicidas em suas lavouras até 10 vezes durante uma única safra (COPLANA: Cooperativa Agroindustrial Brasileira, comunicação pessoal).

Um estudo conduzido por Norsworthy et al. (2012) nos Estados Unidos revelou um aumento de 78% no uso de agroquímicos na produção de amendoim ao longo de uma década. No entanto, o uso desmedido de fungicidas pode levar ao desenvolvimento de fitopatógenos resistentes, comprometendo a eficácia desses produtos no controle de doenças a longo prazo (Ghini, 2000).

O presente estudo é pioneiro ao avaliar o uso de diferentes cepas de *Trichoderma* em associação ou não com fungicidas no manejo das cercosporioses em plantações de amendoim, sob condições de campo.

É essencial ressaltar que a compatibilidade entre o agente biológico e o fungicida escolhido é fundamental para a eficácia do controle. No Brasil, o Clorotalonil e o Difenconazol são fungicidas amplamente utilizados pelos agricultores em larga escala (Moraes et al., 2001).

Os resultados do presente estudo demonstram que as cepas de *Trichoderma* apresentaram boa compatibilidade com os fungicidas Clorotalonil e Difenconazol, quando utilizados na dosagem recomendada pelas respectivas bulas.

No entanto, é importante observar que o tempo de exposição do *Trichoderma* aos fungicidas está diretamente relacionado à inibição de seu crescimento, simulando as condições de campo, onde os conídios serão dispersos e terão menos contato com os fungicidas em comparação com a exposição em placas de Petri, como observado em estudos anteriores (Widmer, 2019).

Neste estudo, foi priorizado a observação da germinação de conídios em diferentes intervalos de tempo quando em associação com os fungicidas. Ao contrário da metodologia convencional de "Poison-Plate", que mantém o fungo em contato

constante com os fungicidas por vários dias em placas de Petri, no presente estudo a abordagem se assemelha mais à realidade do campo, onde os fungicidas são adicionados ao tanque de pulverização e, em seguida, aplicados nas plantas.

Nesse contexto, a viabilidade da germinação é mais relevante do que o crescimento do fungo, conforme destacado por Sánchez-Montesinos et al. (2021) e Maurya et al. (2020), que relataram interações positivas entre *Trichoderma* e fungicidas compatíveis.

No entanto, é importante reconhecer que alguns estudos mostraram resultados desfavoráveis para essa interação, sugerindo que a eficácia pode depender da dose e o tipo de fungicida (Madhavi et al., 2011; Maheshwary et al., 2020), e que a metodologia "Poison-Plate" não reflete adequadamente a sobrevivência dos conídios (Widmer, 2019).

Os resultados aqui demonstrados revelaram que os fungicidas Clorotalonil e Difenconazol tiveram pouco impacto na germinação de conídios de *Trichoderma* nas primeiras 2 horas de contato e durante as duas safras avaliadas, as análises das cercosporioses revelaram que os tratamentos contendo exclusivamente *Trichoderma* obtiveram uma média de índices de severidade até 50% menores do que o tratamento controle.

Apesar desses resultados positivos, é importante notar que as plantas tratadas apenas com *Trichoderma* ainda apresentaram índices de severidade relativamente altos, chegando a alcançar notas de nível 5, conforme a tabela 3 utilizada para classificação.

Os resultados deste estudo são congruentes com o trabalho de Kumar et al. (2017), que também avaliaram a eficácia de *T. harzianum* e *Pseudomonas fluorescens* no controle das cercosporioses em plantas de amendoim. Os autores indicaram que a aplicação de *Trichoderma* por meio de pulverização foliar reduziu significativamente tanto a incidência quanto a gravidade das cercosporioses em até 23%.

Além disso, os resultados deste estudo foram consistentes com o realizado por Ramesh e Zacharia (2017), que demonstraram que a aplicação de *T. viride* reduziu a incidência das cercosporioses em 11,31%, 18,69% e 31,50% nos períodos de 30, 60 e 90 dias após o plantio, respectivamente. Simultaneamente, esse tratamento

promoveu um aumento na produção de amendoim de 7,78 q/ha em comparação com o controle, que atingiu apenas 4,85 q/ha.

Outra pesquisa realizada por Giordano et al. (2023) relataram que *T. harzianum* ITEM 3636 diminuiu de forma significativa o número de folíolos de amendoim afetados pela cercosporiose e estimulou níveis mais elevados de enzimas relacionadas à defesa nas folhas após a inoculação, em condições de estufa.

No entanto, nos ensaios aqui realizados observou-se que os menores índices de severidade das cercosporioses ocorreram nos tratamentos que combinaram *Trichoderma* com fungicidas. Semelhante aos resultados de Yakubu et al. (2019) que indicaram que formulações contendo esporos de *T. harzianum* foram eficazes no aumento da produtividade e na redução das cercosporioses em feijão-caupi e amendoim. Suas formulações de *Trichoderma* registraram um aumento médio de 10 a 58% na produção de vagens em comparação com o tratamento que utilizava apenas fungicidas (Mancozeb + Carbendazim).

No entanto, os resultados obtidos neste trabalho, apenas duas cepas de *Trichoderma* apresentaram diferenças significativas em relação ao tratamento isolado com fungicidas. As cepas *Trichoderma* sp. JAB 02 e *T. harzianum* USP 19 demonstraram os menores índices de severidade quando combinadas com os fungicidas, alcançando porcentagens de 6,33 ($\pm 2,23$) e 6,16 ($\pm 2,13$) após 110 dias de plantio na primeira avaliação e 9,64 ($\pm 1,29$) e 9,28 ($\pm 1,76$) na segunda avaliação.

Contudo, na segunda avaliação, não foi observado diferenças estatísticas significativas nesses tratamentos em comparação com o tratamento isolado com fungicida, que apresentou uma severidade média de 10,26 ($\pm 2,00$) aos 110 dias após o plantio. Vale ressaltar que, na primeira avaliação, durante a safra de 2020, houve um acumulado de precipitação de 888 mm, enquanto na safra de 2021, a precipitação foi de 1324 mm. Com base nesses dados, constatou-se uma severidade média 30% maior no ano de 2021. Esses resultados podem estar relacionados com a quantidade substancial de chuvas na safra de 2021 e, conseqüentemente, níveis mais elevados de umidade relativa, o que favoreceu o desenvolvimento das cercosporioses.

De acordo com March e Marinelli (1998), à medida que a temperatura aumenta, a taxa de desenvolvimento dessa doença também cresce. A severidade das cercosporioses é diretamente influenciada pelo período de umidade das plantas,

sendo que longos períodos de molhamento foliar, de pelo menos 10 horas, juntamente com temperaturas entre 20 °C a 26 °C, proporcionam condições ideais para o desenvolvimento dessa doença.

A alta precipitação pluviométrica na safra de 2021 provavelmente levou à queda de folhas infectadas, o que, somado à grande quantidade de chuva, propiciou a abscisão foliar. Essa explicação encontra suporte nos sintomas observados durante as avaliações realizadas neste estudo.

Culbreath et al. (2001) destacaram que a combinação dos fungicidas Tebuconazole e Chlorothalonil proporcionou um controle mais eficaz das doenças foliares do amendoim em comparação com a aplicação individual de Chlorothalonil ou Tebuconazole.

Portanto, embora o uso de fungicidas de contato possa ser eficaz em certas situações no controle das cercosporioses, como a mancha-preta e a mancha-castanha, torna-se evidente a importância dos fungicidas sistêmicos, especialmente em épocas de elevada precipitação, uma vez que os fungicidas de contato podem ter sua eficácia comprometida, sendo facilmente lixiviados em períodos chuvosos.

Os resultados deste estudo sublinham a necessidade de recorrer a fungicidas para controlar as cercosporioses, dado que esta doença pode causar danos severos às plantas de amendoim. Levar em consideração o histórico da área de plantio também se mostra fundamental. Embora o uso exclusivo de fungicidas tenha apresentado resultados promissores no controle das cercosporioses, a adição de *Trichoderma* resultou em uma produtividade significativamente superior.

Na segunda avaliação, apenas os isolados de *Trichoderma* que obtiveram os melhores resultados na primeira avaliação foram selecionados. A diferença entre o número de pulverizações durante o ciclo, de 5 para 7, foi avaliada somente na segunda avaliação.

Os resultados demonstraram que o volume de pulverização de fungicidas exerce influência sobre o controle das cercosporioses. As diferenças entre 5 e 7 pulverizações foram estatisticamente significativas, evidenciando as dificuldades de reduzir o número de aplicações de fungicidas para o manejo desta doença em cultivos de amendoim.

Os tratamentos com 5 pulverizações apresentaram severidades da doença consideravelmente maiores e uma produtividade de amendoim significativamente inferior em comparação com os tratamentos com 7 pulverizações. As maiores taxas de incidência das cercosporioses foram observadas após 82 DAP em ambas as avaliações. A doença estava presente em quase 100% da área, mas com baixa gravidade nos tratamentos que combinaram *Trichoderma* com fungicidas.

Portanto, a associação de *Trichoderma* com fungicidas resultou em benefícios para a produtividade do amendoim. No entanto, é importante ressaltar que essa melhoria na produtividade pode não estar estritamente ligada ao controle das doenças.

Uma hipótese levantada é de que o *Trichoderma* pode ter contribuído para o crescimento das plantas de amendoim. Durante os experimentos, foi possível observar que as plantas inoculadas com *Trichoderma* apresentaram um aspecto mais vigoroso em comparação com os outros tratamentos. No entanto, embora tenha sido observada essa diferença, não foram coletados dados específicos sobre o estímulo do crescimento; portanto, este aspecto deve ser investigado em estudos futuros.

Vários estudos têm documentado a eficácia do *Trichoderma* no controle de doenças e no estímulo do crescimento das plantas de amendoim. Hossain e Hossain (2013), por exemplo, relataram que um biofungicida baseado em *T. viride* reduziu a incidência de cercosporioses em amendoins em até 22,19% aos 90 dias após a semeadura, além de melhorar parâmetros de crescimento das plantas, como altura, número de folhas, peso das vagens, número de vagens e rendimento final, em comparação com o grupo de controle. Outros estudos, como o conduzido por Dutta et al. (2021), demonstraram melhorias significativas na fisiologia das plantas de amendoim, incluindo biomassa, comprimento e peso das vagens, nodulação das raízes e rendimento, quando tratadas com uma bioformulação líquida de *Trichoderma*. Além disso, Neelipally et al. (2020) observaram que sementes de amendoim tratadas com *Trichoderma* in vitro apresentaram melhor germinação e desenvolvimento das plântulas em comparação com *Bradyrhizobium*.

Esses estudos apoiam a hipótese de que o *Trichoderma* pode desempenhar um papel significativo no crescimento e desenvolvimento das plantas de amendoim. Kamaruzzaman et al. (2016) relataram que *T. harzianum* (ST5), como tratamento de

sementes de amendoim, proporcionou comprimento e peso máximos do broto, peso das raízes com vagens, peso das vagens e número de nódulos por planta, e *T. viride* (ST6) apresentou maior crescimento da planta, nodulação e rendimento.

Frezzarin et al. (2023) também relataram que a inoculação de *Trichoderma* em sementes de amendoim promoveu aumentos na massa seca das raízes, massa seca das brotações, concentrações de fósforo e altura da planta em estufa e condições de campo, em comparação com o controle.

Os tripes mais comuns encontrados durante todas as coletas de amostras pertencem à espécie *E. enigmaticus* sp. n, conforme descrito por Lima et al. (2022). Nas duas avaliações realizadas entre 54 e 68 DAP, observou-se os picos mais elevados na população de tripes nas plantas. Esses resultados assemelham-se aos de Moraes et al. (2005) e Moraes et al. (2006), que também registraram altas infestações de tripes entre 56 e 79 DAS em cultivos de amendoim.

Na primeira avaliação, os tratamentos que utilizaram fungicidas isoladamente e as cepas de *Trichoderma* JAB 02 e USP 19, independentemente de estarem associadas aos fungicidas ou não, apresentaram as menores populações de tripes nas plantas. Na segunda avaliação, as diferenças entre os tratamentos nesse período de pico foram sutis, divergindo apenas do grupo de controle, onde se observou uma quantidade significativamente maior desses insetos.

Foi notável que as demais cepas de *Trichoderma*, quando combinadas ou não com os fungicidas, resultaram em uma leve piora na severidade das cercosporioses em comparação com as cepas JAB 02 e USP 19. Supõe-se que esse resultado possa estar relacionado às infestações mais expressivas de tripes nos tratamentos envolvendo essas outras cepas de *Trichoderma*, sugerindo que as plantas tratadas com essas cepas atraíram mais tripes do que as outras, possivelmente levando a diferentes respostas por parte das cepas de *Trichoderma*, seja atraindo ou inibindo esses insetos.

Quaisquer pequenas variações entre as duas safras podem estar associadas às condições climáticas, visto que o maior volume de chuvas na segunda avaliação pode ter contribuído para um controle natural dos tripes no campo.

De acordo com Srinivasan et al. (2018), tripes que se alimentam das plantas de amendoim podem causar feridas que servem como portas de entrada para diversas doenças, resultando em um aumento na incidência de doenças.

O uso de *Trichoderma* como agente de biocontrole para pragas de insetos tem ganhado destaque nos últimos anos (Poveda, 2021). No entanto, as pesquisas ainda são limitadas no que diz respeito à correlação direta entre o uso de *Trichoderma* e a infestação de tripes. Muvea et al. (2014), por exemplo, relataram que alguns fungos endofíticos, incluindo o *Trichoderma*, exerceram um efeito antagonista sobre as populações de tripes em plantações de cebola, reduzindo a presença dessa praga.

