

POTENCIAL DE FUNGOS MICOPARASITAS NO BIOCONTROLE
DA PINTA-PRETA DO MAMOEIRO

JANIELI MAGANHA SILVA VIVAS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2018

POTENCIAL DE FUNGOS MICOPARASITAS NO BIOCONTROLE
DA PINTA-PRETA DO MAMOEIRO

JANIELI MAGANHA SILVA VIVAS

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Silvaldo Felipe da Silveira.

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

053/2018

V856| Vivas, Janieli Maganha Silva.

Potencial de fungos micoparasitas no biocontrole da pinta-preta do mamoeiro / Janieli Maganha Silva Vivas. – Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

113 f. : il.

Bibliografia: 93 – 113.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2018.

Orientador: Silvaldo Felipe da Silveira.

1. Identificação Molecular. 2. *Acremonium* sp. 3. *Asperisporium caricae*. 4. Fungos - Antagonismo. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 634.651

POTENCIAL DE FUNGOS MICOPARASITAS NO BIOCONTROLE
DA PINTA-PRETA DO MAMOEIRO

JANIELI MAGANHA SILVA VIVAS

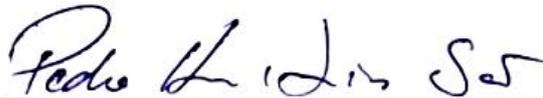
“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Produção Vegetal”

Aprovada em 08 de março de 2018.

Comissão Examinadora:



Prof. Danilo Batista Pinho (D. Sc., Fitopatologia) – UNB



Pedro Henrique Dias dos Santos (D. Sc., Produção Vegetal) – UENF



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



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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

Aos Colegas de Laboratório pela amizade e convivência;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de Doutorado;

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

SUMÁRIO

RESUMO	V
ABSTRACT	Vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. A importância da cultura do mamoeiro	4
2.2. A pinta-preta no mamoeiro	5
2.3. Controle da pinta-preta do mamoeiro.....	7
2.4. Controle biológico	9
2.4.1. O gênero <i>Acremonium</i> sp	11
2.4.2. A espécie <i>Hansfordia pulvinta</i>	12
2.5. Indução de resistência sistêmica em mamoeiro	13
3. TRABALHOS	16
3.1. IDENTIFICAÇÃO DE <i>Acremonium</i> spp. MICOPARASITAS DE <i>Asperisporium caricae</i>	16
3.1.1. Resumo	16
3.1.2. Abstract	17
3.1.3. Introdução	17
3.1.4. Material e Métodos	19
3.1.5. Resultados	21
3.1.6. Discussão.....	31
3.1.7. Conclusão	33
3.1.8. Referências	33
3.2. Antagonismo de fungos com potencial de biocontrole da pinta preta causado por <i>Asperisporium caricae</i>	38

3.2.1. Resumo	38
3.2.2. Abstract	39
3.2.3. Introdução	40
3.2.4. Material e Métodos	41
3.2.5. Resultados e Discussão	45
3.2.6. Conclusão.....	52
3.2.7. Referências.....	52
3.3. Sensibilidade de fungos micoparasitas a produtos alternativos com potencial de uso no controle da pinta-preta do mamoeiro	56
3.3.1. Resumo	56
3.3.2. Abstract	57
3.3.3. Introdução	58
3.3.4. Material e Métodos	60
3.3.5. Resultados e Discussão	64
3.3.6. Conclusão	72
3.3.7. Referências	72
3.4. O progresso da pinta preta e fungos micoparasitas em diferentes genótipos de mamoeiro sob condições naturais de inoculação	76
3.4.1. Resumo	76
3.4.2. Abstract	77
3.4.3. Introdução	78
3.4.4. Material e Métodos	79
3.4.5. Resultados e Discussão	82
3.4.6. Conclusão	90
3.4.7. Referências	91
4. RESUMO E CONCLUSÃO GERAL	94
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

RESUMO

VIVAS, Janieli Maganha Silva D. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2018. Potencial de fungos micoparasitas no biocontrole da pinta-preta do mamoeiro. Orientador: Prof. Silvaldo Felipe da Silveira.

Para o controle da pinta-preta do mamoeiro, causada pelo fungo *Asperisporium caricae*, a pulverização com fungicidas é ainda a principal medida, havendo, portanto, a necessidade de se buscar alternativas de controle de maior sustentabilidade, tais como o controle biológico. Esta possibilidade se consolida pelo fato de ocorrerem no campo fungos de coloração branca colonizando lesões da pinta-preta do mamoeiro. O objetivo deste trabalho foi: i) identificar as espécies de fungos micoparasitas de *Asperisporium caricae*; ii) avaliar a atividade antagônica dos fungos a *A. caricae*; iii) analisar a sensibilidade de fungos micoparasitas a indutores de resistência; e, iv) determinar o progresso da pinta-preta e de fungos micoparasitas em diferentes genótipos de mamoeiro sob condições naturais de inoculação. Para a identificação, isolados de *Acremonium* com potencial de micoparasitismo foram caracterizados quanto à morfologia, extraiu-se o DNA genômico e sequenciaram-se as regiões gênicas LSU, RPB2 e Actina. No estudo de antagonismo, um isolado de cada espécie foi avaliado em co-cultivo com os esporos em germinação do patógeno. Além disso, avaliou-se a atividade enzimática (protease e lipase) dos fungos, em meio de cultura específico para cada enzima, bem como a produção de componentes voláteis e não voláteis, com atividade antagônica a *A. caricae*. No estudo de sensibilidade,

