

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Jaqueline Raquel Tomm Krahn

**CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE BIOLÓGICO DE *Cercospora* spp.
EM MORANGUEIRO (*Fragaria x ananassa* DUCH.)**

Santa Maria, RS
2023

Jaqueline Raquel Tomm Krahn

CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE BIOLÓGICO DE *Cercospora spp.* EM MORANGUEIRO (*Fragaria X ananassa* DUCH.)

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Agronomia**

Orientadora: Prof^a Dr^a. Marlove Fátima Brião Muniz

Santa Maria, RS
2023

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Krahn, Jaqueline Raquel Tomm
CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE BIOLÓGICO DE *Cercospora* spp.
EM MORANGUEIRO (*Fragaria* X *ananassa* DUCH.) / Jaqueline
Raquel Tomm Krahn.- 2023.
72 p.; 30 cm

Orientadora: Marlove Fatima Brião Muniz
Coorientadores: Alessandro Dal Col Lucio, Stela
Maris Kulczynski
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Agronomia, RS, 2023

1. Morango 2. Mancha foliar 3. Cercosporiose 4.
Pequenas frutas 5. Trichoderma I. Muniz, Marlove Fatima
Brião II. Dal Col Lucio, Alessandro III. Kulczynski,
Stela Maris IV. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

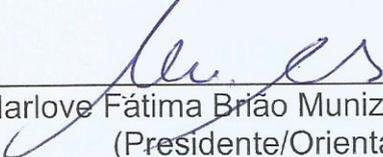
Declaro, JAQUELINE RAQUEL TOMM KRAHN, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Jaqueline Raquel Tomm Krahn

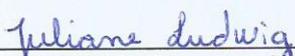
CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE BIOLÓGICO DE *Cercospora spp.* EM MORANGUEIRO (*Fragaria X ananassa* DUCH.)

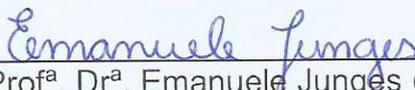
Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Agronomia**

Aprovada em 28 fevereiro de 2023:


Marlove Fátima Brião Muniz, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)


Prof. Dr. Júlio Carlos Pereira da Silva (UFSM)


Prof.ª Dr.ª. Juliane Ludwig (UFFS)


Prof.ª Dr.ª. Emanuele Junges (IFFAR)


Dr.ª. Gerusa Pauli Kist Steffen (DDPA)

Santa Maria, RS
2023

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar comigo nessa trajetória.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, por proporcionar a oportunidade de me qualificar profissionalmente.

À Capes, pela bolsa concedida, que viabilizou a execução deste trabalho.

À minha orientadora, professora Dr^a Marlove Fátima Brião Muniz, pela orientação, disponibilidade, amizade e auxílio durante o desenvolvimento dessa pesquisa e principalmente por me apoiar e incentivar em todos os momentos.

Aos meus co-orientadores, professor Dr. Alessandro Dal'col Lucio e Dra. Stela Maris Kulczynski, pelas dúvidas esclarecidas durante a execução do trabalho.

À banca examinadora, pelas considerações e contribuições prestadas a este trabalho.

Aos professores Dr. Júlio Carlos Pereira da Silva e Dr. Jansen Rodrigo Pereira Santos pelos ensinamentos, amizade e disponibilidade sempre que solicitados.

Aos meus pais Luis e Erica, pela educação, apoio e confiança depositada em todos esses anos de estudos, pelo exemplo de honestidade e trabalho.

Aos meus irmãos, Jackson e Janine, por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus avós Reinaldo e Elzira Krahn (*in memoriam*), Erich e Ida Anna Tomm, pela educação e ajuda prestada durante toda a trajetória da minha vida.

À minha comadre, amiga e colega de profissão Amanda Moraes Cardoso Arenhart, por estar sempre ao meu lado, me incentivando e torcendo por mim.

À equipe de trabalho do Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi da Universidade Federal de Santa Maria, agradeço pela disponibilidade e auxílio no desenvolvimento dos experimentos, pela troca de conhecimentos, pela parceria e amizade. Em especial, a servidora Maria Neves Weber pela orientação nos trabalhos, apoio nos momentos difíceis, amizade e alegria transmitida no dia a dia do laboratório.

Aos colegas do Grupo de Investigações em Fitopatologia da UFSM – GFIT, agradeço pela confiança e amizade.

Aos amigos que estiveram comigo nesse período, agradeço pelo carinho, amizade e apoio para seguir sempre em frente.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com meu trabalho e estiveram presentes em algum momento dessa trajetória.

RESUMO
CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE BIOLÓGICO DE *Cercospora* spp. EM MORANGUEIRO (*Fragaria X ananassa* DUCH.)

AUTORA: Jaqueline Raquel Tomm Krahn
ORIENTADOR(A): Marlove Fátima Brião Muniz

O morangueiro (*Fragaria X ananassa* Duch.) é uma espécie pertencente ao grupo das pequenas frutas e apresenta grande importância comercial, pois seu cultivo é predominante na agricultura familiar em diferentes regiões do país, principalmente nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná e Espírito Santo. Entre as principais doenças que afetam a cultura estão as manchas foliares e atualmente, o controle dessas doenças é realizado, predominantemente, por fungicidas químicos. No entanto, devido ao consumo dos frutos ser, principalmente, de forma “in natura”, alternativas de controle que envolvam tecnologias limpas têm sido mais utilizadas, e entre elas está o controle biológico. Recentemente, foi identificada a ocorrência de uma nova doença foliar em plantas de morangueiro, tendo como agente causal fungos do gênero *Cercospora* spp. Diante disso, o objetivo geral do trabalho foi caracterizar o patossistema *Cercospora* spp. X morangueiro e a ação de diferentes espécies de *Trichoderma* no controle da doença. Como objetivos específicos do trabalho foram definidos: a) avaliar a patogenicidade, caracterizar morfofisiologicamente e molecularmente o agente causal da Cercosporiose em morangueiro; b) avaliar o biocontrole “in vitro” e “in vivo” de *Cercospora* spp. pelas espécies *T. harzianum* e *T. asperellum*; c) Identificar os compostos produzidos pelas diferentes espécies de *Trichoderma*; d) Identificar a eficiência da utilização do antagonista, se organismo vivo ou filtrados de cultura, sob diferentes formas de aplicação no controle de *Cercospora* spp. Para isolamento do patógeno foram coletadas folhas com sintomas característicos de Cercosporiose em nove municípios do Rio Grande do Sul e um de Santa Catarina. Os isolados foram avaliados morfofisiologicamente através do crescimento micelial, da esporulação, do tamanho dos conídios e número de septos e após, os dados foram submetidos ao método de agrupamento UPGMA (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”). Através do dendrograma gerado, agrupou-se os isolados pela similaridade entre as médias dos caracteres, a partir destes, foi realizada a identificação molecular e o teste de patogenicidade de dois isolados por grupo. A análise molecular indicou que a Cercosporiose em morangueiro é causada por um complexo de espécies de *Cercospora* spp., entre elas *C. kikuchii*. As espécies de *Trichoderma* spp. foram eficientes em controlar o crescimento micelial de *Cercospora* spp. tanto no pareamento de culturas como por metabólitos voláteis e não voláteis. Isolados de *Trichoderma* spp. cultivados em meio líquido produziram ácidos graxos e demais compostos orgânicos com potencial fungicida e de ativação de mecanismos de defesa das plantas. A aplicação de *Trichoderma* spp., na forma de organismo vivo ou filtrado de cultura, via foliar ou de forma combinada, foi capaz de reduzir a severidade da Cercosporiose, causada por *Cercospora* spp. em morangueiro.

Palavras-chave: morango; doença foliar; ácidos graxos; cercosporiose

ABSTRACT
CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL CONTROL OF *Cercospora* spp. IN STRAWBERRY (*Fragaria X ananassa* DUCH.)

Author: Jaqueline Raquel Tomm Krahn
Adviser: Marlove Fátima Brião Muniz

The strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) is a species belonging to the group of small fruits and has great commercial importance, since its cultivation is predominant in family farming in different regions of the country, mainly in the states of Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná and Espírito Santo. Among the main diseases that affect the crop are leaf spots and currently, the control of these diseases is predominantly carried out by chemical fungicides. However, due to the fact that fruit consumption is mainly “in natura”, control alternatives involving clean technologies have been more used, and among them is biological control. Recently, the occurrence of a new foliar disease in strawberry plants was identified, with fungi of the genus *Cercospora* spp. Therefore, the general objective of this work was to characterize the pathosystem *Cercospora* spp. X strawberry and the action of different species of *Trichoderma* in controlling the disease. The specific objectives of the work were defined: a) to evaluate the pathogenicity, morphophysiological and molecularly characterize the causal agent of Cercosporiosis in strawberry; b) to evaluate the “in vitro” and “in vivo” biocontrol of *Cercospora* spp. by the species *T. harzianum* and *T. asperellum*; c) Identify the compounds produced by the different species of *Trichoderma*; d) To identify the efficiency of using the antagonist, whether live organism or culture filtrates, under different forms of application in the control of *Cercospora* spp. For isolation of the pathogen, leaves with characteristic symptoms of Cercosporiose were collected in nine municipalities in Rio Grande do Sul and one in Santa Catarina. The isolates were evaluated morphophysiological through mycelial growth, sporulation, conidia size and number of septa and then the data were submitted to the UPGMA grouping method (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”). Through the generated dendrogram, the isolates were grouped by the similarity between the means of the characters, from these, the molecular identification and the pathogenicity test of two isolates per group were performed. Molecular analysis indicated that *Cercospora* leaf spot on strawberry is caused by a complex of *Cercospora* spp. species, including *C. kikuchii*. The species of *Trichoderma* spp. were efficient in controlling the mycelial growth of *Cercospora* spp. both in culture pairing and by volatile and non-volatile metabolites. Isolates of *Trichoderma* spp. grown in liquid medium produced fatty acids and other organic compounds with fungicidal potential and activation of plant defense mechanisms. The application of *Trichoderma* spp., in the form of a live organism or filtered from culture, via leaves or in combination, was able to reduce the severity of Cercosporiosis, caused by *Cercospora* spp. in strawberry.

Keywords: strawberry; leaf disease; fatty acids; cercosporiosis

LISTA DE FIGURAS

2 CAPITULO 1: PRIMEIRO RELATO DE *Cercospora* cf. *malloti* CAUSANDO CERCOSPORIOSE EM *Fragaria x ananassa* DUCH. NO BRASIL.

Figure 1. Morphological aspects of *Cercospora* cf. *malloti* reported in strawberry (*Fragaria x ananassa*) in Brazil. A-B) Symptomatic leaves with small circular spots initially reddish-purple to dark brown color with a grayish pale center. C-D) Closer look at the lesion with arrows pointing to stroma containing the fasciculate conidiophores. E) Colony of the isolate M6 in PDA medium. F) Conidiophores in the stroma. G) Multi-septated conidia, where one of them is attached to the conidiophore. H) Single- and multi-septated conidia. 19

3 CAPITULO 2: CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE *Cercospora* spp. EM *Fragaria x ananassa* Duch.

Figure 1. Conidiophores of *Cercospora* spp. on PDA medium (A), conidia and conidiophores (B), and different conidium sizes (C).27

Figure 2. Witness with discs of culture medium without the pathogen (A), isolate M6 on strawberry leaves (B), lesions after 15 days of incubation with isolate M6 (C), and lesion caused by *Cercospora* spp. (D).29

Figure 3. Phylogenetic tree obtained from the actin gene sequence (ACT) of isolates of *Cercospora* spp. associated with strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) leaves, showing the phylogenetic relationships among species according to the Maximum Likelihood statistical method, with the Kimura 2-parameter model. The numbers on the branches indicate the percentage of bootstrap analysis replicates in which the replicates were observed.30

Figure 4. Phylogenetic tree obtained from the sequence of the elongation factor 1-alpha gene of isolates of *Cercospora* spp. associated with strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) leaves, showing the phylogenetic relationships among species according to the Maximum Likelihood statistical method, with the Kimura 2-parameter model. The numbers on the branches indicate the

percentage of bootstrap analysis replicates in which the replicates were observed (1000 replicates).31

Figure 5. Production of cercosporin in V8 culture medium. Colony of isolate M6 (*C. kikuchii*) on V8 culture medium (A), and colony of isolate M11 (*Cercospora* spp.) on V8 culture medium (B)..32

4 CAPITULO 3: *Trichoderma* spp. NO BIOCONTROLE DE *Cercospora* spp. EM *Fragaria X ananassa* DUCH.

Figura 1. Câmara úmida em plantas de morangueiro inoculadas com *Cercospora* spp.47

LISTA DE TABELAS

3 CAPITULO 2: CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE *Cercospora* spp. EM *Fragaria x ananassa* Duch.

Table 1. Isolates of <i>Cercospora</i> spp. from strawberry (<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.) crops in different municipalities of Rio Grande do Sul and Santa Catarina states, Brazil.	23
Table 2. Morphological characters of <i>Cercospora</i> spp. isolates on PDA culture medium	26
Table 3. Groups of <i>Cercospora</i> spp. isolates obtained from strawberry leaves, based on the UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) grouping method.....	28
Table 4. Genbank accession codes of <i>Cercospora</i> spp. isolates for the actin (ACT) and elongation factor 1-alpha (Tef-1) regions.....	31
Table 5. Mycelial growth and sporulation of <i>Cercospora</i> spp. on different culture media	32

4 CAPITULO 3: *Trichoderma* spp. NO BIOCONTROLE DE *Cercospora* spp. EM *Fragaria X ananassa* DUCH.

Tabela 1. Isolados de <i>Cercospora</i> spp e <i>Trichoderma</i> spp. utilizados nos testes de antagonismo.	41
Tabela 2. Composição dos tratamentos de acordo com a formulação do antagonista e o isolado patogênico.....	46
Tabela 3. Média do diâmetro final da colônia de isolados de <i>Cercospora</i> spp. obtidos de folhas de morangueiro, em confrontação direta por pareamento de culturas de <i>Trichoderma</i> spp.....	49
Tabela 4. Percentual de inibição do crescimento micelial de isolados de <i>Cercospora</i> spp. obtidos de folhas de morangueiro, em confrontação direta por	

pareamento de culturas e sua classificação quanto ao antagonismo, conforme notas de Bell et al. (1982).....	49
Tabela 5. Média do diâmetro final da colônia de isolados de <i>Cercospora</i> spp. obtidos de folhas de morangueiro, em placas sobrepostas por confrontação direta com metabólitos voláteis de culturas de <i>Trichoderma</i> spp.....	51
Tabela 6. Percentual de inibição do crescimento micelial de isolados de <i>Cercospora</i> spp. obtidos de folhas de morangueiro, em placas sobrepostas por confrontação direta com metabólitos voláteis de espécies de <i>Trichoderma</i> spp.	51
Tabela 7. Produção de biomassa fúngica de <i>Trichoderma</i> spp. em meio líquido.....	52
Tabela 8. Média do diâmetro final da colônia de isolados de <i>Cercospora</i> spp. obtidos de folhas de morangueiro, com uso de filtrado de cultura a base de <i>Trichoderma</i> spp.....	53
Tabela 9. Percentual de inibição do crescimento micelial de isolados de <i>Cercospora</i> spp. obtidos de folhas de morangueiro, com uso de filtrado de cultura de <i>Trichoderma</i> spp.....	54
Tabela 10. Identificação de componentes voláteis presentes no filtrado de cultura de <i>Trichoderma asperellum</i> (proveniente do isolado IVCT1) extraídos com quatro solventes: hexano, acetato de etila, metanol e etanol, o tempo de retenção (TR) (min) e a área (%).	57
Tabela 11. Identificação dos componentes voláteis presentes no filtrado de cultura de <i>Trichoderma harzianum</i> (proveniente do isolado IST1) extraídos com quatro solventes: hexano, acetato de etila, metanol e etanol, o tempo de retenção (TR) (min), a unidade área (%).	58
Tabela 12. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) na cultura do morangueiro, cultivar Camarosa, tratada com organismo vivo e/ou filtrado de cultura de <i>Trichoderma</i> spp. no controle da Cercosporiose.	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2 CAPITULO 1: PRIMEIRO RELATO DE <i>Cercospora</i> cf. <i>malloti</i> CAUSANDO CERCOSPORIOSE EM <i>Fragaria</i> x <i>ananassa</i> DUCH. NO BRASIL.....	17
2.2 INFORMAÇÃO SUPLEMENTAR.....	19
3 CAPITULO 2: CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE <i>Cercospora</i> spp. EM <i>Fragaria</i> x <i>ananassa</i> Duch.....	20
Materials and Methods.....	22
Obtaining isolates of <i>Cercospora</i> spp.	22
Morphophysiological characterization	23
Molecular characterization	24
Pathogenicity test.....	25
Results and Discussion	25
Morphological characterization.....	25
Pathogenicity test.....	28
Molecular characterization	29
Morphophysiological characterization	32
Conclusions	33
Acknowledgments.....	33
Compliance with Ethical Standards	33
Literature Cited	34
4 CAPITULO 3: <i>Trichoderma</i> spp. NO BIOCONTROLE DE <i>Cercospora</i> spp. EM <i>Fragaria</i> X <i>ananassa</i> DUCH.....	37
1 INTRODUÇÃO	39
2 MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS.....	41
2.2 AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO DE <i>Trichoderma</i> spp. à <i>Cercospora</i> spp.....	42
2.3 CONTROLE DE <i>Cercospora</i> spp. “IN VITRO” E “IN VIVO” COM <i>Trichoderma</i> spp.....	43
2.3.1 Produção de filtrados de cultura de <i>Trichoderma</i> spp.	43
2.3.2. Metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. na inibição do crescimento micelial de <i>Cercospora</i> spp.	44
2.3.3 Identificação de metabólitos voláteis presentes em filtrado de cultura de <i>Trichoderma</i> spp.....	44
2.3.3.1.Procedimento de extração	44
2.3.3.2 Equipamentos e procedimento para cromatografia gasosa.....	45

2.3.4 Ação “in vivo” de <i>Trichoderma</i> spp. no controle de <i>Cercospora</i> spp. em morangueiro.	46
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1 AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO DE <i>Trichoderma</i> spp. À <i>Cercospora</i> spp. POR TESTE DE CULTURA PAREADA E PLACAS SOBREPOSTAS.....	48
3.2 CONTROLE DE <i>Cercospora</i> spp. “IN VITRO” E “IN VIVO” A PARTIR DE FILTRADO DE CULTURA OU ORGANISMO VIVO DE <i>Trichoderma</i> spp.....	52
3.2.1 Metabólitos de <i>Trichoderma</i> spp. na inibição do crescimento micelial de <i>Cercospora</i> spp.	52
3.2.2 Identificação de metabólitos voláteis presentes em filtrado de cultura de <i>Trichoderma</i> spp.....	54
3.2.3 Ação “in vivo” de filtrado de cultura ou/e organismo vivo de <i>Trichoderma</i> spp. no controle <i>Cercospora</i> spp. em morangueiro.	59
4. CONCLUSÕES	61
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
5. CONSIDERAÇÕES GERAIS	65
6. CONCLUSÃO GERAL	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1 INTRODUÇÃO GERAL

O morangueiro cultivado atualmente (*Fragaria X ananassa* Duch.) originou-se na Europa, da hibridização entre as espécies americanas *Fragaria chiloensis* Mill. e *F. virginiana* Duch. (VAUGHAN; GEISSLER, 1997). É uma angiosperma dicotiledônea pertencente à família Rosaceae, subfamília Rosoideae, de plantas herbáceas, com altura variando de 15 a 30 cm, podendo ser rasteiras ou eretas, formando pequenas touceiras que aumentam de tamanho com o envelhecimento da planta (BRANZANTI, 1989; RONQUE, 1998).