A produtividade do amendoim foi menor para todos os tratamentos aqui realizados durante a segunda avaliação, possivelmente devido ao aumento da precipitação e à maior severidade das cercosporioses em comparação com a primeira avaliação.

Tais resultados destacam que a aplicação de *Trichoderma* em conjunto com fungicidas resultou em um aumento significativo na produção de amendoim. Houve um aumento médio de 500 a 675 kg/ha em comparação com o tratamento apenas com fungicida e de 2700 a 2967 kg/ha em relação ao grupo de controle durante o segundo experimento. No entanto, vale ressaltar que esses resultados foram observados apenas para duas cepas de *Trichoderma*, JAB 02 e USP 19.

Hasan et al. (2016) concluíram que o biofungicida baseado em *Trichoderma* pode ser eficaz no manejo ecológico de manchas foliares, resultando em um rendimento 53,61% superior em comparação com as plantas do grupo de controle. A aplicação de *T. harzianum* também foi associada ao aumento dos retornos econômicos e à melhora na relação benefício-custo nas plantações de amendoim (Sharma et al., 2012).

De acordo com as conclusões de Kumhar et al. (2018), o tratamento de sementes com Tebuconazole e a aplicação no sulco de plantio com *T. viride* enriquecido com esterco de curral foram os tratamentos mais eficazes e financeiramente vantajosos para o manejo da podridão do colo e da mancha foliar precoce. Jadon et al. (2017) também constataram que o tratamento com fungicida (Mancozeb), seguido pelo tratamento de sementes com *T. harzianum*, controlou eficazmente doenças transmitidas pelo solo em cultivos de amendoim.

Os fungicidas ainda são a principal ferramenta de controle de doenças em plantações de amendoim. No entanto, o uso complementar de *Trichoderma* como agente de biocontrole de fitopatógenos e na reabilitação do solo pode reduzir a necessidade de fertilizantes químicos, ao mesmo tempo que estimula o crescimento das plantas (Tripathi et al., 2013). Além disso, a combinação de *Trichoderma* com fungicidas pode não apenas aumentar a produtividade do amendoim, mas também contribuir para a lucratividade dos agricultores.

Essa abordagem oferece uma alternativa sustentável aos pesticidas químicos, promovendo a saúde do solo e reduzindo a poluição ambiental. No entanto, são necessárias mais pesquisas para compreender completamente o potencial dessa abordagem e otimizar sua aplicação em diversos sistemas de cultivo.

5. CONCLUSÃO

Este estudo apresenta evidências convincentes de que a combinação de *Trichoderma* com fungicidas é mais benéfica em comparação com o uso isolado de fungicidas. Os tratamentos combinados resultaram em uma redução significativa na severidade das cercosporioses e em maiores índices de produtividade de amendoim, destacando o potencial do *Trichoderma* como uma ferramenta eficaz de biocontrole e um complemento aos fungicidas. Essas descobertas ressaltam a importância de realizar mais pesquisas sobre estratégias sustentáveis de manejo de doenças, como a combinação *Trichoderma*-fungicida, para aprimorar a produção de amendoim.

6. REFERÊNCIAS

- Anco DJ, Thomas JS, Jordan DL, Shew BB, Monfort WS, Mehl HL, et al. (2020). Peanut Yield Loss in the Presence of Defoliation Caused by Late or Early Leaf Spot. ***Plant Dis*** 104:1390–1399. doi: 10.1094/PDIS-11-19-2286-RE.
- Andrés JA, Pastor NA, Ganuza M, Rovera M, Reynoso MM, Torres A (2016). “Biopesticides: An Eco-Friendly Approach for the Control of Soilborne Pathogens in Peanut,” in *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity* (New Delhi: Springer India), 161–179. doi: 10.1007/978-81-322-2647-5_9.
- Barbosa RM, Homem BFM, Tarsitano MAA (2014). Custo de produção e lucratividade da cultura do amendoim no município de Jaboticabal, São Paulo. ***Revista Ceres*** 61:475–481. doi: 10.1590/0034-737X201461040005.
- Barreto M (2007) **Manual de identificação e manejo das doenças do amendoim. Jaboticabal**: Funep, 33 p.
- Bitancourt AA, Jenkins AE (1940). Novas espécies de *Elsione* e *Sphaceloma* sobre hóspedes de importância econômica. ***Arquivos do Inst. Biológico*** 11: 45-58.
- Brotman Y, Kapuganti JG, Viterbo A. (2010). *Trichoderma*. ***Current Biology*** 20, R390–R391. doi: 10.1016/j.cub.2010.02.042.
- Cantonwine EG, Culbreath AK, Stevenson KL, Kemerait RC, Brenneman TB, Smith NB, et al. (2006). Integrated Disease Management of Leaf Spot and Spotted Wilt of Peanut. ***Plant Dis*** 90:493–500. doi: 10.1094/PD-90-0493.
- Chaparro AP, Carvajal LH, Orduz S (2011). Fungicide tolerance of *Trichoderma asperelloides* and *T. harzianum* strains ***Agricultural Sciences*** 2:301–307. doi: 10.4236/as.2011.23040.
- Culbreath AK, Brenneman TB, Kemerait RS (2001) Applications of mixtures of copper fungicides and chlorothalonil for management of peanut leaf spot diseases. ***Plant Health Progress*** 2:1–8. doi: 10.1094/php-2001-1116-01-rs.
- Dutta P, Deb L, Gogoi J, Mahanta M, Kumari A, Yasin A, Sharma A. (2021). “UmTricho” a liquid bioformulation of indigenous strain of *Trichoderma harzianum* effectively managed the tikka disease (*Cercospora* spp.) of peanut, *Arachis hypogaea* L. under the agroecological condition of Meghalaya. ***Biological Forum – An International Journal***, 13:529-535.
- Faisal M, Tiwari S (2015). Comparison of bio-agents and botanicals with fungicides against tikka and anthracnose diseases of peanut (*Arachis hypogaea* L.). ***Int J Plant Prot*** 8:45–48. doi: 10.15740/HAS/IJPP/8.1/45-48.

- Frezarín ET, Santos CHB, Sales LR, dos Santos RM, de Carvalho LAL, Rigobelo EC (2023). Promotion of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Growth by Plant Growth-Promoting Microorganisms. **Microbiol Res** (Pavia) 14: 316–332. doi: 10.3390/microbiolres14010025.
- Gallo D, Nakano O, Silveira N, Carvalho RPL (2002). Manual de Entomologia Agrícola. Piracicaba: Agronômica Ceres.
- Ghini RKH (2000). *Resistência de fungos a fungicidas*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente.
- Giordano DF, Pastor NA, Rouws LFM, de Freitas KM, Erazo JG, Del Canto A et al. (2023). *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 colonizes peanut roots as an endophyte and protects the plants against late leaf spot. **Symbiosis** 89:337–352. doi: 10.1007/s13199-023-00913-z.
- Giordano DF, Pastor N, Palacios S, Oddino CM, Torres AM (2021). Peanut leaf spot caused by *Nothopassalora personata*. **Trop Plant Pathol** 46:139–151. doi: 10.1007/s40858-020-00411-3.
- Harman G, Khadka R, Doni F, Uphoff N. (2021). Benefits to Plant Health and Productivity From Enhancing Plant Microbial Symbionts. **Front Plant Sci** 11. doi: 10.3389/fpls.2020.610065.
- Hasan MM, Hossain I, Kashem MA, Mondal MMA, Rafii MY, Latif MA (2016). Effect of botanicals and biofungicide on controlling tikka disease (*Cercospora* sp.) of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Legume Research - An International Journal** 39. doi: 10.18805/lr.v39i1.8874.
- Hasan MM, Islam R, Hossain I, Shirin K (2014). Biological Control of Leaf Spot of Peanut. **Journal of Bioscience and Agriculture Research** 1:66–78. doi: 10.18801/jbar.010214.08.
- Hossain M, Hossain I. (2013). Screening of different plant extracts against leaf spot (*Cercospora arachidicola* and *Cercosporidium personatum*) of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Bangladesh Journal of Agricultural Research** 38:491–503. doi: 10.3329/bjar.v38i3.16976.
- Ijaz M, Rauf CHA, Ul Haque I, ul Hussan F, Mahmood A. (2008). Distribution and severity of *Cercospora* leaf spot of peanut in rainfed region of Punjab. **Pakistan Journal of Phytopathology** 20:165–172.
- Jadon KS, Thirumalaisamy PP, Kumar V, Koradia VG, Padavi RD (2017). Integrated Management of Major Foliar and Soil-Borne Diseases of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) with Fungicides, *Trichoderma* and Castor Cake. **Int J Curr Microbiol Appl Sci** 6: 1884–1899. doi: 10.20546/ijcmas.2017.612.215.

- Jelihovschi E, Faria JC, Allaman IB (2014). ScottKnott: A Package for Performing the Scott-Knott Clustering Algorithm in R. *TEMA (São Carlos)* 15:3. doi: 10.5540/tema.2014.015.01.0003.
- Jordan DL, Dunne J, Stalker HT, Shew BB, Brandenburg RL, Anco D, et al. (2020). Risk to sustainability of pest management tools in peanut. *Agricultural & Environmental Letters* 5. doi: 10.1002/ael2.20018.
- Kamaruzzaman M, Rahman MM, Islam MS, Ahmad MU (2016). Efficacy of four selective *Trichoderma* isolates as plant growth promoters in two peanut varieties. *International Journal of Biological Research* 4:152. doi: 10.14419/ijbr.v4i2.6468.
- Kanade SG, Shaikh AA, Jadhav JD, Chavan CD. (2015). Influence of weather parameters on tikka (*Cercospora* spp.) and rust (*Puccinia arachidis*) of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Asian Journal of Environmental Science* 10:39–49. doi: 10.15740/HAS/AJES/10.1/39-49.
- Kemerait RC, Jr Brenneman TB, Culbreath AK (2005). " **Peanut disease control**," in Georgia Pest Management Handbook, ed. P. Guillebeau (Athens, GA: University of Georgia Cooperative Extension Service), 122-123.
- Kemerait RC, Jr Culbreath AK, Prostko E, Brenneman TB, Tubbs S, Srinivasan R, Abney M, Monfort S, Rabinowitz A, Pilon C, Bag S, Tillman B, Dufault N, Mulvaney M, Small I, Hagan A, Chen C, Jacobson A, Balkcom K, Strayer-Scherer Z, Anco D. (2020). Peanut Rx Peanut Disease Risk Index. <https://peanuts.caes.uga.edu/content/dam/caes-subsite/peanuts/docs/2020/2020-Peanut-Rx-Disease-Risk-Index.pdf> [Accessed March 11, 2023].
- Kumar S, Jaiswal S, Kumar A, Verma A, Surender Kumar C, Lal AA (2017). Influenced of natural products and bio-fungicide against tikka disease of peanut caused by *Cercospora* spp. Available at: www.thepharmajournal.com.
- Kumar STMRA (2014). *Trichoderma*: Mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases. *Agricultural Research* 9:3838–3852. doi: <https://doi.org/10.5897/AJAR2014.9061>.
- Kumhar DR, Meena AK, Meena PN (2018). Efficacy of bio agents and fungicides against collar rot and early leaf spot of peanut. *Indian Phytopathol* 71:549–554. doi: 10.1007/s42360-018-0080-5.
- Lima ÉFB, Alencar ÁRS, de Nanini F, Michelotto MD, Corrêa AS (2022). "Unmasking the Villain": Integrative Taxonomy Reveals the Real Identity of the Key Pest (Thysanoptera: Thripidae) of Peanuts (*Arachis hypogaea* L.) in South America. *Insects* 13:120. doi: 10.3390/insects13020120.
- Lourenção AL, Moraes ARA, Godoy IJ, Ambrosano GMB. (2007). Efeito da infestação de *Enneothrips flavens* moulton sobre o desenvolvimento de cultivares de amendoim. *Bragantia* 66:623–636. doi: 10.1590/S0006-87052007000400013.