quatro isolados antagonistas - três de *Acremonium* (um de cada espécie) e um de *Hansfordia pulvinata* - foram cultivados em meio de cultura juntamente com os produtos alternativos: Agro-Mos[®], Bion[®], Ecolife[®], Hortifos pk[®], Matriz G[®], Vitaphol[®]. Avaliou-se a toxicidade dos produtos testados com base no índice biológico, calculado a partir dos valores de crescimento micelial, esporulação e germinação dos conídios. Os produtos considerados compatíveis com os isolados de fungos micoparasitas foram pulverizados em plantas sintomáticas, sob condições de telado. Por fim, avaliou-se, ao longo de um ano, a ocorrência natural da pinta-preta e de fungos micoparasitas em três genótipos de mamoeiro no campo, em lavoura de Mimoso do Sul - ES, sendo estimada, mensalmente, a incidência e a severidade da doença pinta-preta e dos fungos micoparasitas na folha intermediária e na última folha. Obtiveram-se as frequências dos gêneros dos fungos micoparasitas nas diferentes épocas do ano. Foi possível identificar ocorrência de três novas espécies de *Acremonium* sp. associadas ao micoparasitismo em pinta-preta do mamoeiro: *Acremonium* sp I (CF/UENF 446, COAD 1733), *Acremonium* sp II (CF/UENF449, COAD1730) e *Acremonium* sp III (COAD 1731), todas pertencentes à família Bionectriaceae e ao complexo de espécies de *A. sclerotigenum*. Confirmou-se no co-cultivo o evento de micoparasitismo para a maioria dos isolados micoparasitas, com exceção de *Simplicillium implicatum*. Maiores atividades de protease foram observadas para *S. implicatum*, *S. lanosoniveum* e duas espécies de *Acremonium* sp. Já para lipase, um isolado de *H. pulvinata* e uma espécie de *Acremonium* sp apresentaram maiores atividades. Não se observou efeito de componentes voláteis sobre a germinação de conídios do patógeno. Por outro lado, uma espécie *Acremonium* sp. apresentou forte efeito de antibiose *in vitro* para compostos não-voláteis a *A. caricae*. O fungo *H. pulvinata* apresentou-se compatível com a maioria dos produtos testados com exceção de Hortifos[®]. O produto Bion[®] e Matriz[®] apresentaram-se compatíveis com todos os isolados testados tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Nos três genótipos, a doença e o micoparasitismo foram mais intensos nos meses de temperaturas mais frias, coincidindo com as épocas mais úmidas e de maiores índices pluviométricos. *H. pulvinata* e *Acremonium* sp. foram os fungos predominantes, sendo o primeiro mais frequente em épocas mais frias e o segundo, em épocas mais quentes.

ABSTRACT

VIVAS, Janieli Maganha Silva D. Sc., Northern Rio de Janeiro State University Darcy Ribeiro. March, 2018. Potential of mycoparasite fungi in the biocontrol of papaya black-spotted. Advisor: Prof. Silvaldo Felipe da Silveira.

For the control of the black-spot of pa caused by the fungus *Asperisporium caricae* paya, fungicides sprays are the main measure, and being necessary to look for alternatives of control of greater sustainability, such as biological control. This possibility is reinforced by the fact that there are white-colored fungi colonizing papaya black-spot lesions under field conditions. Therefore, the objective of this work was: i) to identify the mycoparasite fungi species of *Asperisporium caricae*; ii) to evaluate the antagonistic activity of fungi under *A. caricae*; iii) to analyze the sensitivity of mycoparasites to resistance inducers; and iv) determine the progress of black-spot and mycoparasite fungi in different genotypes of papaya under natural inoculation conditions. For the identification, isolates of *Acremonium* obtained with potential of mycoparasitism were studied morphologically and extracted from DNA and sequenced the region LSU, RPB2 and Actin for phylogenetic analysis. For antagonism studies, one isolate of each species was evaluated in microculture with the pathogen. In addition, we evaluated the enzymatic activity (protease and lipase) of fungi, in culture medium specific for each enzyme, as well as a production of volatile and non-volatile components. In the sensitivity study, four antagonist isolates - three from *Acremonium* (one from each species) and one from *H. pulvinata* - were grown in culture medium with the

alternative products: Agro-Mos[®], Bion[®], Ecolife[®], Hortifos pk[®], Matrix G[®], Vitaphol[®]. In vitro, we evaluated the toxicity of the tested products based on the magnitudes of the biological index obtained by the values of mycelial growth, sporulation and conidia germination. Only the products considered compatible with the four isolates were tested in vivo, being sprayed in symptomatic plants with isolates with screened products. Finally, a natural occurrence of black-spot and mycoparasite fungi in three papaya genotypes was evaluated, and the incidence and severity of black-spot disease and mycoparasite fungi on the intermediate and last leaves were monthly estimated. Also, the frequencies of each genus of mycoparasite fungi were plotted along year. Three new species of *Acremonium* associated with mycoparasitism of *A. caricae* were described: New species 01 (isolates A-601, A-602, A-603), New species 02 (isolates A-598, A-604, A -616, A-618, A-619) and New species 03 (isolated A-617), all signatures of a Bionectriaceae family and the *A. sclerotigenum* species complex. The mycoparasitism interactions with germilings spores were confirmed for most of the tested isolates, except for *Simplicillium implicatum*. Larger protease activities were observed in *S. implicatum*, *S. lanosoniveum* and two species of *Acremonium* sp. However, for lipase, *H. pulvinata* and one species of *Acremonium* sp presented greater activities. No effect of volatile components was observed. For the non-volatils, there was production of antifungal metabolite with prominence for an *Acremonium* sp. The *H. pulvinata* fungus were insensible (compatible) to most of the products tested except Hortifos[®]. The Bion[®] and Matriz[®] products were compatible with all isolates tested both in vitro and in vivo. In all three genotypes, the disease and mycoparasitism levels were more intense in the months of colder temperatures, coinciding with the wetter seasons and higher rainfall periods. *H. pulvinata* and *Acremonium* sp. were the predominant fungi, the first being more frequent in colder times, and the second in warmer times.

1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) está entre as fruteiras mais cultivadas e consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Atribui-se essa demanda crescente do consumo da fruta *in natura* à intensificação de seu uso pela indústria, compondo alimentos funcionais e fármacos. Apesar da importância econômica e social incontestável, a cultura do mamoeiro esbarra em problemas de natureza fitossanitária. Dentre as doenças fúngicas, a principal é a pinta-preta [*Asperisporium caricae* (Speg.) Maubl.] que reduz a produtividade e onera o custo de produção, devido à necessidade de aplicações constantes de fungicidas para seu controle (Barreto et al., 2011).

