

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA**

Thaís Lopes de Oliveira

Engenheiro Agrônomo

**BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE *TRICHODERMA*
NO CONTROLE DA CROSTA NEGRA EM SERINGUEIRA**

Dracena

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA**

Thaís Lopes de Oliveira

Engenheiro Agrônomo

**BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE *TRICHODERMA*
NO CONTROLE DA CROSTA NEGRA EM SERINGUEIRA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Ciências
Agrárias e Tecnológicas – Unesp, Câmpus
de Dracena como parte das exigências
para conclusão do curso.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Firmino

Dracena

2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Dracena



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
UNESP – CÂMPUS DE DRACENA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE TRICHODERMA NO CONTROLE DA
CROSTA NEGRA EM SERINGUEIRA

Modalidade: Trabalho de atividades de pesquisa

Autor: Thais Lopes de Oliveira

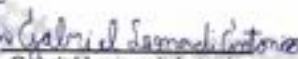
Orientador (a): Profª. Drª. Ana Carolina Firmino

Número de Créditos: 12

Data da aprovação e correção de acordo com as sugestões da Banca: 20/06/2023


Profª. Drª. Ana Carolina
Firmino


Prof. Dr. Vitor Corrêa de
Mattos Barreto


Gabriel Leonardi Antonio

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Luis Adolfo Pina de Oliveira e Vera Lucia Lopes de Oliveira, que me educaram e me possibilitaram mais essa conquista sendo um apoio na minha vida e sempre incentivando a correr atrás dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por sempre guiar os meus caminhos e como Jesus disse “Eu sou o caminho, a verdade e a vida, ninguém vem ao Pai a não ser por mim”, pois Deus sabe o que faz e o que acontece em minha vida, devido que nada ocorre sem o seu consentimento.

Aos meus pais, Luis Adolfo e Vera Lucia que são o meu apoio e os maiores incentivadores da minha maior conquista de vida, sou grata por todos os esforços que tiveram que fazer ao longo da vida e poder conseguir retribuir a eles é o meu maior presente, pois sei que foi difícil e não tenho palavras para descrever o quanto sou grata por tudo.

Agradeço também ao meu namorado Dhônata Marcos por sempre estar ao meu lado apoiando e incentivando a nunca desistir, e a sempre batalhar pelos meus sonhos, por ser meu companheiro não só de vida, mas também durante a minha graduação, pois sei que quando precisava de ajuda ele estaria ao meu lado para auxiliar no que precisasse.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Firmino pelas oportunidades durante a graduação e ensinamentos, por acreditar no meu potencial e esforço e auxiliando no meu aperfeiçoamento profissional e pessoal.

Aos meus colegas Marcela Eloi, Louyne Varine, Izabela Ponso, Angelo Codonho, Bruna Regina, Gustavo Sato e Jonas Reina que durante a graduação se tornaram a minha segunda família e parceiros das maiores loucuras.

Agradeço a Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológica – Campus de Dracena pelos cinco anos de graduação, por me conceder todo conhecimento necessário para me tornar uma profissional dedicada.

E por fim a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), referente aos processos no 2020/11518-4, pelo apoio financeiro.

“Por isso não tema, pois estou com você; não tenha medo, pois sou o seu Deus. Eu o fortalecerei e o ajudarei; eu o segurarei com a minha mão direita vitoriosa.” (Isaías 41:10)

RESUMO

A crosta negra, tornou-se uma doença preocupante na cultura da seringueira (*Hevea brasiliensis*), pois ela provoca intensa desfolha e conseqüentemente a diminuição na produção de látex. Sabendo que não há fungicidas registrados para o controle desta doença o uso do controle biológico mostra-se uma alternativa promissora. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de controle de *Cladosporium* spp. por meio da utilização de isolados de *Trichoderma* obtidos a partir de folhas doentes de seringueira que apresentavam o crescimento natural deste fungo. Para isso foram realizados testes *in vitro*, em mudas de seringueira e em campo. Nos experimentos *in vitro*, foram aferidas a produção de metabólitos voláteis e não voláteis e a capacidade de antagonismo/parasitismo dos isolados TC1 e AP1. Nos experimentos em casa de vegetação com mudas de seringueira, foram realizados experimentos para a verificação dos efeitos curativo e protetor dos isolados de *Trichoderma*, com aferição da severidade da doença e das enzimas peroxidase e fenilalanina, que estão ligadas a expressão de resistência da planta. Os isolados TC1 e AP1, também foram testados em árvores no campo, neste caso foi quantificada a severidade da doença, após quatro aplicações destes fungos. Nos testes com os isolados AP1 e TC1 *in vitro* foi possível verificar que estes isolados possuem metabólitos voláteis que inibem o crescimento do patógeno causador da crosta negra em seringueira, além de possuírem capacidade antagônica e parasitária. A aplicação destes fungos em casa de vegetação mostrou-se efetiva, principalmente para os tratamentos curativos, pois os dois isolados controlaram a doença e aumentaram as atividades das enzimas estudadas. Nos tratamentos preventivos, somente o isolado TC1 apresentou controle da doença. Já no campo, viu-se a necessidade de maiores testes com estes isolados de *Trichoderma*, pois apesar de eles terem diminuído a doença, não houve diferença deles em relação a testemunha. Deste modo, apesar dos isolados terem potencial no controle da doença é necessário aferir melhor a efetividade dos *Trichodermas* testados para o controle da crosta negra no campo.

Palavras-chave: *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningiopsi*, *Hevea brasiliensis*, *Cladosporium* sp.

ABSTRACT

Black scab has become a worrying disease in the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) culture, as it causes intense defoliation and consequently a decrease in latex production. Knowing that there are no registered fungicides to control this disease, the use of biological control is a promising alternative. Thus, this work aimed to evaluate the ability to control *Cladosporium* spp. through the use of *Trichoderma* isolates obtained from diseased rubber tree leaves that showed the natural growth of this fungus. For this, *in vitro* tests were carried out, in rubber tree seedlings and in the field. In the *in vitro* experiments, the production of volatile and non-volatile metabolites and the antagonism/parasitism capacity of the TC1 and AP1 isolates were measured. In experiments in a greenhouse with rubber tree seedlings, experiments were carried out to verify the curative and protective effects of the *Trichoderma* isolates, measuring the severity of the disease and the enzymes peroxidase and phenylalanine, which are linked to the expression of plant resistance. The TC1 and AP1 isolates were also tested on trees in the field, in this case the severity of the disease was quantified after four applications of these fungi. In tests with the AP1 and TC1 isolates *in vitro*, it was possible to verify that these isolates have volatile metabolites that inhibit the growth of the pathogen that causes black scab in rubber trees, in addition to having antagonistic and parasitic capacity. The application of these fungi in a greenhouse proved to be effective, mainly for curative treatments, as the two isolates controlled the disease and increased the activities of the studied enzymes. In preventive treatments, only the TC1 isolate showed disease control. In the field, however, the need for further tests with these *Trichoderma* isolates was seen, because although they had reduced the disease, there was no difference between them in relation to the control. Thus, although the isolates have potential to control the disease, it is necessary to better assess the effectiveness of the tested *Trichodermas* for the control of black scab in the field.

Keywords: *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningiopsi*, *Hevea brasiliensis*, *Cladosporium* sp.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Crescimento de colônias nos testes de metabólitos não voláteis do *Trichoderma* AP1 sobre *C. cladosporioides* **(A)**, *C. pseudocladosporioides* **(B)** e *C. anthropophilum* **(C)**.....30
- Figura 2** - Crescimento micelial (cm/dia) de isolados de *Cladosporium* no teste de produção de metabólitos voláteis com isolado de *Trichoderma* AP130
- Figura 3** - Crescimento micelial (cm/dia) de isolados de *Cladosporium* no teste de produção de metabólitos voláteis com isolado de *Trichoderma* TC131
- Figura 4** - Isolado de *C. pseudocladosporioides* no teste de produção de metabólitos voláteis com isolado de *Trichoderma* AP1 com 30 dias de incubação. **A.** testemunha (sem *Trichoderma*). **B.** *C. pseudocladosporioides* x *Trichoderma* isolado AP1.....31
- Figura 5** - Avaliação da capacidade de parasitismo e antagonismo do isolado TC1 de *Trichoderma*. **A.** *C. cladosporioides*; **B.** *C. pseudocladosporioides*; **C.** *C. anthropophilum*; **D.** *C. delicatulum*; **E.** *C. uredinicola*.....32
- Figura 6** - Avaliação da capacidade de parasitismo e antagonismo do isolado AP1 de *Trichoderma*. **A.** *C. cladosporioides*; **B.** *C. pseudocladosporioides*; **C.** *C. anthropophilum*; **D.** *C. delicatulum*; **E.** *C. uredinicola*.....32
- Figura 7** - Severidade da doença (porcentagem de área foliar lesionada) de folhas coletadas antes da aplicação dos tratamentos.....38
- Figura 8** - Regressão linear de 2º grau baseada na severidade da doença (porcentagem de área foliar lesionada) de folhas coletadas antes da aplicação dos tratamentos, nos meses fevereiro/2022 **(1)**, abril/2022 **(2)**, julho/2022 **(3)** e outubro/2022 **(4)**.....39
- Figura 9** - Dados climáticos da Cidade de Araçatuba no ano de 2022.....40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Severidade (porcentagem de área foliar lesionada) e incidência (porcentagem de plantas com sintomas queima apical e presença de crostas nas hastes) da doença em mudas de seringueira tratadas com os isolados de *Trichoderma* AP1 e TC1.....35
- Tabela 2** - Atividade da enzima peroxidase em seringueira após o tratamento curativo e preventivo com os isolados de *Trichoderma* AP1 e TC136
- Tabela 3** - Atividade da enzima fenilalanina em seringueira após o tratamento curativo e preventivo com os isolados de *Trichoderma* AP1 e TC137
- Tabela 4** - Análise de variância do experimento realizado no campo com os isolados de *Trichoderma* e com produtos químicos.....38