- Madhavi, G. B., Bhattiprolu, S. L., & Reddy, V. B. (2011). Compatibility of Biocontrol Agent *Trichoderma viride* with Various Pesticides. **Journal of Horticultural Sciences**, 6: 71–73.
- Maheshwary NP, Gangadhara Naik B, Amoghavarsha Chittaragi, MK Naik, Satish KM, Nandish MS. (2020). Compatibility of *Trichoderma asperellum* with fungicides. **Pharma Innovation** 9:136-140. <https://dx.doi.org/10.22271/tpi>
- March G, Marinelli A (1998). " Enfermedades del Maní," in Manual del Maní 3ª Edición, ed. Pedelini R, Casini C (Manfredi: INTA), 24–35.
- Marinelli AO (2017). "El cultivo de maní en Argentina," in **Enfermedades fúngicas del maní**, eds. E. Fernandez and O. Giayetto (Córdoba: Ediciones UNRC), 285–311.
- Maurya S, Rai D, Dubey S, Pal RK (2020). Compatibility of *Trichoderma harzianum* with different fungicides under In vitro. **Int J Chem Stud** 8:2946–2949. doi: 10.22271/chemi.2020.v8.i1as.8716.
- Meyer MC, MSM, SJC (2019). *Trichoderma: uso na agricultura*. Brasília, DF: Embrapa Soja (CNPSo).
- Moraes ARA, Moraes SA, Lourenção AL, Godoy IJ, Martins ALM. (2006). Efeito da aplicação de thiamethoxam para o controle do tripses na redução da severidade da verrugose do amendoim. **Fitopatol Bras** 31:164–179. doi: 10.1590/S0100-41582006000200007.
- Moraes SA, Godoy IJ, Gerin MAN (1983). Resistance of *Arachis hypogaea* to *Puccinia arachidis*, *Sphaceloma arachidis* and *Phoma arachidicola* [peanut, rust, wart, clayish spot]. **Fitopatologia Brasileira** 8:499–506.
- Moraes SA, Godoy IJ, Pezzopane JRM, Pereira JCVNA, SILVEIRA LCP (2001). Eficiência de fungicidas no controle da mancha preta e verrugose do amendoim por método de monitoramento. **Fitopatol Bras** 26:134–140. doi: 10.1590/S0100-41582001000200003.
- Moraes ARA, Lourenção AL, Godoy IJ, Teixeira GC (2005) Infestation by *Enneothrips flavens* Moulton and yield of peanut cultivars. **Sci. agric.** 62:469-472 doi: 10.1590/S0103-90162005000500010
- Muvea AM, Meyhöfer R, Subramanian S, Poehling HM, Ekesi S, Maniania NK (2014). Colonization of Onions by Endophytic Fungi and Their Impacts on the Biology of *Thrips tabaci*. **PLoS One** 9:242. doi: 10.1371/journal.pone.0108242.
- Neelipally RTKR, Anoruo AO, Nelson S. (2020). Effect of Co-Inoculation of *Bradyrhizobium* and *Trichoderma* on Growth, Development, and Yield of *Arachis hypogaea* L. (Peanut). **Agronomy** 10:1415. doi: 10.3390/agronomy10091415.

- Oliveira DGP, Pauli G, Mascarín GM, Delalibera, I. (2015). A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. **J Microbiol Methods** 119:44–52. doi: 10.1016/j.mimet.2015.09.021.
- Ons L, Bylemans D, Thevissen K, Cammue BPA. (2020). Combining Biocontrol Agents with Chemical Fungicides for Integrated Plant Fungal Disease Control. **Microorganisms** 8: 1930. doi: 10.3390/microorganisms8121930.
- Parsa S, Ortiz V, Vega FE. (2013). Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. **J Vis Exp**. 74:1-5. doi: 10.3791/50360.
- Partridge DE, Sutton TB, Jordan DL, Curtis VL, Bailey JE. (2006). Management of *Sclerotinia Blight* of Peanut with the Biological Control Agent *Coniothyrium minitans*. **Plant Dis** 90:957–963. doi: 10.1094/PD-90-0957.
- Poveda J (2021). *Trichoderma* as biocontrol agent against pests: New uses for a mycoparasite. **Biological Control** 159:4634. doi: 10.1016/j.biocontrol.2021.104634.
- Raffa CM, Chiampo F. (2021). Bioremediation of Agricultural Soils Polluted with Pesticides: A Review. **Bioengineering** 8:92. doi: 10.3390/bioengineering8070092.
- Ramesh MA, Zacharia S. (2017). Efficacy of Bio-agents and Botanicals against leaf Spot (*Cercospora arachidicola* Hori) of Peanut (*Arachis hypogaea* L.). **J Pharmacogn Phytochem** 6:504-506.
- R Core Team (2020) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from: <https://www.R-project.org/>.
- Richard B, Ukwela M, Avav T. (2018). Major Diseases of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) in Benue State of Nigeria. **Asian Journal of Advances in Agricultural Research** 4:1–12. doi: 10.9734/AJAAR/2017/38372.
- Ruano-Rosa D, Prieto P, Rincón AM, Gómez-Rodríguez MV, Valderrama R, Barroso JB, et al. (2016). Fate of *Trichoderma harzianum* in the olive rhizosphere: time course of the root colonization process and interaction with the fungal pathogen *Verticillium dahliae*. **BioControl** 61:269–282. doi: 10.1007/s10526-015-9706-z.
- Sánchez-Montesinos B, Santos M, Moreno-Gavira A, Marín-Rodulfo T, Gea FJ, Diáñez F. (2021). Biological Control of Fungal Diseases by *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* and Its Compatibility with Fungicides. **Journal of Fungi** 7:598. doi: 10.3390/jof7080598.
- Sharma P, Kumar Saini M, Deep S, Kumar V. (2012). Biological Control of Peanut Root Rot in Farmer's Field. **Journal of Agricultural Science** 4. doi: 10.5539/jas.v4n8p48.

- Srinivasan R, Abney MR, Lai PC, Culbreath AK, Tallury S, Leal-Bertioli SCM (2018). Resistance to Thrips in Peanut and Implications for Management of Thrips and Thrips-Transmitted Orthotospoviruses in Peanut. **Front Plant Sci** 9. doi: 10.3389/fpls.2018.01604.
- Srivastava M, Vipul K, Mohammad S, Sonika P, Anuradha S (2016). *Trichoderma*- a potential and effective bio fungicide and alternative source against notable phytopathogens: A review. **Afr J Agric Res** 11:310–316. doi: 10.5897/AJAR2015.9568.
- Subrahmanyam P, Mcdonald D, Walliyar F, Raddy L, Nigam S, Gibbons R. (1995). Screening Methods and Sources of Resistance to Rust and Late Leaf Spot of Peanut. Patancheru, India: ICRISAT.
- Tripathi P, Singh PC, Mishra A, Chauhan PS, Dwivedi S, Bais RT et al. (2013). *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental clean-up. **Clean Technol Environ Policy** 15:541–550. doi: 10.1007/s10098-012-0553-7.
- Tshilenge-Lukanda L, Nkongolo KKC, Kalonji-Mbuyi A, Kizungu RV (2012). Epidemiology of the Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Leaf Spot Disease: Genetic Analysis and Developmental Cycles. **Am J Plant Sci** 3:582–588. doi: 10.4236/ajps.2012.35070.
- Waliyar F, Adamou M, Traoré A. (2000). Rational Use of Fungicide Applications to Maximize Peanut Yield Under Foliar Disease Pressure in West Africa. **Plant Dis** 84: 1203–1211. doi: 10.1094/PDIS.2000.84.11.1203.
- Wickham H (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. Available from: <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Widmer TL (2019). Compatibility of *Trichoderma asperellum* isolates to selected soil fungicides. **Crop Protection** 120:91–96. doi: 10.1016/j.cropro.2019.02.017.
- Woo SL, Ruocco M, Vinale F, Nigro M, Marra R, Lombardi N, et al. (2014). *Trichoderma*-based Products and their Widespread Use in Agriculture. **Open Mycol J** 8, 71–126. doi: 10.2174/1874437001408010071.
- Yakubu I, Yusuf AA, Kabir A, Usman MS, Bello SK, Praveen Kumar D (2019). Efficacy of some bio-control agent formulations on scab of cowpea and peanut late leaf spot in the Nigerian savanna. **Niger J Biotechnol** 36:34. doi: 10.4314/njb.v36i1.5.

CAPÍTULO IV - Aplicação Pré-Colheita de *Trichoderma* para Manejo de Aflatoxinas na Cultura do Amendoim

Resumo - Este estudo investigou o impacto de diversos tratamentos nos níveis de aflatoxina em grãos de amendoim, com foco na utilização de diferentes cepas do fungo *Trichoderma* e fungicidas em combinação com o fungo *Aspergillus flavus*, produtor de aflatoxina. Foi avaliada a atividade inibitória de 10 cepas antagonistas de *Trichoderma* contra o *A. flavus* aflatoxigênico, tanto in vitro quanto in vivo. O efeito antagonista contra os fitopatógenos *Sclerotium rolfsii*, *Aspergillus niger* e *A. flavus* foram avaliados por meio da inibição do crescimento radial das colônias e de interações fúngicas pela técnica de culturas pareadas. Dez cepas de *Trichoderma* foram examinadas quanto à sua capacidade de biocontrole in vivo. As cepas *Trichoderma* sp. JAB 02, *Trichoderma* sp. JAB 03 e *T. harzianum* USP 19 demonstraram eficácia contra os três patógenos (*S. rolfsii*, *A. niger* e *A. flavus*) nos testes de antagonismo realizados em laboratório. De forma geral, certas cepas de *Trichoderma*, em particular *Trichoderma* sp. JAB 03 e *T. harzianum* USP 19, mostraram-se consistentemente mais eficazes na redução dos níveis de aflatoxina em amendoins em condições de campo. O estudo também investigou o papel do *Trichoderma* como endófito, colonizando os espaços intercelulares nas raízes do amendoim. Concluímos que cepas específicas de *Trichoderma* (*Trichoderma* sp. JAB 03 e *T. harzianum* USP 19) reduziram significativamente os níveis de aflatoxina no amendoim e aumentaram o rendimento das colheitas, exceto quando combinadas com *A. flavus*. Por outro lado, os fungicidas resultaram consistentemente em rendimentos mais elevados, possivelmente devido ao controle mais eficaz de manchas foliares e outras doenças que causaram danos severos nos outros tratamentos. Embora os fungicidas não tenham reduzido as aflatoxinas quando utilizados isoladamente em comparação com o controle, eles não afetaram negativamente os rendimentos quando combinados com *A. flavus*, ao contrário das cepas de *Trichoderma*. Portanto, embora as cepas de *Trichoderma* tenham potencial para a redução de aflatoxinas e o aumento de rendimento, é necessário um manejo cuidadoso quando *A. flavus* está presente devido aos seus potenciais efeitos adversos.

Keywords: biological control (CB), mycotoxin, peanut.

Pre-Harvest Application of *Trichoderma* for Aflatoxin Management in Peanut crop

Abstract - This study examined the impact of various treatments on aflatoxin levels in peanuts, focusing on the use of different strains of the fungus *Trichoderma* and fungicides in conjunction with the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. The inhibitory action of 10 antagonistic *Trichoderma* strains against the aflatoxigenic *A. flavus* in vitro and in vivo were examined. Antagonistic effect against *Sclerotium rolfsii*, *Aspergillus niger* And *A. flavus* was assessed by inhibition of radial growth of the colonies and by fungal interactions. Ten *Trichoderma* strains were screened for their modes of biocontrol ability in dual culture. The *Trichoderma* sp. JAB 02, *Trichoderma* sp. JAB 03 and *T. harzianum* USP 19 strains were effective against all the three pathogens *S. rolfsii*, *A. niger* and *A. flavus* in lab antagonism test. Overall, certain *Trichoderma* strains, notably *Trichoderma* sp. JAB 03 and *T. harzianum* USP 19, consistently proved the most effective for aflatoxin reduction in peanuts in field conditions. The study also examined *Trichoderma*'s role as an endophyte, colonizing the intercellular spaces in peanut roots. We concluded that specific strains of *Trichoderma* (*Trichoderma* sp. JAB 03 and *T. harzianum* USP 19) significantly minimized aflatoxin levels in peanuts. They also enhanced crop yields, except when combined with *A. flavus*. Fungicides consistently resulted in the highest yields, possibly due to more effective control of leaf spots and other diseases that caused severe damage in other treatments. Although fungicides did not reduce aflatoxins when used alone compared to the control, however, they did not negatively affect yields when combined with *A. flavus*, unlike *Trichoderma* strains. Therefore, while *Trichoderma* strains have the potential for aflatoxin reduction and yield increase, careful management is necessary when *A. flavus* is present due to its potential adverse effects.

Keywords: biological control (CB), mycotoxin, peanut.

1. INTRODUÇÃO

O amendoim, *Arachis hypogaea* L., é uma importante oleaginosa amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo. No entanto, uma preocupação significativa com a saúde e segurança no consumo de amendoins, é a contaminação por aflatoxinas, muitas vezes ultrapassando o limite de 20 partes por bilhão estabelecido pela Organização Mundial da Saúde para o consumo humano.

De acordo com Guo et al. (2009), o amendoim é uma das culturas mais vulneráveis à contaminação por *Aspergillus flavus*. Ingerir alimentos contaminados com aflatoxinas pode resultar em várias complicações de saúde, incluindo câncer. A contaminação por aflatoxinas é um desafio persistente no cultivo de amendoins, causando perdas significativas na produção e riscos à saúde.

Aflatoxinas, compostos potentes carcinogênicos e hepatotóxicos, são produzidos pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* durante os estágios de pré e pós-colheita em certas condições ambientais (Reddy et al., 2010; Uppala et al., 2013). A forma mais potente e tóxica é a aflatoxina B1 (AfB1), classificada como carcinogênica para humanos (grupo I) pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer. As estratégias atuais para o controle da contaminação por aflatoxina incluem rotação de culturas, preparo do solo, fungicidas e cultivares resistentes (Lavkor e Var, 2017).

No entanto, esses métodos são ineficazes e podem representar riscos ambientais e de saúde (Bhatnagar-Mathur et al., 2015; Ahmad et al., 2023). Portanto, a aplicação de agentes de biocontrole para prevenir a infecção pré-colheita e a contaminação por aflatoxina pode oferecer uma solução sustentável para esse problema urgente. *Trichoderma* spp. são conhecidos por suas propriedades antagonistas contra vários patógenos de plantas (Benítez et al., 2004).

Nesse contexto, agentes de controle biológico como *Trichoderma* spp. têm recebido considerável atenção devido ao seu potencial para suprimir *Aspergillus* spp., reduzindo assim a produção de aflatoxinas. Estudos recentes também relataram os efeitos positivos da aplicação de *Trichoderma* na redução da contaminação pré-colheita por aflatoxina em amendoins (Jiang et al., 2018).