Antigamente, reportada como doença secundária, a pinta-preta tornou-se a principal doença na cultura do mamoeiro, por depreciar os frutos e favorecer as podridões secundárias em pós-colheita (Ventura e Rezende, 2016). No campo, as lesões foliares da pinta-preta reduzem a área fotossintética e ao incidir nos frutos, deprecia-os comercialmente, ainda, enquanto verdes (Ventura et al., 2004). Plantas muito afetadas podem perder de 50 a 60% de suas folhas ativas em um período de dois a três meses e a incidência de frutos doentes pode atingir 100% (Zambolim et al., 2002). Santos e Barreto (2003) relatam perdas de 30% na comercialização de mamão em São Paulo, em decorrência do ataque de pinta-preta. A espécie *A. caricae* é relatada como uma espécie parasita obrigatória (Holliday, 1980) ou fastidiosa, embora já haja relatos de seu cultivo *in vitro* (Silva, 2010, Oliveira, 2015). A pulverização de fungicidas é necessária para se garantir

a produção do mamoeiro, com reflexos negativos para a saúde humana, o ambiente e a comercialização. Ademais, o mamoeiro é uma planta sensível a produtos químicos, especialmente fungicidas triazóis em formulações oleosas (Ventura et al., 2003).

A demanda mundial por alimentos funcionais e de qualidade requer o uso de insumos menos tóxicos e justifica a pesquisa visando o desenvolvimento de práticas sustentáveis de produção e de controle de doenças na agricultura. No último caso, os produtos indutores de resistência, ou ativadores de plantas, vêm se destacando por apresentarem eficiência no controle de doenças em várias culturas e por serem praticamente atóxicos, pois não deixam resíduos prejudiciais à saúde humana e ao ambiente (Resende et al., 2007). Os indutores de resistência não atuam do mesmo modo que os agroquímicos convencionais, pois apresentam baixa toxicidade ao organismo alvo, ativando os mecanismos de defesa latentes nas plantas (Pascholat, 2003). Por outro lado, o controle biológico desponta como alternativa ao uso de agrotóxicos na cultura do mamoeiro (Vivas, 2014; Vivas et al., 2017), especialmente no sistema de cultivo orgânico. Salienta-se que não há, atualmente, cultivares com resistência genética total à pinta-preta, que possa ser explorada em lavouras comerciais nem tampouco produtos alternativos ou biológicos para o controle de doença na cultura do mamoeiro (Vivas et al., 2012; Vivas et al., 2015a).

Segundo Cook e Baker (1983), o controle biológico consiste na redução do inóculo patogênico ou das atividades determinantes da doença (crescimento, infectividade, virulência, agressividade e outras qualidades do patógeno, ou processos que determinam infecção, desenvolvimento de sintomas e reprodução) resultante da ação de um ou mais organismos, que não o homem. O controle biológico tem sido testado e apresentado potencial de utilização em várias culturas (Peresse e Picard, 1980; Camponhola e Bettilo, 2003; Bettilo et al., 2008, 2009). Em mamoeiro, Vivas et al. (2015b, 2017) isolaram, sequenciaram a região *Internal transcribed spacer* (ITS) e identificaram os fungos *Hansfordia pulvinata* e *Acremonium sp* como micoparasitas em lesões de *A. caricae* em pinta-preta do mamoeiro. Com base em testes *in vitro* e mediante inoculação de fungos micoparasitas em lesões de pinta-preta em mudas de mamoeiro, sob condições controladas, concluiu-se que há possibilidade de se utilizar estes fungos no controle biológico da pinta-preta do mamoeiro.

Entretanto, novos estudos sobre a atividade destes fungos micoparasitas *in vitro* são necessários para elucidar o modo de ação destes agentes sobre o patógeno e estudos em campo são necessários, sob os pontos de vista ecológico e epidemiológico, bem como para se avaliar a influência das condições climáticas sobre o patógeno e os fungos micoparasitas. Tais informações, ainda inexistentes, são imprescindíveis para se implementar com sucesso o biocontrole da pinta-preta na cultura do mamoeiro.

Aventa-se, ainda, a possibilidade da combinação de duas técnicas, indução de resistência e controle biológico, visando potencializar o controle sustentável da pinta-preta, pois cada técnica atua de forma independente e em diferentes fases do ciclo infeccioso. Enquanto a indução de resistência previne novas infecções, reduzindo a infecção e a colonização bem como o surgimento de novas lesões, o controle biológico com micoparasitas atuaria nas lesões esporuladas em folhas inferiores, possivelmente impedindo a multiplicação e a disseminação do patógeno. Com base nesta hipótese, é necessário estudar a sensibilidade de fungos micoparasitas a produtos indutores de resistências, no intuito de se embasar o controle integrado, aliado à indução de resistência sistêmica, no controle sustentável da pinta-preta do mamoeiro.

Neste sentido, visando dar continuidade aos trabalhos de biocontrole da pinta-preta do mamoeiro, conduzidos no laboratório de Entomologia e Fitopatologia da Universidade do norte Fluminense Darcy Ribeiro, o presente estudo foi realizado com objetivo de: a) Identificar em nível de espécie isolados de fungos micoparasitas de *Asperisporium caricae*; b) Avaliar a atividade antagônica dos fungos sob *A. caricae*; c) Avaliar a sensibilidade *in vivo* de micoparasitas a indutores de resistência e, d) Avaliar o progresso da pinta-preta e de fungos micoparasitas em diferentes genótipos de mamoeiro sob condições naturais de inoculação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A importância da cultura do mamoeiro

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma das fruteiras mais comuns em quase todos os países da América Tropical. A fruta é usada como fonte importante de papaína, enzima proteolítica de ação semelhante à da pepsina e tripsina, empregada para os mais variados usos nas indústrias têxteis, farmacêutica, de alimentos e cosméticos. Das folhas, frutos e sementes do mamoeiro são extraídos também um alcaloide denominado carpaína, utilizado como ativador cardíaco. Além disso, o mamão é boa fonte de cálcio e excelente fonte de pró-vitamina A e de ácido ascórbico (vitamina C), sendo que o teor deste último aumenta com a maturação do fruto (Trindade, 2000).

Segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), em 2016, a produção mundial de mamão girou em torno de 13 milhões de toneladas, das quais 33,1% são produzidas na América Latina e Caribe (FAO, 2018). O Brasil, com uma produção de aproximadamente 1,5 milhões de toneladas, é o segundo maior produtor mundial de mamão, ficando atrás somente da Índia. No entanto, o potencial brasileiro de exportação do mamão é muito grande, visto que as variedades produzidas no país são compatíveis com a demanda do mercado externo (Cruz, 2008). Ainda, segundo dados da FAO (2018) nos últimos anos, houve um aumento da área plantada e da produção de mamão no Brasil.

Um dos fatores que limita a capacidade de exportação do mamão brasileiro é a falta de certificação na adoção de programas que atestem a qualidade das frutas, e do manejo fitossanitário dependente de pulverizações com fungicidas para o controle de doenças foliares, dentre elas, a pinta-preta. Exigências dessa natureza têm sido feitas pelo Mercado Comum Europeu, principal comprador do mamão brasileiro, bem como pelo mercado norte americano (Cruz, 2008). Sendo de grande interesse alternativas de controle dentro de um programa de qualidade sanitária para a cultura.

2.2. A pinta-preta do mamoeiro

A cultura do mamoeiro tem sido relatada como hospedeira de aproximadamente 171 diferentes espécies de fungos no mundo (Nishijima e Zhu, 2004). Dentre esses, o fungo *Asperisporium caricae* (Speg.) Maubl, agente causal da pinta-preta, constitui-se no mais importante patógeno foliar da cultura, pela depreciação do aspecto comercial da fruta e pela exigência de muitas aplicações de fungicidas para o seu controle (Nishijima et al., 1994; Santos Filho et al., 2007). Santos e Barreto (2003) relatam perdas de 30% na comercialização de frutos de mamão em São Paulo. Segundo Liberato e Zambolim (2002), plantas muito afetadas podem perder de 50 a 60% de suas folhas maduras (completamente desenvolvidas) em um período de dois a três meses e a incidência da doença em frutos pode atingir quase 100%.

No Brasil, a primeira descrição da pinta-preta foi conduzida por Maublanc em 1913, no estado do Rio de Janeiro. A pinta-preta é a doença mais comumente observada, tanto em pomares comerciais quanto em pomares domésticos. O patógeno encontra-se disseminado na maioria das regiões tropicais e subtropicais do globo, incluindo a África do Sul, Argentina, Austrália, Ilhas Bermudas, Ilhas Salmão, Colômbia, Cuba, El Salvador, Flórida, Índia, Jamaica, Japão, México, Peru, Porto Rico, Quênia, Sri Lanka, Tanzânia, Venezuela e Zimbábue (Liberato et al., 2007). Os mesmos autores ainda relataram a ocorrência de pinta-preta nos E.U.A. Canadá e Filipinas.

A primeira denominação do agente causal da pinta-preta do mamoeiro foi feita por Spegazzini como *Cercospora caricae*, em 1886. Ao longo dos anos

ocorreram mudanças taxonômicas e na nomenclatura, tendo como sinonímias as espécies: *Epiclinium cumminsii* Masee, *Scolecotrichum caricae* Ellis & Everh., *Fusicladium caricae* (Speg.) Sacc., *Pucciniopsis caricae* Earle. Atualmente, *A. caricae* é o nome válido, sendo a espécie-tipo do gênero (CMI, 1990; Seifert, 2011)

A espécie *A. caricae* é um fungo cercosporoide biotrófico, dado a dificuldade de seu cultivo e esporulação *in vitro*. Sua posição taxonômica é proposta com base em análises filogenéticas de sequências nucleotídicas de genes conservados, estando inserido na família Mycosphaerellaceae, ordem Capnodiales, classe e sub-classe Dothideomycetes, filo Ascomycota, reino Fungi (INDEX FUNGORUM, 2018). No entanto, alguns aspectos taxonômicos do gênero *Asperisporium* são controversos, tais como a comprovação de existência de fase sexual ou teleomórfica em *Mycosphaerella*. Estudos mostram que *Mycosphaerella caricae* (Maubl.) Hansf. não é o teleomorfo de *A. caricae*. Segundo Videiras et al (2017), estas espécies estão mais próximas de *Mycosphaerella* e *Paramycovellosiella*.

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

A infecção dá-se, comumente, na face inferior das folhas mais velhas, servindo de fonte de inóculo para os frutos, daí a importância de controlar a doença primeiramente nelas. A doença é mais severa em períodos chuvosos e em regiões com alta umidade relativa (Adikaram e Wijepala, 1995; Elder et al., 2000). Nas faces inferiores das folhas, o fungo desenvolve frutificações pulverulentas que formam manchas pequenas, geralmente menores do que 4 mm de diâmetro, circulares, ligeiramente angulosas de coloração escura. Na face superior das folhas correspondentes à lesão, formam-se lesões semelhantes de

coloração pardo-clara envolvida por uma pequena depressão e halo amarelo (Luna, 1986).