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TC1	<i>Trichoderma</i> spp.
AP1	<i>Trichoderma</i> spp.
FAL	Fenilalanina ammonia-lise
POXs	Peroxidase
SAR	Resistência sistêmica adquirida
IRS	Resistência induzida
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
BDA	Batata, dextrose e agar
mmol	Milimol
min	Minuto
mg	Miligrama
g	Grama
mL	Mililitro
h	Hora
ng	Nanograma
cm	Centímetro
mm	Milímetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 Seringueira	18
3.2 Doenças folhares e crosta negra.....	18
3.3 Agente causal.....	19
3.4 Sintomas	20
3.5 <i>Trichoderma</i>	20
3.5.1 Peroxidase	21
3.5.2 Fenilalanina amônia-lise.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Obtenção dos fungos usados no trabalho e preparação do inóculo microrganismos	24
4.2 Testes com os agentes de controle biológico “ <i>in vitro</i> ”	24
4.3 Teste com agentes de controle biológico em mudas de seringueira.....	24
4.3.1 Quantificação das enzimas peroxidase e fenilalanina amônia-liase..	25
4.4 Teste com os agentes de controle biológico em campo	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Testes com os agentes de controle biológico “ <i>in vitro</i> ”	28
5.2 Teste com agentes de controle biológico em mudas de seringueira.....	32
5.3 Teste com os agentes de controle biológico em campo	37
6 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

A seringueira (*Hevea brasiliensis*) apesar da sua importância, a expansão da cultura no território brasileiro vem enfrentando muitas barreiras, entre os quais estão os problemas fitossanitários. Dentre as doenças foliares que estão sendo encontradas com frequência na maior parte das áreas de cultivo, pode-se citar a antracnose, causadas por *Colletotrichum* ssp. (Furtado; Gasparotto; Pereira, 2016) e a crosta negra, sendo que esta última vem trazendo certa preocupação, pois há relatos de queda de 38% na produção de borracha entre os anos de 2017 e 2020 em algumas regiões produtoras de látex (Virgens Filho et al., 2022). A crosta negra pode ser causada por um complexo de fungos, identificados como *P. huberi*, *R. heveae* e *Cladosporium* sp. (forma assexuada de *Rosenscheldiella heveae*) (Junqueira; Bezerra, 1990; Gasparotto; Pereira, 2016; Gomes, 2023).

O controle químico de doenças de seringueira é limitado pelo fato de não haver produtos registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento para todas as doenças, como no caso da crosta negra (Agrofit, 2023). Os poucos produtos registrados nesta cultura são utilizados com maior frequência em jardins clonais e viveiros, pois a aplicação no campo requer uma série de cuidados para que não haja impacto ambiental, além de necessitar que as plantas possuam certas características, como a área foliar ou desenvolvimento da copa homogêneo, para uma ação mais eficaz do produto (Grigoletti Jr., Santos, Auer, 2000; Guyot, 2001).

O uso de materiais resistentes seria a melhor alternativa para manejo da crosta negra e de outras doenças na cultura na seringueira, já que esta fica por longo período no campo (Alvarenga; Carmo, 2014). Porém, os trabalhos relacionados com este tipo de assunto nesta cultura comumente relatam que alguns materiais resistentes se tornam suscetíveis em determinados locais. Esta variação na reação a doença, segundo os autores, se deve a interação do genótipo com o ambiente, que podem favorecer a expressão da doença no campo, além da ocorrência de variabilidade genética do patógeno envolvido (Furtado et al., 1994; Guen Seguin e Mattos, 2000; Antonio et al., 2021).

No caso da crosta negra, existem alguns relatos de controle biológico. Há casos que o controle da crosta negra pode se dar naturalmente por fungos hiperparasitas, como *Cylindrosporium* sp. e *Dicyma pulvinata*. Este fato é

interessante já que estudos recentes apontam que os fungos endofíticos isolados da microfauna foliar podem restringir tanto crescimento *in vitro* quanto *in vivo* de patógenos de diferentes culturas, inclusive de seringueira, diminuindo os danos que estes causam, destacando assim seu status como uma nova fonte de agentes de controle biológico contra fitopatógenos de plantas tropicais (Gazis; Chaverri, 2010; Abraham et al., 2013). Além disso, endófitos de plantas tropicais constituem um conjunto ecológico rico em espécies de microrganismos que deve ser incluso em qualquer programa destinado a rastrear novos metabólitos para uso na agricultura (Rungjimdamai et al. 2008; Tejesvi et al. 2009).

Magalhães et al. (2021a) e Celin et al. (2021), mostraram a eficiência de dois isolados de *Trichoderma*, obtidos a partir de um parasitismo natural observado em campo sob lesões de crosta negra e antracnose. Magalhães et al. (2021a) apontou que os isolados TC1 e AP1 de *Trichoderma* foram eficazes no controle da antracnose através da produção de metabólitos voláteis e não voláteis e que o isolado AP1 teve o melhor resultado no teste de pareamento. Estes mesmos isolados, ao serem testados em mudas de seringueira reduziram a severidade da antracnose, bem como da mortalidade dos enxertos infectados com *Colletotrichum*, além de aumentarem a altura da planta, diâmetro do caule e melhorarem a eficiência relativa do acúmulo de fitomassa seca e a área foliar específica das plantas (Celin et al., 2021). Assim, os resultados demonstram que os isolados testados possuem potencial na área de controle biológico do patógeno e pode ser alvo de estudos para desenvolvimento de produtos contra a antracnose em seringueiras.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo estudar a efetividade dos isolados TC1 e AP1 de *Trichoderma*, obtidos da microfauna de folhas de seringueira e eficazes no controle da antracnose, no controle da crosta negra *in vitro* e em clones comerciais de seringueira, e assim colaborar com o desenvolvimento de métodos alternativos no manejo da doença no campo.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a capacidade de controle dos isolados com base nos testes de produção de metabólitos voláteis e não voláteis e a capacidade de parasitismo/antagonismo.
- Verificar o efeito curativo e protetor dos isolados TC1 e AP1 para controle biológico do patógeno *Cladosporium* sp.
- Quantificação das enzimas peroxidase e fenilalanina amônia-liase na qual interagem a induzir os mecanismos de defesa da planta.
- Verificar os agentes de controle biológico em campo baseando na severidade da crosta negra.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Seringueira

No Brasil, a seringueira (*Hevea brasiliensis*) é cultivada em diferentes estados, desde a região Norte até o norte do Estado do Paraná (Gasparotto et al., 2012). Esta cultura é responsável pela produção do látex, que dá origem a borracha natural. Esta matéria prima é de grande importância na indústria pneumática, mas também imprescindível para outros setores, como saúde (luvas cirúrgicas, preservativos, tubos cirúrgicos, biomateriais para aplicação médica etc.), calçados, mineração e siderúrgicas etc. (Alvagenga, Carmo, 2014). Além disso, possuir grande importância social, decorrente da geração de cerca de mais de 80 mil postos de trabalho no país.

A seringueira é relevante também do ponto de vista ambiental, já que é uma cultura reflorestadora, que contribui para a conservação do solo, manutenção da água, serve de abrigo e alimento para fauna e possui alta taxa de sequestro de carbono da atmosfera, em quantidades equivalentes ao de uma floresta natural (em torno de 90 toneladas de CO₂ por planta de 15 anos) (Carmo; Manzatto; Alvarenga, 2007; Alvagenga, Carmo, 2014; Scaloppi Junior, 2015; Braga, 2016).

3.2 Doenças folhares e crosta negra

A seringueira apresenta um importante papel, mas quando atinge o terceiro ano, ela passa por uma fase de senescência, que leva a queda das folhas seguindo por um novo reenfolhamento (Gasparotto et al., 2012). Este período é considerado de risco, já que ocorre maiores ataques de doenças foliares como mal-das-folhas, antracnose, oídio, mancha areolada (Gasparotto et al., 1997; Furtado et al., 2016).

No entanto, dentre as doenças foliares, encontra-se a crosta negra, a qual é considerada de pouca importância, devido queda precoce das folhas após o reenfolhamento, podendo ser considerado uma senescência natural do que uma ação patogênica. Porém devido aos últimos anos com devida mudança climática e a expansão dos seringais, tornou-se um dos principais problemas fitossanitários (Gasparotto et al., 2012; Gonçalves, Goes, 2017).

A crosta negra pode ser encontrada no Brasil, Venezuela, Trinidad, Colômbia, Bolívia, Peru e Suriname. Enquanto no Brasil, pode ser visto nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Mato Grosso e em destaque na região de São Paulo. Entre os municípios de São Paulo, da região de Votuporanga no período de 2012 e em 2017 foram relatados sintomas nas cidades de Palestina, Olímpia, Barretos, Colômbia, Colina, Guaraci, Guaíra, São José do Rio Preto, Paulo de Faria, Tanabi, Bebedouro, Bálsamo, José Bonifácio, Ipiruá, Mirassolândia e Mendonça (Gonçalves, Goes. 2017). Tornando assim, os sintomas do fungo observados no campo mais frequentes (Gasparotto et al., 2012).

3.3 Agente Causal

A infecção da crosta negra, pode ser causada por dois fungos, de forma isolada ou em conjunto, sendo *Phyllachora huberi* que pertence à família Phyllachoraceae e *Rosenscheldiella heveae* pertencente à família Mycosphaerellaceae (Junqueira, Bezerra, 1999; Gonçalves, Goes, 2017).

A Phyllachoraceae é composta por fungos biotróficos que é formado por 59 gêneros com cerca de 1500 epítetos de espécies (Maharachchikumbura et al. 2015, Index Fungorum 2017). Podendo ser identificada de acordo com a morfologia, mas devido ao tempo, as informações genéticas foram se perdendo indicando instabilidade taxonômica presente na família, apresentando parte do grupo das espécies polifiléticas (Dayarathne et al. 2017; Santos et al., 2016).

Rosenscheldiella heveae dentre a espécies da família Mycosphaerellaceae, são capazes de colonizar diferentes nichos, devido a variação de vida, podendo ser patógenos endófitos, sapróbios e epífitas que facilita a entrada no hospedeiro, além de conseguir produzir algumas toxinas que anula a resposta de defesa, facilitando assim o seu desenvolvimento (Bradshaw, 2004; Bradshaw, Zhang , 2006; Chen et al. 2007; De Wit 2016)

Porém, segundo Gomes (2023) baseada em conhecimentos morfológicos revisando as espécies definidas para crosta negra associando ao levantamento feito no Estado de São Paulo, observou-se que a *R. heveae* onde associada a seringueira, apresenta como forma assexuada *Cladosporium* spp.

3.4 Sintomas

A infecção da crosta negra ocorre normalmente em folíolos jovens, mas de forma lenta podendo ser vista em folhas com mais de um mês de idade (Gasparotto et al., 2012).

Os sintomas surgem na parte abaxial ou inferior dos folíolos como placas circulares negras e quando ocorre o ressecamento torna-se quebradiça perto das nervuras, entretanto na parte adaxial ou superior do limbo apresenta pequenas áreas lesionadas de cor amarelada que corresponde as incrustações estromáticas negras (Gasparoto et al., 2012).