Este estudo teve como objetivo fornecer uma comparação detalhada do uso de *Trichoderma* spp. e fungicidas tradicionais no controle da contaminação pré-colheita por aflatoxina em amendoins.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados fúngicos

As espécies de *Trichoderma* utilizadas neste estudo foram obtidas a partir da coleção de fungos da Amazônia, Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz, Brasil, e incluíram *Trichoderma gamsii* (número de acesso: CFAM 0044), *Trichoderma tawa* (CFAM 0149), *Trichoderma koningii* (CFAM 0358), *Trichoderma reesei* (CFAM 1162), *Trichoderma harzianum* (CFAM 1718) e *Trichoderma koningiopsis* (CFAM 0810). Além disso, foram utilizadas outras espécies provenientes de outros bancos de coleções de fungos, entre eles, *Trichoderma harzianum* (USP19), *Aspergillus flavus* (USP44) (produtor de aflatoxina) e *Aspergillus niger* (USP12) provenientes da coleção de fungos do Departamento de Biologia da Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP), Brasil, e os *Trichoderma* sp. JAB01, *Trichoderma* sp. JAB02, *Trichoderma* sp. JAB03 e *Sclerotium rolfsii* provenientes da coleção de fungos do Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental campus de Jaboticabal da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP-FCAV), Brasil.

2.2 Preparação do Inóculo Fúngico

Os isolados fúngicos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de batata-dextrose-água (BDA; KASVI) e incubados em uma incubadora B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio) no escuro a 26 ± 2 °C por 10 dias. Posteriormente, foi realizada a fermentação sólida para aumentar a quantidade de inóculo utilizado nos experimentos. Para a fermentação sólida, foram utilizados sacos de polipropileno (35 cm de comprimento $\times$ 22 cm de largura) contendo 300 g de arroz parboilizado. Inicialmente, o arroz foi hidratado com 200 ml de água destilada e mantido à temperatura ambiente por 50 minutos. Em seguida, o arroz foi peneirado para remover o excesso de água e autoclavado a 120 °C por 20 minutos.

O inóculo de cada isolado de *Trichoderma* foi preparado raspando os conídios presentes no meio de cultura BDA dentro dos sacos de polipropileno contendo arroz; o procedimento foi realizado em uma câmara de fluxo laminar asséptico e, em seguida, foi mantido na incubadora B.O.D. no escuro a 26 ± 2 °C por 10 dias.

Após a proliferação dos isolados fúngicos, uma suspensão de conídios foi preparada lavando os grãos de arroz com 500 ml de 0,01% (v/v) de Tween 80® em cada saco, e a concentração de conídios foi ajustada para 1×10^9 conídios/ml por contagem em um hemocitômetro de Neubauer (KASVI) com um microscópio óptico (LEICA DMLB).

Para confirmar a viabilidade dos fungos utilizados nos experimentos, a germinação de conídios foi determinada pelo método de contagem direta em 4 ml de PDA ajustado com 0,001% (v/v) de Derosal® 500 SC (Carbendazim, Bayer CropScience, S.P., Brasil) em placas Rodac® incubadas com suspensões de 1×10^6 conídios/ml para cada espécie fúngica (Oliveira et al., 2015).

Posteriormente, as placas de Petri foram mantidas na incubadora B.O.D. por 22 horas, no escuro a 26 ± 2 °C. O número de conídios germinados e não germinados foi quantificado sob um microscópio óptico, estimando a porcentagem de conídios germinados. As suspensões foram utilizadas apenas se as taxas de germinação fossem superiores a 85%.

2.3 Avaliação in vitro de espécies de *Trichoderma* quanto à atividade antagônica contra *Sclerotium rolfsii*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*

Utilizando a técnica de culturas pareadas em BDA, oito isolados de espécies de *Trichoderma* foram examinados quanto às suas atividades inibitórias contra *S. rolfsii*, *A. flavus* e *A. niger*. Um disco micelial (5 mm) de *S. rolfsii*, *A. flavus* e *A. niger* foi colocado em um lado da placa de BDA (5 cm de distância de *Trichoderma*, a distância que separa as duas colônias), e do outro lado o *Trichoderma* com 5 dias de incubação.

Os isolados de *Trichoderma* foram então incubados a 27°C durante 5 dias. Tampões miceliais de *S. rolfsii*, *A. flavus* e *A. niger* foram colocados em placas de BDA de forma semelhante para o tratamento controle. As placas de teste foram incubadas durante 5 dias a 27°C. As colônias dos patógenos tiveram seu crescimento

radial avaliado. Conforme explicado anteriormente por Wonglom et al. (2019), o percentual de inibição foi calculado da seguinte forma:

$$\text{Percentagem de inibição (\%)} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

, R1 é o crescimento radial isolado de *S. rolfsii*, *A. flavus* ou *A. niger* (controle), e R2 é o crescimento radial desses organismos após o pareamento de culturas. Cada tratamento foi repetido três vezes e os resultados foram apresentados como média, erro padrão (n=3).

2.4 Local experimento de campo

Sementes de amendoim da variedade IAC OL-3 foram obtidas da COPLANA - Cooperativa Agroindustrial, Jaboticabal, SP, Brasil. Dois experimentos de campo foram conduzidos durante as safras de amendoim de 2020-21 e 2021-22 na fazenda Cesar Dândaro, em Sertãozinho, no estado de São Paulo, Brasil.

A área de cultivo está localizada entre 21° 4' 58.877 " de latitude Sul e 48° 0' 31.304" de longitude Oeste. A área apresenta histórico de alta incidência de doenças de solo, com sucessivos plantios de amendoim. As datas de semeadura nas safras de 20/21 e 21/22 foram realizadas em 27 de novembro de 2020 e 12 de outubro de 2021, respectivamente.

Os dados climáticos da região foram coletados durante os experimentos (Tabela 1). Para a safra de 2020-21, a precipitação acumulada de setembro a abril foi de 828,7 mm e para a safra de 2021-22 foi de 1324,4 mm, respectivamente.

Tabela 1. Dados climáticos mensais das safras 20/21 e 21/22 em Sertãozinho-SP.

Ano	Mês	Temperatura (°C)			UR (%)	Precipitação (mm)
		Mínimo	Média	Máxima		
2020	Setembro	18.0	26.1	34.9	42.8	16.5
	Outubro	20.2	26.3	34.5	54.6	77.0
	Novembro	18.1	24.9	33.0	56.8	94.8
	Dezembro	20.2	24.5	31.4	76.7	312.4
2021	Janeiro	20.7	25.2	31.8	63.6	138.8
	Fevereiro	19.7	24.6	31.4	61.4	91.7
	Março	19.8	24.8	31.5	58.2	65.2
	Abril	17.8	23.6	29.6	55.2	32.3
2021	Setembro	19.5	27.5	35.2	46.0	40.5
	Outubro	18.5	25.0	37.5	70.5	272.5
	Novembro	18.7	25.2	36.1	62.4	147.9
	Dezembro	19.0	24.9	34.0	70.1	210.9
2022	Janeiro	20.3	24.2	31.1	79.3	283.8
	Fevereiro	20.0	24.6	31.2	76.2	199.2
	Março	20.4	25.4	32.3	71.0	91.9
	Abril	17.7	23.4	30.8	70.4	77.7

O experimento foi instalado em campo em delineamento de blocos completos casualizados, com dez tratamentos, replicados quatro vezes. Os tratamentos consistiram de (1) Controle, (2) *Trichoderma* sp. JAB 02, (3) *Trichoderma* sp. JAB 03, (4) *T. harzianum* USP 19, (5) *Trichoderma* sp. JAB 02 + *A. flavus*, (6) *Trichoderma* sp. JAB 03 + *A. flavus*, (7) *T. harzianum* USP 19 + *A. flavus*, (8) *A. flavus* sozinho, (9) Fungicidas + *A. flavus*, (10) Fungicidas sozinho.

O tamanho da parcela foi de 3,6 m × 5 m = 18 m². Os becos entre parcelas e repetições foram de 1 m e 1,5 m, respectivamente. O genótipo de amendoim utilizado foi o IAC-OL3, cuja semeadura foi realizada no dia 3 de dezembro de 2020, e a densidade de plantio de 20 sementes por metro linear.

As sementes dos tratamentos 9 e 10 utilizadas nos experimentos foram submetidas ao tratamento químico com Piraclostrobina, tiofanato de metila e fipronil (Standak® TOP, BASF S.A.) na dosagem de 300 mL/100 kg de sementes. Para as sementes dos tratamentos 2, 3, 4, 5, 6 e 7, foi inoculada a própria cepa de *Trichoderma* para cada tratamento, realizada por aplicação direta da suspensão de conídios (5 ml com 1 × 10⁷ conídios/ml) sobre a semente. (encharcamento do solo) conforme metodologia de Parsa et al. (2013).

Aplicações de fungicidas para os tratamentos 9 e 10 (Clorotalonil, 2,0 L/ha e Difenconazol, 0,35 L/ha) e *Trichoderma* (1 L/ha 1 × 10⁸) para 2, 3, 4, 5, 6 e 7

tratamentos iniciados 15 dias após a germinação do amendoim. Perduraram até os 118 dias do ciclo do amendoim com intervalos de 15 dias entre as pulverizações. As pulverizações foram aplicadas no sulco de plantio para cada tratamento. O volume médio de calda utilizado foi de 250 litros por hectare, proporcionando pulverização uniforme.

O controle dos insetos-praga foi realizado durante todo o experimento em todos os tratamentos; os inseticidas foram aplicados em todos os tratamentos, sendo utilizados clorantpriliprole (200 g/L) e oxima metilcarbamato (metomil) (215 g/L) na dosagem de 0,6 mL e 1,6 mL/L, respectivamente.

2.5 Determinação da concentração de Aflatoxina B₁ em amendoim

As análises de aflatoxinas foram realizadas na COPLANA: Cooperativa Agroindustrial, Jaboticabal, SP, Brasil. 50 g de amendoim sem casca de cada tratamento foram moídos em um moinho para preparação da amostra. As subamostras foram então armazenadas a -32°C em um freezer até a análise.

As soluções de estoque, intermediário e padrão de trabalho de AFB₁ foram realizadas utilizando o método de Stroka et al. (2014). Uma solução padrão AFB₁ (10 g/mL), a concentração foi medida usando um espectrofotômetro UV. Usando este padrão, padrões operacionais para AFB₁ foram produzidos para análise de HPLC (Stroka et al., 2014).

Os métodos usados para extrair AFB₁ das amostras e as condições cromatográficas foram baseados no método oficial AOAC 999.07 com algumas pequenas modificações (Stroka et al., 2014).

Resumindo: 50 gramas de amostras contendo amendoim foram agitadas por 30 minutos em 300 mL de solvente metanol: H₂O (80:20 v/v). O amendoim também continha 100 mL de n-hexano. Após a filtração, 20 mL do filtrado foram diluídos com 130 mL de água deionizada e passados por um filtro de microfibras de vidro. Os 75 mL restantes do filtrado foram utilizados para limpeza adicional em uma coluna de teste Afla IAC.

Após a coluna ter sido pré-condicionada com 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (2 a 3 mL/min), 75 mL do extrato da amostra diluída foram

passados pela coluna de teste Afla a 2 a 3 mL por minuto. A coluna foi então lavada com 15 mL de água. 0,5 mL de metanol de grau HPLC foi usado para eluir AFB1 da coluna e mais 0,75 mL do mesmo solvente foi adicionado um minuto depois. 100 microlitros da solução foram injetados no HPLC após 3mL de água para HPLC terem sido adicionados ao eluente.

Todos os componentes foram separados usando um sistema de HPLC com um detector de fluorescência em uma coluna monolítica (100 4,6 mm). A fase móvel foi composta por água: metanol a uma vazão de 1,2 mL/min (55:45, v/v). O detector de fluorescência trabalhou a 365 nm para excitação e 435 nm para emissão.

Para derivatização pós-coluna, Perbrometo de Bromidrato de Piridínio (PBPB) foi utilizado a uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Os solventes usados para os experimentos eram de grau HPLC ou analítico.

2.6 Colonização de fungos nas plantas de amendoim

Plantas de amendoim inoculadas com tratamentos fúngicos foram lavadas inteiras em água destilada para remover a sujeira superficial nas raízes 30 dias após a semeadura. Posteriormente, as raízes foram cortadas com tesoura em fragmentos.

Para cada tratamento foram sorteadas 5 plantas, totalizando 60 fragmentos de plantas por tratamento (raízes). Essas amostras foram desinfestadas superficialmente por imersão consecutiva em Etanol 75% por 1 minuto, Hipoclorito de Sódio 1% (NaOCl) por 3 minutos e etanol 75% por 1 minuto novamente, enxaguadas três vezes em água destilada estéril e secas em papel de filtro estéril. A eficácia da esterilização foi confirmada por plaqueamento de 100 µl da última água de enxágue em meio BDA, e a ausência de crescimento de fungos ou bactérias foi considerada indicativa de que a técnica de foi bem-sucedida (Parsa et al., 2013), e cada seção de raiz foi colocada em Placas com meio BDA antes e depois da esterilização (Greenfield et al., 2016).

O meio TSM adaptado descrito por Askew e Laing (1993) foi então colocado individualmente em placas de Petri (90 × 15 mm), o meio consistia em: BDA (todas as quantidades são por litro) 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,9 g de K_2HPO_4 , 1,0 g de NH_4NO_3 , 0,15 g de KCl, 0,15 g de Cristal Violeta em 950 ml de água destilada, que foi autoclavado a 121°C por 15 min.