Nos frutos os primeiros sintomas são verificados quando estes ainda estão verdes, na forma de manchas circulares semelhantes às lesões das folhas. O tamanho das manchas acompanha o desenvolvimento dos frutos, tornam-se então pretas e salientes, ásperas ao tato, porém, limitando-se à camada superficial do fruto (Liberato et al., 2007). Estas lesões não atingem a polpa, sendo restritas apenas à casca, onde causam endurecimento na parte afetada. Porém, os frutos manchados não são comercializados, pois as manchas reduzem a sobrevida na pós-colheita, por predispor os frutos a podridões secundárias. A presença de apenas algumas lesões inviabiliza a exportação do fruto (Kimati et al., 2005)

A grande frequência com que a doença é encontrada no campo indica que o fungo não tem problemas de sobrevivência, provavelmente porque o mamoeiro apresenta folhas suscetíveis durante todo o ano, e também indica que os conídios são disseminados pelo vento a longas distâncias. Respingos de chuva e água de orvalho também contribuem para a disseminação. (Rezende e Martins, 2005). Estudos conduzidos no campo na região de Linhares, Estado do Espírito Santo, sugerem que as condições favoráveis ao desenvolvimento de epidemias sejam temperaturas variando de 25 °C a 30 °C e umidade relativa variando de 80% a 100%, sendo o pico da intensidade da doença entre os meses de novembro a março, (Suzuki et al., 2007). Todavia, estudos monocíclicos sob condições controladas são necessários.

2.3. Controle da pinta-preta do mamoeiro

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

No sistema de cultivo atual, a pulverização de fungicidas convencionais é necessária para se garantir a produção do mamoeiro, com reflexos negativos para a saúde humana, o ambiente e a comercialização. Todavia, o mamoeiro é uma planta muito sensível a produtos químicos, especialmente fungicidas triazóis em formulações oleosas, os mais utilizados no combate às doenças foliares causadas por fungos na agricultura (Liberato et al., 1999). Ademais, o mercado internacional, cada vez mais exigente, estabelece níveis de tolerância de resíduos de agroquímicos mínimos, com base em métodos analíticos modernos, de alta capacidade de detecção. A recusa de cargas de frutas por presença de resíduos de agrotóxicos é altamente prejudicial à comercialização, não somente pela perda econômica, mas principalmente pelo marketing negativo à exportação de frutas tropicais brasileiras.

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

O melhoramento genético, pela seleção de genótipos resistentes, constitui medida alternativa. Esta metodologia baseia-se em uma medida sustentável de controle da pinta-preta do mamoeiro, trata-se de uma tecnologia sem impactos ao meio ambiente e à saúde humana. Entretanto, não há relatos de cultivares que sejam imunes/resistentes a esta doença (Santos e Barreto, 2003; Dianese et al., 2007; Vivas et al., 2012; Vivas et al., 2015a; Poltronieri et al., 2017).

Para o controle de doenças fúngicas em culturas agrícolas, dentre as alternativas ao controle químico convencional, feito normalmente pela pulverização com fungicidas orgânico-sintéticos, desponta atualmente a indução da resistência (Santos et al., 2017) e o controle biológico (Vivas et al., 2017). Produtos indutores de resistência, com destaque para o Acybenzolar-S-metil, são praticamente atóxicos ao homem e ao ambiente, sendo prontamente decompostos e não deixam resíduos nos alimentos. Seu modo de ação é indireto, pela indução de mecanismos de defesa latentes nas plantas, as quais reagem prontamente à infecção por agentes biológicos nocivos, impedindo infecções (Santos et al., 2017).

Outra medida de controle seria o controle biológico, o qual, segundo Cooker e Beker (1983), consiste na redução do inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, pela atividade antagônica por um ou mais organismos. Fungos micoparasitas dos gêneros *Hansfordia* e *Acremonium* têm sido encontrados em lesões da pinta-preta do mamoeiro (Vivas et al., 2017).

2.4. Controle biológico

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

Inicialmente o controle biológico foi aplicado para controlar insetos, ácaros, e ervas daninhas. Com o passar do tempo, seu emprego se tornou mais amplo e outros invertebrados, patógenos de plantas e mesmo alguns vertebrados são considerados alvos (Parra et al., 2002). Em 1932, o fungo *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz [*Trichoderma viride* (Pers)] foi observado parasitando fungos fitopatogênicos. Este foi o primeiro relato do uso de fungos como agente de biocontrole de fungos patogênicos, induzindo um processo em torno de pesquisas do uso de micoparasitas para esta finalidade (Adams, 1990). No Brasil, embora o uso do controle biológico não seja uma prática generalizada entre os agricultores, há avanços significativos para algumas culturas. Um exemplo de sucesso consiste no uso de *Trichoderma* no controle de *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Botrytis* e *Crinipellis*, nas

culturas do feijão, soja, algodão, fumo, morango, tomate, cebola, alho, plantas ornamentais e cacau (Bettiol e Morandi, 2009; Silva et al., 2017).

Dado a sua ampla gama de hospedeiro, o gênero *Trichoderma* foi avaliado (através de pareamento de cultura, teste de metabólitos fixo e teste de metabólitos voláteis) por Almeida (2009) contra culturas de *Colletotrichum* spp, *Cercospora musae* e *Asperisporium caricae*, a fim de viabilizar o seu controle biológico, *T. viride* mostrou-se ampla potencialidade para antagonizar os fitopatógenos testados. Os resultados obtidos neste trabalho para o fungo *A. caricae* são questionáveis uma vez que o tempo de condução do experimento (7 a 15 dias em BDA) tanto para o antagonista quanto para o patógeno torna inviável a competição *in vitro*. *A. caricae* apresenta crescimento lento, portanto no experimento supracitado, o tempo de incubação não permite o crescimento de colônias do patógeno. Segundo Oliveira (2005), o fungo *A. caricae* é cultivado com dificuldade em meio de cultura artificial no laboratório e, nesta condição, possui crescimento muito lento, com o diâmetro das colônias atingindo 2 mm em dois meses de cultivo.

Em mamoeiro existem trabalhos testando *Trichoderma* no tratamento de solo e substratos ou a microbiolização de sementes no controle da podridão-do-pé causada por *Phytophthora* spp (Ueno e Silva, 2001; Tatagiba et al., 2005, Dianese et al., 2007). Entretanto, trabalhos conduzidos na busca de controle de fitopatógenos fúngicos de partes aéreas na cultura do mamoeiro são propostos por Vivas et al. (2014, 2017). Estes autores observaram que em folhas de mamoeiro com lesões de pinta-preta ocorriam fungos micoparasitas pertencentes à espécie *Hansfordia pulvinata* e a *Acremonium* spp, os quais colonizaram lesões foliares de pinta-preta em mudas de mamoeiro, sob condições de telado.