Assim, quando ocorre a desfolha, o fungo pode sobreviver na folhagem no chão como estroma, que é uma massa de hifas de aparência firme, tendo ou não a presença de tecido hospedeiro que dará origem aos ascósporos, tornando essencial para a inoculação (Massola Júnior, 2019; Gasparoto et al., 2012).

Portanto ao se constatar a presença de crosta negra nos seringais, deve-se ter atenção devido ao patógeno *C. gloeosporioides*, pois o fungo invade as rupturas da epiderme causando formação de lesões específicas da antracnose em volta das estruturas do fungo, acarretando desta forma um agravamento da condição fitossanitária da cultura (Gasparoto et al., 2012).

3.5 *Trichoderma*

Trichoderma é um fungo anamorfo que pode ser classificado como um decompositor de madeira, produzindo esporos verdes que possuem uma alta capacidade de colonizar a rizosfera das plantas e gerar estruturas de resistência como clamidósporos e microescleródios que auxilia em sua sobrevivência em diferentes ambientes (Meyer, et al., 2019).

Esses fungos possuem a capacidade de interação com as plantas, promovendo um crescimento da parte aérea, produzindo auxinas, metabólitos que facilitam o desenvolvimento das raízes e pelos absorventes ampliando a superfície de absorção e incentiva a solubilização de nutrientes (Yedidia et al., 2001; Samolski et al., 2012). Exibe assim, inúmeras qualidades, principalmente a sua ação por distintos mecanismos contra fitopatógenos, como antibiose, microparasitismo, produção de enzimas degradadoras de parede celular, competição por nutrientes e indutores de resistência (Silva, et al., 2011).

Uma das características, desse fungo seria a indução de resistência, normalmente a planta apresenta uma resistência natural, independentemente do patógeno se atingiu o sítio de infecção, com isso, o *Trichoderma* induz de forma sistêmica a defesa da planta ao ataque de patógenos, visto que, outros mecanismos de defesa podem continuar inativos ou latentes sendo acionado ou ativado após o agente de indução (Barros et al., 2010).

A indução é uma atividade desencadeada através de um sinal externo que é conectado a receptores na célula vegetal, estimulando a expressão de genes específicos a defesa da planta determinando a interação planta-patógeno (Carvalho, 2022). Os pontos de indução, consistem no reconhecimento do patógeno ou moléculas eliciadoras que se divide em resistência induzida (ISR) ou resistência sistêmica adquirida (SAR), na qual contribui para o manejo de doenças (Carvalho, 2022).

As moléculas eliciadoras apresentam dois fatores de origens sendo o primeiro biótico que induz a resistência através de compostos químicos liberados por microorganismo não patogênicos no caso o *Trichoderma* e em segundo o abiótico que é por meio de agentes não biológicos como o ácido salicílico utilizado contra a *Phytophthora palmivora* em cacaueiro (Carvalho, 2022).

Assim, estas interações que induzem os mecanismos de defesa, fazem com que ocorra alterações metabólicas que estão relacionadas com mudanças na atividade de enzimas-chaves no metabolismo primário e secundário sendo uma delas a peroxidase (POXs) e a fenilalanina amônia-lise (FAL) (Araujo & Menezes, 2009).

3.5.1 Peroxidase

A peroxidase (POXs), apresenta um importante papel, devido auxiliar na defesa da planta pelo aumentando da atividade que relaciona com a redução da severidade da doença (Kuhn, 2007).

Essa enzima catalisa na oxirredução entre peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxida os fenólicos de polissacarídeos ferulicolados (polissacarídeo ligado a ácido ferúlico) e resíduos de tirosina, a partir de proteínas estruturais da parede celular, como exemplo, a glicoproteínas (Kuhn, 2007).

Apresenta diversas funções na defesa celular como foi mencionado, devido a sua contribuição na lignificação, suberização e metabolismo da parede

celular, como proteínas associado a patógenos, a qual pertence à família PR-9 (Kuhn, 2007).

Quando a planta atravessa este período de estresse, como ferimentos provocados por fatores bióticos ou abióticos e por patógenos, o sistema de autodefesa se ativa em respostas aos danos causados, fazendo com que a POXs, induza desta forma o fortalecimento da parede celular e reprimindo a invasão do patógeno (Kuhn, 2007).

3.5.2 Fenilalanina amônia-liase

A fenilalanina amônia-liase (FAL) é uma enzima presente no metabolismo secundário, que se relaciona com a via de fenilpropanóides, envolvida na biossíntese de compostos fenólicos e das moléculas sinalizadoras, onde modifica através da catalisação da L-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico (Carvalho, 2022; Kuhn, 2007).

O ácido *trans*- cinâmico desempenha diversas funções na planta destacando o suporte mecânico causado pela lignina que atua contra estresse abiótico ou na proteção contra estresses bióticos, por exemplo ação de fitopatógenos (Kuhn, 2007). Em resposta ao surgimento de um patógeno, a FAL eleva sua atividade devido ao estresse causado, aumentando assim, a síntese de fitoalexinas ou compostos reativos (Kuhn, 2007).

Segundo Pascholati (2011), as fitoalexinas estão associadas a modificação da membrana plasmática do patógeno, resultando na perda de eletrólitos, morte celular, perda da integridade estrutural e funcional da membrana. Portanto, a FAL torna-se importante na defesa da planta contra patógenos pois ativa mecanismos de sinalização através de cascatas de reações (Carvalho, 2022).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos fungos usados no trabalho e preparação do inóculo microrganismos

Com base em testes realizados no controle biológico da antracnose (Magalhães et al. 2021a; Celin et al., 2021), foram escolhidos dois isolados de *Trichoderma* para o trabalho, TC1 e AP1, identificados como *Trichoderma viride* e *Trichoderma koningiopsi*, respectivamente. Estes isolados também foram escolhidos por terem sido encontrados colonizando naturalmente folhas infectadas com a crosta negra e antracnose.

A obtenção dos fungos usados nos trabalhos e a preparação do inóculo foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - Campus de Dracena – UNESP. (FCAT – Campus Dracena)

O patógeno escolhido para o trabalho pertence ao gênero *Cladosporium*, forma assexuada de *Rosenscheldiella heveae*, devido a facilidade de replicação e obtenção de esporos em laboratório. Os isolados destes fungos foram identificados por Gomes (2023).

Tanto o patógeno, quanto os isolados de *Trichoderma*, foram reativados, mantidos e multiplicados em meio da cultura BDA (Batata, dextrose e Agar), sob temperatura de $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo alternado.

Para a verificação completa da efetividade dos isolados de *Trichoderma*, no controle da crosta negra, foram realizados testes *in vitro*, em mudas, em casa de vegetação e em campo.

4.2 Testes com os agentes de controle biológico “*in vitro*”

Os testes com os agentes de controle biológico “*in vitro*” foi executado no Laboratório de Fitopatologia da FCAT – Campus Dracena.

Foram realizados três experimentos utilizando dois isolados de *Trichoderma* (TC1 e AP1) e cinco espécies diferentes de *Cladosporium*: *C. cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides*, *C. anthropophilum*, *C. delicatulum* e *C. uredinicola*.

Os experimentos realizados verificaram a capacidade de controle dos isolados com base nos testes para averiguação de produção de metabólitos voláteis e não voláteis e de capacidade de parasitismo/antagonismo. Para isso,

cada isolado de *Cladosporium* foi pareado com um isolado de *Trichoderma*. Foram realizadas 10 repetições para cada pareamento, sendo cada repetição uma placa. O experimento foi repetido duas vezes.

A produção de metabólitos não voláteis pelos isolados estudados foi realizado pela técnica de bicamada. Neste procedimento foi realizada a antibiose por difusão em dupla camada, conforme metodologia descrita por Romeiro (2007). A avaliação foi feita a partir da observação da presença ou ausência de um halo de inibição do patógeno ao redor da colônia de *Trichoderma*.

A verificação da produção de voláteis foi realizada pela técnica de placas sobrepostas. Segundo a metodologia descrita por Solino et al. (2017) com modificações, onde foram utilizadas as bases de placas de Petri contendo meio BDA posicionadas umas sobre as outras. As avaliações foram realizadas através da medição diária do raio das colônias, sendo finalizadas quando a colônia controle (que não tinha contato com o *Trichoderma*) atingiu a borda da placa. Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente pelo software Sisvar (Ferreira, 2011),

A capacidade de parasitismo ou antagonismo dos isolados de *Trichoderma* foi realizada através da técnica de pareamento entre fungos. Neste caso, são feitos teste de confronto direto por meio de pareamento de culturas, seguindo uma adaptação da metodologia descrita por Solino et al. (2017) onde foram utilizadas placas de Petri contendo meio BDA com um disco de 5 mm de diâmetro do patógeno depositado a 2 cm da borda da placa e no lado oposto da placa foi depositado um disco de 5 mm de diâmetro de *Trichoderma*. Após a deposição dos discos, as placas foram incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e analisadas diariamente para verificar a presença de halos que inibem o crescimento de isolados de *Cladosporium* (antagonismo) ou a presença de parasitismo por *Trichoderma*.

4.3 Teste com os agentes de controle biológico em mudas de seringueira

Para este experimento, foi realizado em casa de vegetação da FCAT – Campus Dracena, utilizando mudas com cerca de seis meses de idade do clone de seringueira RRIM 600 devido ser suscetível e o mais plantado. Neste teste foi usado somente um isolado de *C. Cladosporioides*, que se mostrou patogênico nos testes realizados em casa de vegetação por Gomes (2023).

Foi realizada a verificação tanto do efeito curativo quanto do efeito protetor dos isolados TC1 e AP1 de *Trichoderma*. Nos experimentos para verificação da ação curativa dos agentes de controle biológicos testados, o patógeno foi inoculado cinco dias antes dos indutores de resistência. Já para a verificação da ação preventiva, os isolados de *Trichoderma* foram aplicados cinco dias antes da inoculação do patógeno.

As aplicações dos fungos trabalhados (tanto para controle biológico quanto do patógeno) foram via pulverização de toda a planta (aproximadamente 100mL de suspensão/planta), até o ponto de escorrimento. As suspensões de fungos aplicadas nas plantas foram obtidas de colônias cultivadas em meio BDA, que foram lavadas com água destilada, filtradas em gaze estéril, quantificada em câmara de Neubauer e ajustada para 10^8 esporos. mL⁻¹.