No Brasil, a área plantada com morangueiro é aproximadamente de 5.200 hectares (ha), apresentando uma produção de mais de 200.000 toneladas (ANTUNES et al., 2021). Já no Rio Grande do Sul, o cultivo do morangueiro é realizado em mais de 2000 propriedades rurais, nas quais as áreas variam de 0,5 a 1 ha, caracterizando-as como propriedades de agricultura familiar com produção média anual de aproximadamente 15 toneladas (OLIVEIRA, 2005; IBGE, 2017). Nessas propriedades, são empregadas diversas técnicas de manejo, caracterizando os sistemas de cultivo (MADAIL, 2016). Entre algumas técnicas utilizadas nos sistemas estão o cultivo no solo com ou sem o uso de “*mulching*”, hidroponia, cultivo protegido com ou sem o uso de bancadas suspensas. Associado a essas técnicas, o manejo da cultura pode ser desempenhado de forma orgânica ou convencional. No manejo convencional, predominam o uso de produtos químicos, sejam eles adubos, herbicidas, inseticidas ou fungicidas. Já no manejo orgânico tem-se o incentivo ao uso de compostos orgânicos para melhorar a fertilidade e qualidade do solo, além do controle natural de pragas e doenças (FALCÃO, 2013).

A cultura do morangueiro é atacada por diferentes doenças, que podem ser causadas por fungos, bactérias, vírus, entre outros e podem acometer raízes, folhas, flores, frutos em pré e pós-colheita. No entanto, os fungos são responsáveis pela maioria das doenças na planta, principalmente as manchas foliares (REIS; COSTA, 2011). Entre as doenças foliares estão a mancha de *Diplocarpon*, causada por *Diplocarpon earliana*, a mancha de *Dendrophoma*, causada por *Dendrophoma obscurans*, a mancha de *Micosphaerella*, causada por *Micosphaerella fragariae*, a antracnose, causada por *Colletotrichum fragariae*, e recentemente, uma nova doença foliar foi diagnosticada em plantios de morangueiro no Brasil, denominada de Cercosporiose (KRAHN et al., 2022a). A doença causa manchas foliares durante todo

o ciclo da cultura, principalmente no período reprodutivo, causando redução da área fotossintetizante e conseqüentemente perdas de produtividade, e tem como agente causal a *Cercospora* cf. *malloti*. A Cercosporiose no morangueiro pode ser facilmente confundida com outras manchas foliares, devido à similaridade dos sintomas observados, o que pode dificultar a escolha de medidas de controle adequadas (PARISI et al., 2016; LOPES et al., 2017). Muitas vezes, algumas práticas de manejo utilizadas na cultura, como o uso de agrotóxicos, sem a devida observação ao período de carência, podem resultar em resíduos no solo e frutos, o que não é visto como um fator positivo e sustentável, pois uma parte da produção do morangueiro é consumida “in natura”, podendo trazer riscos à saúde do agricultor e do consumidor, já que muitas doenças cancerígenas são associadas a essas substâncias químicas (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018; FRIEDERICH et al., 2021).

No manejo integrado de doenças, o controle biológico de patógenos, com uso de antagonistas, pode ser utilizado como uma estratégia de manejo, respeitando suas limitações e exigências, como o equilíbrio entre todos os organismos presentes no ambiente e suas interações. Entre os fungos antagonistas estão diversas espécies de *Trichoderma*, que têm sido usados como agentes ativos em formulações de biocontrole e biofertilizantes (YASSIN et al., 2021; ESLAHI et al., 2021; JI et al., 2021). Esses fungos agem diretamente para enfrentar os patógenos, seja por mecanismos como micoparasitismo, competição ou antibiose (VINALE et al., 2008), ou indiretamente, por indução de mecanismos de defesa, quando pelas vias de resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (ISR) (MAYO et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

Com intuito de buscar alternativas sustentáveis ao controle de patógenos foliares, o uso de controle biológico, seja com organismos vivos ou com uso de bioprodutos à base de *Trichoderma* spp. tem-se destacado em diferentes patossistemas. Dessa forma, no presente trabalho realizou-se o estudo da caracterização do patossistema *Cercospora* spp. x morangueiro e a identificação de formas de utilização de *Trichoderma* spp. no biocontrole do patógeno. O objetivo do capítulo I foi avaliar a patogenicidade e caracterizar morfofisiologicamente e molecularmente o agente causal da Cercosporiose em plantas de morangueiro, dando origem ao primeiro relato, no Brasil, de *Cercospora* cf. *malloti* como agente causal da cercosporiose do morangueiro (KRAHN et al, 2022a). Na finalidade de conhecer

melhor o agente causal *Cercospora* cf. *malloti*, no capítulo II foi realizada a caracterização morfofisiológica, molecular e a patogenicidade de diferentes isolados de *Cercospora* spp., coletados de folhas com sintomas característicos de Cercosporiose em diferentes municípios do Rio Grande do Sul e um em Santa Catarina (KRAHN et al., 2022b). No capítulo III, objetivou-se avaliar a ação de isolados de *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma harzianum* no controle “in vitro” e “in vivo” de *Cercospora* spp., com uso de organismo vivo ou/e filtrado de cultura, assim como, a identificação de metabólitos voláteis presentes no filtrado de cultura de *Trichoderma* spp. Nos testes “in vitro”, avaliou-se o antagonismo dos isolados de *Trichoderma* no controle de *Cercospora* spp., através dos testes de cultura pareada e placas sobrepostas e, também, por metabólitos não volatéis presentes nos filtrados de cultura. A identificação dos metabólitos volatéis presentes no filtrado de cultura foi realizada por meio de cromatografia gasosa. No teste “in vivo” avaliou-se a redução da severidade de *Cercospora* spp. em plantas de morangueiro, com uso de organismo vivo ou/e filtrado de cultura de *Trichoderma* spp. e, posteriormente, determinou-se a Área Abaixo da Curva da Doença.

2 CAPITULO 1: PRIMEIRO RELATO DE *Cercospora* cf. *malloti* CAUSANDO CERCOSPORIOSE EM *Fragaria x ananassa* DUCH. NO BRASIL.

Artigo publicado na Revista Plant Disease:

Krahn, J. R. T.; Muniz, M. F. B.; Poletto, T.; Fantinel, V. S.; Quevedo, A. C.; Strahl, M. A.; Couto, L. F. da S. C.; Rabuske, J. E.; Silva, J. C. P. da. First report of *Cercospora* cf. *malloti* causing brown eyespot on strawberry in Brazil **Plant Disease**, v. 106, n. 9, e2530, 2022. <https://doi.org/10.1094/pdis-10-21-2385-PDN> .

First report of *Cercospora* cf. *malloti* causing brown eyespot on strawberry in Brazil

J. R. T. Krahn¹, T. Poletto¹, V. S. Fantinel¹, A. C. Quevedo¹, M. A. Strahl¹, L. F. S. Couto¹, J. E. Rabuske¹, M. F. B. Muniz^{1†} and J. C. P da Silva^{1†}

¹Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Defesa Fitossanitária, Santa Maria, Brazil.

†Correponding autor: marlovedmuniz@yahoo.com.br; julio.c.silva@ufsm.br

Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) is one of the most consumed small fruits from the Rosaceae family in Brazil. It is cultivated on ~4,500 ha in all regions of the country, with a wide range of fungi pathogens causing leaf diseases. Strawberry leaves (cv. San Andreas) with symptoms of eyespot usually related to *Mycosphaerella fragariae* (*Ramularia tulasnei*) (Mazaro et al. 2006) were observed in April 2019, in a field located in Santa Maria, Rio Grande do Sul state, Brazil (29°43'19.6"S and 53°43'04.6" W). However, the symptoms slightly differed from *Mycosphaerella* blight as well as the fungi structures observed under an optical microscope. The symptomatic leaves had small circular spots, initially reddish-purple to dark brown color, which later increased in size. The center of the lesion was grayish pale, where dark brown conidiophores were found over it. The symptom occurred in 50% of the leaves of all plants during the crop season. To identify the causal agent, symptomatic leaves were collected and superficially disinfected with 70% ethanol for 30 s followed by 0.5% bleach for 30 s and then washed in sterile distilled water. The leaves were placed in germination boxes with a moistened paper filter and incubated at 25 ± 1°C with a 12h photoperiod for four days. After the formation of the fungal structure, the fungi was isolated in potato dextrose agar (PDA) medium and kept for 20 days at 25 ± 1°C. Colonies were dark brown with pinkish aerial mycelium, with an average daily growth of 2.40 mm in diameter. The conidia were hyaline, 1-septated with a filiform shape, some of them straight and others slightly curved. Conidia average measurement was 10.2 to 82.4 x 4.8 to 8.8 µm, similar to morphological characteristics of the genus *Cercospora*. The DNA was extracted from pure cultures of an isolate considered "representative" of the fungi that grew in the plates. To confirm the identity, the PCR amplification was carried out for internal transcribed spacer (ITS) region ITS 1-5.8S - ITS 2 and Calmodulin region (CAL) genes (Acqua et al, 2011). The ITS (No. MZ713249) and CAL (No. MZ713254) sequences

were deposited in the Genbank database. BLASTn analysis revealed the isolate was 99% similar to *Cercospora* cf. *malloti* which access codes in GenBank are KT 193689 and KT 193738 (Nguanhom et al. 2015). A pathogenicity test was performed to fulfill Koch's postulates. Strawberry plants with healthy leaves (60 days old), were inoculated with 6 mm diameter discs of PDA containing the mycelium grown for 20 days. Each leaf received three discs. In the control plants, discs containing only PDA were inoculated. The plants were maintained in growth chambers at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and 12 h of photoperiod. Six plants were used as replicates. The previously described symptoms were observed in all inoculated leaves after five days. The control plants did not present any symptoms. The pathogen was then re-isolated from the lesions and identified as *C. cf. malloti*. In Thailand *C. cf. malloti* is reported on different crop species, like *Abelmoschus esculentus* (okra) and *Brassica alboglabra* (cabbage) (Nguanhom et al. 2015), but not in strawberries. To our knowledge, this is the first report of *C. cf. malloti* pathogenic to strawberries in Brazil. Therefore, further studies should evaluate the geographic distribution of this pathogen in strawberry fields to prevent further spread in the country.

Keywords: *Fragaria x ananassa*; fungi; plant pathogens.

The author(s) declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We acknowledge the financial support provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Grant 409611/2018-2.

References

- ACQUA, R. D., et al, 2011. **Trop. Plant Pathol.** 36:313.
- MAZARO, S. M., et al, 2006. **Cienc. Rural.** 36:648.
- NGUANHOM, J., et al, 2015. **Phytotaxa.** 233:27.

2.2 INFORMAÇÃO SUPLEMENTAR

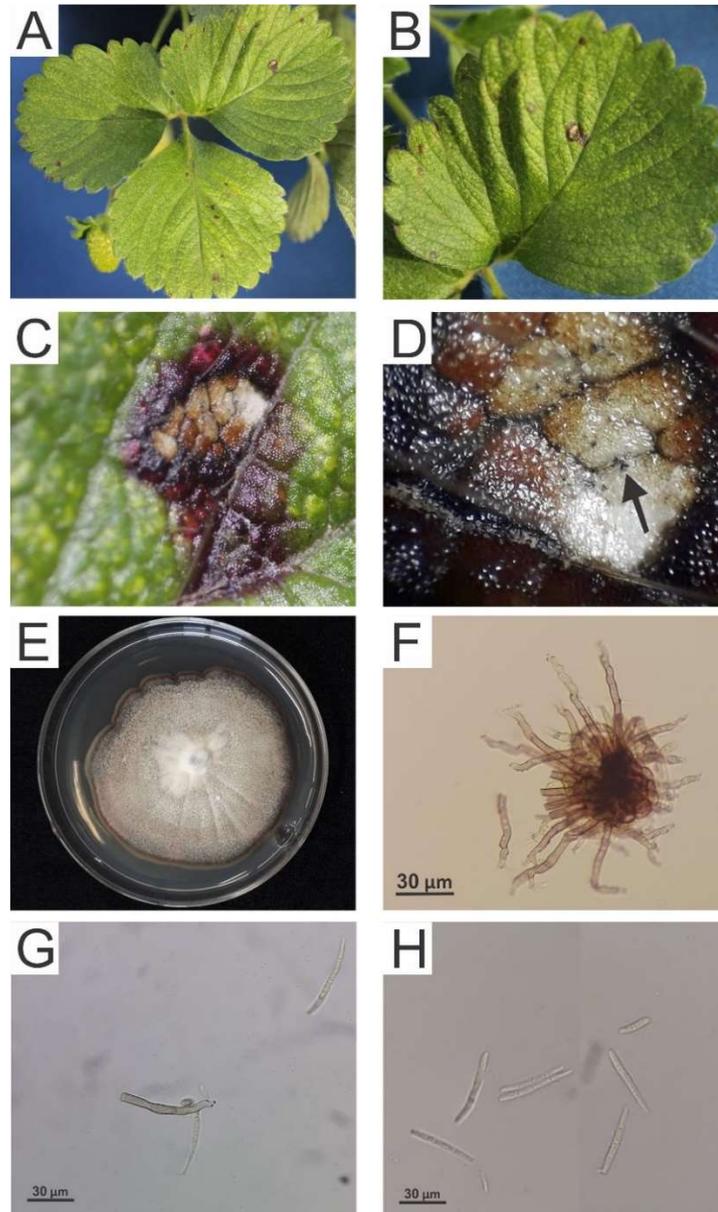


Figura 1. Morphological aspects of *Cercospora cf. malloti* reported in strawberry (*Fragaria x ananassa*) in Brazil. A-B) Symptomatic leaves with small circular spots initially reddish-purple to dark brown color with a grayish pale center. C-D) Closer look at the lesion with arrows pointing to stroma containing the fasciculate conidiophores. E) Colony of the isolate M6 in PDA medium. F) Conidiophores in the stroma. G) Multi-septated conidia, where one of them is attached to the conidiophore. H) Single- and multi-septated conidia

3 CAPITULO 2: CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE *Cercospora* spp. EM *Fragaria x ananassa* Duch.

Artigo publicado na Revista Brasileira de Ciências Agrárias:

KRAHN, J. R. T. et al, Morphophysiological and molecular characterization of *Cercospora* spp. in *Fragaria x ananassa* Duch. Revista Brasileira de Ciências Agrárias. v.17, n.4, p. 1-9, 2022. Disponível em: <http://www.agraria.pro.br/ojs32/index.php/RBCA/article/view/v17i4a2745>> Acesso: 06 jan 2023. DOI: <https://doi.org/10.5039/agraria.v17i4a2745>

Resumo

A cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) é originária da Europa e apresenta ampla distribuição geográfica. No Brasil, o cultivo é predominante nas regiões sul do país. As doenças foliares são um dos principais problemas da cultura e são causadas por espécies de fungos de diferentes gêneros. Recentemente, *Cercospora* spp. foi relatado como agente causal de cercosporiose em folhas de morangueiro. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a patogenicidade e caracterizar morfofisiológica e molecularmente isolados de *Cercospora* spp. obtidos de folhas de morangueiro. A patogenicidade foi avaliada em folhas destacadas, a caracterização morfofisiológica em diferentes meios de culturas e a identificação molecular pelas regiões actina e fator de alongação1-alfa. As características morfológicas foram semelhantes às encontradas em espécies do gênero *Cercospora*. A cercosporiose em morangueiro é causada por um complexo de espécies do gênero *Cercospora*, entre essas *C. kikuchii*.

Palavras-chave: cercosporiose; actina; fator de alongação; morangueiro

Morphophysiological characterization and molecular identification of *Cercospora* spp. in *Fragaria x ananassa* Duch.

Abstract

The strawberry crop (*Fragaria x ananassa* Duch.) is originally from Europe and has a wide geographic distribution. In Brazil, cultivation is predominant in the southern regions of the country. Leaf diseases are one of the main problems of culture and are caused by different fungal genera. Recently, *Cercospora* spp. has been reported as a

causal agent of brown eye spot on strawberry leaves. Thus, the aim of this study was to evaluate the pathogenicity and characterize morphophysiological and molecularly isolates of *Cercospora* spp. obtained from strawberry leaves. The pathogenicity was evaluated in detached leaves, the morphophysiological characterization in different culture media and the molecular identification by the actin and elongation factor1- α regions. The morphological characteristics were similar to those found in species of the genus *Cercospora*. *Cercospora* leaf spot in strawberry is caused by a complex of species of the genus *Cercospora*, including *C. kikuchii*.

Key words: cercosporiosis; actin; elongation factor; strawberry

Introduction

Strawberry (*Fragaria* \times *ananassa* Duch.) is cultivated on all continents. The area planted to this fruit worldwide is estimated to be 384,668 hectares (ha) (FAOSTAT, 2020). Brazil has favorable climatic conditions for the development of strawberry because it has subtropical climate regions, which provides a good adaptation of the different cultivars available on the market (Rosa et al., 2013).

In Brazil, the area planted with strawberry is approximately 5,200 ha, with a production of over 200,000 tons (Antunes et al., 2021). This production is predominantly in small family-based areas, with the participation of available labor supplemented by occasional contracts in periods of greater demand (Madail, 2016).

The productivity and quality of strawberries are influenced by different factors. These can be of abiotic or biotic origin, and among the biotic factors are the pathogenic fungi, causal agents of different diseases that affect the strawberry crop. Foliar diseases are one of the main problems of the crop and are caused by fungal species of different genera. Recently, Krahn et al. (2022) reported the occurrence of a new leaf spot in the strawberry crop, called cercosporiosis, caused by the fungus *Cercospora* cf. *malloti*.