2.4.1. O gênero *Acremonium* sp

O gênero *Acremonium* Link foi revisto morfológicamente por Gams (1971; 1975) e, segundo autor, inclui algumas das estruturas reprodutivas mais simples de todos os fungos filamentosos. Em meio de cultura seu crescimento geralmente é lento. Produz conídios geralmente pequenos, hialinos ou pouco pigmentados, de parede fina e lisa, com forma esférica ou cilíndrica, unicelulares e agregadas

em cabeças viscosas ou em cadeias, às vezes em cabeças. As cadeias estão presentes em uma única fialide, sendo que algumas espécies deste gênero podem formar clamidósporos (Gams 1971, 1975; Domsch et al., 2007, Perdomo et al., 2011).

Estudos moleculares têm demonstrado que *Acremonium* é polifilético, com espécies pertencendo a diferentes ordens em Sordariomycetes. Muitas espécies, incluindo a espécie tipo *A. alternatum* Link: Fr pertencem à Hypocreales, algumas à Sordariales e um pequeno grupo à família Plectosphaerellaceae em Glomerellales (Glenn et al., 1996; Zare et al., 2007; Schoch et al., 2009; Perdomo et al., 2011; Summerbell et al., 2011). Cerca de 100 espécies foram descritas no mundo como pertencentes ao gênero *Acremonium*, geograficamente difundidas e registradas em vários substratos, incluindo espécies saprófitas, micoparasitas, parasitas de artrópodes etc (Kirk et al., 2001).

Os membros deste gênero são conhecidos como saprófitos em materiais em decomposição, esporadicamente como agentes patogênicos de plantas, como parasitas em artrópodes, fungos e outros animais, e principalmente em regiões tropicais como agentes raros de doenças humanas (Gams, 1971; Weisenborn et al., 2010). *A. spp.* apresentam potencial para uso na agricultura, podendo servir como agentes protetores de plantas contra insetos e outras pragas de lavouras, além de inibir a ação de fungos fitopatogênicos (Koga et al., 1997; Cho et al., 1999; Azevedo et al., 2000; Kelemu et al., 2002; Poling et al., 2008)

Vivas et al. (2017), testando *in vitro* isolados de *Acremonium* spp. em telado, encontraram resultados promissores com potencial para serem usados no controle da pinta-preta do mamoeiro. Em outras culturas, o fungo *Acremonium* já foi utilizado na tentativa de se controlar doenças de plantas. Sudo (1989) demonstrou a viabilidade de se controlar biologicamente doenças da parte aérea em coqueiro - lixas-pequena e grande – *Camarotella acrocomiae* (Mont.) K.D. Hyde & P.F. Cannon - com *Acremonium alternatum* Link e *Acremonium persicinum* (Nicot) N. Gams, micoparasitas isolados diretamente dos estromas dos patógenos.

Warwick (2001), na tentativa de viabilizar o controle da lixa do coqueiro através de diferentes formas de aplicação de *A. persicinum*, em nível de campo, concluiu que a melhor época de aplicação foi aquela realizada em meses chuvosos no período da tarde, onde houve uma colonização efetiva dos estromas

pelo micoparasita. Os índices de parasitismo de lixa-grande e pequena do coqueiro por *Acremonium cavaraeanum* (Jasevali) W. Gams e *Hansfordia pulvinata* (Berk M.A. Curtis) S. Hughes (Syn. *Dicyma pulvinata* (Berk M.A. Curtis) Arx) também foram avaliados e observou-se que *A. cavaraeanum* coloniza todas as cavidades estromáticas dos patógenos, formando na superfície dos estromas uma massa clara e pulverulenta que impede a esporulação do patógeno (Warwick, 2007). Já *D. pulvinata* não parasitou as partes internas dos estromas e cresceu apenas na superfície externa. Em condição de campo, o controle foi parcial das doenças avaliadas pelo uso dos fungos micoparasitas.

2.4.2. A espécie *Hansfordia pulvinata*

O fungo mitospórico *Hansfordia pulvinata*, estabelecido por (Berk & M.A. Curtis) S. Hughes 1958, foi considerado sinônimo de *Dicyma boulanger* por Von Arx (1982) e, atualmente, são considerados como duas espécies distintas. De acordo com as diferenças apontadas por Seifert et al. (2011), os fungos do gênero *Hansfordia* são caracterizados por conidióforos ramificados, trichodermoides ou verticilados, de coloração marrom. Célula conidiogênica simpodial, dentículatas e hialina e conídios amero (asseptados) secos, únicos e hialinos.

A espécie *H. pulvinata* é considerada micoparasita, cosmopolita e saprofítica, sendo relatada sobre muitos fungos dematiáceos, principalmente cercosporioides (Hawksworth, 1981), sendo relatado pela primeira vez como micoparasita em *Isariopsis indica* K.R.G. Nair em espécies de *Cercospora fresen* na Índia (Rathaiyah e Pavgi, 1971; Krishna e Singh, 1979). Nos Estados Unidos e na França, este fungo foi alvo de pesquisas para controle da mancha-preta *Nothopassalora personata* (Berk. & M.A. Curtis) do amendoim (*Arachis hypogea* L.) e da cladosporiose - *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun & Crous do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Peresse e Le Picard, 1980; Tirilly et al., 1983; Mitchell et al., 1987).