O experimento foi avaliado semanalmente, durante 120 dias, contando a partir da inoculação do patógeno. Foram avaliadas a incidência de sintomas (queima apical e presença de crostas nas hastes) e a severidade da doença, sendo esta última realizada através da porcentagem de área com sintomas nas folhas tratadas. Neste caso, 10 folhas por muda foram marcadas e fotografadas em cada avaliação para análise no aplicativo Leaf Doctor (Pethybridge, Nelson, 2015).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições por tratamento nos testes para efeito curativo e nos testes para efeito protetor. O experimento foi realizado duas vezes. Os resultados obtidos da severidade foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2011), já os resultados de incidência de sintomas, foram expressos na forma de porcentagem de plantas que demonstraram sintomas queima apical e presença de crostas nas hastes.

4.3.1 Quantificação das enzimas peroxidase e fenilalanina amônia-liase

Foram analisadas no Laboratório de Fitopatologia da FCAT – Campus Dracena e com isso, cinco amostras de folhas localizadas na parte de cima das plantas foram coletadas 4, 8, 12, 16 e 24 horas, após a aplicação dos isolados de *Trichoderma*. Estas folhas foram processadas em tampão fosfato como descrito por Pierozzi (2013) para obtenção de extrato proteico que foi utilizado

nas análises em relação a atividade da peroxidase (expresso como unidades de absorção/min/mg/proteína) segundo metodologia descrita por Boava e colaboradores (2010) e atividade da fenilalanina amônia-liase (expresso como ng/mL ácido *trans*-cinâmico/g proteína/h) segundo Pierozzi (2013). Todos os ensaios enzimáticos foram conduzidos em triplicado para cada tratamento. Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas segundo o teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software Sisvar (Ferreira, 2011).

4.4 Teste com os agentes de controle biológico em campo

Para este experimento foi utilizada uma área com árvores com cerca de seis anos de idade. A área de implantação do experimento está localizada em Araçatuba, no Estado de São Paulo, e era composta somente pelo clone RRIM 600. A escolha deste local foi devido à alta severidade e frequência de ocorrência de crosta negra. As árvores estavam dispostas em espaçamento de 7,0 m entre linhas e 3,0 m entre plantas.

Para a instalação do experimento foi adotado o esquema de delineamento em blocos ao acaso, com cinco repetições por bloco. Foram realizados cinco tratamentos: 1. Testemunha - sem aplicação de produto; 2. Aplicação do isolado de TC1 de *Trichoderma*; 3. Aplicação do isolado AP1 de *Trichoderma*; 4. Aplicação de *Trichoderma harzianum* comercial; 5. Aplicação de produtos químicos (fungicida a base de fluxapiroxade + piraclostrobina usado na parte aérea e ureia a 5% nas folhas sobre solo).

As aplicações dos tratamentos foram realizadas da seguinte maneira: pulverização aérea nos meses de fevereiro/2022, abril/2022 e outubro/2022 de *Trichoderma* e Fungicida, de modo a proteger as folhas novas, e uma pulverização nas folhas sobre o solo de *Trichoderma* e ureia, no mês de julho/2022, para evitar eliminar o inóculo relacionado às folhas caídas no chão pela senescência natural da planta, em torno das plantas tratadas.

A multiplicação dos isolados TC1 e AP1 foi realizada em grãos de arroz colonizados pelos fungos que foram processados conforme a metodologia de fermentação em estado sólido descrita por Mascarin et al. (2019). Para aplicação deles no campo, o arroz foi lavado e assim foi obtida uma solução (10^8 esporos.mL⁻¹ de calda) que foi aplicada no experimento. A solução de

Trichoderma comercial (10^8 esporos.mL⁻¹ de calda) e agentes de controle químicos, foi preparada conforme as recomendações do fabricante. Foi aplicado um volume de cerca de 80L de calda em cada tratamento, com o auxílio de um pulverizador tipo atomizador quando os tratamentos eram dirigidos a folha e um pulverizador costal quando os tratamentos foram aplicados no solo

A avaliação do experimento foi baseada na severidade da crosta negra, conforme metodologia descrita por Antonio et al. (2021). A avaliação foi realizada no mesmo dia da pulverização. Para isso foram coletados 15 folíolos ao acaso no terço médio de cada bloco (três por planta) com o auxílio de um podão antes da aplicação dos tratamentos. Os folíolos coletados foram levados ao laboratório, escaneados e a porcentagem de área com sintomas da doença foi aferida com o programa Leaf Doctor (Pethybridge, Nelson, 2015). A análise de variância e a análise de regressão foi realizada pelo software R-project (R Core Team, 2016).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Testes com os agentes de controle biológico “*in vitro*”

A produção de metabólitos não voláteis não foi observada, pela técnica utilizada, em nenhum dos isolados de *Trichoderma* testados, pois todos os isolados de *Cladosporium* cresceram uniformemente sobre a colônia de *Trichoderma* (Figura 1). No teste de produção de voláteis, os dois isolados testados mostraram-se promissores, pois quando comparados com os controles, inibiram efetivamente o crescimento micelial das diferentes espécies de *Cladosporium* utilizadas (Figuras 2, 3 e 4). Essa capacidade de produção de compostos voláteis pelo fungo *Trichoderma* spp. que inibem o desenvolvimento dos fitopatógenos vem sendo estudadas e elucidadas por vários trabalhos (Monte, Bettiol, Hermosa, 2019).

Os compostos voláteis estão dentro do grupo de metabólitos secundários produzidos pelo *Trichoderma*. São regidos por grandes grupos de genes biossintéticos, sendo esses relacionados a produção de enzimas essenciais, como peptídeos sintetases não ribossomais (NRPSs), policetídeos sintases (PKSs) ou terpeno sintases/ciclases, enzimas acessórias (como citocromo P450s, oxidoredutases, metiltransferases, etc.) associadas a compostos mencionados como inibidores de crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. A atividade antifúngica *in vitro* de muitos dos metabólitos secundários produzidos por *Trichoderma* é conhecida contra vários patógenos importantes, como *Botrytis*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Stachybotrys*, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Phytophthora* e *Pythium* (Hermosa et al., 2014). Silva e colaboradores (2019) em ensaios realizados em laboratório por meio de testes de placa invertida, assim como realizado no presente trabalho, verificaram que alguns isolados de *Trichoderma* inibiram até 35% o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Em alguns casos, os compostos voláteis também estão relacionados a genes ligados a fatores de crescimento de plantas (Zeilinger et al., 2016). Como exemplo deste último caso, pode-se citar o trabalho desenvolvido por Jalali, Zafari e Salari (2017), o qual mostrou que plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas por duas semanas a compostos voláteis de isolados de *Trichoderma koningii*, apresentaram menor acúmulo de H_2O_2 , o que levou,

consequentemente, a proteção da planta contra danos oxidativos sob estresse salino em comparação com as plantas que não foram expostas a esses compostos. Além disso, os autores citam que houve aumento do vigor das plantas tratadas com os voláteis de *Trichoderma*.

Verificou-se também a ação antagônica e parasitária dos isolados AP1 e TC1 testados sobre todos os isolados de *Cladosporium* usados no experimento. Neste caso, observou-se que há inibição do crescimento do patógeno na placa, seguida de seu parasitismo pelos agentes biológicos testados (Figuras 5 e 6). Estes mecanismos de controle de fitopatógenos por *Trichoderma* são os mais conhecidos. A ação antagônica observada em placa pode ser decorrente competição por nutrientes. Neste ponto, vale ressaltar que fungos do gênero *Trichoderma* possuem a característica sendo encontrados em quase todos os solos, no filo plano e em habitats naturais que contém grandes quantidades de matéria orgânica, onde se comporta como excelente decompositor de material vegetal e fúngico, o que leva a crer que ele é um bom competidor por espaço e pelos recursos nutricionais. Isso pode ser decorrente da versatilidade metabólica que lhes permitem crescer utilizando uma ampla gama de fontes de carbono e de nitrogênio (Longa, Pertot, Tosi, 2008; Monte, Bettiol, Hermosa, 2019). Porém estas características não são suficientes para que o *Trichoderma* exerça sua ação antagônica, sendo necessário outros mecanismos, como a produção de metabólitos secundários e o parasitismo, que preparam as condições para que seja mais eficaz (Sivan; Chet, 1989; Monte, Bettiol, Hermosa, 2019).

Assim como a produção de metabólitos secundários, a capacidade de parasitismo também foi observada nos isolados AP1 e TC1 no presente trabalho, como citado anteriormente. Estas características são uma das mais relevantes do gênero *Trichoderma*, principalmente pelo fato deste fungo ter capacidade de se alimentar de fungos ou oomicetos vivos ou mortos, sendo assim este gênero conhecido como micoparasitas. O micoparasitismo é decorrente da produção de enzimas que degradam a parede celular, como quitinases e glucanases, de fungos fitopatogênicos (Kubicek et al., 2011) e da atividade de algumas proteases (Flores et al., 1997). Esses resultados, assim como os obtidos no atual estudo, podem possibilitar o desenvolvimento de estratégias de uso de tais compostos no controle de doenças de plantas, incluindo a seringueira.

Os resultados obtidos nos testes *in vitro* com os isolados de *Trichoderma* AP1 e TC1 no controle do agente causal da crosta negra, apontam que estes possuem características importantes, como a produção de voláteis, antagonismo e parasitismo. Estes resultados, somados aos resultados obtidos por Magalhães et al. (2021a) e Celin et al. (2021), que demonstraram a eficiência da aplicação destes mesmo isolados no controle de *Colletotrichum* de seringueira, *in vitro* e *in vivo*, possibilitam estudos mais avançados que envolvam o desenvolvimento de estratégias de uso de tais isolados no controle de diferentes doenças de seringueira.