The symptoms of cercosporiosis in strawberry are observed on the leaves during the entire cycle of the crop, especially during the reproductive period. The leaves present circular spots with an initial reddish-purple to dark brown coloration, which later increase in size, presenting the center of the lesion with a whitish coloration (Krahn et al., 2022).

Thus, the objective of this study was to evaluate the pathogenicity and to morphophysiological and molecularly characterize isolates of *Cercospora* spp. obtained from strawberry leaves.

Materials and Methods

Obtaining isolates of *Cercospora* spp.

Leaves with characteristic symptoms of cercosporiosis were collected between the months of April and October 2019, in strawberry producing properties in several municipalities of Rio Grande do Sul state, Brazil, and in the municipality of São João do Oeste, Santa Catarina state, Brazil.

The collected leaves were stored in plastic bags under refrigeration and sent to the Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi, at the Universidade Federal de Santa Maria, to perform the identification and isolation of the pathogen. Thus, direct isolation was performed by transferring part of the fungal structures from the leaf lesion to Petri plates containing PDA culture medium (potato - dextrose - agar) and 0.05 mg of streptomycin 100mL⁻¹ of medium, and then the plates were placed in an incubator with a 12 hour photoperiod and temperature of 25 ± 2 °C for 15 days. After identification and isolation of the pathogen, monospore cultures were performed to obtain purified isolates (Fernandes, 1993). From the collections 13 isolates were obtained, as shown in Table 1.

Table 1. Isolates of *Cercospora* spp. from strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) crops in different municipalities of Rio Grande do Sul and Santa Catarina states, Brazil.

Isolate	Municipality	Coordinates
M1	Santiago - RS	29°10'59.1"S 54°50'59.9"W
M2	Ijuí - RS	28°22'06.6"S 53°58'30.0"W
M3	Capão do Cipó - RS	29°02'08.7"S 54°38'06.4"W
M4	Santa Maria - RS	29°43'19.6"S 53°43'04.6"W
M5	Coronel Barros - RS	28°23'10.4"S 54°04'15.1"W
M6	Santa Maria - RS	29°43'19.6"S 53°43'04.6"W
M7	São João do Oeste - SC	27°05'49.6"S 53°35'25.9"W
M8	Santa Maria - RS	29°38'57.2"S 53°55'04.5"W
M9	Agudo - RS	29°38'33.7"S 53°15'10.1"W
M10	Passo Fundo - RS	28°13'48.5"S 52°22'45.2"W
M11	Santa Maria - RS	29°38'57.2"S 53°55'04.5"W
M12	São João do Polêsine - RS	29°40'30.2"S 53°31'16.0"W
M13	Paraíso do Sul - RS	29°45'01.3"S 53°03'42.1"W

Morphophysiological characterization

To evaluate morphological characteristics such as colony coloration, size and number of conidial septa, and the final colony diameter (FCD) and sporulation of all isolates, PDA medium discs with 6 mm diameter of *Cercospora* spp. isolates, obtained from colonies with 15 days of growth, were transferred to other plates with PDA medium and kept at 25 ± 2 °C, with 12 hours of photoperiod, in a climate-controlled incubator, for a period of 15 days. For this, five repetitions were used, each consisting of one plate. The mycelial growth of each isolate was evaluated at 15 days of incubation by measuring the average colony diameter in two diametrically opposite directions. Next, colony staining was determined by observation and comparison of the top surface of the Petri dishes, aided by the Munsell color chart (Munsell Color, 2009). The sporulation was evaluated at 20 days of incubation, 15 days with temperature at 25 ± 2 °C and photoperiod of 12 hours, and the other days with continuous ultraviolet light. For each isolate, the length and width of 10 conidia, as well as the number of septa were measured with the aid of an optical microscope, with micrometer attached, at 40× magnification.

For the evaluation of physiological characteristics, such as mycelial growth and sporulation, two pathogen isolates were grown on different media. Discs of PDA medium, 6 mm in diameter containing mycelium of *Cercospora* spp. obtained from colonies with 15 days of growth were transferred to plates containing the malt culture

medium (malt extract, agar and distilled water), carrot medium (CAR: carrot extract, agar and distilled water) and vegetable juice medium (V8: commercial V8 juice, CaCO₃, agar and distilled water). The plates with the isolates were kept at 25 ± 2 °C, with 12 hours of photoperiod, in a climate-controlled incubator, for a period of 15 days for the evaluation of FCD.

The sporulation was evaluated at 20 days of incubation, 15 days with temperature at 25 ± 2 °C and photoperiod of 12 hours, and the other days with continuous ultraviolet light. On each plate, 10 mL of sterile distilled water was added, plus one drop of the emulsifier Tween 80®, after which the colonies were scraped off and sieved through a double layer of gauze. The suspension was stirred for 30 seconds and, with the help of a micropipette, 1 mL was removed and spread in the Neubauer chamber for the subsequent estimation of conidia concentration (conidia mL⁻¹). Data were subjected to analysis of variance and means were compared by Scott-Knott test using SISVAR 5.3 software (Ferreira, 2019).

Molecular characterization

DNA extraction and sequencing of the isolates was performed at the Instituto Biológico de São Paulo, according to the method described by Doyle & Doyle (1987) from mycelium grown in culture medium. The extracted genomic DNA sample was submitted to polymerase chain reaction (PCR) for amplification of the internal transcribed spacer (ITS) region of the rDNA and segments of calmodulin, elongation factor 1-alpha, and actin genes. The primer oligonucleotides for the ITS region were SR6R and LR1 (Muniz et al., 2010), for the calmodulin gene were CAL-228F and CAL-737R, for the elongation factor gene were EF1-728F and EF1-986R, and for the actin gene were ACT-512F and ACT-783R (Carbone & Kohn, 1999). The sequenced fragments were analyzed using BioEdit software (Hall, 1999). The nucleotide sequences obtained were compared with those already existing for *Cercospora* spp. in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). The sequences from GenBank that presented the highest scores were selected and aligned with those from the isolates, by the ClustalW algorithm, in addition, the phylogenetic analysis was conducted by adopting the Maximum Likelihood method, by the Kimura 2-parameter model, with 1,000 replicates by MEGA version 10 software (Kumar et al., 2018).

Pathogenicity test

For the pathogenicity test, detached leaves of strawberry cv. Camarosa and six isolates of *Cercospora* spp. were used (Rosa & Menezes, 2001). The asepsis of the leaves was done by immersion in a 70% alcohol solution for 30 seconds, followed by immersion in 0.5% sodium hypochlorite for 30 seconds, and finally rinsed in sterilized distilled water for another 30 seconds and dried in a laminar flow chamber. After asepsis, the leaves were placed in “gerbox” boxes, with two sheets of “germitest” paper moistened with sterilized distilled water.

The experimental design used was entirely randomized, with three repetitions consisting of two leaves. Each leaf received nine discs of PDA medium containing the mycelium of the fungus from 20-day-old colonies. Wounds were made on the leaves using a histological needle. After inoculations, the boxes were closed and stored in a climate controlled chamber at 25 ± 2 °C and a 12 hour photoperiod for 14 days. The evaluation took place on the fourteenth day post-inoculation. The inoculated site was measured orthogonally to obtain the diameter of the lesions (mm) and considered infected when the necrotic spots were significantly larger than the control. The leaves of the control treatment were wounded with a histological needle and PDA discs without the pathogen were added. The incidence of infection was calculated by the formula [Incidence (%) = (infected sites / inoculated sites) × 100] (Poletto, 2022).

Results and Discussion

Morphological characterization

The 13 isolates of *Cercospora* spp. were characterized for daily mycelial growth and then the final colony diameter (FCD) and daily mycelial growth rate (MGR) were determined, as well as sporulation and conidia size. The isolates were registered in the Sisgen by the number: A57AE19.

Table 2 shows the means of the analyzed variables and, by the mean comparison test, it can be seen that there was a statistical difference between the isolates. Statistical analysis allowed the isolates to be grouped into four groups for the FCD and MGR variables, while for sporulation, three.

Tabela 2. Morphological characters of *Cercospora* spp. isolates on PDA culture medium

Isolate	FCD (mm)	M.G.R. (mm dia ⁻¹)	Sporulation (conidia. ml ⁻¹)	Conidia		
				Width. (µm) (Interval)	Length. (µm) (Interval)	Septo (Interval)
M1	53.5 a*	3.56 a	7.0 x 10 ⁴ b	9.2 (8-10)	43.4 (40-45)	7 (6-8)
M2	51.11 b	3.40 b	8.8 x 10 ⁴ b	8 (7-8)	39.2 (38-40)	5.4 (5-6)
M3	48.37 b	3.22 b	1.2 x 10 ⁵ a	8.2 (8-9)	37.3 (36-39)	5.8 (5-7)
M4	44.62 c	2.97 c	1.9 x 10 ⁵ a	3.1 (3-4)	7.3 (5-8)	3.6 (3-4)
M5	42.45 c	2.83 c	1.5 x 10 ⁵ a	3.7 (3-4)	8.5 (8-10)	4 (4-4)
M6	36.41 d	2.44 d	2.1 x 10 ⁴ c	4.1 (3-4)	10.7 (9-12)	3.6 (3-4)
M7	52.44 a	3.49 a	7.3 x 10 ⁴ b	10.5 (9-12)	52.6 (50-56)	6.8 (7-8)
M8	47.67 b	3.17 b	9.4 x 10 ⁴ b	3.3 (3-4)	6.8 (5-8)	2.8 (2-3)
M9	47.63 b	3.17 b	7.8 x 10 ⁴ b	3 (2-4)	10.2 (9-10)	3.2 (3-4)
M10	49.39 b	3.29 b	1.4 x 10 ⁵ a	10.7 (10-12)	74.4 (70-77)	11 (10-11)
M11	56.44 a	3.76 a	1.4 x 10 ⁵ a	13.3 (13-14)	84.4 (80-87)	16.6 (14-18)
M12	49.96 b	3.33 b	1.4 x 10 ⁵ a	9.8 (9-10)	80.6 (75-86)	15.8 (14-17)
M13	47.58 b	3.17 b	1.3 x 10 ⁵ a	9.8 (8-11)	69.4 (68-70)	14.2 (13-16)
CV (%)	9.50	9.50	20.16			

* Averages followed by the same letter in the column do not differ statistically by the Scott-Knott test ($p \geq 0.05\%$); CV - coefficient of variation; FCD - final colony diameter; MGR - mycelial growth rate.

The group with the highest mean FCD scores was composed of *Cercospora* isolates M1, M7, and M11, and the group with the lowest average was M6 alone. Consequently, the TCM was also proportional to these isolates, with values of 3.56, 3.49, and 3.76 mm day⁻¹, for M1, M7, and M11, respectively, and the lowest was 2.44 mm day⁻¹ for isolate M6 (Table 2).

The isolates M3, M4, M5, M10, M11, M12, and M13 formed the group with the highest sporulation, in which, the isolate M4 stood out (1.9×10^5 conidia mL⁻¹). The isolate M6 alone showed the lowest sporulation: 2.1×10^4 conidia mL⁻¹, while the other isolates showed intermediate sporulation. Also in Table 2, the variables conidia width, length, and number of septa showed variation among the isolates. In addition to these evaluated characteristics, the presence of conidiophores was observed (Figure 1A).



Figure 1. Conidiophores of *Cercospora* spp. on PDA medium (A), conidia and conidiophores (B), and different conidium sizes (C). Bar: 10 μ m.

In general, the isolates had slow growth with formation of aerial mycelium, pinkish in color, and, as the colony aged, they showed grayish color. Li et al. (2021), also observed isolates of *Cercospora* cf. *citrulina* with slow growth, however, the mycelium coloration was white to gray. Although, it is a characteristic of the genus *Cercospora*, Pittner et al. (2016), studying the development of *Cercospora beticola* reported a more accelerated mycelial growth of the colony, as in seven days the final colony diameter ranged from 30.75 to 46.50 mm. The differences in morphological and physiological characters found in the present study may be related to the conditions of the culture medium, as well as related to the natural variability of populations of the genus *Cercospora*.

The conidia were hyaline, monoseptate to multiseptate with various shapes, ranging from filiform, straight to slightly curved. The average size of the conidia was distinct among the isolates, as was the number of septa. For the isolate M6 it was $4.1 \times 10.7 \mu\text{m}$ and an average of 3.6 septa. M11 in turn showed larger conidia, $13.3 \times 84.4 \mu\text{m}$ and an average number of 16.6 septa. These characteristics are consistent with fungi of the genus *Cercospora*. Andrade (2016), reports that he found a wide variation in the size of *Cercospora* spp. conidia on cucurbits, with width measurements 4 to 8 μm and length ranging from 40 to 216 μm . The number of septa found in the author study ranged from 3 to 20 and varied in shape. Similar results were also found by Queiroz et al. (2020), in conidia of *C. apii* that were 2.5 to 4 μm width and 92 to 210 μm length.

After morphological characterization, the data related to mycelial growth (FCD, MGR) and sporulation (conidia size: width and length, number of septa, and sporulation) were submitted to the UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) grouping method, and through the generated dendrogram, the isolates were grouped into three groups by the similarity between the averages of the characters, based on these, molecular identification and the pathogenicity test of two isolates per group were performed (Table 3).

Table 3. Groups of *Cercospora* spp. isolates obtained from strawberry leaves, based on the UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) grouping method.

Group	Isolate
1	M10, M13*, M11* e M12
2	M6*, M4, M5, M8* e M9
3	M7*, M1, M2* e M3

*Isolates used for pathogenicity testing and molecularly identified.

Pathogenicity test

Isolates M2, M6, M7, M8, M11, and M13 of *Cercospora* spp. were pathogenic to strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) leaves. The first symptoms observed were small circular spots, initially light brown in color with a yellowish halo (Figure 2C). At the end of the test, the leaves had brown to purple spots and cream to whitish-colored lesion centers (Figure 2D), with an average lesion diameter ranging from 2.52 to 3.08 mm among isolates. The incidence of the disease was 100%, since all inoculated sites had a lesion. Leaves that were inoculated with culture medium alone showed no symptoms.

Chai et al. (2021) observed similar symptoms on leaves of *Abelmoschus esculentus* when infected by *Cercospora* cf. *flagerallis*. These symptoms are characteristic of the genus *Cercospora*, due to the ability of some species to produce a metabolite called cercosporin, which is toxic to plants and responsible for the purple coloration of leaves (Santos, 2015).

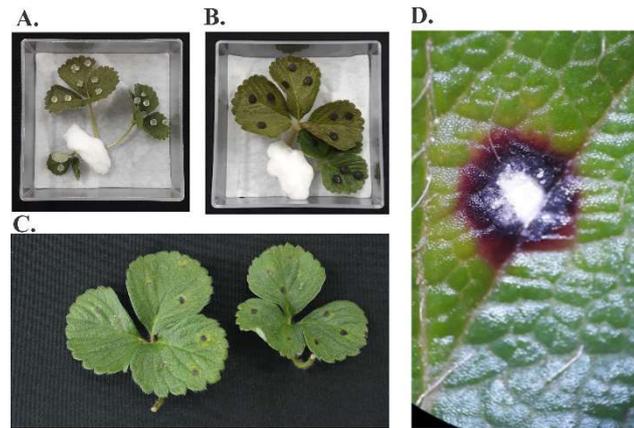


Figure 2. Witness with discs of culture medium without the pathogen (A), isolate M6 on strawberry leaves (B), lesions after 15 days of incubation with isolate M6 (C), and lesion caused by *Cercospora* spp. (D).

Molecular characterization

The ITS (internal transcribed spacer) regions of rDNA and the partial calmodulin gene (CAL) were inconclusive for all isolates and therefore will not be presented. Figures 3 and 4 represent the phylogenetic trees obtained by aligning isolates M2, M6, M7, M8, M11, and M13 with the actin (ACT) region (Figure 3) and elongation factor 1-alpha (Tef-1) (Figure 4) sequences of *Cercospora* isolates from the GenBank database.

Only isolates M2 and M6 were identified as *C. kikuchii*, as they were allocated in a distinct clade with *C. kikuchii* isolates with bootstrap support value of 96% for ACT region and 84% for Tef-1. For the ACT and Tef-1 region, isolates M7, M8, M11 and M13 were grouped into clades with species sequences of *C. cf. flagerallis*, *C. cf. brunkei* and *C. armoraciae*, *C. zebrina*, *C. nicotianae*, and *Cercospora* sp. species identification was inconclusive. However, it can be said that they belong to the genus *Cercospora*. *C. kikuchii* is known as the causal agent of *Cercospora* leaf spot on leaves and purple spot on soybean (*Glycine max*) seeds. Recent studies have confirmed that these diseases are caused by a complex of different *Cercospora* species, including: *C. kikuchii*, *C. cf. flagellaris*, *C. cf. sigesbeckiae*, and *C. nicotianae* (Soares et al., 2015; Albu et al., 2016). Therefore, isolates with inconclusive identification may form a complex of species that cause cercosporiosis on strawberry.

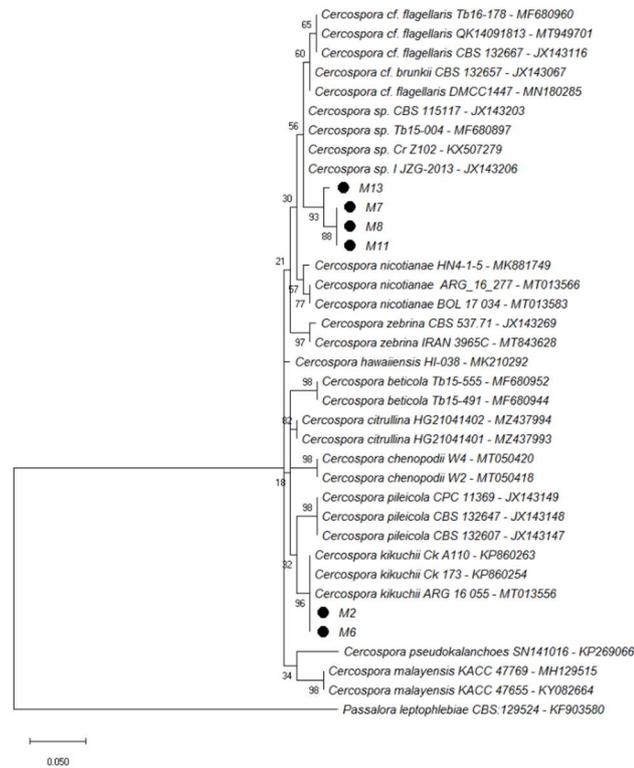


Figure 3. Phylogenetic tree obtained from the actin gene sequence (ACT) of isolates of *Cercospora* spp. associated with strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) leaves, showing the phylogenetic relationships among species according to the Maximum Likelihood statistical method, with the Kimura 2-parameter model. The numbers on the branches indicate the percentage of bootstrap analysis replicates in which the replicates were observed (1000 replicates).