Os ingredientes antimicrobianos e fungicidas (todas as quantidades são por litro) foram 0,25 g de Cloranfenicol, 9,0 ml de solução estoque de Estreptomicina (1% peso/vol), 0,5 g/L de Dodine (65%), 0,1 g/L de Cicloheximida e 1,2 ml de Propamocarb (772 g de ingrediente ativo por litro). As placas de Petri foram incubadas no escuro a 24°C por 15 dias.

A presença de microrganismos nos tecidos vegetais foi confirmada observando-se o crescimento das colônias de cada espécie fúngica no meio de cultura e observando-se as estruturas reprodutivas ao microscópio óptico (visualização morfológica), de acordo com as chaves taxonômicas descritas por Gams e Bissett (2002) e McClenny (2005).

A frequência de colonização foi estimada como o número de fragmentos colonizados por microrganismos em relação ao número total de fragmentos de plantas e expressa em porcentagem.

2.6 Análise estatística

Todos os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via com um nível de significância de $p\text{-valor} \leq 0,05$ para investigar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as médias de tratamento.

Em todos os ensaios, a significância estatística foi determinada usando o teste post-hoc Scott-Knott para realizar comparações pareadas de médias em um nível de significância de valor $p \leq 0,05$ e depois agrupadas de acordo.

Para realizar esta análise, foi utilizado a função "SK" do pacote "ScottKnott" (Jelihovschi et al., 2014), que é implementado no software estatístico R (R Core Team, 2020). As representações gráficas foram geradas usando o pacote R "ggplot2" (Wickham, 2016).

3. RESULTADOS

3.1 Inibição do crescimento de *Sclerotium rolfii*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* em antagonismo in vitro com cepas de *Trichoderma* pela técnica de culturas pareadas

Foi comparado o potencial antagonista de diferentes cepas de *Trichoderma* em cultivo pareado contra *S. rolfii*, *A. flavus* e *A. niger* em testes de antagonismo em placas de Petri. Contra *S. rolfii*, a cepa mais efetiva foi *T. harzianum* USP19 com 77,43% de inibição, seguida de *Trichoderma* sp. JAB 03 e *Trichoderma* sp. JAB 02 com 75,41% e 75,38% de inibição, respectivamente (Tabela 2). As cepas menos efetivas foram *T. gamsii* 0044 e *T. tawa* 149 com cerca de 60% de inibição.

No controle do fungo *A. flavus*, *T. harzianum* USP19 mais uma vez exibiu o desempenho mais robusto, demonstrando uma taxa de inibição de 93,33%. Enquanto o *Trichoderma* sp. JAB 02 e *Trichoderma* sp. JAB 03 mantiveram alta efetividade com aproximadamente 90% de inibição (Tabela 2). Notavelmente, a cepa *T. gamsii* 0044 foi a menos efetiva, com uma taxa de inibição de 52,31% (Tabela 2).

Em relação ao fungo *A. niger*, o *Trichoderma* sp. JAB 02 e o *T. harzianum* USP19 mostraram efeitos antagonistas superiores com taxas de inibição acima de 89%, seguidos por *Trichoderma* sp. JAB 03. As cepas menos efetivas foram *T. tawa* 149 e *T. gamsii* 0044, com taxas de inibição em torno de 57% (Tabela 2).

Em resumo, *T. harzianum* USP19, *Trichoderma* sp. JAB 02 e *Trichoderma* sp. JAB 03 consistentemente mostraram um potencial antagonista superior contra os três fitopatógenos. *T. gamsii* 0044 e *T. tawa* 149 foram geralmente as cepas menos efetivas em todos os casos.

Tabela 2. Eficácia do antagonismo in vitro de cepas de *Trichoderma* em cultivo pareado com *S. rolfsii*, *A. flavus* e *A. niger*.

Isolado <i>Trichoderma</i>	Porcentagem de Inibição (%) ¹		
	<i>Sclerotium rolfsii</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>T. koningii</i> 358	70.77 (±1.54) c	80.51 (±0.89) d	69.74 (±0.89) c
<i>T. koningiopsis</i> 810	71.28 (±0.89) c	82.57 (±1.78) d	72.31 (±3.08) c
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 01	74.87 (±0.88) b	86.15 (±1.54) c	86.15 (±1.54) b
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 03	75.38 (±1.54) ab	94.26 (±0.89) a	92.31 (±1.54) a
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02	75.41(±1.54) ab	90.34 (±0.89) b	85.94(±1.54) b
<i>T. harzianum</i> USP19	77.43 (±1.78) a	93.33 (±1.77) a	89.74 (±2.35) a
<i>T. reesei</i> 1162	61.03 (±1.78) d	68.72 (±0.89) e	57.95 (±1.78) d
<i>T. gamsii</i> 0044	60.00 (±1.54) de	52.31 (±1.54) g	56.92 (±1.54) de
<i>T. tawa</i> 149	57.95 (±0.89) e	63.59 (±1.78) f	54.36 (±0.88) e
<i>T. harzianum</i> 1718	71.30 (± 0.89) c	63.65 (±1.78) f	57.91 (± 1.78) d

¹Média ± SD de 3 replicações.

Valores na mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott a 5%.

Além da inibição do crescimento micelial fúngico, todas as cepas de *Trichoderma* causaram descoloração dos micélios de *Sclerotium*, que mudaram para uma coloração amarronzada quando em contato aos micélios do *Trichoderma* nas placas de ensaio in vitro (Figura 1).

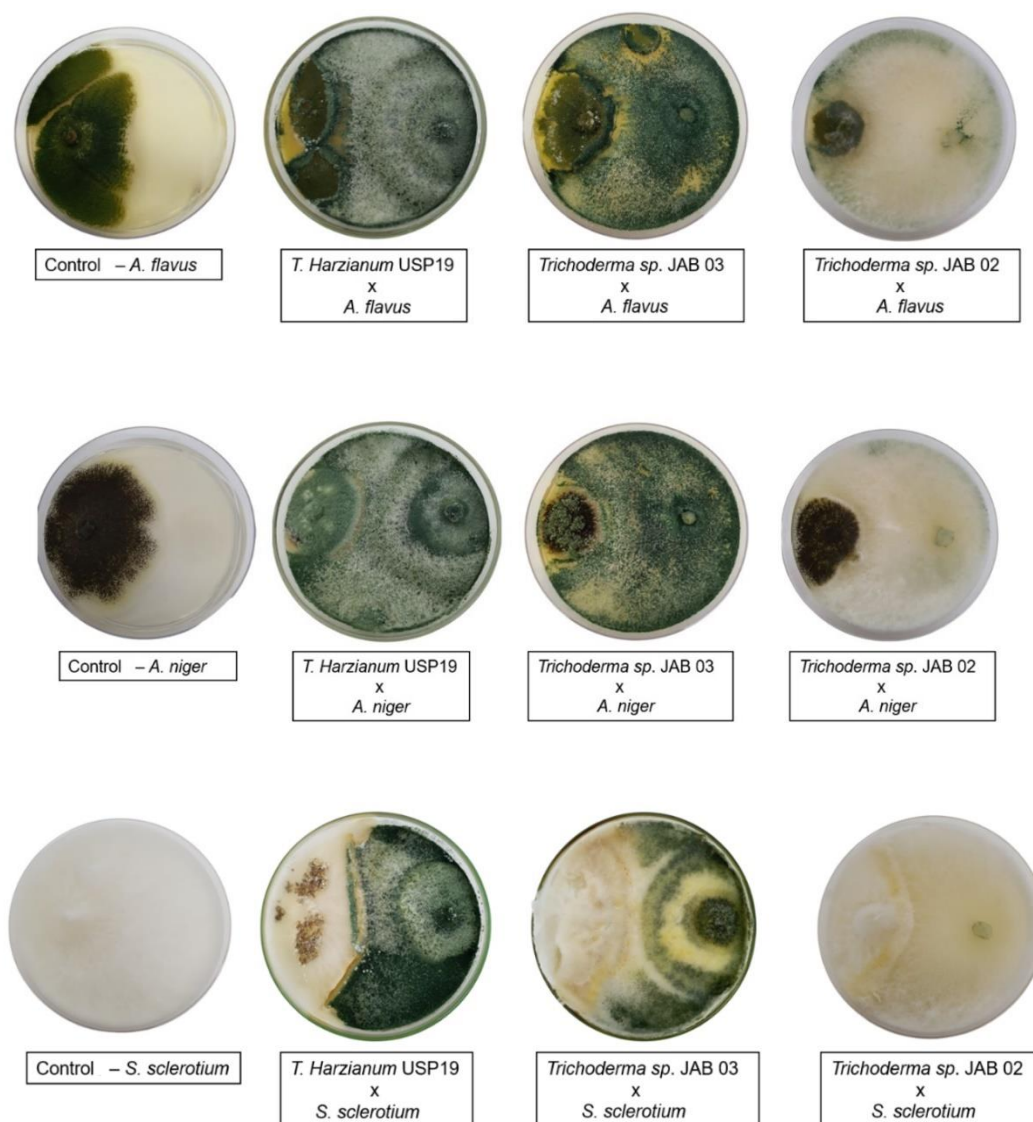


Figura 1. Antagonismo in vitro de cepas de *Trichoderma* em cultivo pareado com *S. rolfsii*, *A. flavus* e *A. niger*.

3.2 Concentração de Aflatoxina B₁ no amendoim

Os resultados da primeira avaliação revelaram uma variação significativa nas concentrações de aflatoxina. A amostra controle exibiu um nível moderado de aflatoxinas (7,95 µg/kg) (Tabela 3). As cepas de *Trichoderma*, especificamente *Trichoderma* sp. USP 19 e *Trichoderma* sp. JAB 03, mostraram resultados promissores, reduzindo o nível de aflatoxina para 5,275 µg/kg e menos de 2 µg/kg comparado ao controle, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Quantidade de aflatoxina **B₁** presente nas amostras de cada tratamento na primeira e segunda avaliações.

Experimento 1	
Tratamentos	Aflatoxinas B₁ (µg/kg)
Controle	7.95 d
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02	5.275 b
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 03	(<2) ¹ a
<i>T. harzianum</i> USP 19	(<2) a
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02 + <i>A. flavus</i>	13.375 f
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 03 + <i>A. flavus</i>	10.025 e
<i>T. harzianum</i> USP 19 + <i>A. flavus</i>	9.525 e
<i>A. flavus</i>	20.975 g
Fungicidas + <i>A. flavus</i>	13.825 f
Fungicidas	6.6 c
Média	8.75
CV (%)	10.17
Experimento 2	
Controle	8.025 c
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02	6.05 b
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 03	(<2) ¹ a
<i>T. harzianum</i> USP 19	(<2) a
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02 + <i>A. flavus</i>	14.425 e
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 03 + <i>A. flavus</i>	10.375 d
<i>T. harzianum</i> USP 19 + <i>A. flavus</i>	9.975 d
<i>A. flavus</i>	21.575 f
Fungicidas + <i>A. flavus</i>	14.55 e
Fungicidas	7.375 c
Média	9.23
CV (%)	6.56

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p>0,05$);

CV (%): Coeficiente de variação; 1(<2): menos de 2 µg/kg

Da mesma forma, *T. harzianum* USP 19 reduziu efetivamente as concentrações de aflatoxina para menos de 2 µg/kg. No entanto, a aplicação de *A. flavus* junto com essas cepas de *Trichoderma* resultou em um aumento nos níveis de aflatoxina em comparação com o uso isolado de *Trichoderma*. Especificamente, *Trichoderma* sp. JAB 02, *Trichoderma* sp. JAB 03 e *T. harzianum* USP 19, quando usados com *A. flavus*, resultaram em níveis de aflatoxina de 13,375 µg/kg, 10,025 µg/kg e 9,525

µg/kg, respectivamente (Tabela 3).

O maior nível de aflatoxinas (20,975 µg/kg) foi observado quando *A. flavus* foi utilizado sem nenhum agente de controle biológico. Os fungicidas sozinhos resultaram em um nível menor de aflatoxinas (6,6 µg/kg) em comparação com o controle, enquanto em combinação com *A. flavus*, eles apresentaram uma concentração relativamente alta de 13,825 µg/kg (Tabela 3).

Em conclusão, os tratamentos mais eficazes para a redução de aflatoxina foram *Trichoderma* sp. JAB 03 e *T. harzianum* USP 19 sem *A. flavus*. Esses achados sugerem que certas cepas de *Trichoderma* podem atuar como potentes agentes de controle biológico na agricultura para reduzir os níveis de aflatoxina.

Para a segunda avaliação, os resultados indicaram uma diferença notável nos níveis de aflatoxina entre os tratamentos. A amostra controle exibiu um nível relativamente elevado de aflatoxinas (8,025 µg/kg) (Tabela 3). O uso de diferentes cepas de *Trichoderma*, especificamente *Trichoderma* sp. JAB 02 e *Trichoderma* sp. JAB 03, reduziu significativamente as concentrações de aflatoxina para 6,05 µg/kg e menos de 2 µg/kg, respectivamente. *T. harzianum* USP 19 também se mostrou eficaz, diminuindo as concentrações de aflatoxina para menos de 2 µg/kg (Tabela 3).

Curiosamente, a aplicação de *A. flavus* junto com essas cepas de *Trichoderma* levou a um aumento na concentração de aflatoxina em comparação com o uso apenas das cepas de *Trichoderma*. Em particular, o uso combinado de *Trichoderma* sp. JAB 02, *Trichoderma* sp. JAB 03 e *T. harzianum* USP 19 com *A. flavus* resultou em níveis de aflatoxina de 14,425 µg/kg, 10,375 µg/kg e 9,975 µg/kg, respectivamente (Tabela 3).