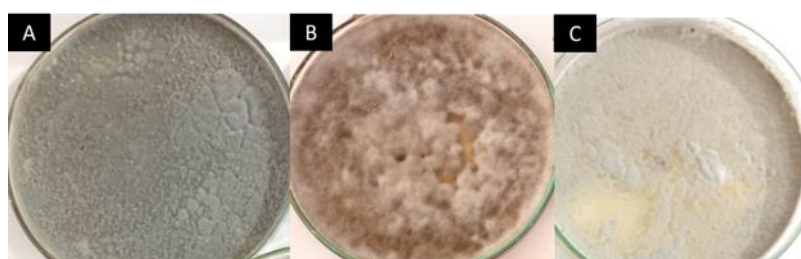


Figura 1: Crescimento de colônias nos testes de metabólitos não voláteis do *Trichoderma* AP1 sobre *C. cladosporioides* (A), *C. pseudocladosporioides* (B) e *C. anthropophilum* (C)

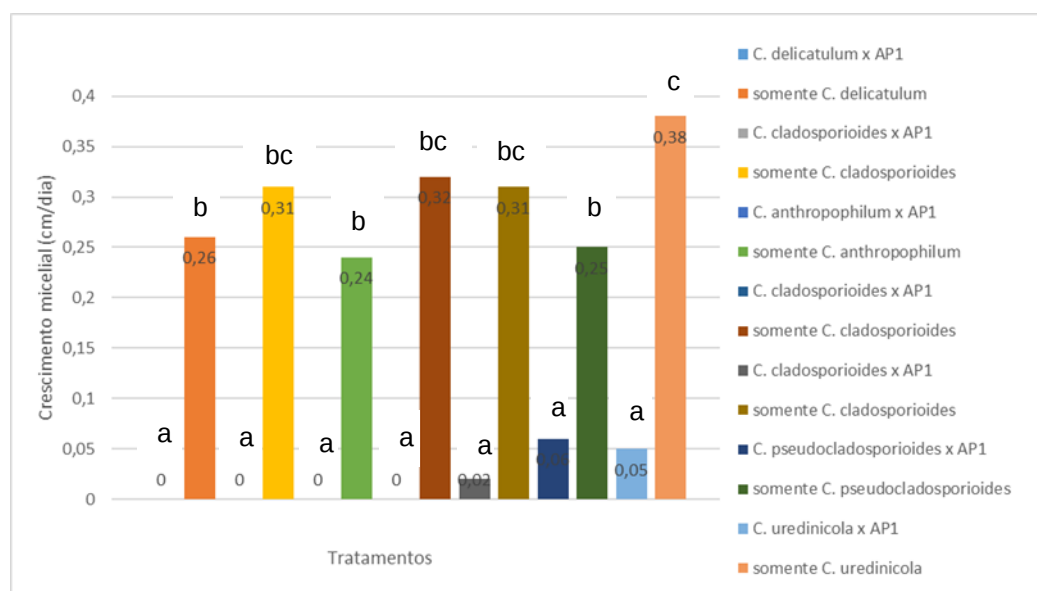


Figura 2: Crescimento micelial (cm/dia) de isolados de *Cladosporium* no teste de produção de metabólitos voláteis com isolado de *Trichoderma* AP1. *As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (p-valor < 0,05/CV=39,37).

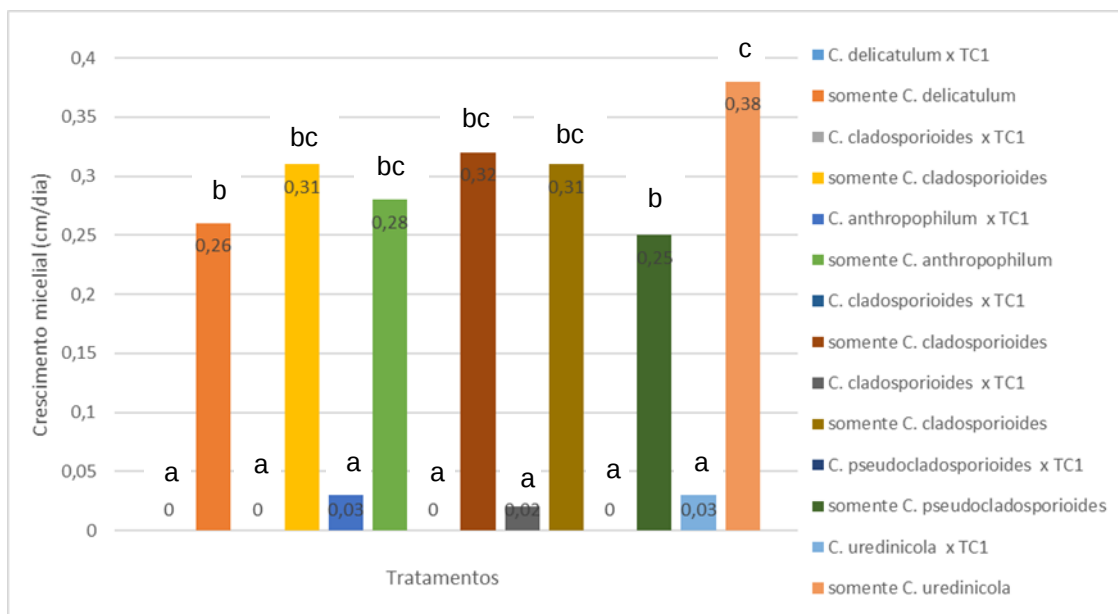


Figura 3: Crescimento micelial (cm/dia) de isolados de *Cladosporium* no teste de produção de metabólitos voláteis com isolado de *Trichoderma* TC1. *As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (p-valor < 0,05/CV=32,20).

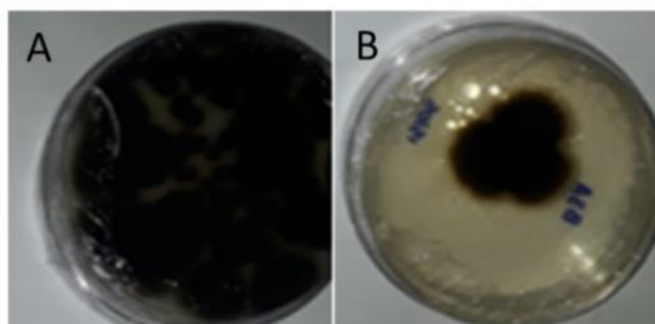


Figura 4: Isolado de *C. pseudocladosporioides* no teste de produção de metabólitos voláteis com isolado de *Trichoderma* AP1 com 30 dias de incubação. **A.** testemunha (sem *Trichoderma*). **B.** *C. pseudocladosporioides* x *Trichoderma* isolado AP1.

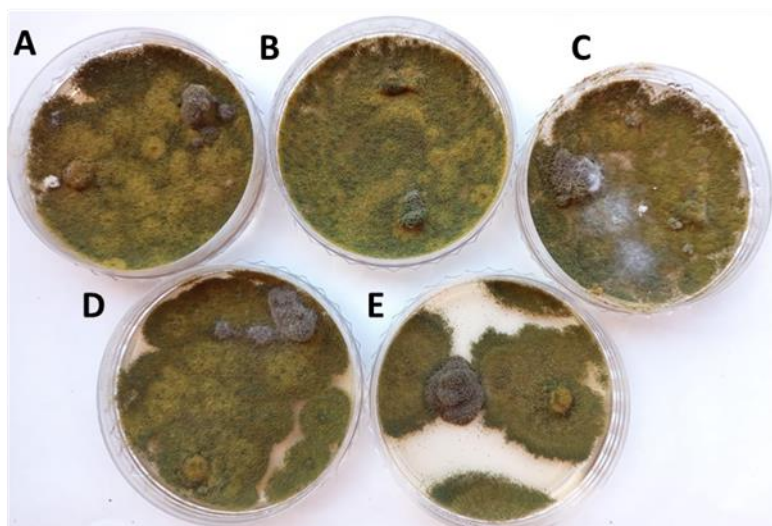


Figura 5: Avaliação da capacidade de parasitismo e antagonismo do isolado TC1 de *Trichoderma*. **A.** *C. cladosporioides*; **B.** *C. pseudocladosporioides*; **C.** *C. anthropophilum*; **D.** *C. delicatulum*; **E.** *C. uredinicola*.

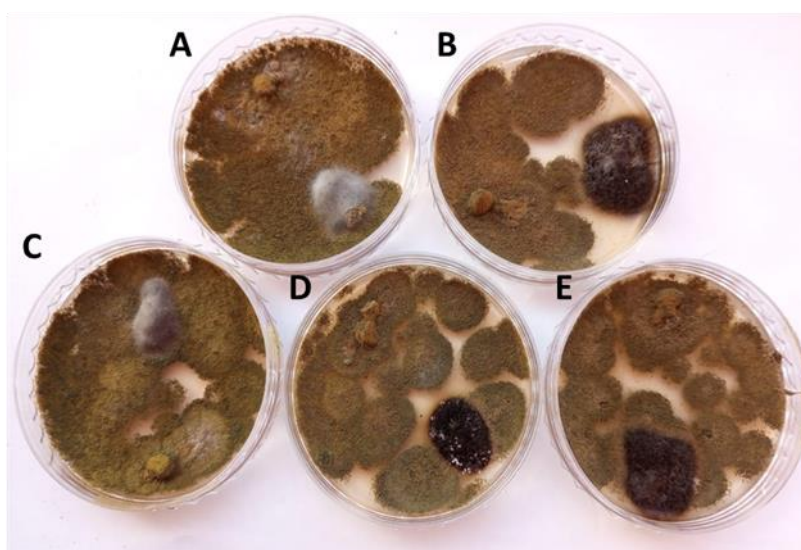


Figura 6: Avaliação da capacidade de parasitismo e antagonismo do isolado AP1 de *Trichoderma*. **A.** *C. cladosporioides*; **B.** *C. pseudocladosporioides*; **C.** *C. anthropophilum*; **D.** *C. delicatulum*; **E.** *C. uredinicola*.

5.2 Teste com os agentes de controle biológico em mudas de seringueira

Em relação ao controle da crosta negra em mudas de seringueira, foi possível observar que a utilização dos isolados AP1 e TC1 foi eficiente (Tabela 1), principalmente no tratamento preventivo, já que neste foi observado uma queda da incidência da doença, em relação ao curativo, mas isso não descarta

o uso destes isolados de forma curativa, quando já ocorreu a infecção pelo fungo. De acordo com os dados de severidade, que apontam uma queda da doença. Deste modo, foi possível verificar a ação direta do fungo sobre o patógeno, corroborando com os dados obtidos nos testes *in vitro*.

Baseado nas análises das enzimas ligadas a resistência da planta parece que a resposta dela a aplicação dos isolados de *Trichoderma* testados foi mais expressiva pela peroxidase (Tabela 2) nas primeiras horas no tratamento curativo com ambos os isolados ou com eles em aplicados em conjunto. Porém, observou-se que a resposta teve duração mais longa quando foi aplicado o isolado TC1 de modo preventivo. Este isolado provocou a mesma resposta, em relação ao tempo de duração do pico da enzima fenilalanina (Tabela 3), também no tratamento preventivo. Se correlacionarmos estas repostas das enzimas com a severidade da doença e incidência, percebemos que o isolado TC1 ou a associação desse com o AP1, foram os tratamentos que mostraram menores porcentagens, quando comparado ao tratamento controle onde só se aplicou o patógeno.

Sabendo que os sintomas analisados na incidência da doença são os que aparecem mais rápidos (Gomes, 2023), em torno de 15 dias, é provável que esta resposta rápida das enzimas nos tratamentos que envolvem o isolado TC1, explique o porquê de esses mostrarem baixo ou nenhum sintoma de queima apical e de crosta nas hastes, já que estas enzimas podem dificultar o estabelecimento da doença (Paschollati et al., 2008).