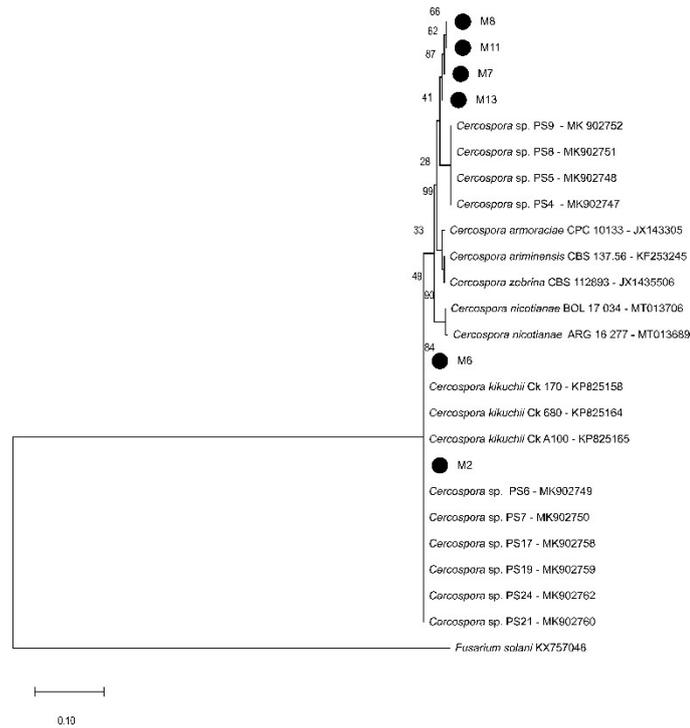


Figura 4. Phylogenetic tree obtained from the sequence of the elongation factor 1-alpha gene of isolates of *Cercospora* spp. associated with strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) leaves, showing the phylogenetic relationships among species according to the Maximum Likelihood statistical method, with the Kimura 2-parameter model. The numbers on the branches indicate the percentage of bootstrap analysis replicates in which the replicates were observed (1000 replicates).

Table 4 shows the accession codes of *Cercospora* spp. isolates deposited in Genbank for the actin and elongation factor 1-alpha regions.

Table 4. Genbank accession codes of *Cercospora* spp. isolates for the actin (ACT) and elongation factor 1-alpha (Tef-1) regions

Isolate	Species	Region	
		ACT	Tef-1
M2	<i>C. kikuchii</i>	ON950243	ON975037
M6	<i>C. kikuchii</i>	ON950731	ON989006
M7	<i>Cercospora</i> sp.	ON960074	ON994187
M8	<i>Cercospora</i> sp.	ON972466	ON995107
M11	<i>Cercospora</i> sp.	ON960047	OP038545
M13	<i>Cercospora</i> sp.	ON972438	OP004917

Morphophysiological characterization

For morphophysiological characterization on different culture media, isolates M6 and M11 were selected, due to their distinct characteristics, such as FCD, sporulation, and conidia size on PDA medium.

On the different culture media tested, the isolates showed distinct behaviors regarding FCD, sporulation, and the production of cercosporin. However, the V8 juice medium provided the best development conditions for M6 and M11, getting a FCD of 47.39 and 56.03 mm, respectively. As for sporulation it was 1.12×10^5 conidia mL⁻¹ for M6 and 5.06×10^4 conidia mL⁻¹ for M11 (Table 5).

Table 5. Mycelial growth and sporulation of *Cercospora* spp. on different culture media.

Isolate	Medium					
	CAR		MALT		V8	
	FCD (mm)	Esp. con. mL ⁻¹	FCD (mm)	Esp. con. mL ⁻¹	FCD (mm)	Esp. con. mL ⁻¹
M6	44.82	6.25×10^3	45.16	5.94×10^4	47.39	1.12×10^5
M11	51.47	1.50×10^4	51.45	6.56×10^4	56.03	5.06×10^4

CAR - carrot culture medium; MALT - malt type culture medium; V8 - vegetable juice culture medium; FCD - final colony diameter.

Production of cercosporin was observed in both isolates of *Cercospora* spp. with the V8 medium providing the highest production of the toxin (Figure 5). This may be related to the composition of the medium, which is rich in micronutrients, and also to the ability of each isolate to metabolize the toxin, since not all *Cercospora* species produce the toxin (Świdarska et al., 2020).

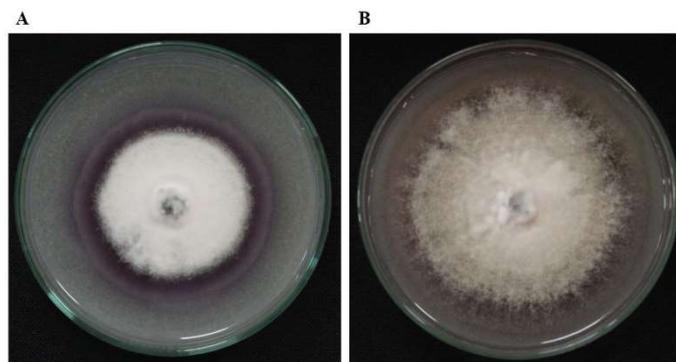


Figure 5. Production of cercosporin in V8 culture medium. Colony of isolate M6 (*C. kikuchii*) on V8 culture medium (A), and colony of isolate M11 (*Cercospora* spp.) on V8 culture medium (B).

The V8 juice medium is a rich carbohydrate medium, because its composition includes different types of vegetables rich in sugars. Thus, it is considered a medium that provides good mycelial growth and sporulation of different species of the genus *Cercospora* (Hanada et al., 2002; Beckman & Payne, 1983). Ramírez et al. (2019) in a recent study, evaluating the sporulation of cercosporoid fungi with different culture media, reported that media composed with V8 juice provided the best conditions for sporulation of isolates of *Cercospora* sp. and *Pseudocercospora fumosa*, corroborating with the results obtained in the present study. Therefore, the culture medium with vegetable juice can be used for the development of new studies involving *Cercospora* isolates, as it provided the best conditions for growth, sporulation, and cercosporin production.

Conclusions

The isolates were pathogenic to *Fragaria × ananassa* Duch. cv. Camarosa, morphologically, on PDA medium, the colonies showed slow growth with aerial mycelium of pinkish to grayish color.

The morphological characteristics are similar to those described for the identification of cercosporid fungi, which was confirmed by molecular characterization.

Cercospora in strawberry is caused by a complex of species of the genus *Cercospora*, among them *C. kikuchii*.

The culture medium with vegetable juice provided the best condition for growth, sporulation, and cercosporin production of *Cercospora* sp. isolates.

Acknowledgments

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Brazil) for granting a productivity scholarship to Muniz, M. F.B. and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Brazil) for granting a scholarship to the first author.

Compliance with Ethical Standards

Author contributions: Conceptualization: JR TK, MFBM; Data curation: JR TK, TP, LGS; Formal analysis: JR TK, MFBM; Investigation: JR TK, MFBM, LGS, VSF, TP, IGV;

Methodology: JR TK, MFBM; Project administration: JR TK, MFBM; Resources: JR TK, MFBM; Supervision: JR TK, MFBM; Validation: JR TK, MFBM, VSF; Visualization: JR TK, IGV; Writing - original draft: JR TK; Writing - review & editing: MFBM, LGS.

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

Financing source: The Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Finance Code 001, and the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Literature Cited

Albu, S.; Schneider, W.; Price, P. P.; Doyle, V. P. *Cercospora* cf. *flagellaris* and *Cercospora* cf. *sigesbeckiae* are associated with *Cercospora* leaf blight and purple seed stain on soybean in North America. *Phytopathology*, v.106, n.11, p.1376-1385, 2016. < <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-15-0332-R>>

Andrade, K. M. Caracterização de fungos cercosporóides associados à vegetação de Mata Atlântica e cercanias no Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2016. 136p. Dissertação mestrado.

Antunes, L. E. C.; Bonow, S.; Lima, R. H. de, Costa, H.; Paulus, G.; Ries, J. Morango: produção aumenta ano a ano. *Campo & Negócios*, p.87–90, 2021.

Beckman, P.M.; Payne, G.A. Cultural techniques and conditions influencing growth and sporulation of *Cercospora zeaе maydis* and lesion development in corn. *Phytopathology*, v.73, n.2, p.286-289, 1983. < https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1983Articles/Phyto73n02_286.pdf> 05 Jul. 2022.

Chai, A. L.; Zhao, X. J. L.; Shi, Y. X.; Xie, X. W.; Li, L.; Li. B. J. First report of *Cercospora* leaf spot caused by *Cercospora* cf. *flagerallis* on Okra in China. *Plant disease*, v.105, n.7, p.2018, 2021. < <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2155-PDN>>

Doyle, J. J.; Doyle, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, n.1, p.13-15, 1991.

FAOSTAT. World production of strawberries. < <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>> 2020. 15 abr. 2022.

Fernandes, M. R. Manual para laboratório de fitopatologia. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993. 128 p. (Embrapa-CNPT. Documentos, 6). <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/815639> . 10 Jun. 2021.

Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, v.41, n.41 p. 95-98, 1999.

Hanada, R.E.; Gasparotto, L.; Pereira, J.C.R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.27, n.2, p.170-173, 2002. < <https://doi.org/10.1590/S0100-41582002000200008>>

Krahn, J. R. T.; Muniz, M. F. B.; Poletto, T.; Fantinel, V. S.; Quevedo, A. C.; Strahl, M. A.; Couto, L. F. da S. C.; Rabuske, J. E.; Silva, J. C. P. da. First report of *Cercospora* cf. *malloti* causing brown eyespot on strawberry in Brazil. Plant Disease, v. 00, n. 00, 2022. < DOI: [10.1094/PDIS-10-21-2385-PDN](https://doi.org/10.1094/PDIS-10-21-2385-PDN)>

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Noya, Z, C., Tamura, K. Mega X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, v. 35, n. 6, p.1547-1549, 2018. <[10.1093/molbev/msy096](https://doi.org/10.1093/molbev/msy096)>

Li, M.; Hu, M. J.; Gao, Z. Y.; Hong, X. Y.; Zhao, C.; Zhang, S. G. First report of *Cercospora* cf. *citulina* causing leaf spot of *Ipomoea pes-caprae* na China. Plant disease, v.105, n.4, p.1203, 2021. < <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-1081-PDN>>

Madail, J. C. M. Panorama econômico In: Antunes, L. E. C.; Reisser, C. J.; Schwengber, J. E.(Org.). Morangueiro. Brasília: Embrapa, 2016. v.1, p. 17-33.

Munsell Color. Munsell soil color charts. New Windsor: Macbeth Division of Kollinorgen Instruments Corporation, 2009.

Poletto, T. Patossistema *Colletotrichum* spp. x *carya illinoensis*, caracterização e controle. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2022. 144p. Tese doutorado.

Pittner, E.; Piva, R.; Santos, J. C. dos.; Santos, L. A. dos.; Faria, C. M. D. R. Análise do desenvolvimento de *Cercospora beticola* frente ao fungicida tebuconazol. Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science, v. 9, n. 3, p.53-60, 2016.

Ramírez, G. H.; Anderson, F. E.; Bianchinotti, M. V. Induction of sporulation of cercosporoid pathogens of moth vine (*Araujia hortorum*). New Zealand Journal of Botany, v. 53, n. 3, p. 179-187, 2019. < <https://doi.org/10.1080/0028825X.2019.1578244>>

Rosa, R. C. T.; Menezes, M. Caracterização patogênica, fisiológica e morfológica de *Pseudocercospora musae*. Fitopatologia Brasileira, v. 26, n. 2, p.141-147, 2001. < <https://doi.org/10.1590/S0100-41582001000200004>>

Queiroz, M. F.; Ferreira, B. W.; Nobrega, T. F.; Barreto, R. W. First report of *Cercospora apii* sensu lato 'sp. h' causing leaf spot on Geranium (*Pelargonium × hortorum*) in Brazil. Plant disease, v.104, n.12, p.3265, 2020. < <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-1114-PDN>>

Rosa, H. T.; Streck, N.A.; Walter, L. C.; Andriolo, J. L.; Silva, M. R. Crescimento vegetativo e produtivo de duas cultivares de morango sob épocas de plantio em ambiente subtropical. *Revista Ciência Agronômica*. v.44, n.3, 2013. < <https://doi.org/10.1590/S1806-66902013000300024>>

Santos, A. da Silva. Caracterização morfológica de *Cercospora* e eficiência da toxina cercosporina na seleção de genótipos de pimenteiros ornamentais. Areia: Universidade Federal da Paraíba, 2015. 71p. Tese doutorado.

Soares, A. P. G.; Guillin, E. A.; Borges, L. L.; Silva, A. C. T.; Almeida, A. M. R.; Grijalba, P. E.; Gottlieb, A. M.; Bluhm, B. H.; Oliveira, L. O. de. More *Cercospora* species infect soybeans across the Americas than meets the eye, *PLoS ONE*, v.10, n.8, 2015. < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133495>>

4 CAPÍTULO 3: *Trichoderma* spp. NO BIOCONTROLE DE *Cercospora* spp. EM *Fragaria X ananassa* DUCH.

Resumo:

O gênero fúngico *Trichoderma* spp. têm apresentado potencial para o controle de fitopatógenos, pois secreta compostos capazes de inibir ou impedir o desenvolvimento desses, sendo uma alternativa para o controle biológico de doenças em plantas. Recentemente, *Cercospora* spp. foram relatados como agentes causais da cercosporiose em morangueiro e assim, o presente estudo objetivou avaliar a ação antagônica “in vitro” e “in vivo” de dois isolados de *Trichoderma*, um da espécie *T. asperellum* e outro de *T. harzianum* e dos seus filtrados de cultura no controle de *Cercospora* spp. em *Fragaria x ananassa* Duch. Os testes “in vitro” foram de confrontação direta por pareamento de culturas e metabólitos voláteis, onde avaliou-se a inibição do crescimento micelial e o antagonismo segundo a escala de Bell et al. (1982) e também, a produção de filtrados de cultura para avaliação do potencial biocontrolador por metabólitos não voláteis. Também realizou-se a identificação dos metabólitos voláteis presentes no filtrado de cultura de *Trichoderma* spp. O teste “in vivo” consistiu na aplicação preventiva de organismo vivo de *Trichoderma* e/ou filtrado de cultura de diferentes formas, a fim de reduzir a severidade de *Cercospora* spp., em plantas de morangueiro. Avaliou-se a severidade de doença para determinação da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). A comparação das médias nos testes “in vitro” foi pelo teste de Tukey, e no teste “in vivo” por Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro, com o software SISVAR 5.3. De modo geral, nos resultados dos testes “in vitro”, ambos os isolados de *Trichoderma* spp. inibiram o crescimento micelial de *Cercospora* spp. Identificou-se a presença de ácidos graxos e demais compostos orgânicos nos filtrados de cultura de *Trichoderma* spp. O uso de forma preventiva de organismo vivo e/ou filtrados de cultura de *T. asperellum* ou *T. harzianum* em plantas de morangueiro, reduziu a severidade de *Cercospora* spp. Os isolados de *Trichoderma* spp. apresentam potencial biocontrolador à *Cercospora* spp. e podem ser utilizados em programas de controle biológico.

Palavras-chave: severidade da doença; ácidos graxos; antagonismo; filtrados de cultura

***Trichoderma* spp. IN THE BIOCONTROL OF *Cercospora* spp. EM *Fragaria X ananassa* DUCH.**

Abstract

Fungi of the genus *Trichoderma*, have shown potential for the control of phytopathogens, as they secrete compounds capable of inhibiting or preventing their development, being an alternative for the biological control of plant diseases. Fungi of the genus *Cercospora* spp. were reported as causal agents of brown eye spot in strawberry and thus, the present study aimed to evaluate the "in vitro" and "in vivo" antagonistic action of two *Trichoderma* isolates, one of the species *T. asperellum* and another of *T. harzianum* and its culture filtrates in the control of *Cercospora* spp. in *Fragaria x ananassa* Duch. The "in vitro" tests were direct confrontation by pairing of cultures and volatile metabolites, where the inhibition of mycelial growth and antagonism were evaluated according to the scale by Bell et al. (1982) and also the production of culture filtrates to evaluate the biocontrol potential of non-volatile metabolites. The volatile metabolites present in the culture filtrate of *Trichoderma* spp. The "in vivo" test consisted of the preventive application of a live *Trichoderma* organism and/or culture filtrate in different ways, in order to reduce the severity of *Cercospora* spp., in strawberry plants. Disease severity was evaluated to determine the area under the disease progress curve (AUDPC). Comparison of means in the "in vitro" tests was performed using the Tukey test, and in the "in vivo" test, using the Skott-Knott test at 5% error probability, with the SISVAR 5.3 software. In general, in the results of the "in vitro" tests, both isolates of *Trichoderma* spp. inhibited the mycelial growth of *Cercospora* spp. The presence of fatty acids and other organic compounds was identified in the culture filtrates of *Trichoderma* spp. The preventive use of live organisms and/or culture filtrates of *T. asperellum* or *T. harzianum* in strawberry plants reduced the severity of *Cercospora* spp. *Trichoderma* spp. present biocontrol potential to *Cercospora* spp. and can be used in biological control programs.

Keywords: disease severity; fatty acids; antagonism; culture filtrates

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Cercospora* é considerado um dos maiores e mais heterogêneos dentro da classe dos fungos Hyphomycetes, tendo diversas espécies já relatadas como agentes causais de doenças. Na maioria das vezes, essas são causadoras de manchas foliares, mas também podem causar lesões em flores, frutos, brácteas, sementes e pedicelos de diferentes plantas de interesse agrícola (CHUPP, 1954).

Cercospora kikuchii é conhecida como agente causal da Cercosporiose em folhas e da mancha púrpura em sementes de soja (*Glycine max*). Estudos recentes confirmaram que essas doenças são causadas por um complexo de diferentes espécies de *Cercospora*, entre elas: *C. kikuchii*, *C. cf. flagellaris*, *C. cf. sigesbeckiae* e *C. nicotianae* (SOARES et al., 2015; ALBU et al., 2016). *Cercospora kikuchii* e outras espécies do mesmo gênero foram relatadas como agentes causais da Cercosporiose em morangueiro, os quais causam pequenas manchas circulares, inicialmente, de cor marrom claro com halo amarelado e com o avançar da doença passam de marrom a púrpura com centro da lesão de coloração creme a esbranquiçada (KRAHN et al., 2022a; KRAHN et al., 2022b).