O maior nível de aflatoxina foi observado quando *A. flavus* foi aplicado sem nenhum agente de controle biológico (21,575 µg/kg). O uso de fungicidas sozinho resultou em um nível reduzido de aflatoxina (7,375 µg/kg) em comparação com a amostra controle, enquanto a aplicação combinada com *A. flavus* levou a uma concentração elevada de 14,55 µg/kg (Tabela 3).

Em resumo, os tratamentos mais eficazes para a redução de aflatoxina foram *Trichoderma* sp. JAB 03 e *T. harzianum* USP 19 sem *A. flavus*.

3.3 Produtividade do amendoim

Foram investigados os efeitos de diferentes tratamentos na produção de grãos de amendoim, medida em kg por hectare (kg/ha). Os tratamentos envolveram diversas cepas de *Trichoderma* e fungicidas, aplicados sozinhos e em conjunto com o fungo *A. flavus*.

No primeiro experimento, o grupo controle apresentou uma produção de grãos de 2388,89 kg/ha (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo da produção de amendoim na primeira e segunda avaliações.

Primeiro Experimento		
Tratamentos	Produtividade (kg/ha)	Peso de 100 sementes (g)
Controle	2388.89 d	73,00 b
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02	2847.22 c	75,50 a
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 03	3000.00 c	76,80 a
<i>T. harzianum</i> USP 19	3055.56 c	76,93 a
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02 + <i>A. flavus</i>	2402.78 d	72,93 b
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 03 + <i>A. flavus</i>	2500.00 d	73,43 b
<i>T. harzianum</i> USP 19 + <i>A. flavus</i>	2569.44 d	73,75 b
<i>A. flavus</i>	1944.44 f	70,18 c
Fungicidas + <i>A. flavus</i>	3819.44 b	72,45 b
Fungicidas	4375.00 a	76,08 a
Média	2890.27	74.1
CV (%)	4.45	1.25
Segundo Experimento		
Controle	2340,28 e	72,00 b
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02	2673,61 d	74,60 a
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 03	2951,39 c	75,84 a
<i>T. harzianum</i> USP 19	2986,11 c	75,93 a
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 02 + <i>A. flavus</i>	2302,08 e	71,73 b
<i>Trichoderma</i> sp. JAB 03 + <i>A. flavus</i>	2402,78 e	72,26 b
<i>T. harzianum</i> USP 19 + <i>A. flavus</i>	2465,28 e	72,25 b
<i>A. flavus</i>	1843,75 f	69,10 c
Fungicidas + <i>A. flavus</i>	3538,19 b	71,15 b
Fungicidas	4027,78 a	75,81 a
Média	2753.13	72.99
CV (%)	4.76	1.36

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p>0,05$);

CV (%): Coeficiente de variação

A utilização das cepas *Trichoderma* sp. JAB 02 e *Trichoderma* sp. JAB 03 resultou em maior rendimento, com 2847,22 kg/ha e 3000,00 kg/ha, respectivamente (Tabela 4). Também foi observado um aumento leve com a aplicação de *T. harzianum* USP 19, produzindo 3055,56 kg/ha (Tabela 4).

Por outro lado, a adição de *A. flavus* a essas cepas de *Trichoderma* no primeiro experimento resultou em um rendimento semelhante ou ligeiramente acima do controle: *Trichoderma* sp. JAB 02, *Trichoderma* sp. JAB 03 e *T. harzianum* USP 19 com *A. flavus* resultaram em rendimentos de 2402,78 kg/ha, 2500,00 kg/ha e 2569,44 kg/ha, respectivamente (Tabela 4).

No primeiro experimento, a aplicação de *A. flavus* sozinho resultou no menor rendimento entre todos os tratamentos, com 1944,44 kg/ha (Tabela 4). No entanto, o uso de fungicidas, sozinhos ou combinados com *A. flavus*, levou aos maiores rendimentos, com 4375,00 kg/ha e 3819,44 kg/ha, respectivamente (Tabela 4). O tratamento controle resultou em um peso médio de sementes de 73,00 g no primeiro experimento. A aplicação de *Trichoderma* sp. JAB 02 e *Trichoderma* sp. JAB 03 resultou em pesos de 75,50 g e 76,80 g, respectivamente. *T. harzianum* USP 19 resultou em um peso ligeiramente maior de 76,93 g (Tabela 4).

A combinação de *A. flavus* com *Trichoderma* sp. JAB 02, *Trichoderma* sp. JAB 03 e *T. harzianum* USP 19 no primeiro experimento resultou em pesos de sementes de 72,93 g, 73,43 g e 73,75 g, respectivamente (Tabela 4).

A aplicação de *A. flavus* sozinho resultou no menor peso de sementes de 70,18 g. No entanto, o uso de fungicidas no primeiro experimento, tanto sozinhos quanto combinados com *A. flavus*, resultou em pesos maiores de 76,08 g e 74,10 g, respectivamente (Tabela 4).

Em resumo, a aplicação das cepas de *Trichoderma* JAB 02, JAB 03 e *T. harzianum* USP 19, assim como o uso de fungicidas sozinhos ou em combinação com *A. flavus*, resultaram nos maiores pesos de sementes no primeiro experimento. Por outro lado, a aplicação de *A. flavus*, seja sozinho ou combinado com as cepas de *Trichoderma*, resultou em pesos de sementes menores.

No segundo experimento, o tratamento controle resultou em uma produção de grãos de 2340,28 kg/ha. A utilização de *Trichoderma* sp. JAB 02 e *Trichoderma* sp.

JAB 03 levou a um aumento no rendimento, com 2673,61 kg/ha e 2951,39 kg/ha, respectivamente (Tabela 4). Foi observado um rendimento ligeiramente maior quando *T. harzianum* USP 19 foi utilizado, com uma produção de 2986,11 kg/ha (Tabela 4).

A combinação de *A. flavus* com *Trichoderma* sp. JAB 02, *Trichoderma* sp. JAB 03 e *T. harzianum* USP 19 resultou em produções de grãos de 2302,08 kg/ha, 2402,78 kg/ha e 2465,28 kg/ha, respectivamente (Tabela 4).

O menor rendimento foi observado quando *A. flavus* foi aplicado isoladamente, resultando em 1843,75 kg/ha. Em contraste, o uso de fungicidas, tanto sozinhos quanto combinados com *A. flavus*, resultou em rendimentos mais altos, com 4027,78 kg/ha e 3538,19 kg/ha, respectivamente (Tabela 4).

Em resumo, a aplicação de fungicidas, sozinhos ou em combinação com *A. flavus*, resultou nos maiores rendimentos de grãos, em médias de 45% superior ao controle. Enquanto isso, a aplicação de *Trichoderma* melhorou o rendimento em média de 25% em relação ao controle.

No segundo experimento, os tratamentos com *Trichoderma* sp. JAB 02, *Trichoderma* sp. JAB 03, *T. harzianum* USP 19 e fungicidas sem a presença de *A. flavus* mostraram a maior eficácia, levando aos pesos de sementes mais elevados (74,60 g - 75,93 g). Esses tratamentos foram estatisticamente superiores aos demais (Tabela 4).

Os tratamentos envolvendo *Trichoderma* sp. (JAB 02 e JAB 03), *T. harzianum* USP 19 combinado com *A. flavus*, o controle e fungicidas combinados com *A. flavus* tiveram pesos de sementes variando de 71,15 g a 72,26 g no segundo experimento (Tabela 4). O tratamento menos eficaz no segundo experimento foi *A. flavus* sozinho, que resultou no menor peso de sementes de 69,10 g (Tabela 4). Isso foi significativamente menor em comparação com os outros grupos de tratamentos. No geral, os resultados sugerem que *Trichoderma* sp. ou fungicidas usados sozinhos, sem a presença de *A. flavus*, contribuem para maiores pesos de sementes, enquanto a presença de *A. flavus* diminui o peso das sementes.

3.4 Colonização endofíticas em raízes de amendoim por *Aspergillus*, *Trichoderma* e outros microrganismos

Os resultados mostram as porcentagens de ocorrência de vários microrganismos em fragmentos de raízes de plantas de amendoim 30 dias após a inoculação em diferentes condições de tratamento (Tabela 5).

Para *Trichoderma* sp., nenhuma ocorrência foi observada nos tratamentos controle, *A. flavus*, Fungicidas + *A. flavus* e somente fungicidas. As taxas de ocorrência mais altas foram encontradas nos tratamentos envolvendo *Trichoderma* sp. JAB 03 e *T. harzianum* USP 19 (30%), e taxas mais baixas para os tratamentos combinados *Trichoderma* sp. JAB 02, JAB 03 e *T. harzianum* USP 19 com *A. flavus* (10-20%) (Tabela 5).

Aspergillus sp. teve a maior ocorrência no tratamento *A. flavus* (60%), e o controle mostrou uma taxa de ocorrência de 40% (Figura a e b) (Tabela 5). Todos os outros tratamentos exibiram uma ocorrência de 10-40% (Tabela 5).

Para outros microrganismos, a maior ocorrência foi observada no controle (50%). Outros tratamentos apresentaram uma taxa de ocorrência variando de 20 a 40% (Tabela 5).

Em geral, a presença das cepas de *Trichoderma* parece reduzir a ocorrência de *Aspergillus* sp. Além disso, os tratamentos envolvendo *Trichoderma* sp. JAB 03 e *T. harzianum* USP 19 mostraram maiores taxas de colonização por *Trichoderma* sp. em comparação com os demais. Foi possível observar a colonização endofítica ou não de *Aspergillus* nas plantas e sementes de amendoim (Figura 2).

Tabela 5. Ocorrência (%) de microrganismos em fragmentos de raízes de plantas de amendoim aos 30 dias após a inoculação.

Tratamentos	Ocorrência %		
	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	Outros microrganismos
Controle	0	40	50
<i>Trichoderma sp.</i> JAB 02	10	20	30
<i>Trichoderma sp.</i> JAB 03	30	10	20
<i>T. harzianum</i> USP 19	30	10	20
<i>Trichoderma sp.</i> JAB 02 + <i>A. flavus</i>	10	30	30
<i>Trichoderma sp.</i> JAB 03 + <i>A. flavus</i>	10	30	30
<i>T. harzianum</i> USP 19 + <i>A. flavus</i>	20	30	30
<i>A. flavus</i>	0	60	40
Fungicidas + <i>A. flavus</i>	0	40	30
Fungicidas	0	30	40

Foi possível observar a colonização endofítica de *Aspergillus* nas plantas e sementes de amendoim conforme destacado na Figura 2.

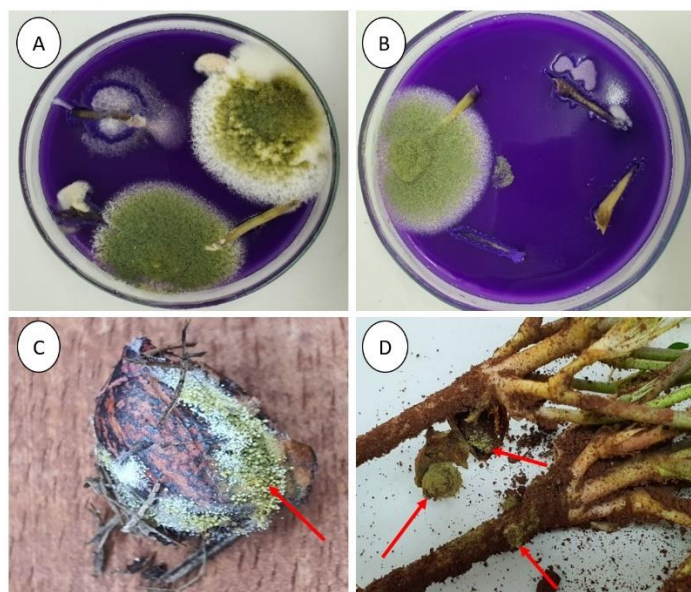


Figura 2. A) e (B) placas de petri com fragmentos de plantas de amendoim, demonstrando o fungo endofítico *A. flavus* com esporulação externa. (C) colonização por *A. flavus* em semente de amendoim, indicando o fungo na seta vermelha. (D) colonização por *A. flavus* em plantas de amendoim retiradas do campo, indicando o fungo pelas setas vermelhas.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o impacto de vários tratamentos nos níveis de aflatoxina em amendoins, focando no uso de diferentes cepas de *Trichoderma* e fungicidas, tanto em combinação quanto sem o fungo produtor de aflatoxina *A. flavus*.

O *Trichoderma* spp. é eficaz na redução da contaminação por aflatoxina em várias culturas, incluindo amendoins (Anjaiah et al., 2006; Bagwan, 2011; Chiuraise, 2015; Kifle, 2016); arroz (Reddy et al., 2009); e milho doce (Sivparsad and Laing, 2016). O presente estudo descobriu que a pulverização pré-colheita de amendoins com cepas de *Trichoderma* reduziu drasticamente *A. flavus* em condições de campo, concentração de aflatoxina e infecção.

Os resultados dos ensaios de cultura dupla in vitro e micoparasitismo sugerem que o micoparasitismo e a antibiose são os prováveis mecanismos responsáveis pela inibição do crescimento de *A. flavus*. O *Trichoderma* é antagonista do *A. flavus* se

houver uma alta incidência de supressão em placas de cultura dupla. Essa atividade antifúngica significativa pode ter vindo do próprio *Trichoderma* ou de substâncias liberadas pelo fungo. Esse mecanismo de antibiose também foi documentado em outras pesquisas que mostraram que as cepas de *Trichoderma* têm efeitos antagonistas sobre o crescimento de *A. flavus* e de *Fusarium* spp. micotoxigênicos (Chiuraise et al., 2015; Joo et al., 2015).