O aumento da atividade da peroxidase, nestes mesmos tratamentos, no decorrer dos tempos avaliados, também pode explicar o não aparecimento da doença, mesmo 60 dias após a inoculação do fungo, pois esta enzima faz parte um sistema de catalisação, que envolve a oxidação e a eventual polimerização de grupos álcoois hidroxicinâmicos em presença de peróxido de hidrogênio, formando a lignina. Além disso, ela ainda ajuda na formação de compostos fenólicos, os quais acumulam em reposta a infecção, impedindo o estabelecimento da infecção na planta (Paschollati et al., 2008; Lorenzetti et al., 2018).

A atividade da enzima peroxidase já foi relatada como sendo mais expressiva que a fenilalanina em estudos relacionados com a interação de *Colletotrichum* em seringueira e em estudos que compraram clones resistentes

com suscetíveis, sendo que ela foi mais expressiva nos clones resistentes (Magalhães et al., 2021b). No patossistema seringueira - *Phytophthora palmivora*, também é possível verificar o acúmulo de alguns compostos ligados a peroxidase, como a escopoletina e compostos fenólicos (Chinnapun, 2009). Com isso, parece que esta enzima é de grande valor para a seringueira se defender, e o estímulo ao aumento de sua atividade pode colaborar na diminuição da doença.

Os resultados obtidos nos testes com mudas de seringueira com a aplicação dos isolados AP1 e TC1 são importantes, não somente pelo fato de não haver produtos químicos registrados para o controle da crosta negra (MAPA, 2023), mas pelo fato destes isolados terem se mostrados eficientes no controle de antracnose em mudas de seringueira. Além de reduzirem a severidade da antracnose, bem como da mortalidade dos enxertos infectados com *Colletotrichum*, agente causal desta doença, os isolados AP1 e TC1 melhoram algumas características desejáveis na muda, como sua altura, diâmetro do caule, eficiência relativa do acúmulo de fitomassa seca e a área foliar específica das plantas. Com isso, os resultados demonstram que os isolados testados possuem potencial na área biológica de controle de patógenos importes da seringueira e pode ser alvo de maiores estudos.

Tabela 1: Severidade (porcentagem de área foliar lesionada) e incidência (porcentagem de plantas com sintomas queima apical e presença de crostas nas hastes) da doença em mudas de seringueira tratadas com os isolados de *Trichoderma* AP1 e TC1.

Tratamentos*		Severidade da doença (%)	Incidência da doença (%)
Curativo	Somente Água	0,0A	0,0
	Somente o patógeno (<i>C. cladosporioides</i>)	6,78B	50
	<i>Trichoderma</i> - isolado AP1	0,0A	33,3
	<i>Trichoderma</i> - isolado TC1	0,0A	16,6
	<i>Trichoderma</i> - isolados AP1+TC1	1,04A	0,0
Preventivo	Somente Água	0,0A	0,0
	Somente o patógeno (<i>C. cladosporioides</i>)	7,96B	83,6
	<i>Trichoderma</i> - isolado AP1	0,0A	16,6
	<i>Trichoderma</i> - isolado TC1	0,0A	0
	<i>Trichoderma</i> - isolados AP1+TC1	0,0A	0
CV	35,01		-

**CV, coeficiente de variação dos dados transformados em raiz quadrada - SQRT, (Y). As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas não são significativamente diferentes (teste de Scott-Knott; $p < 0,05$).

Tabela 2: Atividade da enzima peroxidase em seringueira após o tratamento curativo e preventivo com os isolados de *Trichoderma* AP1 e TC1.

Tratamentos*		Atividade da peroxidase (mmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ proteína)				
		4 horas	8 horas	12 horas	16 horas	24 horas
Curativo	Somente Água ^{NS}	0,036B	0,034A	0,026A	0,023A	0,023A
	Somente o patógeno (<i>C. cladosporioides</i>) NS	0,020B	0,025A	0,034A	0,025A	0,020A
	<i>Trichoderma</i> - isolado AP1	0,090Cb	0,027Aa	0,013Aa	0,013Aa	0,016Aa
	<i>Trichoderma</i> - isolado TC1	0,053Bb	0,044Bb	0,010Aa	0,008Aa	0,010Aa
	<i>Trichoderma</i> - isolados AP1+TC1	0,028Ba	0,097Cb	0,063Bb	0,008Aa	0,002Aa
Preventivo	Somente Água ^{NS}	0,035B	0,036B	0,027A	0,012A	0,021A
	Somente o patógeno (<i>C. cladosporioides</i>) NS	0,035B	0,020A	0,025A	0,036B	0,018A
	<i>Trichoderma</i> - isolado AP1 ^{NS}	0,006A	0,015A	0,021A	0,017A	0,033B
	<i>Trichoderma</i> - isolado TC1	0,026Ba	0,042Bb	0,094Cc	0,032Bb	0,017Aa
	<i>Trichoderma</i> - isolados AP1+TC1	0,020Ba	0,047Bb	0,046Bb	0,040Bb	0,012A
CV		65,23				

*CV, coeficiente de variação dos dados transformados em raiz quadrada - SQRT, (Y). As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e as mesmas letras minúsculas nas linhas não são significativamente diferentes. NS: não há diferença significativa entre os tratamentos (teste de Scott-Knott; $p < 0,05$).

Tabela 3: Atividade da enzima fenilalanina em seringueira após o tratamento curativo e preventivo com os isolados de *Trichoderma* AP1 e TC1.

Tratamentos*		Atividade da fenilalanina (ng/mL ácido trans-cinâmico.g proteína ⁻¹ .h ⁻¹)				
		4 horas	8 horas ^{NS}	12 horas	16 horas	24 horas ^{NS}
Curativo	Somente Água ^{NS}	1,90A	2,83	2,68A	2,60A	2,52
	Somente o patógeno (<i>C. cladosporioides</i>) NS	2,40A	2,75	2,62A	2,64A	2,62
	<i>Trichoderma</i> - isolado AP1 ^{NS}	3,03B	2,98	2,91A	2,80A	2,47
	<i>Trichoderma</i> - isolado TC1 ^{NS}	2,46A	3,09	2,75A	2,75A	2,63
	<i>Trichoderma</i> - isolados AP1+TC1 ^{NS}	2,38A	2,77	2,97A	2,55A	2,51
Preventivo	Somente Água ^{NS}	1,92A	2,88	2,70A	2,60A	2,60
	Somente o patógeno (<i>C. cladosporioides</i>) NS	2,44A	2,75	2,73A	2,60A	2,63
	<i>Trichoderma</i> - isolado AP1 ^{NS}	2,47A	2,81	2,71A	2,23A	2,26
	<i>Trichoderma</i> - isolado TC1	3,00Ba	2,87a	3,62Bb	3,07Ba	2,66a
	<i>Trichoderma</i> - isolados AP1+TC1 ^{NS}	2,95B	2,58	2,60A	2,61A	2,21
CV		72,23				

*CV, coeficiente de variação dos dados transformados em raiz quadrada - SQRT, (Y). As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e as mesmas letras minúsculas nas linhas não são significativamente diferentes. NS: não há diferença significativa entre os tratamentos (teste de Scott-Knott; $p < 0,05$).

5.3 Teste com os agentes de controle biológico em campo

Pelo boxplot (Figura 7) gerado nas análises estatísticas vê-se que a dispersão dos dados para os tratamentos de 2 a 5 são semelhantes. Segunda a análise de variância (Tabela 4), não houve interação significativa entre os tratamentos e as avaliações, deste modo os fatores envolvidos no experimento foram avaliados isoladamente. Percebe-se que o fator tratamento não foi

significativo ao nível de 5% de probabilidade, diferente do fator avaliação, que foi significativo. Neste caso, por se tratar de um fator quantitativo, a análise realizada foi a regressão linear (Figura 8).

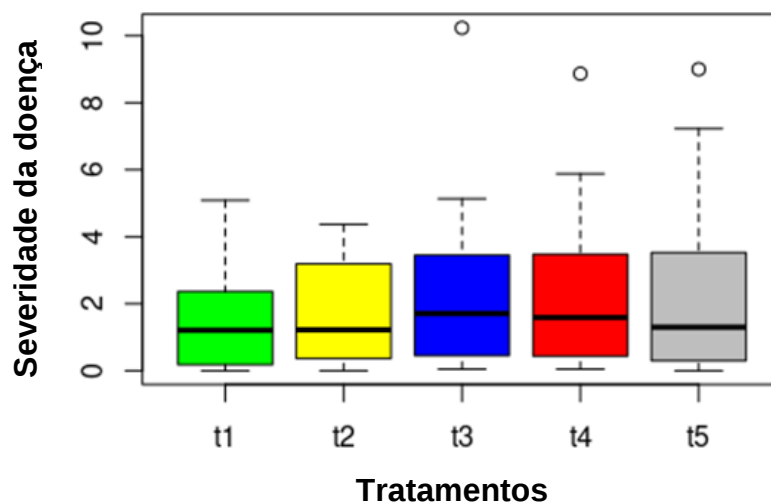


Figura 7: Severidade da doença (porcentagem de área foliar lesionada) de folhas coletadas antes da aplicação dos tratamentos. **T1.** Testemunha - sem aplicação de produto; **T2.** Isolado de TC1 de *Trichoderma*; **T3.** Isolado AP1 de *Trichoderma*; **T4.** *T. harzianum* comercial; **T5.** Controle químico.

Tabela 4: Análise de variância do experimento realizado no campo com os isolados de *Trichoderma* e com produtos químicos.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr (>Fc)
Tratamentos	4	12,01	3,002	2,720	0,06680
Blocos	4	17,36	4,341	3,933	0,02075*
Erro a	16	17,66	1,104		
Avaliação	3	299,70	99,901	63,872	<2e-16**
Tratamentos x Avaliação	12	14,88	1,240	0,793	0,65588
Erro b	60	93,84	1,564		
Total	99	455,45			
CV (%)	51,33				

*houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste F de 5% e **1%.