Outro exemplo que se encontra em estudo no Brasil é o controle do mal das folhas da seringueira (*Pseudocercospora ulei* (Henn.) Hora Junior & Mizubuti) com o micoparasita *D. pulvinata*. Este fungo tem sido apontado como promissor, pois coloniza e destrói as lesões estromáticas do patógeno e, conseqüentemente,

reduz o desfolhamento das plantas e a taxa de inóculo em reinfecções (Junqueira e Gasparotto, 1991). Além das avaliações realizadas por Junqueira e Gasparotto (1991), Rodrigues (2002) conduziu experimentos relativos ao cultivo do fungo em laboratório, enquanto na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia tem sido estudados aspectos fisiológicos, morfológicos, moleculares e de patogenicidade, no intuito de selecionar isolados de *D. pulvinata*, com potencial para o desenvolvimento de biofungicida (Tavares et al., 2004). Delmadi et al. (2009) concluíram que em campo, as aplicações com as diferentes concentrações de fungo tiveram um efeito de controle semelhante à aplicação com o fungicida benomyl para o mal das folhas da seringueira.

2.5. Indução de resistência sistêmica em mamoeiro

Produtos indutores de resistência, ou ativadores de plantas, vêm se destacando por apresentarem eficiência no controle de doenças em várias culturas e por serem praticamente atóxicos, pois não deixam resíduos que possam prejudicar a saúde humana e o ambiente (Resende et al., 2007). Os indutores de resistência não atuam do mesmo modo que os agroquímicos convencionais, pois apresentam baixa toxicidade ao organismo alvo, ativando mecanismos de defesa latente nas plantas, uma vez que mesmo não possui sistema imunológico como os animais, sabe-se que as plantas apresentam diversas respostas de defesa contra estresses bióticos ou abióticos (Pascholat, 2003).

A resistência sistêmica induzida (SIR) pode ser ativada em plantas por uma série de substâncias (eliciadores), impedindo ou atrasando a atividade de patógenos em seus tecidos (Resende et al., 2007). Dentre os mecanismos de defesa vegetal induzidos relatam-se: reação de micosensibilidade, barreiras estruturais pós-formadas, aumento de síntese de fitoalexinas e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PRP's), como a hidrolase β -1,3-glucanase, que degradam paredes celulares de patógenos fúngicos, além de quitinases (Hammerschmidt, 1999).

Na década de 1990, foi desenvolvido o éster S-metil do ácido benzo-(123)-tiadiazole-7-carbotióico (ASM), substância derivada do ácido acetil salicílico (AAS) que atua como indutor de resistência em diversas espécies vegetais. O ASM encontra-se registrado pela Syngenta como fungicida comercial (Bion®) para várias culturas agrícolas, especialmente tomateiro, cacauzeiro e citros (Ryals et al., 1996; Silva e Resende, 2001). O uso comercial de ASM tem estimulado um avanço nas pesquisas com indução de resistência de plantas a diversos tipos de patógenos, incluindo-se bactérias, vírus e nematoides (Resende et al., 2007). No entanto, a eficiência da indução da resistência no controle de doenças é dependente do genótipo da planta hospedeira (Liu et al., 1995). Para que ocorra a ativação dos mecanismos de defesa, estes são dependentes da ação de genes pré-existentes ou do “*background* genético” da planta. O reconhecimento do indutor depende de genes específicos que são ativados e aptos a desencadear rapidamente as respostas de defesa (Côté et al., 1995).

Na cultura do mamoeiro, a eficácia de ASM tem sido estudada. Sob condições controladas, comprovou-se que ASM (Bion®) pode controlar antracnose em frutos e folhas (Nascimento et al., 2009) e reduz a incidência da podridão-do-pé, causada por *Phytophthora spp.* (Tavares, 2009). Para pinta-preta e outras doenças foliares do mamoeiro, o pioneirismo vem de estudos realizados pela equipe da Fitopatologia da UENF (Terra, 2009; Santos et al., 2017). Estudos foram conduzidos para se avaliar o efeito da indução da resistência em genótipos comerciais. Para Santos et al. (2017), os resultados sugerem que, para a proteção dos genótipos de mamoeiro estudados, houve um efeito sinérgico do genótipo com os produtos testados para controle de pinta-preta, especialmente para os genótipos mais resistentes pulverizados com acibenzolar-S-metil (ASM/Bion®).

O uso de fertilizante organomineral e argilas silicatadas também já foram utilizados como indutores de resistência à pinta-preta do mamoeiro, Pratissoli et al. (2007), avaliando estes produtos constataram redução da incidência e da severidade da pinta-preta quando se associou fertilizante organomineral mais argila silicatada. A aplicação destes produtos torna-se uma medida eficaz e economicamente viável para o manejo da pinta-preta em cultivos de mamão.

O fertilizante organomineral, além de melhorar o estado nutricional das plantas, pode funcionar como cofatores de enzimas que participam do metabolismo de defesa das plantas. Já o mecanismo pelo qual o silício afeta o desenvolvimento das doenças em plantas é, possivelmente, resultado da ação deste elemento no tecido do hospedeiro, proporcionando impedimento físico e um maior acúmulo de compostos fenólicos e lignina no local da injúria (Chérif et al., 1992). Esta função estrutural proporciona mudanças anatômicas nos tecidos, como células epidérmicas com a parede celular mais espessa devido à deposição de sílica nas mesmas, favorecendo a melhor arquitetura das plantas, além de aumentar a capacidade fotossintética e resistência às doenças (Blaich e Grundh Fer, 1998; Bélanger et al., 2003).

Outro produto que também foi testado em pinta-preta do mamoeiro é o fosfito. Dianese et al (2008) testaram produtos à base de fosfitos foliares em telados e em condições de campo, com plantas naturalmente infectadas pelo patógeno *A. caricae*. Tanto no experimento de campo quanto sob telado, os tratamentos contendo fosfito reduziram a severidade da doença. Segundo Fenn e Coffey (1984), os fosfitos possuem propriedades de esimular a formação de substâncias naturais de autodefesa da planta, como as fitoalexinas, protegendo-as do ataque de fungos.