De acordo com Schuster e Schmoll (2010) e Sivasithamparam e Ghisalberti (1998), cepas de *Trichoderma* têm sido encontradas que produzem um maior número de metabólitos com atividade antibiótica, como poliquetídeos, pironas, terpenos, metabólitos derivados de aminoácidos e polipeptídeos, para sobreviver e competir em seu nicho ecológico.

Outro mecanismo potencial de ação usado pelo *Trichoderma* para evitar o crescimento de *A. flavus* foi o micoparasitismo, de acordo com pesquisas ultraestruturais publicadas por Kifle et al. (2016) e Sivparsad and Laing (2016), as hifas de *Trichoderma* enrolam-se em torno das hifas de *A. flavus*. Essa ação de enrolamento torna possível tanto a entrada do *T. harzianum* no lúmen do *A. flavus* parasitado quanto a subsequente assimilação do conteúdo da célula (Chiuraise et al., 2015). O *Trichoderma* spp. usa um mecanismo de micoparasitismo bem documentado que foi demonstrado em vários patógenos (Huang and Kokko, 1993; Chiuraise et al., 2015; Omarjee, 2002; Yobo et al., 2004).

Ren et al. (2022) investigaram a ação inibitória de 20 isolados de *Trichoderma* antagonistas contra o isolado aflatoxigênico *A. flavus* e sua eficácia na redução da formação de aflatoxina *in vitro*. Os resultados revelaram que oito dos 20 isolados inibiram significativamente o crescimento das colônias de Af-9, com 14 isolados reduzindo significativamente o teor de aflatoxina B1 (AfB1). No entanto, a inibição do crescimento de Af-9 e a redução do AfB1 não estavam necessariamente correlacionadas, sugerindo que a redução do teor de AfB1 por essas cepas de *Trichoderma* pode estar baseada em outros mecanismos, como degradação enzimática ou complexação.

Outro estudo realizado por Yue et al. (2022) investigou a capacidade de várias cepas de *Trichoderma* em degradar aflatoxinas prejudiciais, especificamente aflatoxina B1 (AFB1). De 65 isolados, *T. reesei* CGMCC3.5218 provou ser o mais

eficaz, degradando 100% de uma baixa concentração de AFB1 em 3 dias e 87,6% de uma alta concentração em 5 dias. Ele degradou mais de 85% das aflatoxinas em amendoins, milho e ração artificial e naturalmente contaminados em sete dias. Dini et al. (2022) também exploraram o potencial da cepa *T. afroharzianum* T22 e suas exoenzimas na degradação de micotoxinas prejudiciais, especificamente a Aflatoxina B1 (AFB1) e a Ocratoxina A (OTA). A maior atividade de degradação de AFB1 e OTA foi obtida quando cogumelos liofilizados e fibra bruta foram usados como substrato. Essa capacidade de reduzir micotoxinas pode ser atribuída às enzimas peroxidase produzidas pela cepa *T. afroharzianum* T22.

No estudo aqui realizado as amostras de controle exibiram níveis moderados de aflatoxinas (7,95 µg/kg e 8,025 µg/kg) para ambas as avaliações em campo. A detecção de aflatoxina nas sementes de controle não inoculadas pode ser devida à presença de *A. flavus* ou *A. parasiticus*, que são regularmente encontrados no solo. De acordo com Starr and Selim (2008), as cepas de *Aspergillus* são amplamente encontradas em campos agrícolas e solos e podem ser a principal fonte de inóculo para colonizar culturas.

As cepas *T. harzianum* USP 19 e *Trichoderma* sp. JAB 03 reduziram significativamente as concentrações de aflatoxina em ambas as avaliações. esses tratamentos consistentemente reduziram o nível de aflatoxina para menos de 2 µg/kg em ambas as avaliações. No entanto, a combinação de *A. flavus* com essas cepas de *Trichoderma* aumentou a concentração de aflatoxina. Especificamente, a adição de *A. flavus* ao *Trichoderma* sp. JAB 02, *Trichoderma* sp. JAB 03 e *T. harzianum* USP 19 resultou em níveis de aflatoxina mais altos do que quando as cepas de *Trichoderma* foram usadas isoladamente.

Demonstrando a baixa eficácia do fungicida no controle de *Aspergillus* em uma situação de campo. A aplicação de *A. flavus* sem nenhum agente de controle biológico levou aos maiores níveis de aflatoxina. O uso de fungicidas isoladamente resultou em níveis de aflatoxina semelhantes ao controle em ambas as avaliações.

Em conclusão, em ambas as avaliações, o *Trichoderma* sp. JAB 03 e o *T. harzianum* USP 19, com ou sem *A. flavus*, se mostraram consistentemente os mais eficazes para a redução de aflatoxina. Esses resultados destacam o potencial de certas cepas de *Trichoderma* como agentes de controle biológico para o controle dos

níveis de aflatoxina em amendoins. De acordo com Anjaiah et al. (2006), o *Trichoderma* spp. usados como tratamento de sementes ajudou a reduzir a infecção por *A. flavus* em sementes de amendoim e a inibir a infecção por *A. flavus* na zona das vagens.

Resultados semelhantes foram demonstrados por Kifle et al. (2016) no controle da infecção pré-colheita de amendoins por *A. flavus* com a cepa *T. harzianum* kd (Tkd) no campo. As sementes de amendoim tratadas com (Tkd) demonstraram a capacidade de parasitar *A. flavus*. Os níveis de aflatoxina nas plantas de controle foram significativamente maiores do que nas plantas tratadas com Tkd. O rendimento das plantas tratadas com Tkd foi de 35 a 49% maior do que nas plantas de controle. Outro estudo de Sivparsad and Laing (2016) investigou a eficácia da cepa *T. harzianum* T77 no controle de *A. flavus* em milho doce. Eles aplicaram o *T. harzianum* como tratamento de pulverização pré-colheita nas sedas do milho doce em vários intervalos. Os resultados mostraram uma diminuição significativa da infecção por *A. flavus* e da contaminação por aflatoxina após os tratamentos de pulverização nas sedas com T77 em 10 e 12 dias após a polinização.

No presente estudo, o crescimento do micélio de *Trichoderma*, *Aspergillus* e outros microrganismos a partir de raízes esterilizadas de amendoins cultivados em placas de Petri indica colonização endofítica dos espaços intercelulares nas raízes de amendoim por esses fungos. Isso mostra que os amendoins são um hospedeiro compatível do *Trichoderma*, atuando como um endófito.

Horn (2006) relatou a relação entre a densidade de várias espécies de *Aspergillus* no solo e a incidência de colonização das sementes de amendoim em condições controladas de laboratório. As sementes de amendoim foram inoculadas em 20 solos diferentes que variavam em composição e densidade de espécies de *Aspergillus*, e depois incubadas por duas semanas. A pesquisa descobriu que a densidade do solo de espécies individuais da seção Flavi afetou a incidência da colonização das sementes. Apesar de alguns solos apresentarem altas densidades de espécies, o aumento exponencial da colonização das sementes por espécies da seção Flavi muitas vezes atingia o máximo bem abaixo de 100%, possivelmente devido à competição entre as espécies.

Outros gêneros fúngicos só puderam invadir sementes de amendoim quando

as densidades do solo de espécies das seções Flavi e Nigri eram baixas. Os resultados sugerem que a densidade do solo de espécies de *Aspergillus* desempenha um papel crucial na colonização das sementes de amendoim. Outros gêneros fúngicos foram descritos como colonizadores de plantas de amendoim, como *Penicillium*, *Fusarium* e *Clonostachys* (Horn, 2005). A colonização endofítica por *Aspergillus* não causa sintomas visíveis na planta de amendoim, tornando o controle dessa infecção um desafio.

Esta pesquisa também examinou os efeitos na produção de amendoim em vagens. Em resumo, em ambas as avaliações, o uso de fungicidas resultou nas maiores produções, enquanto o *A. flavus* sozinho resultou nas menores produções. Cepas específicas de *Trichoderma* demonstraram propriedades de aumento da produção, mas sua combinação com *A. flavus* não melhorou significativamente a produção em relação ao controle.

Esses resultados destacam os benefícios potenciais de fungicidas e cepas de *Trichoderma* para melhorar o rendimento das culturas e a necessidade de gerenciamento cuidadoso quando o *A. flavus* está presente. Os melhores resultados de produção nos tratamentos com fungicidas podem estar correlacionados com o controle de outras doenças foliares do amendoim, que causam grande redução no rendimento.

Na primeira avaliação, na safra de 2021, foram observadas precipitações acumuladas de 888 mm, enquanto na safra de 2022, a precipitação foi de 1324 mm. Com base nesses dados, foram observados sintomas graves de cercosporioses, verrugose e outras doenças em ambas as avaliações, mas na safra de 2022, a severidade das doenças foi superior (dados não publicados).

Esses resultados podem estar relacionados com a grande quantidade de chuva na safra de 2022 e, conseqüentemente, maiores níveis de umidade relativa, o que favoreceu o desenvolvimento das doenças foliares. De acordo com March and Marinelli (1998), à medida que a temperatura aumenta, também aumenta a taxa de desenvolvimento dessas doenças. Períodos de cinco ou mais horas com umidade relativa superior a 95% e temperatura mínima acima de 16 °C são ideais para epidemias de doenças foliares.

5. CONCLUSÃO

Este estudo revelou que cepas específicas do fungo *Trichoderma*, como JAB 03 e USP 19, reduziram significativamente os níveis de aflatoxina em grãos de amendoim. Quando aplicados isoladamente, esses *Trichodermas* foram mais eficazes na redução de aflatoxinas do que fungicidas ou combinações de ambos. Embora os fungicidas tenham proporcionado um melhor controle de doenças foliares, eles não reduziram as aflatoxinas como o *Trichoderma* fez. As cepas de *Trichoderma* também aumentaram a produtividade em relação ao controle, mas esse benefício não se manifestou quando combinadas com *A. flavus*.

6. REFERÊNCIAS

- Anjaiah V, Thakur RP, Koedam N (2006) Evaluation of bacteria and *Trichoderma* for biocontrol of pre-harvest seed infection by *Aspergillus flavus* in peanut. **Biocontrol Sci Technol** 16:431–436
- Ahmad M, Zhenlian H, Qing K (2023) “Aflatoxin in peanuts and maize: an overview on occurrence, regulations, prevention, and control methods.” **World Mycotoxin Journal**. Doi:10.3920/wmj2022.2786
- Askew DJ, Laing MD (1993). An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species. **Plant Pathol.** 42:686-690.
- Bagwan NB (2011) Eco-friendly management of aflatoxin B1 at pre-harvest level in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Int J Plant Prot** 4:1–6
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, 7:249-260.
- Bhatnagar-Mathur P, Sunkara S, Bhatnagar-Panwar M, Waliyar F, Sharma KK (2015). Biotechnological advances for combating *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in crops. **Plant Science**, 234:119-132.
- Chiuraise N, Yobo KS, Laing MD (2015). Seed treatment with *Trichoderma harzianum* strain kd formulation reduced aflatoxin contamination in peanuts. **Journal of Plant Diseases and Protection**, 122:74–80.
- Dini I, Alborino V, Lanzuise S, Lombardi N, Marra R, Balestrieri A, Ritieni A, Woo SL, Vinale F (2022). *Trichoderma* Enzymes for Degradation of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A. **Molecules**, 27.DOI:10.3390/molecules27123959
- Gams W, Bissett J (2002) Morphology and Identification of *Trichoderma*. In: Kubicek, C.P. and Harman, G.E., Eds., ***Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics***, Taylor & Francis Ltd., London, 3-31.
- Greenfield M, Gómez-Jiménez MI, Ortiz V, Vega FE, Kramer M, Parsa S. (2016). *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. **Biol. Control** 95:40–48. doi: 10.1016/j.biocontrol.2016.01.002
- Guo B, Jiujang GE, Holbrook CC, Cleveland TE, Nierman WC, Scully BT (2009). Strategies in prevention of pre-harvest aflatoxin contamination in peanuts: Aflatoxin biosynthesis, genetics and genomics. **Peanut Sci.** 36:11–20.
- Horn BW (2005) Colonization of wounded peanut seeds by soil fungi: selectivity for species from *Aspergillus* section Flavi. **Mycologia**. 97:202-17. doi: 10.3852/mycologia.97.1.202.

Horn BW (2006). Relationship between soil densities of *Aspergillus* species and colonization of wounded peanut seeds. **Canadian Journal of Microbiology**. 52:951-960. <https://doi.org/10.1139/w06-050>

Huang HC, Kokko EG (1993) *Trichodema roseum*, a mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Can J Bot** 71:1631–1638

Jeliahovschi E, Faria JC, Allaman IB (2014). ScottKnott: A Package for Performing the Scott-Knott Clustering Algorithm in R. **TEMA** (São Carlos) 15, 003. doi: 10.5540/tema.2014.015.01.0003.

Jiang Y, Liang G, Yang S, Yu D (2018). Control of postharvest soft rot caused by *Aspergillus flavus* in peanuts by β -aminobutyric acid (BABA). **Postharvest Biology and Technology**, 142:20-27.