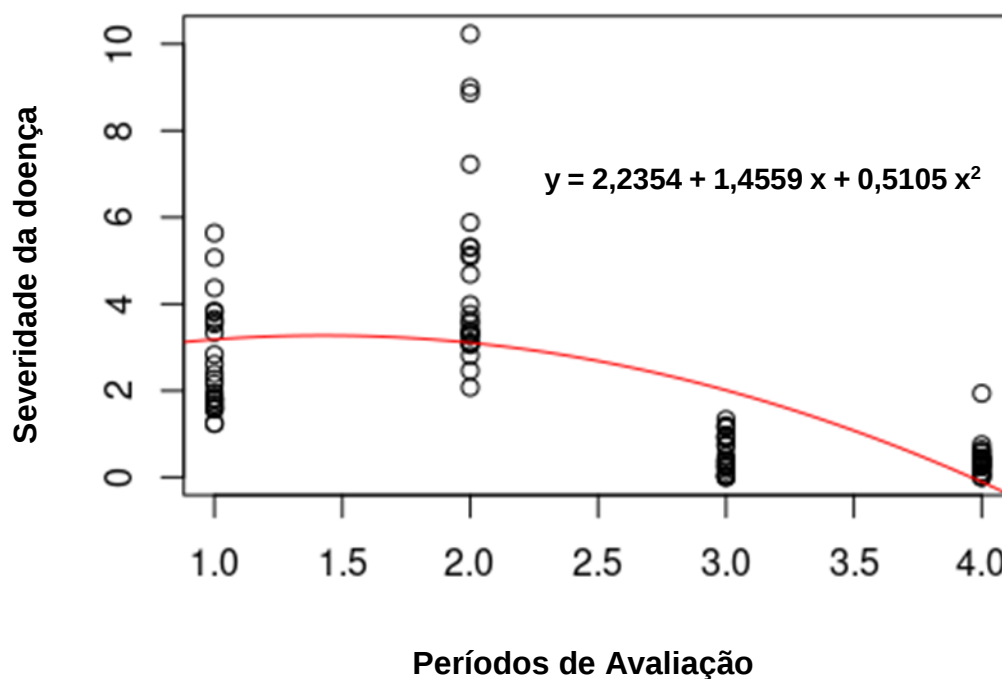


Figura 8: Regressão linear de 2º grau baseada na severidade da doença (porcentagem de área foliar lesionada) de folhas coletadas antes da aplicação dos tratamentos, nos meses fevereiro/2022 **(1)**, abril/2022 **(2)**, julho/2022 **(3)** e outubro/2022 **(4)**.

O fato de os tratamentos não diferirem estatisticamente, traz uma série de pontos que devem ser levantados e discutidos. Por exemplo, no último mês de avaliação notou-se que as que todas as árvores tratadas e as em torno das que receberam o tratamento estavam aparentemente mais saudáveis, com folhas mais verdes, sem sintomas de crosta negra e até de antracnose, diferente das áreas mais afastadas do experimento e das bordaduras, que apresentavam intensas desfolha e sintomas bem aparentes das duas doenças citadas. Isso leva a hipótese que os inóculos de *Trichoderma* aplicados se disseminaram entre os tratamentos, levando a queda da doença em todas as plantas tratadas. Esta hipótese torna-se mais forte quando se verifica a pluviosidade, temperaturas médias e umidade relativa do ar da região no ano de implantação do experimento (Figura 9). Elas se encontravam dentro das condições favoráveis para o desenvolvimento dos fungos usados como controle biológico, que segundo a literatura fica próximo das temperaturas de 20° a 30°C e alta umidade (Steffen et al., 2018; Koike, Lucon, 2003) e para o desenvolvimento da crosta negra

(Firmino, 2022), que mostrou baixa severidade na área do experimento (Figura 8).

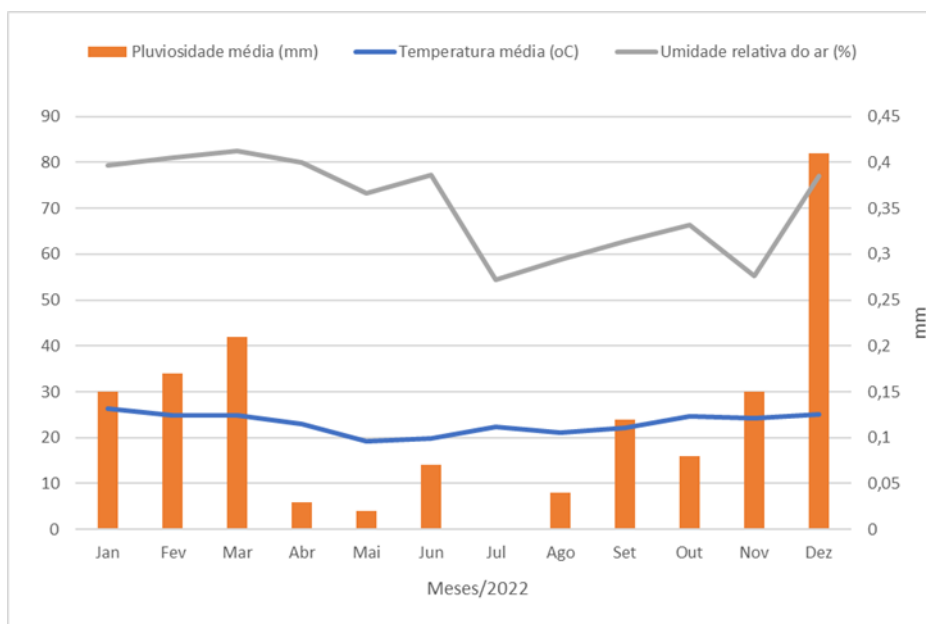


Figura 9: Dados climáticos da Cidade de Araçatuba no ano de 2022 (IPEMET, 2023).

O número de pulverizações e o intervalo entre elas também deve ser levado em consideração para explicar o comportamento dos tratamentos. Alguns trabalhos apontam estes pontos como importantes para o bom desempenho do controle biológico. Costa et al. (2000), cita que quatro pulverizações em épocas chuvosas (duas com intervalos de 15 dias seguida de mais duas com intervalos de 4 dias), em vez de três pulverizações, foi mais efetiva no controle da vassoura de bruxa em cacaueiro, diminuindo mais de 64% o número de basidiomas. Oliveira (2012), também relata a diferença na eficiência dos intervalos de aplicação no caso do patossistema *Fusarium*-Pimenta do reino. Neste caso constatou-se que a aplicação do *Trichoderma* em intervalo de 60 dias, não apresentou controle significativo. Por outro lado, a aplicação o a intervalos de 90 e 120 apresentou controle significativo da doença, independente da dose do produto aplicado por planta. Com isso, fica claro a necessidade de maiores estudos em relação a época de aplicação e intervalo de aplicação em seringueira e ainda se há necessidade de integração com outros métodos de controle, assim como é realizado em cacaueiro. Por exemplo, com base em um ensaio de campo conduzido por 3 anos na cultura do cacaueiro, foi proposto um programa de

aplicação de *Trichoderma* para controle da vassoura-de-bruxa no campo, o qual alterna-se a aplicação de produtos cúpricos (para proteger os tecidos sadios) com *T. stromaticum* (para reduzir o inoculo inicial). Isso reduziu a formação de ramos com sintomas e produziram um maior número de frutos por árvore (Medeiros et al., 2010). Para finalizar, outro ponto que pode se levar a discussão seria o número de folhas coletadas por planta no presente trabalho. É possível que amostragem realizadas não tenha sido representativa, o que leva a necessidade da implementação deste experimento novamente, em mais de um local, com maior número de repetições, com diferentes modos de avaliação, incluindo as avaliações com o auxílio de imagens captadas por VANts e coletar maior número de folíolos em cada tratamento.

6 CONCLUSÃO

Os isolados TC1 e AP1 de *Trichoderma* encontrados possuem metabólitos voláteis que inibem o crescimento do patógeno causador da crosta negra em seringueira, além de possuírem capacidade antagônica e parasitária. Estas características foram verificadas nos testes em mudas de seringueira infectadas, pois eles foram capazes de controlar a doença e aumentar a atividade da enzima peroxidase, relacionada a defesa da planta. Já, nos testes em campo não constatado a diferença significativa entre os tratamentos, incluindo os que foram usados os isolados TC1 e AP1, deste modo há a necessidade de desenvolvimento de maiores estudos em campo.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, A., PHILIP, S., JACOB, C. K., JAYACHANDRAN, K. Novel bacterial endophytes from *Hevea brasiliensis* as biocontrol agent against *Phytophthora* leaf fall disease. **BioControl**, v. 58, p. 675-684, 2013.

AGROFIT. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons Acesso em: 09 mar. 2023.

ALVARENGA, A. de P.; CARMO, C.A.F. de S. do (coord.). Seringueira. 2.ed. rev. e atual. Viçosa, MG: EPAMIG - Unidade Regional EPAMIG Zona da Mata, 2014. 1056p.

ALVARENGA, A.A.; CARMO, C.A.F. **Seringueira**. Viçosa: EPAMIG, 2008. 894p.

ANTONIO, G.L.; SCALOPPI JUNIOR, E.J.; FISCHER, I.H.; FURTADO, E.L.; FIRMINO, A.C. Clonal resistance of rubber tree to *Colletotrichum* spp. **For. Pathol.** 2021, EFP12685. <https://doi.org/10.1111/efp.12685>.

ARAUJO, F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiros por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e Abióticos (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathologica**, v.35, n.3, p.169-172, 2009.

BARROS, F.; SAGATA, É.; FERREIRA, C.; JULIATTI, F. Indução de resistência contra fitopatógenos. **Biosci. J.**, Uberlândia, v.26, n. 2, p. 231-239, Mar./ Abri. 2010.

BOAVA, L. P; KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.F.; DI PIERO, R.N.; FURTADO, E.L. Atividade de quitinases e peroxidases em folhas de eucalipto em diferentes estágios de BRAGA, C. Seringueiros contribuem para a geração de emprego e renda. 2016. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/noticias/seringueiroscontribuem-para-a-geracao-de-emprego-e-renda_347620.html. Acesso em: 09 mar. 2022.

BRAGANÇA, C.A.D. **Molecular characterization of *Colletotrichum* spp. associated with fruits in Brazil**. 2013. 69 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2013.

BRADSHAW, E.R., ZHANG, S. Biosynthesis of dothistromin. **Mycopathologia** v.162, p.201–213, 2006.

CARMO, C. A. F. S.; MANZATTO, C. V.; ALVARENGA, A. P. Contribuição da seringueira para o sequestro de carbono. **Informe Agropecuário**, v. 28, p. 24-31, 2007.

CARVALHO, N. V. **Compostos estruturais bacterianos extraídos de *Xanthomonas* spp. como indutor de resistência a mancha bacteriana e ao oídio do tomateiro**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2022.

CELIN. G., MAGALHÃES, I.P., FIRMINO, A.C. Efeitos de *Trichoderma* sp. endofíticos na sanidade e qualidade de mudas porta-enxertos de seringueira com antracnose. 2021. Disponível em: < http://www.52cbf.com.br/files/anais_cbfito.pdf >. Acesso em: 09 mar. 2022.