A doença causa a redução de área fotossintética das folhas e, conseqüentemente, redução na produtividade da planta. Dessa forma, é necessário que se faça o controle da mesma a fim de evitar prejuízos à produção e a disseminação da doença. Uma das alternativas é o controle biológico de doenças por ser uma forma segura, eficaz e que atende aos requisitos de protocolo de certificações no mercado internacional (MEYER et al., 2019). Diferentes gêneros de fungos, bactérias e leveduras são estudados quanto ao seu potencial antagônico e a sua utilização no controle de doenças e pragas. Fungos do gênero *Trichoderma* têm apresentado potencial para o controle de fitopatógenos e para a promoção do crescimento vegetal, pois secretam compostos ou metabólitos que são capazes de inibir ou impedir o desenvolvimento de patógenos (MACHADO et al., 2012; MARQUES et al., 2018).

Diferentes espécies de *Trichoderma* spp. possuem capacidade de produzir metabólitos secundários, que podem ser diferentes de uma espécie para outra e entre isolados da mesma espécie (VINALE et al., 2014). Em filtrados de cultura de *Trichoderma* spp. é relatada a presença de ácidos graxos, como o linoleico e oleico,

que em contato com a membrana celular de fungos desempenham ação antifúngica (POHL; KOCK; THIBANE, 2011).

O uso de organismos vivos e de filtrados de cultura de *Trichoderma* spp. sobre plantas de feijoeiro, via aplicação foliar e tratamento de sementes, propiciou maior comprimento de raízes e isso está relacionado à produção de metabólitos que interferem no índice mitótico, estimulando a divisão celular das raízes, e assim, promovendo o crescimento das mesmas (AGUIAR et al., 2015; SARZI, 2019). Marques et al. (2018) utilizando filtrados de cultura de diferentes espécies de *Trichoderma* no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, observaram a produção de metabólitos não voláteis capazes de inibir o crescimento micelial do patógeno, processo denominado de antibiose.

Além da capacidade de *Trichoderma* spp. em controlar diretamente o crescimento de fitopatógenos, há indícios de que também podem induzir resistência sistêmica e localizada a diversos patógenos (YEDIDIA et al., 2001). Isto pode ser devido à presença de enzimas como quitinase e β -1,3-glucanase, que por estarem diretamente ligadas a mecanismos de defesa da planta, são responsáveis pelo processo de degradação de componentes estruturais da parede celular dos fungos fitopatogênicos, como quitina e glucanas (JUNGES, 2016; PANDIAN; RAJA; SHARMA, 2018). Assim, o presente estudo objetivou avaliar a ação “in vitro” e “in vivo” de dois isolados de *Trichoderma*, um da espécie *T. asperellum* e outro de *T. harzianum* e dos seus filtrados de cultura no controle da Cercosporiose em *Fragaria X ananassa* Duch.

O uso de organismos vivos e de filtrados de cultura de *Trichoderma* spp. sobre plantas de feijoeiro, via aplicação foliar e tratamento de sementes, propiciou um maior comprimento de raízes e isso está relacionado a produção de metabólitos que interferem no índice mitótico, estimulando a divisão celular das raízes, e assim, promovendo o crescimento das mesmas (AGUIAR et al., 2015; SARZI, 2019). Marques et al. (2018) utilizando filtrados de cultura de diferentes espécies de *Trichoderma* no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, observaram a produção de metabólitos não voláteis capazes de inibir o crescimento micelial do patógeno, processo denominado de antibiose.

Além da capacidade de *Trichoderma* spp. em controlar diretamente o crescimento de fitopatógenos, há indícios de que também podem induzir resistência

sistêmica e localizada a diversos patógenos (YEDIDIA et al., 2001). Isto pode ser devido a presença de enzimas como quitinase e β -1,3-glucanase, que por estarem diretamente ligadas a mecanismos de defesa da planta, são responsáveis pelo processo de degradação de componentes estruturais da parede celular dos fungos fitopatogênicos, como quitina e glucanas (JUNGES, 2016; PANDIAN; RAJA; SHARMA, 2018). Assim, o presente estudo objetivou avaliar a ação “in vitro” e “in vivo” de dois isolados de *Trichoderma*, um da espécie *T. asperellum* e outro de *T. harzianum* e dos seus filtrados de cultura no controle da Cercosporiose em *Fragaria X ananassa* Duch.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados de *Cercospora* spp. utilizados neste experimento são oriundos de folhas de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) com sintomas de Cercosporiose, obtidos em estudos anteriores (KRAHN et al, 2022), assim como os de *Trichoderma* spp. (KRAHN, 2017). Os isolados encontram-se armazenados na Micoteca do Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi da Universidade Federal de Santa Maria e estão devidamente cadastrados no SISGEN e no Genbank (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Cercospora* spp e *Trichoderma* spp. utilizados nos testes de antagonismo.

Isolado	SisgGen ¹	GenBank ²		Espécie	Município	Coordenadas
		ACT ³	Tef-1 ⁴			
M2	A57AE19	ON950243	ON975037	<i>C. kikuchii</i>	Ijuí - RS	28°22'06.6"S 53°58'30.0"W
M6	A57AE19	ON950731	ON989006	<i>C. kikuchii</i>	Santa Maria - RS	29°43'19.6"S 53°43'04.6"W
M7	A57AE19	ON960074	ON994187	<i>Cercospora</i> sp.	São João do Oeste - SC	27°05'49.6"S 53°35'25.9"W
M8	A57AE19	ON972466	ON995107	<i>Cercospora</i> sp.	Santa Maria - RS	29°38'57.2"S 53°55'04.5"W
M11	A57AE19	ON960047	OP038545	<i>Cercospora</i> sp.	Santa Maria - RS	29°38'57.2"S 53°55'04.5"W
M13	A57AE19	ON972438	OP004917	<i>Cercospora</i> sp.	Paraíso do Sul - RS	29°45'01.3"S 53°03'42.1"W
		Tef-1 ⁴				
IVCT1	A6F94OE	MN329691		<i>T. asperellum</i>	Montenegro - RS	29°41'21"S 51°25'1"W
IST1	A6F94OE	MN128943		<i>T. harzianum</i>	Montenegro - RS	29°41'21"S 51°25'1"W

Fonte: Autor

¹ Código de acesso ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado do Brasil; ² Código de acesso ao banco de dados do GenBank; ³ Gene da Actina utilizado para identificação de *Cercospora* sp.; ⁴Gene do fator de alongação 1-alfa utilizado para a identificação de *Cercospora* sp. e *Trichoderma* sp.

O inóculo de cada isolado de *Cercospora* spp. e de *Trichoderma* spp., necessário para realização dos testes, foi obtido pelo cultivo em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubados à temperatura de 25 ± 2 °C, com 12h de fotoperíodo, por 15 dias e oito dias, respectivamente.

2.2 AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp. à *Cercospora* spp.

Para a avaliação do antagonismo pelo teste da cultura pareada, foram utilizados discos de meio de cultura BDA com 6 mm de diâmetro, contendo estruturas de *Cercospora* spp., retirados da zona de crescimento de colônias e transferidos para a borda das placas de Petri com 80 mm de diâmetro, contendo também meio BDA. As placas foram mantidas a 25 ± 2 °C, com 12h de fotoperíodo, em incubadora climatizada, por 48h. Após esse período, um disco de meio BDA de 6 mm de diâmetro, contendo estruturas de *Trichoderma* spp., foi transferido para a posição oposta aos discos de micélio contendo *Cercospora* spp. nas placas de Petri. Os tratamentos testemunhas foram compostos por placas de Petri contendo apenas *Cercospora* spp. e mantidas incubadas nas mesmas condições.

Para verificar a inibição do crescimento do patógeno pelos compostos voláteis produzidos pelo antagonista foi utilizado o teste de placas sobrepostas (BOMFIM et al., 2010). Discos com meio de cultura BDA com 6 mm de diâmetro contendo micélio de *Cercospora* spp. e de *Trichoderma* spp. foram inoculados separadamente em meio de cultura BDA, sendo dispostos no centro das placas de Petri. Após 24h de desenvolvimento dos isolados de *Cercospora* spp., as placas foram sobrepostas às do antagonista e unidas lateralmente por parafilme. As placas foram mantidas a 25 ± 2 °C, com 12h de fotoperíodo, em incubadora climatizada, por um período de oito dias. Os tratamentos testemunhas foram compostos por placas de Petri contendo apenas *Cercospora* spp. e mantidas incubadas nas mesmas condições.

A avaliação do antagonismo, em ambos os testes, ocorreu no oitavo dia após a transferência de *Trichoderma* spp. para as placas, pela medição do crescimento micelial das colônias de *Cercospora* spp., utilizando-se um paquímetro digital. Os

dados do oitavo dia de medição foram utilizados para calcular o percentual de inibição do crescimento micelial dos isolados de acordo com a expressão proposta por Badawy et al. (2014). O antagonismo no teste de culturas pareadas também foi avaliado segundo a escala de Bell, com notas que variam de 1 a 5, onde: 1 – antagonista cresce e ocupa toda placa; 2 – antagonista cresce sobre 2/3 da placa; 3 – antagonista e patógeno crescem até metade da placa; 4 – patógeno cresce sobre 2/3 da placa; 5 – patógeno cresce por toda placa (BELL, WELLS e MARKHAM, 1982).

Cada tratamento foi composto por cinco repetições em análise fatorial 3x6 (Antagonista: dois isolados de *Trichoderma* spp. e ausência de *Trichoderma* spp. x Patógeno: seis isolados de *Cercospora* spp.) e delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey utilizando o *software* SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011).

2.3 CONTROLE DE *Cercospora* spp. “IN VITRO” E “IN VIVO” COM *Trichoderma* spp.

2.3.1 Produção de filtrados de cultura de *Trichoderma* spp.

Para a produção do filtrado de cultura de *Trichoderma* spp. foi realizado o processo de fermentação submersa, conforme metodologia de Junges (2016). Foram utilizados Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura líquido, composto por água destilada, 50 g.L⁻¹ de sacarose, 20 g.L⁻¹ de água de maceração de milho, 7.5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 10 mL.L⁻¹ de suspensão de esporos de cada isolado de *Trichoderma* spp. com concentração de 1 x 10⁵ conídios mL⁻¹ e pH 5. A incubação foi realizada em shaker (Tecnal® shakermodel TE-420) a 28 °C, por 96h, com agitação de 100 rpm. Após a produção do caldo fermentado foi realizada a filtragem em membranas milipore® de 11 e 0,22 micras com auxílio de bomba de vácuo, removendo a biomassa fúngica.

A determinação da massa seca da biomassa fúngica foi realizada a partir dos resíduos da primeira filtragem, obtidos em membrana milipore® de 11 micras, as amostras foram depositadas em placas de Petri, e transferidas para estufa a 105 °C durante 24h (KLAIC, 2014). Decorrido o tempo, realizou-se a pesagem das placas e foi determinada a massa seca de cada amostra.

2.3.2. Metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. na inibição do crescimento micelial de *Cercospora* spp.

Para a avaliação do efeito inibitório de metabólitos não voláteis e enzimas produzidas pelos isolados de *Trichoderma* spp. na fermentação submersa, foi utilizada a metodologia descrita por Furlani et al. (2007) com modificações.

Após os isolados de *Trichoderma* spp. passarem pelo processo de fermentação e filtragem, originaram o filtrado de cultura com a presença de metabólitos e enzimas, o qual foi incorporado ao meio BDA na proporção de 10 mL do filtrado de cultura para cada 100 mL de meio BDA. Após a solidificação do meio, foi depositado, no centro de cada placa, um disco de seis mm de diâmetro de estruturas de cada um dos isolados de *Cercospora* spp. com 15 dias de crescimento em meio BDA. Para o tratamento testemunha, foi depositado um disco de mesmo diâmetro do fitopatógeno, em meio de cultura BDA, sem a presença do filtrado de cultura na placa. As placas foram incubadas em câmara climatizada a $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ com fotoperíodo de 12h durante 15 dias, após foi avaliado o crescimento micelial do patógeno por meio da mensuração do diâmetro da colônia em dois sentidos opostos, determinando-se a média do crescimento micelial para posterior cálculo do percentual de inibição do crescimento micelial conforme Badawy et al. (2014).

Cada tratamento foi composto por cinco repetições em análise fatorial 3x6 (Antagonista: dois isolados de *Trichoderma* spp. e ausência de *Trichoderma* spp. x Patógeno: seis isolados de *Cercospora* spp.) e delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey utilizando o *software* SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011).

2.3.3 Identificação de metabólitos voláteis presentes em filtrado de cultura de *Trichoderma* spp.

2.3.3.1. Procedimento de extração

Uma alíquota de 10 mL dos filtrados de cultura de *T. asperellum* e *T. harzianum*, devidamente filtrada, foi adicionada à 50 mL dos solventes orgânicos, etanol, metanol, acetato de etila e hexano. As soluções permaneceram em agitação

constante em temperatura ambiente, acopladas a condensador por 24h. Decorrido este período foram colocadas para precipitar em tubo de ensaio por 24 h (etanol e metanol) e 2 h (acetato de etila) e 1 h (hexano). O sobrenadante foi acondicionado em refrigerador para análises (SARZI, 2019).

2.3.3.2 Equipamentos e procedimento para cromatografia gasosa

As amostras foram analisadas em um sistema GC-Q / MS. Para isso, utilizou-se um autoamostrador tipo injetor da série AOC-20is (Shimadzu, Kyoto, Japão), o cromatógrafo a gás do modelo GC-2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japão) e o espectrômetro de massa do modelo GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Kyoto, Japão). Utilizou-se uma coluna de sílica fundida Rtx®-5ms GC (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 micron de espessura de filme) com 5% de difenil e 95% de dimetil polisiloxano (Restek Corporation, Bellefonte, PA, EUA). O gás Hélio foi utilizado para o transporte a uma vazão de 1,69 mL.min⁻¹ para as amostras dissolvidas em acetato de etila e hexano e 1,33 mL.min⁻¹ para as amostras dissolvidas em metanol e etanol. Para todas as amostras a temperatura de injeção foi mantida a 270 °C.

Um volume de 1 µL de cada amostra foi injetado com uma razão de separação de 1:10. Para as amostras dissolvidas em acetato de etila e hexano, a temperatura do forno foi aumentada de 50 °C para 280 °C a uma taxa de 5 °C.min⁻¹, e mantida por 15 min. Para as amostras dissolvidas em metanol e etanol, a temperatura do forno foi aumentada de 100 °C para 310 °C a uma taxa de 5 °C.min⁻¹, e mantida por 15 min. A temperatura da interface para todas as amostras foi mantida a 280 °C e a temperatura da fonte de íons a 280 °C. Os espectros de massa foram registrados ao longo de 35-500 amu, a 0,30 scan/s para as amostras dissolvidas em acetato de etila e hexano e acima de 35-700 amu, a 0,30 scan/s para as amostras dissolvidas em metanol e etanol. Os voláteis foram identificados por espectrômetro de massa quadrupolo com o modo de impacto de elétrons (EI) gerado a 70 eV no modo de aquisição de varredura. A identificação de componentes individuais foi feita usando os seus índices de retenção relativos com o Registro Wiley de Dados Espectrais de Massa (Palisade Corporation, Newfield, NY).

2.3.4 Ação “in vivo” de *Trichoderma* spp. no controle de *Cercospora* spp. em morangueiro.

O experimento de controle “in vivo” de *Cercospora* spp. em morangueiro foi realizado em casa de vegetação no Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria, no período de julho a dezembro de 2021. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em fatorial 7x2 (Antagonista: dois isolados de *Trichoderma* spp., três formas de aplicação para cada isolado: organismo vivo via substrato, filtrado de cultura via foliar, organismo vivo via substrato mais filtrado de cultura via foliar e, ausência de *Trichoderma* spp. x Patógeno: dois isolados de *Cercospora* spp. via foliar). Cada tratamento foi composto por cinco repetições, em que cada planta representou uma unidade experimental. Foram transplantadas mudas de morangueiro da cultivar Camarosa para vasos de 1 L, contendo substrato próprio para a cultura. A adubação foi realizada pelo fornecimento de solução nutritiva duas a três vezes na semana, após o estabelecimento.

Os tratamentos consistiram na combinação de *Trichoderma* spp. em três formas de aplicação: organismo vivo, filtrado de cultura, ambos aplicados de forma isolada, ou organismo vivo mais filtrado de cultura de forma combinada, aplicados antes da inoculação do patógeno. A aplicação do organismo vivo foi realizada na forma de suspensão de esporos, via substrato, e o filtrado de cultura por meio de aplicação foliar. Foram utilizados os isolados patogênicos de *Cercospora* spp. (M6 e M11) e os isolados de *Trichoderma* spp. (IVCT1 e IST1), sendo das espécies *T. asperellum* e *T. harzianum*, respectivamente. A composição dos tratamentos é apresentada na tabela 2.

Tabela 2. Composição dos tratamentos de acordo com a formulação do antagonista e o isolado patogênico.

Tratamento	Formulação do antagonista	Isolado patogênico
1	Ausência de <i>Trichoderma</i> spp.	M6: <i>Cercospora kikuchii</i>
2	Filtrado de cultura via foliar – IVCT1 ¹	M6: <i>Cercospora kikuchii</i>
3	Filtrado de cultura via foliar - IST1 ²	M6: <i>Cercospora kikuchii</i>
4	Organismo vivo via substrato - IVCT1	M6: <i>Cercospora kikuchii</i>
5	Organismo vivo via substrato - IST1	M6: <i>Cercospora kikuchii</i>
6	Filtrado de cultura via foliar - IVCT1 + Organismo vivo via substrato - IVCT1	M6: <i>Cercospora kikuchii</i>
7	Filtrado de cultura via foliar - IST1 + Organismo vivo via substrato - IST1	M6: <i>Cercospora kikuchii</i>

8	Ausência de <i>Trichoderma</i> spp.	M11: <i>Cercospora</i> sp.
9	Filtrado de cultura via foliar – IVCT1	M11: <i>Cercospora</i> sp.
10	Filtrado de cultura via foliar - IST1	M11: <i>Cercospora</i> sp.
11	Organismo vivo via substrato - IVCT1	M11: <i>Cercospora</i> sp.
12	Organismo vivo via substrato - IST1	M11: <i>Cercospora</i> sp.
13	Filtrado de cultura via foliar - IVCT1 + Organismo vivo via substrato - IVCT1	M11: <i>Cercospora</i> sp.
14	Filtrado de cultura via foliar - IST1 + Organismo vivo via substrato - IST1	M11: <i>Cercospora</i> sp.