Kifle MH, Yobo KS, Laing MD (2017) Biocontrol of *Aspergillus flavus* in peanut using *Trichoderma harzianum* stain kd. **J Plant Dis Prot** 124:51–56. <https://doi.org/10.1007/s41348-016-0066-4>

Lavkor I, Var I. (2017) The Control of Aflatoxin Contamination at Harvest, Drying, Pre- Storage and Storage Periods in Peanut: The New Approach [Internet]. Aflatoxin-Control, Analysis, Detection and Health Risks. **InTech**; 2017. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68675>

March G, Marinelli, A (1998). " Enfermedades del Maní," in Manual del Maní 3ª Edición, ed. Pedelini R, Casini C (Manfredi: INTA), 24–35.

McClenny N (2005) Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. **Med Mycol**. 43:125-8. doi: 10.1080/13693780500052222.

Oliveira DGP, Pauli G, Mascarin GM, Delalibera I. (2015). A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. **J Microbiol Methods** 119:44–52. doi: 10.1016/j.mimet.2015.09.021.

Omarjee J (2002) Studies on the application of biocontrol agents for the control of seedling diseases. Ph.D. thesis, University of Natal, Pietermaritzburg

Parsa S, Ortiz V, Vega FE (2013). Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. **J. Vis. Exp.** 74:360. doi: 10.3791/50360

R Core Team (2020) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from: <https://www.R-project.org/>.

Reddy KRN, Reddy CS, Muralidharan K (2009) Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. **Food Control** 20:173–178

Reddy BN, Raghavender CR, Salleh B, Saad B. (2010). An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. **Toxin Reviews**, 29:3-26.

Ren X, Branà MT, Haidukowski M, Gallo A, Zhang Q, Logrieco AF, Li P, Zhao S, Altomare C (2022) Potential of *Trichoderma* spp. for Biocontrol of Aflatoxin-Producing *Aspergillus flavus*. **Toxins** 14:86. <https://doi.org/10.3390/toxins14020086>

Sivasithamparam K, Ghisalberti EL (1998) Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Harman GE, Kubicek CP (eds) *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor and Francis, London, pp 139–192

Schuster A, Schmoll M (2010) Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Appl Microbiol Biotechnol** 87:787–799

Sivparsad BJ, Laing MD (2016) Pre-harvest silk treatment with *Trichoderma harzianum* reduces aflatoxin contamination in sweetcorn. **J Plant Dis Prot** 123:285–293. <https://doi.org/10.1007/s41348-016-0037-9>

Starr JM, Selim MI (2008). Supercritical fluid extraction of aflatoxin B1 from soil. **Journal of Chromatography A**, 12:37–43.

Stroka J, Anklam E, Joerissen U, Gilbert J (2000) Immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography using post-column bromination for the determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste and paprika powder. **J. AOAC Int.** 83:320–340.

Uppala SS, Bowen FM (2013) Woods; Pre-harvest aflatoxin contamination and soluble sugars of peanut. **Peanut Science** 40:40–51. doi: <https://doi.org/10.3146/PS12-9.1>

Wickham H (2016) ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. Available from: <https://ggplot2.tidyverse.org>.

Wonglom P, Daengsuwan W, Ito S, Sunpapao A (2019). Biological control of Sclerotium fruit rot of snake fruit and stem rot of lettuce by *Trichoderma* sp. T76–12/2 and the mechanisms involved. **Physiol. Mol. Plant. Pathol.** 107:1–7. doi: 10.1016/j.funeco.2019.100867

Yue X, Ren X, Fu J, Wei N, Altomare C, Haidukowski M, Logrieco AF, Zhang Q, Li P. (2022) Characterization and mechanism of aflatoxin degradation by a novel strain of *Trichoderma reesei* CGMCC3.5218. **Front Microbiol.** 13;13:1003039. doi: 10.3389/fmicb.2022.1003039.

CAPÍTULO V – Considerações finais

A produção de amendoim no Brasil desempenha um papel crucial tanto no mercado interno quanto no internacional. No entanto, ela é fortemente impactada por inúmeras doenças e infestações de insetos pragas. O método primário para controlar esses problemas tem sido tradicionalmente o uso de agroquímicos, como fungicidas e inseticidas. Embora essas substâncias possam mitigar efetivamente os danos no amendoim, seu uso excessivo pode ter consequências preocupantes.

O uso excessivo de agroquímicos pode levar ao desenvolvimento de cepas resistentes de doenças e pragas, prejudicando a biodiversidade ao matar organismos não alvo e insetos benéficos. Além disso, eles podem contaminar o solo, a água e o ar, afetando outras culturas, a fauna e potencialmente a saúde humana. Resíduos desses produtos químicos nas colheitas podem também representar problemas de segurança alimentar. Há claramente uma necessidade de estratégias sustentáveis e ecologicamente corretas para o manejo de doenças, e é aí que a importância de pesquisas adicionais se torna evidente. Estudos que exploram agentes de controle biológico, como as espécies do fungo *Trichoderma*, podem oferecer alternativas ou complemento viáveis aos agroquímicos, contribuindo para práticas agrícolas sustentáveis. Essas pesquisas podem levar ao desenvolvimento de soluções eficazes, ambientalmente amigáveis e econômicas, que são cruciais para a sustentabilidade e rentabilidade de longo prazo da produção de amendoim no Brasil. Isso não apenas apoia a economia agrícola, mas também ajuda a proteger a saúde ambiental e humana.

Os fungos entomopatogênicos e *Trichoderma* são ferramentas valiosas no contexto do manejo sustentável e ecologicamente correto de doenças e pragas na agricultura. Os fungos entomopatogênicos são fungos que podem parasitar e matar insetos. Eles oferecem uma alternativa ou complemento ecologicamente correta aos inseticidas químicos. Uma vez que esses fungos entram em contato com o inseto, eles penetram em sua casca externa e eventualmente o matam, geralmente através da produção de toxinas. Eles são altamente específicos para suas pragas-alvo, reduzindo o risco de prejudicar organismos não alvo. Além disso, eles também podem limitar o

desenvolvimento de resistência a inseticidas, uma vez que empregam diversas estratégias de infecção, ao contrário dos inseticidas químicos de ação única.

O *Trichoderma*, por outro lado, é um gênero de fungos que tem mostrado um potencial significativo como agentes de controle biológico contra várias doenças de plantas. Eles combatem fungos nocivos por meio de diversos mecanismos, como micoparasitismo, competição por nutrientes e espaço e indução de resistência sistêmica nas plantas. As espécies de *Trichoderma* podem ajudar a controlar uma ampla variedade de patógenos, reduzir a dependência de fungicidas químicos e melhorar a saúde e o crescimento das plantas. Em combinação, fungos entomopatogênicos e *Trichoderma* podem fornecer uma abordagem integrada para o manejo de pragas e doenças. Isso poderia reduzir significativamente a dependência de pesticidas e fungicidas químicos, mitigando os riscos ambientais e de saúde associados ao seu uso excessivo.

Além disso, eles podem contribuir para a manutenção da biodiversidade, melhorar a saúde do solo e garantir a sustentabilidade das práticas agrícolas. No entanto, mais pesquisas são necessárias para otimizar seu uso, compreender suas interações com diferentes pragas, patógenos e condições ambientais e desenvolver formulações e métodos de aplicação eficazes. A transferência adequada de conhecimento para os agricultores sobre o uso desses agentes de controle biológico também é crucial para sua implementação bem-sucedida. Uma comunicação aprimorada entre pesquisadores e agricultores é essencial para desenvolver estratégias eficazes de controle biológico e garantir que os agricultores estejam bem informados sobre o uso correto do produto para doenças específicas. Muitos estudos exploraram o *Trichoderma* como agente de controle biológico, mas a maioria foi realizada em laboratório, com sua eficácia posteriormente testada no campo. A demanda futura por esses produtos é esperada para aumentar cada vez mais.

No Capítulo II, foi investigado os efeitos de fungos entomopatogênicos endofíticos inoculados em plantas de amendoim e como essas plantas afetaram duas pragas larvais, *Chrysodeixis includens* e *Spodoptera cosmioides*. A pesquisa utilizou nove cepas/espécies de fungos entomopatogênicos dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Cordyceps*, inoculadas em plantas de amendoim pelo método de “Soil-Drench”.

Vários parâmetros foram observados durante o desenvolvimento larval, incluindo peso larval e pupal, mortalidade, consumo de área foliar e tempo do período larval. Além disso, a capacidade endofítica desses fungos em plantas de amendoim e sua persistência no solo também foram investigadas. Os pesos larvais e de pupas de *C. includens* e *S. cosmioides* foram significativamente diferentes entre os grupos de tratamento com fungos. Insetos alimentados com plantas controle tiveram pesos larvais e de pupas mais altos do que insetos alimentados com plantas tratadas com os fungos.

Além disso, o período larval de insetos alimentados com plantas inoculadas com fungos foi de 3 a 5 dias mais longo do que os alimentados com plantas de controle. As taxas de mortalidade de *C. includens* e *S. cosmioides* também foram significativamente diferentes entre os grupos de tratamento com fungos, sendo que insetos alimentados com plantas de controle apresentaram maior sobrevivência do que os alimentados com plantas inoculadas com fungos. Em termos de persistência no solo, todos os fungos *Metarhizium* apresentaram maior persistência em comparação com outros fungos, e apenas *Metarhizium* e *B. bassiana* IBCB215 emergiram da filosfera das plantas de amendoim.

No entanto, o fungo *Cordyceps* mostrou o pior desempenho entre os tratamentos com fungos. Em geral, os resultados mostram que a presença de fungos entomopatogênicos endofíticos em plantas de amendoim teve efeitos negativos no desenvolvimento de *C. includens* e *S. cosmioides*. Os melhores desempenhos foram registrados para as cepas de *Metarhizium* e o fungo *B. bassiana* IBCB215.

Inúmeras doenças fúngicas prejudiciais para a cultura do amendoim, são geralmente controladas usando fungicidas. No entanto, o potencial do *Trichoderma* para combater essas doenças, especialmente em combinação com fungicidas, não foi amplamente explorado na cultura do amendoim.

No Capítulo III, foi examinado a eficácia da combinação de *Trichoderma* com dois fungicidas comumente usados, Chlorothalonil e Difenconazole, no controle de manchas foliares do amendoim. Após um teste de compatibilidade in vitro, foram realizados dois ensaios de campo nas safras 2021 e 2022 para avaliar diferentes cepas de *Trichoderma* usadas em associação ou não com fungicidas. Outros fatores, como infestação de tripes, custo operacional total e produção de amendoim, também

foram registrados. Os tratamentos com *Trichoderma* sp. JAB 02 + F (Fungicidas) e *T. harzianum* USP 19 + F resultaram na menor severidade das doenças e na maior produtividade de amendoim, o que demonstrou o benefício da combinação de *Trichoderma* com fungicidas em relação ao uso isolado de fungicidas. A pesquisa enfatiza o potencial do *Trichoderma* como ferramenta de controle biológico contra doenças do amendoim e sua importância na gestão sustentável.

Finalmente, no **Capítulo IV**, esse estudo examinou intervenções para controlar os níveis de aflatoxina em amendoins durante a pré-colheita, especificamente, diferentes cepas de *Trichoderma* e fungicidas em combinação ou não com a presença de *Aspergillus flavus*, um fungo produtor de aflatoxina. Nas avaliações, as amostras de controle apresentaram níveis moderados de aflatoxina, com as cepas de *Trichoderma* sp. JAB 03 e *T. harzianum* USP 19 reduzindo substancialmente as quantidades de aflatoxinas. Notavelmente, essas cepas de *Trichoderma* mantiveram consistentemente os níveis de aflatoxina abaixo de 2 µg/kg nas duas avaliações. Além disso, a combinação de *A. flavus* com essas cepas de *Trichoderma*, demonstraram que o *Trichoderma* foi capaz de reduzir as concentrações de aflatoxinas mesmo na presença de *A. flavus*. A aplicação isolada de *A. flavus*, sem nenhum agente de controle biológico, resultou nos maiores níveis de aflatoxina.

Os fungicidas utilizados isoladamente diminuíram os níveis de aflatoxina em comparação com o controle, e na combinação com *A. flavus*, porém os níveis de aflatoxinas foram elevados em comparação aos tratamentos com *Trichoderma*. Em resumo, o *Trichoderma* sp. JAB 03 e *T. harzianum* USP 19 com e sem *A. flavus* demonstraram consistentemente as melhores reduções de aflatoxinas. Esses resultados destacam o potencial de certas cepas de *Trichoderma* como agentes de controle biológico na redução dos níveis de aflatoxina em amendoins.

No geral, esses estudos podem contribuir significativamente para a agricultura, destacando o potencial de agentes de controle biológico, como o *Trichoderma* e os fungos entomopatogênicos, como alternativas ou complementos eficazes e sustentáveis aos agroquímicos tradicionais. A pesquisa demonstra sua eficácia no controle de pragas e doenças. Essas descobertas são cruciais para o desenvolvimento de estratégias integradas do manejo de pragas e doenças na cultura do amendoim. Portanto, elas representam importantes avanços em direção à

agricultura sustentável, contribuindo para a preservação da biodiversidade, saúde do solo e, em última instância, da saúde humana.

A necessidade de estudos de campo suplementares para confirmar esses e outros resultados de pesquisa, incluindo a demonstração aos agricultores do manejo eficaz de pragas e doenças em culturas de amendoim utilizando biológicos, com base em diretrizes técnicas, é viável. Além disso, defende-se a colaboração crucial entre cientistas, agentes de extensão, cooperativas, proprietários de empresas e agricultores, a fim de superar os obstáculos na implementação do controle biológico no Manejo Integrado de Pragas e Doenças nas lavouras de amendoim.