CHINNAPUN, D. et al. Inhibition of a *Hevea brasiliensis* protease by a Kazal-like serine protease inhibitor from *Phytophthora palmivora*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 74, n. 1, p. 27-33, 2009.

COSTA, J. C. B. et al. 2000. Ação antagonista de *Trichoderma stromaticum* sobre a produção de basidiomas de *Crinipellis perniciosus* no estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25 (Supl), p. 366.

DAYARATHNE, M.C., MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N., JONES, E.B.G., GOONASEKARA, I.D, BULGAKOV, T.S, AL-SADI, A.M., HYDE, K.D., LUMYONG, S., MCKENZIE, E.H.C. *Neophyllachora* gen nov.(Phyllachorales),

three new species of **Phyllachora** from Poaceae and resurrection of Polystigmataceae (Xylariales). **Mycosphere** 8:1598–1625. 2017.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência E Agrotecnologia**, v.35, p. 1039–1042, 2011

FLORES, A.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. **Current Genetics**, v. 31, n. 1, p. 30-37, 1997.

FURTADO, E. L.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Doenças da seringueira. In: AMORIM, L. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, v. 2, 2016. p. 647-656.

FURTADO, E.L., SILVEIRA, A.R., GONÇALVES, O.S., COSTA, J.D., WINDEL, W., SEGNINI JUNIOR, I. (1994). Avaliação de cultivares de seringueira quanto ao desfolhamento causado por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., no Estado de São Paulo. Brasília: **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.339.

GASPAROTTO, L.; FERREIRA, F.A.; SANTOS, A.F.; PEREIRA, J.C.R.; FURTADO, E.L. Doenças das Folhas. In: GASPAROTTO, L; REZENDE PEREIRA, J.C. **Doenças da seringueira no Brasil**. 2. ed. rev. atual. Brasília: Editora Embrapa, 2012. cap. 3, p. 35 – 176.

GAZIS, R., CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal ecology**, v.3, p.240-254, 2010.

GOMES, M. E. **Crosta negra em seringueira: Identificação e caracterização de agente causal**. 2023. 50 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista – Câmpus de Ilha Solteira, Ilha Solteira, 2023.

GUEN, V.; SEGUIN, M.; MATTOS, C. R. Qualitative resistance of *Hevea* to *Phyllachora huberi* P. Henn. **Euphytica**, 11, 211-217, 2000.

GUYOT, J., OMANDA, E.N., NDOUTOUME, A., OTSAGHE, A.A.M., ENJALRIC, F., ASSOUMOU, H.G.N. Effect of controlling *Colletotrichum* leaf fall of rubber tree on epidemic development and rubber production. **Crop Protection**, v20, p.581-590, 2001.

HERMOSA, R.; CARDOZA, R. E.; RUBIO, M. B.; GUTIÉRREZ, S.; MONTE, E. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. In: GUPTA, V. K.; SCHMOLL, M.; HERRERA-ESTRELLA, A.; UPADHYAY, R. S.; DRUZHININA, I.; TUOHY, M. (Ed.). **Biotechnology and biology of *Trichoderma***. Amsterdam: Elsevier, 2014. p. 125-137.

INDEX FUNGORUM. 2016. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>>. Acesso em: 9 março 2023.

IPMET - Centro de Meteorologia de Bauru. Disponível em: <<https://www.ipmetradar.com.br/>>. Acesso em: 01 maio 2023.

JALALI, F.; ZAFARI, D.; SALARI, H. Volatile organic compounds of some *Trichoderma* spp. increase growth and induce salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Fungal Ecology**, v. 29, p. 67-75, 2017.

JÚNIOR, A. G., DOS SANTOS, Á. F., AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Floresta**, v. 30, 2000.

JUNQUEIRA, N. T.; BEZERRA, J. Nova doença foliar em seringueira (*Hevea* spp.), causada por *Rosenscheldiella heveae* sp. (Loculoascomycetes, Dothideales, Stigmataceae). **Fitopatologia Brasileira**, v.15, p.24–28, 1999.

KOIKE, C. M. LUCON, C. M. M. Efeito de diferentes fatores na esporulação e crescimento de isolados de *Trichoderma* spp. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, 96-99, 2013.

KUBICEK, C. P.; HERRERA-ESTRELLA, A.; SEIDL-SEIBOTH, V.; MARTINEZ, D. A.; DRUZHININA, I. S.; THON, M.; ZEILINGER, S....GRIGORIEV, I. V. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. **Genome Biology**, v. 12, n. 4, R40, 2011.

KUHN, O.J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção. Tese (doutorado) - **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Piracicaba, 2007.

LONGA, C. M. O., PERTOT, I., TOSI, S. Ecophysiological requirements and survival of a *Trichoderma atroviride* isolate with biocontrol potential. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, p. 269-277, 2008.

LORENZETTI, E., STANGARLIN, J. R., KUHN, O. J., PORTZ, R. L. Indução de resistência à *Macrophomina phaseolina* em soja tratada com extrato de alecrim. **Summa Phytopathologica**, v. 44, p. 45-50, 2018.

MAGALHÃES, I. P.; CELIN, G. S.; ALVES, L. S. ; OLIVEIRA, T. L. ; FIRMINO, A. C. In vitro antifungal potential of *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum tamarilloi* from rubber tree. 2021a. Disponível em: < <https://www.simb2021.com.br/trabalhos> >. Acesso em: 09 mar. 2022.

MAGALHÃES, I. P.; GOMES, M. E.; SCALOPPI, E. JR.; FISCHER, I. H.; FURTADO, E. L.; MOREIRA, B. R. A.; PRADO, E. P.; FIRMINO, A. C. Pré-penetração e período de latência de *Colletotrichum tamarilloi* em clones de seringueira resistentes e suscetível sob diferentes condições ambientais. **Scientia Forestalis**, v.49, n.131, 2021b.

MAHARACHCHIKUMBURA SS, HYDE KD, JONES EG, MCKENZIE EH, HUANG SK, ABDEL-WAHAB M, XU J. Towards a natural classification and backbone tree for Sordariomycetes. **Fungal Divers**, v.72, p.199-301. 2015.

MASSOLA JÚNIOR, N. S. Fungos Fitopatogênicos. In.: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (ed.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2019. v.1, cap.2. p. 109.

MEDEIROS, F. H. V.; POMELLA, A. W. V.; DE SOUZA, J. T.; NIELLA, G. R.; VALLE, R.; BATEMAN, R. P.; FRAVEL, D.; VINYARD, B.; HEBBAR, P. K. A novel, integrated method for management of witches' broom disease in Cacao in Bahia, Brazil. **Crop Protection**, v. 29, p. 704-711, 2010.

MONTE, E., BETTIOL, W., HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. **Trichoderma: uso na agricultura**. Brasília: Embrapa, 181-199, 2019.

OLIVEIRA, C.S. **Controle da fusariose da pimenta-do-reino com aplicação de *Trichoderma harzianum***. 2012. 50 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) – Universidade Federal do Espírito Santo, São Matheus, 2012.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Piracicaba, ed. FEALQ, 627.2008.

PASCHOLATI, S. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Agronômica Ceres, São Paulo, 4.ed, v.1, p.593-636, 2011.

PETHYBRIDGE, S.J., NELSON, C.S. Leaf doctor: a new portable application for quantifying plant disease severity. **Plant Disease**, v. 99, p1310-1316, 2015.

PIEROZZI, C. G. **Efeito de fungos sapróbios do semiárido nordestino como indutores no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto**. 2013. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista. Botucatu. 2013.

R Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. 2016. Disponível em: <https://www.R-project.org>. Acesso em mai. 2023.

ROMEIRO RS. (Ed). 2007. Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos. Viçosa: UFV. 269p

RUNGJINDAMAI, N., PINRUAN, U., CHOYEKLIN, R., HATTORI, T., JONES, E.B.G. Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*, in Thailand. **Fungal Divers**, v.33, p.139– 162, 2008.

SAMOLSKI, I.; RINCÓN, A. M.; PINZÓN, L. M.; VITERBO, A.; MONTE, E. The qid74 gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 129-138, 2012.

SANTOS, M. D. M.; DE NORONHA FONSECA, M. E.; SILVA BOITEUX, L.; CÂMARA, P. E. A.; DIANESE, J.C. ITS phylogeny and taxonomy of Phyllachora species on native Myrtaceae from the Brazilian Cerrado. **Mycologia**, 108(6), 1141-1164, 2016.

SCALOPPI JÚNIOR, E.J. O poder público precisa olhar para os seringais. In: INFORMA ECONOMICS FNP. **Agrianual 2015**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria Comércio, 2015. p. 403-404.

SILVA, L. R. da; MELLO, S. C. M. de; MARTINS, I.; INGLIS, M. C. V. Efeito de compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. no crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary.2019. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/197397/1/Boletim-Trichoderma-3466.pdf>>. Acesso em: 09 mar. 2023.

SIVAN, A.; CHET, I. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* of rhizosphere colonization. **Phytopathology**, v. 79, n. 2, p. 198-203, 1989.

SOLINO, A. J. D. S., OLIVEIRA, J. B. S., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., ALENCAR, M. S. R., RIBEIRO, L. M. Potencial antagonista e controle in vitro de *Alternaria solani* por fungos sapróbios. **Summa Phytopathologica**, v.43, 199-204, 2017.

STEFFEN, G. P. K., MALDANER, J., MISSIO, E. L., STEFFEN, R. B. *Trichoderma* controla fitonematóides e aumenta produtividade da soja, Campos Negócios, 2018.

TEJESVI, M.V., TAMHANKAR, S.A., KINI, K.R., RAO, V.S., PRAKASH, H.S. Phylogenetic analysis of endophytic *Pestalotiopsis* species from ethnopharmacologically important medicinal trees. **Fungal Divers**, v.38, p.167–183, 2009.

VIRGENS FILHO, A. D. C. V.; JÚNIOR, I. C. C.; JÚNIOR, J. H.; BEZERRA, J. L. Ocorrência da crosta-negra em seringais do sudeste da Bahia. **Agrotrópica**, v.34, P.67 – 80, 2022

YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, A. K.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, v. 235, n. 2, p. 235-242, 2001.

ZEILINGER, S.; GRUBERA, S.; BANSALB, R.; MUKHERJEE, P. K. Secondary metabolism in *Trichoderma* e Chemistry meets genomics. **Fungal Biology Reviews**, v. 30, p. 74-90, 2016.