Fonte: autor. ¹*T. asperellum*; ²*T. harzianum*.

Os tratamentos foram divididos em três etapas de aplicação. A primeira, no momento do transplante, onde parte das mudas de morangueiro foi transplantada para vasos com substrato, acrescido de 100 ml de suspensão de esporos de cada isolado de *Trichoderma* spp. na concentração de 1×10^5 conídios ml^{-1} e nos demais vasos, foi acrescentado água destilada, na mesma proporção. A segunda etapa foi aproximadamente, 100 dias após o transplante das mudas, quando aplicou-se o filtrado de cultura via foliar, e mais 100 ml de suspensão de esporos, via substrato, de acordo com a combinação dos tratamentos. Em ambos os casos, após 48h da aplicação do antagonista, realizou-se a última etapa dos tratamentos, a qual consistiu na inoculação do patógeno via foliar. Para isso, foram realizados ferimentos nas folhas com o auxílio de uma agulha histológica e borrifados, de forma homogênea, 50 ml de suspensão de esporos, na concentração de 1×10^5 conídios ml^{-1} em cada unidade experimental. Após, cada unidade experimental foi vedada com um saco plástico durante 72 horas, para proporcionar condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (Figura 1).

Figura 1. Câmara úmida em plantas de morangueiro inoculadas com *Cercospora* spp.



Fonte: Autor

A severidade da doença foi avaliada por 14 dias, utilizando a escala diagramática, adaptada, proposta por Mazaro et al. (2006). Com essas informações foi determinada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) utilizando os valores de severidade da doença avaliados aos 1, 3, 5, 10, 12 e 14 dias após a retirada da câmara úmida (CAMPBELL e MADDEN, 1990): $AACPD = \sum \left[\left(\frac{Y_1 + Y_2}{2} \right) * (t_2 - t_1) \right]$, em que Y_1 e Y_2 são duas avaliações consecutivas realizadas nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott utilizando o software SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp. À *Cercospora* spp. POR TESTE DE CULTURA PAREADA E PLACAS SOBREPOSTAS.

No pareamento de culturas, pôde-se observar que as espécies de *Trichoderma* spp. interferiram no crescimento micelial dos isolados de *Cercospora* spp. Para a variável diâmetro final da colônia (DFC), houve interação significativa entre as testemunhas de *Cercospora* spp. e os tratamentos com *Trichoderma* spp. (Tabela 3). Sendo assim, o DFC desses isolados apresentou uma redução significativa no crescimento micelial. Por exemplo, o isolado M13 quando confrontado com *T.*

asperellum e *T. harzianum*, apresentou DFC médio de 9,43 e 9,48 mm, respectivamente, já sua testemunha foi de 23,29 mm.

Tabela 3. Média do diâmetro final da colônia de isolados de *Cercospora* spp. obtidos de folhas de morangueiro, em confrontação direta por pareamento de culturas de *Trichoderma* spp.

Isolado	Espécie	DFC ¹		
		Testemunha	Isolado de <i>Trichoderma</i> spp.	
			IVCT1 ²	IST1 ³
M2	<i>C. kikuchii</i>	15.15 B ^a	10.59 Ab	9.03 Aa
M6	<i>C. kikuchii</i>	22.15 Bc	10.61 Ab	9.08 Aa
M7	<i>Cercospora</i> sp.	14.54 Ba	7.22 Aa	7.24 Aa
M8	<i>Cercospora</i> sp.	13.32 Ba	7.73 Aba	7.43 Aa
M11	<i>Cercospora</i> sp.	18.51 Bb	7.33 Aa	9.69 Aa
M13	<i>Cercospora</i> sp.	23.29 Bc	9.43 Aba	9.48 Aa
CV (%)		4.51		

Fonte: Autor

*Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05\%$) e a média com o menor valor numérico foi considerada a melhor condição no presente estudo, recebendo a letra A (maiúscula ou minúscula).

¹Diâmetro final da colônia em milímetros ² *T. asperellum*; ³*T. harzianum*.

Para a variável percentual de inibição não houve interação significativa entre os fatores, somente diferença entre os isolados de *Cercospora* spp. Os isolados M11 e M13 apresentaram os maiores percentuais médios de redução, com valores de 61,39 e 59,39%, respectivamente (Tabela 4). Ambas as espécies de *Trichoderma* apresentaram notas de antagonismo entre “1” e “2”, sendo que a nota “1” é quando o antagonista cresce por toda a placa de Petri e sobre o disco do patógeno e a nota “2” é quando o antagonista cresce por toda a placa de Petri, porém não se sobrepõe ao disco do patógeno.

Tabela 4. Percentual de inibição do crescimento micelial de isolados de *Cercospora* spp. obtidos de folhas de morangueiro, em confrontação direta por pareamento de culturas e sua classificação quanto ao antagonismo, conforme notas de Bell et al. (1982).

Isolado	Espécie	Inibição (%)		Média	Nota de Bell et al. (1982)	
		IVCT1 ¹	IST1 ²		IVCT1 ¹	IST1 ²
M2	<i>C. kikuchii</i>	30.25	40.56	35.41 C*	2	2
M6	<i>C. kikuchii</i>	50.88	59.01	54.94 AB	1	1
M7	<i>Cercospora</i> sp.	50.29	50.16	50.22 AB	1	1
M8	<i>Cercospora</i> sp.	41.93	44.21	43.07 BC	2	1
M11	<i>Cercospora</i> sp.	60.39	62.4	61.39 A	1	2
M13	<i>Cercospora</i> sp.	59.51	59.27	59.39 A	1	2
CV (%)			20.62			

Fonte: Autor

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05\%$) e a média com o maior valor numérico foi considerada a melhor condição no presente estudo, recebendo a letra A (maiúscula ou minúscula). ¹*T. asperellum*; ²*T. harzianum*.

Um dos mecanismos de ação do gênero *Trichoderma* é a antibiose, no qual os fungos respondem à presença de outros, secretando metabólitos voláteis e não voláteis, com propriedades antifúngicas que inibem o seu crescimento (HARMAN, et. al, 2004; ISAIAS, et. al, 2014; MARQUES, et. al, 2018).

São mais de 300 compostos orgânicos voláteis já identificados em fungos. Estes pertencem a diversos grupos químicos, tais como hidrocarbonetos simples, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, terpenos (KORPI et al., 2009; MORATH et al., 2012; LEMFACK et al., 2014).

O potencial antagonista das espécies *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum* e *T. Koningiopsis* em relação a *Cercospora coffeicola* foi estudado por Silva et. al (2019) e os autores verificaram redução do crescimento micelial, assim como, a colonização do patógeno pelo antagonista. Também classificaram o potencial antagônico com base nas notas de Bell et. al (1982), cujas notas ficaram entre 1 e 2, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo.

Almeida (2009) relata que *Trichoderma viride* apresentou potencial antagônico para os gêneros fúngicos *Colletotrichum* spp., *Asperisporium caricae* e *Cercospora musae*, com redução do crescimento micelial, associando essa redução ao mecanismo de antibiose e também aos metabólitos voláteis e não voláteis produzidos pelo gênero *Trichoderma*. Esses podem apresentar propriedades antibióticas capazes de inibir o desenvolvimento e crescimento de determinados microrganismos (VINALE et. al, 2014). Dessa forma, estudou-se o potencial de biocontrole por meio de metabólitos voláteis dos isolados IVCT1 e IST1 em relação aos isolados de *Cercospora* spp.

Em relação aos compostos voláteis, também ocorreu interação significativa entre as testemunhas de *Cercospora* spp. e os tratamentos com *Trichoderma* spp. para o diâmetro final da colônia (DFC) (Tabela 5). Os isolados IVCT1 (*T. asperellum*) e IST1 (*T. harzianum*) foram capazes de reduzir o DFC de *Cercospora* spp. No entanto, a espécie de *T. harzianum*, reduziu mais o crescimento micelial da maioria dos isolados de *Cercospora* (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito de compostos voláteis no diâmetro final da colônia de isolados de *Cercospora* spp. obtidos de folhas de morangueiro, por placas sobrepostas sobre culturas de *Trichoderma* spp.

Isolado	Espécie	DFC ¹		
		Testemunha	Isolado de <i>Trichoderma</i> spp.	
			IVCT1 ²	IST1 ³
M2	<i>C. kikuchii</i>	33.10 B [*] b	11.39 Aa	11.03 Aa
M6	<i>C. kikuchii</i>	25.97 Ba	21.99 Bbc	13.78 Aab
M7	<i>Cercospora</i> sp.	33.90 Cb	23.92 Bbc	11.84 Aa
M8	<i>Cercospora</i> sp.	30.22 Cab	22.06 Bbc	14.83 Aab
M11	<i>Cercospora</i> sp.	35.00 Cb	18.96 Bb	12.05 Aa
M13	<i>Cercospora</i> sp.	32.04 Cb	25.99 Bc	17.73 Ab
CV (%)		13.64		

Fonte: Autor

*Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05\%$) e a média com o menor valor numérico foi considerada a melhor condição no presente estudo, recebendo a letra A (maiúscula ou minúscula).

¹Diâmetro final da colônia ² *T. asperellum*; ³*T. harzianum*.

Bezerra et. al (2019) relatam que fungos antagonistas do gênero *Trichoderma* atuam diretamente na inibição do crescimento micelial de fungos patogênicos pela ação de metabólitos voláteis e, em seus estudos observaram uma redução do crescimento micelial de *Fusarium guttiforme* por metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. variando de 67,30 a 71,66%. Sarzi (2019), avaliando o potencial biocontrolador de metabólitos voláteis de *T. virens* e *T. harzianum* em relação a *Macrophomina phaseolina*, observou um maior percentual de inibição quando confrontado com *T. harzianum*, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.

Tabela 6. Percentual de inibição do crescimento micelial de isolados de *Cercospora* spp. obtidos de folhas de morangueiro, em placas sobrepostas por confrontação direta com metabólitos voláteis de espécies de *Trichoderma* spp.

Isolado	Espécie	Inibição (%)	
		IVCT1 ¹	IST1 ²
M2	<i>C. kikuchii</i>	65.25 A [*] a	66.58 Aa
M6	<i>C. kikuchii</i>	14.74 Bc	45.96 Ab
M7	<i>Cercospora</i> sp.	29.47 Bbc	64.78 Aa
M8	<i>Cercospora</i> sp.	26.84 Bc	51.01 Aab
M11	<i>Cercospora</i> sp.	45.72 Bb	65.57 Ab
M13	<i>Cercospora</i> sp.	21.54 Bc	44.78 Ab
CV (%)		21.41	

Fonte: Autor

**Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05\%$) e a média com o maior valor numérico foi

considerada a melhor condição no presente estudo, recebendo a letra A (maiúscula ou minúscula),¹
T. asperellum; ²*T. harzianum*.

Os isolados IVCT1 e IST1 demonstram potencial antagônico em ambos os testes de confrontação realizados, pois reduziram o crescimento micelial dos isolados de *Cercospora* spp. tanto por pareamento de culturas e ou por metabólitos voláteis, podendo-se inferir que atuam com mais de um mecanismo de ação contra o agente patogênico e produzem metabólitos voláteis com ação antifúngica (Tabela 6). A busca por micro-organismos com capacidade de produzir efeitos fungistáticos ou fungicida, impedindo a germinação de esporos ou o crescimentos e esporulação de fitopatógenos é muito importante, pois faz com que se tenha o conhecimento de diferentes agentes antagonistas que podem ser utilizados em programas de manejo integrado de doenças (SOLINO et al., 2017).

3.2 CONTROLE DE *Cercospora* spp. “IN VITRO” E “IN VIVO” A PARTIR DE FILTRADO DE CULTURA OU ORGANISMO VIVO DE *Trichoderma* spp.

3.2.1 Metabólitos de *Trichoderma* spp. na inibição do crescimento micelial de *Cercospora* spp.

A produção de biomassa fúngica dos isolados diferiu estatisticamente, o isolado IVCT1 produziu 1,58 g.100 mL⁻¹ de biomassa, já para o IST1 a produção foi de 1,23 g.100 mL⁻¹ (Tabela 6). Essa diferença pode estar relacionada a capacidade de esporulação do isolado, visto que, em estudos anteriores Krahn (2017), determinou uma esporulação de 64,97 x 10⁶ conídios.mL⁻¹ para o isolado IVCT1 e 32,9 x 10⁶ conídios.mL⁻¹ para o IST1. Conseqüentemente, uma maior esporulação, pode resultar em maior produção de metabólitos secundários que atuam na inibição do crescimento micelial de diferentes patógenos.

Tabela 7. Produção de biomassa fúngica de *Trichoderma* spp. em meio líquido

Trat ¹	Biomassa fúngica seca (g.100 ml ⁻¹)
Test ²	0.16 c*
IVCT1 ³	1.58 a
IST1 ⁴	1.23 b
CV(%) ⁵	3.92

Fonte: Autor

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05\%$).¹ Tratamento; ² Testemunha; ³ *T. asperellum*; ⁴ *T. harzianum*. ⁵ Coeficiente de variação.

O diâmetro final da colônia (DFC) e percentual de inibição do crescimento micelial de *Cercospora* spp. por metabólitos presentes no filtrado de cultura de *Trichoderma* spp são apresentados nas tabelas 7 e 8. Para a variável DFC a interação foi significativa entre as testemunhas de *Cercospora* spp. e os tratamentos com filtrado de cultura dos isolados IVCT1 e IST1 (Tabela 7). Os metabólitos presentes no filtrado de cultura foram capazes de diminuir o DFC da colônia dos isolados do patógeno e, conseqüentemente, o percentual de inibição apresentou interação significativa entre os fatores. Para o isolado M2 o maior percentual de inibição foi obtido quando submetido ao tratamento com filtrado de cultura do isolado IVCT1, apresentando 34,29% de redução do crescimento micelial, já no tratamento com isolado IST1 essa redução foi 23,63% (Tabela 8).

Tabela 8. Média do diâmetro final da colônia de isolados de *Cercospora* spp. obtidos de folhas de morangueiro, com uso de filtrado de cultura a base de *Trichoderma* spp

Isolado	Espécie	DFC ¹		
		Testemunha	Isolado de <i>Trichoderma</i> spp.	
			IVCT1 ²	IST1 ³
M2	<i>C. kikuchii</i>	45.85 C*b	30.77 Ab	35.75 Bd
M6	<i>C. kikuchii</i>	36.58 Ba	23.83 Aa	23.69 Aa
M7	<i>Cercospora</i> sp.	51.46 Bc	43.94 Ad	44.32 Ae
M8	<i>Cercospora</i> sp.	47.67 Bb	31.03 Ab	28.99 Ab
M11	<i>Cercospora</i> sp.	56.35 Bd	34.40 Ac	33.20 Acd
M13	<i>Cercospora</i> sp.	47.49 Bb	29.92 Ab	30.27 Abc
CV (%)		4.51		

Fonte: Autor

*Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05\%$) e a média com o menor valor numérico foi considerada a melhor condição no presente estudo, recebendo a letra A (maiúscula ou minúscula).

¹Diâmetro final da colônia ² *T. asperellum*; ³ *T. harzianum*.

Analisando o comportamento de todos os isolados de *Cercospora* spp. em relação ao filtrado de cultura do isolado de *Trichoderma* IVCT1, é observado que o percentual de inibição para o isolado M7 é significativamente inferior, apresentando apenas 14,6% de redução, diferindo estatisticamente dos demais isolados (Tabela 8). Situação semelhante ocorre quando o mesmo é submetido ao filtrado de cultura do

isolado IST1, o percentual de inibição também é inferior, seguido do isolado M2, diferindo estatisticamente dos demais.

Tabela 9. Percentual de inibição do crescimento micelial de isolados de *Cercospora* spp. obtidos de folhas de morangueiro, com uso de filtrado de cultura de *Trichoderma* spp.

Isolado	Espécie	Inibição (%)	
		IVCT1 ¹	IST1 ²
M2	<i>C. kikuchii</i>	34.29 A [*] a	23.63 Bb
M6	<i>C. kikuchii</i>	34.83 Aa	35.18 Aa
M7	<i>Cercospora</i> sp.	14.61 Ab	13.86 Ac
M8	<i>Cercospora</i> sp.	34.81 Aa	39.15 Aa
M11	<i>Cercospora</i> sp.	38.93 Aa	41.06 Aa
M13	<i>Cercospora</i> sp.	37.01 Aa	36.25 Aa
CV (%)		13.87	

Fonte: Autor

*Médias seguidas de mesma letra maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05\%$) e a média com o maior valor numérico foi considerada a melhor condição no presente estudo, recebendo a letra A (maiúscula ou minúscula). ¹ *T. asperellum*; ² *T. harzianum*.

Os filtrados de cultura de *T. asperellum* e *T. harzianum* foram capazes de reduzir o crescimento micelial dos diferentes isolados de *Cercospora* spp., demonstrando o potencial antagonista dessas espécies. Diferentes autores relatam o potencial de biocontrole por metabólitos de *Trichoderma* spp., Marques et. al (2018) quando estudaram o potencial “in vitro” de biocontrole de MNV’s de diferentes espécies de *Trichoderma* spp., entre elas *T. harzianum*, em relação a patógenos radiculares e foliares, constataram que todas as espécies de *Trichoderma* spp. analisadas, apresentam um amplo espectro de ação, inibindo o crescimento micelial dos fungos patogênicos. Guimaraes et. al (2016), quando estudou o efeito inibitório de metabólitos voláteis e não voláteis de diferentes isolados de *T. harzianum* contra *Cladosporium herbarum* concluíram que todos os isolados apresentam potencial de biocontrole.

3.2.2 Identificação de metabólitos voláteis presentes em filtrado de cultura de *Trichoderma* spp.

Pela análise de cromatografia gasosa foi possível a identificação de diferentes compostos, entre eles ácidos graxos, cetonas, álcoois, hidrocarbonetos e alcanos

(Tabelas 9 e 10). O filtrado IVCT1 emitidiu maior número desses compostos voláteis. Em relação ao efeito dos voláteis, o filtrado do isolado IST1 apresentou maior inibição do crescimento de *Cercospora*. Assim, notamos que aqui o número de compostos produzidos não foi o principal fator e sim, que os compostos presentes, exclusivamente, no filtrado IST1 podem ser responsáveis pelo maior efeito contra *Cercospora*.

Com base na análise cromatográfica, foi possível constatar a diferença na produção de compostos voláteis entre os filtrados isolados, podendo ser uma característica fenotípica de cada espécie. Diferentes espécies de *Trichoderma* spp. possuem capacidade de produzir metabólitos secundários, que podem ser diferentes de uma espécie para outra e entre isolados da mesma espécie (VINALE et al., 2014). Essa diferença entre a produção dos compostos pode interferir nos percentuais de inibição encontrados com a utilização dos filtrados de cultura (SANCHEZ et al., 2019).

Os ácido hexadecanóico e esteárico foram identificados em ambos os isolados. Essas moléculas são conhecidas como ácidos graxos saturados por apresentarem apenas ligações simples entre os carbonos de suas cadeias e são produzidas por diferentes organismos vivos, entre eles fungos do gênero *Trichoderma* (YUEF et al., 2018; EMANUEL et al., 2020; MEHDI et al., 2022). O ácido hexadecanóico demonstra ser uma molécula com ação bioativa, visto que, os ácidos graxos têm ação antimicrobiana sobre fungos e bactérias, principalmente na membrana celular dos fungos, aumentando a fluidez da mesma, resultando em desorganização generalizada, que leva a alterações e extravasamento dos componentes intracelulares (POHL; KOCK; THIBANE, 2011; ALBRATTY et al., 2023).

O isolado IST1 foi capaz de metabolizar o composto 1-Butanol 3-methyl-acetate, conhecido como acetato de isoamila. Esse composto possui ação bioativa contra diferentes cepas de leveduras e bactérias. *E.coli* quando foi exposta a molécula, observou-se alterações na expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de açúcares, no ciclo do ácido tricarbóxico e na síntese de proteínas (ANDO; KURATA; KISHIMOTO, 2015).

O composto 2-Furancarboxaldehyde 5-(Hydroxymetil), também presente em ambos os isolados, é um furano oriundo da degradação de açúcares presentes no meio de cultura, no caso a sacarose (KUCHEROV et al., 2018) e não apresenta

propriedade bioativa conhecida. O isolado IVCT1 foi capaz de metabolizar um pico de maior intensidade desse composto, pois teve uma área de retenção de 24,88 %.

O isolado IST1 foi capaz de metabolizar o composto 1-Butanol 3-methyl-acetate, conhecido como acetato de isoamila. Esse composto possui ação bioativa contra diferentes cepas de leveduras e bactérias (ANDO; KURATA; KISHIMOTO, 2015). Dessa forma, apesar de não ter sido testado isoladamente, esse composto pode estar relacionado ao maior efeito dos volateis do isoaldo IST1.

Tabela 10. Identificação de componentes voláteis presentes no filtrado de cultura de *Trichoderma asperellum* (proveniente do isolado IVCT1) extraídos com quatro solventes: hexano, acetato de etila, metanol e etanol, o tempo de retenção (TR) (min) e a área (%).

Nomenclatura	Hexano		Acetato de etila		Metanol		Etanol	
	TR (min)	Área (%)	TR (min)	Área (%)	TR (min)	Área (%)	TR (min)	Área (%)
ÁCIDOS GRAXOS								
Hexadecanoic acid	17.52	6.95			17.46	1.69		
Octadecanoic acid					18.73	0.97		
HIDROCARBONETOS								
Docosane	18.38	3.14						
Tetratetracontane	22.75	44.15						
Dotriacontane	23.39	43.33						
Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-			23.35	40.92				
Pentatriacontane			24.08	30.33				
Pentadecane			16.36	3.8				
ÁLCOOL								
2-Propen-1-ol					8.72	2.38		
2-hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetram							23.87	6.66
COMPOSTOS ORGÂNICOS								
1-Propene, 2-methyl-, trimer	18.22	2.4						
2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone					9.71	1.94	9.72	4.3
2-furancarboxaldehyde, 5-(hydrometil					11.66	14.88	11.67	24.88
2-amino-9-(3,4-dihydroxy-5-hydro					14.14	50.59		
Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxyme					20.73	14.6		
Octadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxyme					21.78	12.92		
Iron, tricarbonyl[N-(phenyl-2-pyridinylmethy			17.06	12				
1,3,5-trisilacyclohexane			20.56	12.86				
N,n'-dimethylpiperazine							9.62	4.64
Cytidine							13.83	28.6
1,2,3-Propanetricarboxylic acid, 2-hydroxy-,							19.35	5.6
Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester							20.12	21.47
Octane, 1,1'-oxybis-							20.67	3.85

Fonte: Autor

Tabela 11. Identificação dos componentes voláteis presentes no filtrado de cultura de *Trichoderma harzianum* (proveniente do isolado IST1) extraídos com quatro solventes: hexano, acetato de etila, metanol e etanol, o tempo de retenção (TR) (min), a unidade área (%).

Nomenclatura	Hexano		Acetato de etila		Metanol		Etanol	
	TR (min)	Área (%)	TR (min)	Área (%)	TR (min)	Área (%)	TR (min)	Área (%)
ÁCIDOS GRAXOS								
Hexadecanoic acid	17.51	31.2						
Octadecanoic acid							18.74	1.35
HIDROCARBONETOS								
Bicycloelemene							17.27	1.47
Beta. Elemene							17.69	2.21
CETONAS								
1,2,3-Trimethylpropane-1,3-dione							9.58	3.48
COMPOSTOS ORGÂNICOS								
4-t-Butyl-2-(1-methyl-2-nitroethyl)cyclohexa	18.06	40.24						
1-Octadecanol, 18-bromo	22.45	28.55						
2-Propanone, 1-hydroxy-					3.03	42.66		
Acetic acid, hexyl ester					7.33	4.33		
Propanoic acid, 2-hydroxy-, ethy					7.42	12.11		
Cyclopentanone, 2-methyl-					7.58	5.22		
2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone					9.77	5.51		
Octanamide, N-(2-mercaptoethyl)-					14.13	30.14		
1-Butanol, 3-methyl-, acetate							6.29	5.65
Hydroxy dimethyl furanone							9.58	3.48
2-furancarboxaldehyde, 5-(hydrometil)							11.67	75.14
Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester							20.12	3.23

Fonte: Autor

3.2.3 Ação “in vivo” de filtrado de cultura ou/e organismo vivo de *Trichoderma* spp. no controle *Cercospora* spp. em morangueiro.

A quantificação do nível de dano de uma doença é importante para a avaliação e validação de alternativas de controle de doenças. As medidas mais utilizadas para a mensuração da doença são a incidência e a severidade. A incidência consiste em avaliar a frequência (%) de plantas doentes presentes em uma amostra e a severidade é baseada pela porcentagem da área ou volume de tecido coberto pelo sintomas e é realizada com o auxílio de escalas diagramáticas (AMORIM; FILHO, 2018). No presente estudo, realizou-se a avaliação da severidade da doença com o auxílio da escala diagramática adaptada da proposta de Mazaro et al. (2006), e com base nessas informações determinou-se a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), a qual é apresentada na Tabela 12.

Tabela 12. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) na cultura do morangueiro, cultivar Camarosa, tratada com organismo vivo e/ou filtrado de cultura de *Trichoderma* spp. no controle da Cercosporiose.

Tratamento	Isolado patogênico	
	M6: <i>Cercospora kikuchii</i>	M11: <i>Cercospora</i> sp.
Testemunha: ausência de <i>Trichoderma</i> spp.	14.83 Ab*	21.86 Bb
Filtrado de cultura via foliar - IVCT1 ¹	3.28 Aa	12.98 Ba
Filtrado de cultura via foliar - IST1 ²	2.34 Aa	10.16 Ba
Organismo vivo via substrato - IVCT1	10.87 Ab	11.27 Aa
Organismo vivo via substrato - IST1	13.37 Ab	12.86 Aa
Filtrado de cultura via foliar - IVCT1 + Organismo vivo via substrato - IVCT1	5.43 Aa	10.67 Ba
Filtrado de cultura via foliar - IST1 + Organismo vivo via substrato - IST1	5.69 Aa	12.94 Ba
CV (%) ³	14.18	

Fonte: Autor

*Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05\%$) e a média com o menor valor numérico foi considerada a melhor condição no presente estudo, recebendo a letra A (maiúscula ou minúscula), conforme resultado estatístico. ¹isolado de *T. asperellum*; ² isolado de *T. harzianum*. ³Os dados foram transformados em $(X+1)^{0,5}$.

Analisando os dados da tabela 12 é verificado que a interação foi significativa entre os isolados patogênicos e os tratamentos com *Trichoderma* spp. O isolado M11 de *Cercospora* spp. demonstrou ser mais agressivo, pois apresenta as maiores médias de AACPD, tanto na testemunha quanto nos demais tratamentos, diferindo

estatisticamente do isolado M6 de *C. kikuchii*. Os tratamentos inoculados com o isolado M11 e que receberam a aplicação de organismo vivo e/ou filtrado de cultura de *Trichoderma* spp., não diferiram entre eles e sim, somente em relação a testemunha, a qual apresentou uma AACPD de 21,86 e nos demais tratamentos variou de 10,16 a 12,98. Embora o isolado M11 de *Cercospora* spp. seja mais agressivo, os tratamentos com *Trichoderma* spp., seja na forma de organismo vivo e/ou filtrado de cultura foram capazes de reduzir a severidade da doença.

Os tratamentos inoculados com o isolado M6 apresentaram uma AACPD inferior em relação ao isolado M11, demonstrando uma menor severidade da doença. Os demais tratamentos que receberam a aplicação de *Trichoderma* spp., seja na forma de organismo vivo e/ou filtrado de cultura diferiram estatisticamente entre eles, sendo os tratamentos com aplicação de filtrado de cultura de forma isolada ou combinada (aplicação foliar + via substrato) os que apresentaram maior redução da AACPD da doença. A testemunha do isolado M6 obteve uma AACPD de 14,83 e os tratamentos com uso de *Trichoderma* spp. variaram de 2,34 a 5,69 (Tabela 12).

A maior severidade da doença causada pelo isolado M11 pode estar relacionada às suas características morfológicas (KRAHN et al, 2022), pois o mesmo apresentou maior média no diâmetro final da colônia, na taxa de crescimento micelial, no tamanho de conídios e no número de septos comparado ao isolado M6 (KRAHN et al, 2022). De modo geral, quando as plantas inoculadas com os isolados M6 e M11 foram expostas aos tratamentos com as diferentes formas de aplicação de *Trichoderma* spp. foi observada a redução da AACPD, demonstrando o potencial de biocontrole dos isolados, visto que fungos desse gênero possuem propriedades antagônicas a diferentes patógenos, podendo reduzir sua ação através da competição, antibiose, parasitismo e indução de resistência (MEDEIROS; SILVA; PASCHOLATI, 2018).

Na competição, o patógeno e o antagonista disputam os mesmos recursos para sobreviver. Já na antibiose o antagonista produz uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a reprodução do fitopatógeno no ambiente ou na planta. No parasitismo, o antagonista se alimenta do fitopatógeno, enfraquecendo ou causando a sua morte e no processo de indução de resistência ocorre a estimulação de mecanismos de defesa da planta com produção de proteínas voltadas a patogênese, acumulação de fitoalexinas e sinalização nas rotas de indução de resistência.

(DRUZHININA et al., 2011; HARMAN et al., 2004; HERMOSA et al., 2012; LUCON et al., 2014). Dessa forma, podemos inferir que os mecanismos de ação de *Trichoderma* spp., que atuaram na redução da severidade da doença foram a antibiose e a indução de resistência, visto que os tratamentos foram aplicados antes da inoculação do patógeno, ou seja, de forma preventiva, pois segundo Remedier (2017) a eficiência do uso de *Trichoderma* estar diretamente relacionado a época de aplicação, e principalmente, quando realizada de forma preventiva.

Na maioria das vezes, a eficiência de produtos à base de *Trichoderma* spp. é relatada na redução da incidência de tombamentos de plantas e da severidade de doenças ocasionadas por patógenos habitantes de solo, como *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Pythium* e *Fusarium* (POMELLA; RIBEIRO, 2009). No entanto, com os resultados positivos do presente estudo é observado que o uso de filtrados de cultura associados ao organismo vivo de *Trichoderma* spp. é uma alternativa de controle biológico a patógenos de parte aérea, com redução da severidade da doença. Rabuske (2021) relata que o uso de biocontroladores a base de *T. asperellum* na parte aérea foi capaz de reduzir a incidência e a severidade da doença cancro do tronco em nogueira-pecã.

4. CONCLUSÕES

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram eficientes em controlar o crescimento micelial de *Cercospora* spp. tanto no pareamento de culturas como por metabólitos voláteis.

Isolados de *Trichoderma* spp. cultivados em meio líquido produziram ácidos graxos e demais compostos orgânicos com potencial fungicida e de ativação de mecanismos de defesa das plantas.

A aplicação de *Trichoderma* spp., na forma de organismo vivo ou filtrado de cultura, via foliar ou de forma combinada, reduziu a severidade de *Cercospora* spp. em morangueiro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRATTY, M et al. Spectral analysis and Antibacterial activity of the bioactive principles of *Sargassum tenerrimum* J. Agardh collected from the Red sea, Jazan, Kingdom of Saudi Arabia. **Brazilian Journal of Biology.**, vol. 83, p. 01 – 10, 2023. Disponível em: < <https://www.scielo.br/j/bjb/a/FdmZr6YJnMNzMNzCQXY7d6jr/> > Acesso em: 07 jan 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.249536>
- ALBU, S.; SCHNEIDER, W.; PRICE, P. P.; DOYLE, V. P. *Cercospora* cf. *flagellaris* and *Cercospora* cf. *sigesbeckiae* are associated with *Cercospora* leaf blight and purple seed stain on soybean in North America. **Phytopathology**, v.106, n.11, p.1376-1385, 2016. < <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-15-0332-R>>
- ALMEIDA, W. D. da S. Antagonismo de *Trichoderma viride* sobre fungos fitopatogênicos, *Colletotrichum* spp., *Cercospora musae* e *Asperisporium caricae* em fruteiras tropicais. **Rev. Bras. de Agroecologia**. v. 4, n. 2, p. 1374 -1378, 2009.
- AMORIM, L; FILHO, A. B. Fenologia, patometria e quantificação de danos. In: **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. São Paulo: Ceres, v. 1, p. 500–518, 2018.
- ANDO, H.; KURATA, A.; KISHIMOTO, N. Antimicrobial properties and mechanism of volatile isoamyl acetate, a main flavour component of Japanese sake (Ginjo-shu). **Journal of applied microbiology**. v. 118, n. 4, p. 873 – 880, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.12764>
- BADAWY, M. E. I.; ABDELGALEIL, S. A. M. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 776-782, 2014.
- BEZERRA, G. A.; DIAS, M. V.; SANTOS, P. H. D. dos. Identificação e seleção de espécies de *Trichoderma* spp. endofíticos de bromélias de restingas como agentes de biocontrole da fusariose em frutos de abacaxi. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 45, n. 2, p. 172-178, 2019.
- CHUPP C. **A monograph of the fungus genus *Cercospora***. Ithaca, New York. 1954.
- DRUZHININA, I. S. et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**. v. 16. p. 749-759. 2011.
- EMANUEL, R. V. et al. In vitro growth of *Colletotrichum gloeosporioides* is affected by butyl acetate, a compound produced during the co-culture of *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis*. **Biotech.**, v. 3, n. 329, p. 01 – 14, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02324-z>
- GUIMARÃES, G. R. et. al Ação de metabólitos voláteis e não voláteis de *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento de *Cladosporium herbarum*. **Pesquisa agropecuária pernambucana**. Recife, v. 21, n. 1, p. 7-11, 2016.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, p. 43-56, 2004.

HARMAN, G., HOWELL, C., VITERBO, A. et al. Espécies de *Trichoderma* - simbiontes oportunistas e avirulentas de plantas. **Nat Rev Microbiol** v. 2, p. 43–56 2004. Disponível em:< <https://www.nature.com/articles/nrmicro797> >. Acesso em: 16 mar 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro79>.

HERMOSA, R. et al. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, New York, v. 158, p. 17-25, 2012.

ISAIAS, C. O., MARTINS, I., SILVA, J. B. T. D., SILVA, J. P. D., et. al Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu v.40, n. 1, p. 34-41. 2014. Disponível em: < <https://www.scielo.br/pdf/sp/v40n1/v40n1a05.pdf> > Acesso em: 18 mar 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052014000100005>

KORPI, A. ET AL.. Microbial Volatile Organic Compounds. **Critical Reviews in Toxicology**. v. 39, p. 139-193, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408440802291497>

KRAHN, J. R. T. et al. Morphophysiological and molecular characterization of *Cercospora* spp. in *Fragaria* × *ananassa* Duch. Revista Brasileira de Ciências Agrárias. v.17, n.4, p. 1-9, 2022. Disponível em: <http://www.agraria.pro.br/ojs32/index.php/RBCA/article/view/v17i4a2745>> Acesso: 06 jan 2022. DOI: <https://doi.org/10.5039/agraria.v17i4a2745>

KUCHEROV, F. A. et al. Chemical transformations of biomass-derived C6-furanic platform chemicals for sustainable energy research, materials science, and synthetic building blocks. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, n. 7, p. 8064-8092, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b00971>

LEMFACK, M.C. et al. MVOC: A database of microbial volatiles. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 744 – 748, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1250>
LUCON, C. M. M. et al. **Trichoderma: o que é, para que serve e como usar corretamente na lavoura**. 1. Ed. São Paulo: Instituto Biológico, 2014. 28 p.

MACHADO, D. F. M. et al. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n.1, p. 274-288, jan-jun 2012.

MARQUES, E.; MARTINS, I.; MELLO, S. C. M. Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. **Biota Neotropica**. v. 1, p. 01-05, 2018. Disponível em:< <https://www.scielo.br/pdf/bn/v18n1/1676-0611-bn-18-1-e20170418.pdf>>. Acesso em: 25 mar 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2017-0418>

MAZARO, S. M. et al. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha-de micosferela em morangueiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.2, p.648-652, mar-abr, 2006. Nota. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/cr/v36n2/a45v36n2.pdf>>. Acesso em: 10 maio. 2019.

MEDEIROS, F. H.V. de; SILVA, J. C. P da; PASCHOLATI, S. F. Controle Biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos** 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2018. p. 261-274.

MEHDI, S. S. et al. Cytotoxicity of *Trichoderma Reesei* Extract in Hepa1-6 Cancer Cells. **Journal of Advanced Biomedical Sciences** v. 12, v. 1, p. 106 -118, 2022. DOI: <https://doi.org/10.18502/jabs.v12i1.8878> Acesso em: 18 nov. 2022.

MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; DA SILVA, J. C. **Trichoderma: uso na agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 538 p. 1ª ed. 2019.

MORATH, S. U. et al. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal biology reviews**. v. 26, p. 73-83, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.001>

POHL, C. H.; KOCK, J. L. F.; THIBANE, V. S. Antifungal free fatty acids: A review. In: MENDEZ-VILAS, A. (Ed.) **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. 1 ed. Formatex: 2011. p. 61-71.

POMELLA, A. W. V.; RIBEIRO, R. T. S. Controle biológico com trichoderma em grandes culturas: uma visão empresarial. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 239-244.

RABUSKE, J.E. **Trichoderma asperellum no manejo de doenças e na promoção de crescimento de plantas de noqueira-pecã** 2021. 174 F. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2021.

REMEDIER: Eco-friendly solution against soil-borne diseases. Milan: Isagro, 2017. Disponível em: < <https://www.isagro.com/static/upload/31-/31-remedier.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2022.

SANCHEZ, A.D.; OUSSET, M.J.; SOSA, M.C. Biological control of Phytophthora collar rot of pear using regional *Trichoderma* strains with multiple mechanisms. **Biological Control**, v. 135, p. 124–134, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.05.012> Acesso em: 23 dez. 2022.

SARZI, J. S. **Trichoderma spp. no biocontrole de *Macrophomina phaseolina* e no crescimento de feijoeiro**. 2019. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2019.

SILVA, M. E. da; MATSUMURA, A. T. S. et. al, Antagonismo in vitro entre *Trichoderma* spp. e *Cercospora coffeicola*, **Anais In: Sincobiol**, 2019, Londrina/PR. Disponível em: < <http://www.icb.bio.br/antagonismo-in-vitro-entre-trichoderma-spp-e-cercospora-coffeicola/>> Acesso em: 10 mar 2021.

SOARES, A. P. G. et al. More *Cercospora* species infect soybeans across the Americas than meets the eye, **PLoS ONE**, v.10, n.8, 2015. < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133495>>

SOLINO, A. J. da S. et al. Antagonistic potential and *in vitro* control of *Alternaria solani* by saprobic fungi. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 3, p. 199-204, 2017. Disponível em: < <https://www.scielo.br/j/sp/a/vLNtLV9tgRqYsvFjRSm6YYv/?lang=pt>> . Acesso: 31 jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2202>

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, L. E., et. al Metabólitos secundários de *Trichoderma* ativos em plantas e patógenos fúngicos. **The Open Mycology Journal**, v. 8, p. 127 – 139. 2014. Disponível em:< <https://benthamopen.com/contents/pdf/TOMYCJ/TOMYCJ-8-127.pdf>> Acesso em: 10 abr 2021. DOI: 10.2174 / 1874437001408010127

YUEF, M P. H. et. al, Identification and evaluation of secondary metabolites by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) in native strains of *Trichoderma* species. **African Journal of Biotechnology**, v. 17, n 37, p 1162-1171, 2018. Disponível em < <https://academicjournals.org/journal/AJB/article-full-text-pdf/DF0389758593>> Acesso em: 28 dez 2022. DOI: 10.5897/AJB2018.16546

5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A área plantada com morangueiro, no Brasil, é aproximadamente de 5.200 ha, apresentando uma produção de mais de 200.000 toneladas (Antunes et al., 2021). Os maiores produtores da fruta no país são os estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná e Espírito Santo e essa produção é predominante em pequenas áreas de base familiar.

A produtividade e a qualidade dos frutos de morangueiro são influenciadas por diferentes fatores. Esses podem ser de origem abiótica ou biótica, e entre os fatores bióticos estão presentes os fungos patogênicos, agentes causais de diferentes doenças, que acometem a cultura. As doenças foliares são um dos principais problemas da cultura e são causadas por espécies de fungos de diferentes gêneros.

No cultivo convencional o controle das doenças foliares é realizado com o uso de fungicidas químicos e de cultivares resistentes. No entanto, as plantas e frutos podem vir a apresentar residuais desses produtos químicos (ANVISA, 2016), e como uma parte da produção do morangueiro é consumido “in natura”, o consumidor estará mais exposto a essas moléculas, que são prejudiciais à saúde humana. Com intuito

de buscar alternativas sustentáveis ao controle de patógenos foliares, o uso de controle biológico, seja com organismos vivos ou com uso de bioprodutos a base de *Trichoderma* spp. tem-se destacado em diferentes patossistemas. Diante disso, neste estudo objetivou-se caracterizar o patossistema *Cercospora* spp. X morangueiro e buscar alternativas de controle biológico para *Cercospora* spp.

O primeiro estudo envolvendo a cercosporiose no morangueiro no Brasil, originou a publicação intitulada primeiro relato de *Cercospora* cf. *malloti* causando cercosporiose em *Fragaria x ananassa* DUCH. no Brasil (Capítulo 1). Neste estudo, foi realizada a identificação do patógeno *C. cf. malloti* associada as lesões folhas com sintomas de Cercosporiose em uma área comercial de morangueiro no município de Santa Maria – RS, primeiramente, pela descrição dos sintomas da doença e sinais do patógeno e, posteriormente, comprovada pela análise morfológica, molecular e patogênica do agente causal.

A fim de investigar a variabilidade de *Cercospora* spp. associadas à cercosporiose no morangueiro realizou-se um estudo mais abrangente, dando origem ao Capítulo 2 desta tese. No qual, foram coletadas folhas de morangueiro com sintomas de cercosporiose em nove municípios do Rio Grande do Sul e um de Santa Catarina, em diferentes sistemas de produção de morangueiro, totalizando 13 isolados de *Cercospora* spp. Esses isolados foram caracterizados morfológicamente e, posteriormente, foram submetidos ao método de agrupamento UPGMA (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”) e através do dendrograma gerado, agrupou-se os isolados em três grupos pela similaridade entre as médias dos caracteres morfológicos, a partir destes, foi realizada a identificação molecular e o teste de patogenicidade de dois isolados por grupo.

A identificação molecular de *Cercospora* spp. é bastante complexa, visto que espécies de *Cercospora* foram nomeadas em homenagem ao hospedeiro do qual eram isoladas, e na medida que se identificava a mesma espécie, no entanto, em outro hospedeiro, era descrita como uma nova espécie. Aliado a isso, tem-se a escassez dessas sequências genéticas em bancos de dados (Chupp 1954, Ellis 1971). No presente estudo, foram utilizadas quatro regiões gênicas a fim de identificar as espécies de *Cercospora*, sendo elas a região ITS (internal transcribed spacer) do rDNA, região do gene parcial da calmodulina (CAL), região da actina (ACT) e do fator de alongação 1-alfa (Tef-1).

A região ITS (internal transcribed spacer) do rDNA e do gene parcial da calmodulina foram inconclusivas para todos os isolados, corroborando com demais autores, que afirmam que essas regiões são limitadas para distinguir as espécies de *Cercospora*, sendo necessária a ampliação de outras regiões (GROENEWALD et al., 2010; GROENEWALD et al., 2013). Com base no sequenciamento nas regiões ACT e Tef-1 foi possível identificar a espécie dos isolados M2 e M6 como *C. kikuchii* e os demais somente como *Cercospora* sp., pela comparação com sequências similares depositadas no Genbank.

Fungos patogênicos do gênero *Cercospora* spp. são considerados mais evoluídos, pois conseguem conviver com o hospedeiro, não causando a rápida destruição da planta, mas sim, retirando nutrientes e interferindo na capacidade fotossintética da planta (AMORIM et al., 2018). Dessa forma, no capítulo 3 objetivou-se estudar alternativas sustentáveis para o controle de patógenos foliares, utilizando de agentes de biocontrole como o fungo *Trichoderma* spp., pois o gênero apresenta grande potencial para a supressão de fitopatógenos, devido seu amplo espectro de ação (ISAIAS et al., 2014).

Para avaliar a ação do antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre os isolados de *Cercospora* spp. causadores da cercosporiose em morangueiro, foram conduzidos testes “in vitro” e “in vivo”. Os testes “in vitro” foram de confrontação direta por pareamento de culturas e metabólitos voláteis, onde avaliou-se a inibição do crescimento micelial e o antagonismo segundo a escala de Bell et al. (1982) e também a produção de filtrado de cultura para avaliação do potencial biocontrolador. Já o teste “in vivo”, consistiu na aplicação preventiva de organismo vivo de *Trichoderma* e/ou filtrado de cultura, a fim de reduzir a severidade de *Cercospora* spp. quando inoculadas em plantas de morangueiro.

Para isso, foram selecionadas duas espécies de *Trichoderma* que apresentaram potencial de biocontrole em estudos anteriores (KRAHN, 2017): *T. asperellum* e *T. harzianum*, isolados IVCT1 e IST1, respectivamente, e seis isolados patogênicos de *Cercospora* spp. (M2, M6, M7, M8, M11 e M13) para os testes “in vitro” e para o teste “in vivo” utilizou-se apenas os isolados M6 e M11. O isolado M6 foi escolhido por ser o primeiro identificado e relatado como patogênico no Capítulo 1 e o M11 por destacar-se na caracterização morfológica, apresentando as maiores médias dos caracteres no Capítulo 2.

De modo geral, nos resultados dos testes “in vitro”, ambos os isolados de *Trichoderma* spp. inibiram o crescimento micelial de *Cercospora* spp., sendo influenciados pelas características de crescimento micelial desses. Mas vale destacar, que especificamente no teste de metabólitos voláteis, o isolado IST1 (*T. harzianum*) apresentou os maiores percentuais de inibição de crescimento micelial de *Cercospora* spp., podendo se inferir que o mesmo produz uma maior quantidade de compostos voláteis com capacidade antifúngica. Em meio de cultivo de suco de vegetais V8, os isolados de *Cercospora* spp. produziram cercosporina, uma toxina produzida por algumas espécies do gênero, que causa toxidez as plantas e também é responsável pela coloração púrpura da lesão. Na avaliação do potencial de biocontrole “in vivo” dos isolados de *Trichoderma* spp., os resultados foram positivos, visto que teve-se a redução da severidade de ambos os isolados de *Cercospora* spp. Embora, no isolado M11, essa redução tenha sido inferior, ela diferiu da testemunha, demonstrando o potencial antagonico das formulações a base de *Trichoderma* spp.

A eficiência do potencial de biocontrole “in vivo” dos isolados de *Trichoderma* spp. e suas formas de aplicação sofre influência do isolado patogênico. O isolado M6 obteve uma agressividade menor e, conseqüentemente, uma severidade e AACPD também menor, se comparado ao isolado M11. Isso pode estar relacionado as características morfológicas desses isolados, pois ambos diferem quanto ao crescimento micelial e tamanho de conídios. Além disso, a identificação da espécie do isolado M11 foi inconclusiva, sendo classificado apenas como pertencente ao gênero *Cercospora*.

A caracterização do patossistema *Cercospora* spp. x morangueiro, bem como alternativas de controle biológico da doença, são estratégias que podem ser utilizadas no manejo integrado de doenças para a cultura, pois visam uma produção mais limpa e sustentável, auxiliando no desenvolvimento da hortifruticultura do país.

6. CONCLUSÃO GERAL

Neste estudo, concluiu-se que a ocorrência de cercosporiose na cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.), nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, com base nas regiões gênicas actina e fator de alongação do DNA, tem

como agente causal um complexo de espécies de *Cercospora* spp., entre elas *C. kikuchii*.

Nos testes “in vitro”, os isolados de *Trichoderma* spp. foram capazes de inibir o crescimento micelial de *Cercospora* spp., tanto por pareamento de culturas, metabólitos voláteis ou metabólitos não voláteis. No filtrado de cultura de cultura, de ambos os isolados, foi identificada a presença de ácidos graxos. O isolado IST1 foi capaz de metabolizar o composto Butanol 3-methyl acetate, conhecido como acetato de isoamila. Esses compostos apresentam ação bioativa contra diferentes micro-organismos.

O uso de forma preventiva de organismo vivo e/ou filtrado de cultura de *T. asperellum* ou *T. harzianum* em plantas saudáveis de morangueiro, diminuíram a severidade de *Cercospora kikuchii* e de *Cercospora* spp. Embora, tenha-se observado redução da severidade do patógeno, o isolado M11 (*Cercospora* spp.) apresentou uma maior agressividade, visto que AACPD foi maior nessa situação. Diante disso, é importante salientar a necessidade da realização de estudos complementares, a fim de identificar essa e demais espécies.

Tendo como aporte os resultados dos testes “in vitro” e “in vivo”, é possível afirmar que os isolados de *Trichoderma* IVCT1 e IST1 apresentam potencial biocontrolador à *Cercospora* spp. e podem ser utilizados em programas de controle biológico, aliados ao manejo integrado de doenças em morangueiro, a fim de uma produção mais sustentável e segura.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. V. 1, Editora: Agronômica Ceres. 704 p. 2018.
- ANTUNES, L. E. C. et al. Morango: produção aumenta ano a ano. **Anuário HF: Campo & Negócios**. São Paulo, p. 87 – 90, 2021. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/222342/1/Antunes-Anuario-HF-2021-pag-87.pdf>> Acesso em: 30 abr. 2022
- ANTUNES, L. E. C.; BONOW, S.; LIMA, R. H. DE, COSTA, H.; PAULUS, G.; RIES, J. Morango: produção aumenta ano a ano. **Campo & Negócios**, p.87–90, 2021. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1131057/morango-producao-aumenta-ano-a-ano>>. Acesso em: 25 jul. 2022.
- ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos**. Brasília. nov. 2016.
- BRAZANTI, E. C. **La fresa**. Madri: Mundi-Prensa, 1989.
- CHUPP C. A monograph of the fungus genus *Cercospora*. Ithaca, New York. 1954.
- ELLIS M. R. Hifomicetos Dematáceos. Kew, Inglaterra: **Commonwealth Mycological Institute**. 1971.
- ESLAHI, N. et al. The profile change of defense pathways in *Phaseolus vulgaris* L. by biochemical and molecular interactions of *Trichoderma harzianum* transformants overexpressing a chimeric chitinase. **Biological Control**, v. 152, p. 104304, 2021. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104304>> . Acesso em: 29 jan. 2023.
- FALCÃO, J. V. et al. Qualidade do solo cultivado com morangueiro sob manejo convencional e orgânico. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 4, p. 450-459, out./dez. 2013.
- FRIEDERICH, K. et al. Situação regulatória internacional de agrotóxicos com uso autorizado no Brasil: potencial de danos sobre a saúde e impactos ambientais. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 37, n. 4, 2021. DOI:10.1590/0102-311X00061820
- GROENEWALD J.Z. et al. Especificação e gama de hospedeiros de *Cercospora*. In: **Mancha foliar Cercospora de beterraba sacarina e espécies relacionadas**. LARTEY R.T.; WEILAND J.J.; PANELLA L.; CROUS P.W.; WINDELS C.E.. APS Press, Minnesota EUA: p. 21–37, 2010.
- GROENEWALD J.Z. et al. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. **Studies in Mycology** v. 75, p. 115–170, 2013. Disponível em;< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3713887/>> Acesso em: 25 mai 2021. DOI: <https://doi.org/10.3114%2Fsim0012>

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo agropecuário 2017: dados preliminares**. Rio de Janeiro. 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6619#resultado>>. Acesso em: 26 abr. 2019.

Jl, S. et al. *Trichoderma* biofertilizer (mixTroTha) mediates *Malus sieversii* resistance to *Alternaria alternata*. **Biological Control**, v. 156, p. 104539, 2021. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104539>> . Acesso em: 29 jan. 2023.

KRAHN, J. R. T. et al, First report of *Cercospora* cf. *malloti* causing brown eyespot on strawberry in Brazil **Plant Disease**, v. 106, n. 9, e2530, 2022 (a). <https://doi.org/10.1094/pdis-10-21-2385-PDN> .

KRAHN, J. R. T. et al, Morphophysiological and molecular characterization of *Cercospora* spp. in *Fragaria* × *ananassa* Duch. Revista Brasileira de Ciências Agrárias. v.17, n.4, p. 1-9, 2022 (b). Disponível em: <http://www.agraria.pro.br/ojs32/index.php/RBCA/article/view/v17i4a2745>> Acesso: 06 jan 2022. DOI: <https://doi.org/10.5039/agraria.v17i4a2745>

KRAHN, J. R. T. **Microbiota do solo em três sistemas de cultivo de citros e patogenicidade de *Fusarium* spp.** 2017. 94 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2017.

LOPES, C. V.A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. de Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde e debate**. Rio de Janeiro. v. 42, n. 117, p. 518 -534, abr-jun 2018.

LOPES, E. P. et al. A new species of *Calonectria* causing rot on ripe strawberry fruit in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, v. 47, n. 1, p. 1-11, 2017.

MADAIL, J. C. M. Panorama econômico IN: ANTUNES, L. E. C.; REISSER, C. J.; SCHWENGBER, J. E.(Org.). **Morangueiro**. Brasília: Embrapa, 2016. v.1, p. 17-33.

MAYO, S. et al. Development of a qPCR strategy to select bean genes involved in plant defense response and regulated by the *Trichoderma velutinum*–*Rhizoctonia solani* interaction. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1109, 2016.

OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P.; SCIVITTARO, W. B. Mudanças certificadas de morangueiro: maior produção e melhor qualidade da fruta. **A lavoura**, Rio de Janeiro, v. 108, n 655, p. 35-38, 2005.

PARISI, M. C. M. et al. Doenças do morangueiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2016. p. 561-572.

REIS, A.; COSTA, H. Principais doenças do morangueiro no Brasil e seu controle. **Comunicado técnico 96: EMBRAPA**. Brasília, DF. P. 9 dez. 2011.

RONQUE, E. R. V. **A cultura do morangueiro**. Curitiba: Emater, 1998. 206 p.

VAUGHAN, J. G.; GEISLER, C. A. **The new Oxford book of food plants**. New York: Oxford University, 1997. 237 p.

VINALE, F. et al. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 72, n. 1-3, p. 80-86, 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>>. Acesso em: 30 jan. 2023.

YASSIN, M. T. et al. Antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* strains against some fusarial pathogens causing stalk rot disease of maize, in vitro. **Journal of King Saud University-Science**, p. 101363, 2021. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101363>> Acesso em: 29 jan. 2023.

ZHANG, S.; GAN, Y.; XU, B. Application of plant-growth-promoting fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 enhances tolerance of wheat to salt stress through improvement of antioxidative defense system and gene expression. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1405, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01405>>. Acesso em: 30 jan. 2023.