Dessa forma e com base no cenário fitossanitário e comercial que envolve toda a cadeia de formação e comercialização de mamoeiro, pelo fato da indução de resistência não afetar o patógeno diretamente, em geral, a aplicação de indutores de resistência poderá ser combinada ao controle biológico, como alternativo ao controle químico convencional. Ademais, tais tecnologias poderão conjuntamente ser incorporadas à produção integrada de frutas ou constituírem práticas de controle fitossanitário na produção de frutos orgânicos, livre de resíduos de agrotóxicos.

3. TRABALHOS

3.1. IDENTIFICAÇÃO DE *Acremonium* spp. MICOPARASITAS DE *Asperisporium caricae*

3.1.1. Resumo

Dentre as doenças fúngicas mais comuns da cultura do mamoeiro, destaca-se a pinta-preta, doença foliar causada por *Asperisporium caricae*. O fungo desenvolve nas folhas manchas pequenas, escuras, circulares, ligeiramente angulosas, de coloração escura e cobertas por frutificações pulverulentas negras. Nestas lesões observou-se ocorrência de fungos micoparasitas similares a *Acremonium*. Visando à identificação específica, procedeu-se a caracterização morfológica e a análise filogenética de sequências de DNA dos genes ITS, LSU e RPB2. A identificação dos isolados baseada na combinação de estudos morfológicos e filogenéticos, utilizando inferência bayesiana, possibilitaram a identificação de três novas espécies de *Acremonium* associadas ao micoparasitismo a *A. caricae*: *Acremonium* sp I (CF/UENF 446, COAD 1733), *Acremonium* sp II (CF/UENF449, COAD1730) e *Acremonium* sp III (COAD 1731). As análises filogenéticas permitiram ainda posicionar taxonomicamente as espécies na família Bionectriaceae, mais precisamente no complexo de espécies de *A. sclerotigenum*. Considerando que o presente trabalho foi baseado em

poucos isolados hiperparasitas, acredita-se que há mais espécies associadas a esse nicho a serem descobertas em novos estudos.

3.1.2. Abstract

Among the most common fungal diseases in papaya crop, the black-spot, caused by *Asperisporium caricae* stands out. The fungus develops small, dark, circular to slightly angular leaf spots, covered by black powdery of conidia in mass. In these lesions the occurrence of white-colored fungus, apparently mycoparasites, was observed. Aiming the specific identification of the last fungi, the morphological and molecular characterization were proced. The phylogenetic studies were based on Bayesian inference of separated and concatenated ITS, LSU and RPB2 sequences. Three new *Acremonium* species were described associated with *A. caricae* mycoparasitism: *Acremonium* sp I (CF/UENF 446, COAD 1733), *Acremonium* sp II (CF/UENF449, COAD1730) and *Acremonium* sp III (COAD 1731). The thre species were classified on Bionectriaceae, in the clado of *A. sclerotigenum*, a complex species. As three new species were described based in a collection of few hyperparasite isolates, we believe in a great diversity of species existence waiting to be explored occupying this nich on nature in Tropics.

3.1.3. Introdução

Dentre as doenças fúngicas que atacam o mamoeiro (*Carica papaya* L.) destaca-se a pinta-preta, causada pelo fungo *Asperisporium caricae* (Speg.) Maubl. (Ventura e Rezende, 2016). Incidindo tanto nas folhas quanto em frutos, reduzindo a taxa fotossintética da planta e depreciando a qualidade comercial dos frutos (Ventura e Rezende, 2016). O fungo desenvolve pequenas manchas circulares, ligeiramente angulosas de coloração escura (Persley & Ploetz, 2003). Nestas lesões escuras, geralmente observa-se a ocorrência de fungo de coloração branca, aparentemente micoparasitas.

Em um estudo sobre fungos potenciais micoparasitas de *A. caricae*, Vivas et al. (2017) relataram, com base em morfologia e análises filogenéticas de sequências ITS, a ocorrência de *Hanfordia pulvinata* e *Acremonium* spp. como micoparasitas naturais em lesões foliares da pinta-preta do mamoeiro. Neste mesmo estudo, os autores observaram variação morfocultural e filogenética dentre os isolados, havendo a possibilidade de ocorrência de diferentes espécies de *Acremonium*. Nesta perspectiva, novos estudos incluindo sequências de outras regiões gênicas são necessários para identificação específica dos isolados de *Acremonium*, associados ao patossistema *C. papaya* x *A. caricae*.

O gênero *Acremonium* Link, revisto morfologicamente por Gams (1971, 1975), compreende espécies que incluem algumas das estruturas mais simples de todos os fungos filamentosos. Por apresentar características morfológicas aparentemente simples, várias espécies identificadas e classificadas neste gênero estão sendo revisadas com auxílio de estudos moleculares (Summerbell et al., 2011; Perdomo et al., 2011; Giraldo et al., 2012, 2015). Tais estudos moleculares têm demonstrado que o gênero *Acremonium* é polifilético, com espécies pertencendo a diferentes ordens de *Sordariomycetes*. Muitas espécies pertencem à *Hypocreales* (incluindo a espécie tipo *Acremonium alternatum* Link), algumas à *Sordariales* e um pequeno grupo alocado na família *Plectosphaerellaceae* em *Glomerellales* (Zare et al., 2007; Schoch et al., 2009; Perdomo et al., 2011; Summerbell et al., 2011). Relata-se a ocorrência de mais de 100 espécies descritas no gênero *Acremonium*, geograficamente dispersas em todo o mundo, e colonizando diferentes substratos e ocupando diferentes nichos na natureza (Kirk et al., 2001).

Os membros deste gênero são conhecidos como saprófitos em materiais em decomposição, esporadicamente como agentes patogênicos de plantas, parasitas de artrópodes, de fungos e em alguns outros animais, principalmente em regiões tropicais, e raramente, também associados a doenças humanas em pessoas imunodeprimidas (Gams, 1975; Domsch et al., 2007; Weisenborn, 2010; Hoog et al., 2015). *Acremonium* spp. apresentam uso potencial na agricultura, podendo servir como agente protetor de plantas contra insetos e outras pragas de lavouras, além de inibir a ação de fungos fitopatogênicos (Kelemu et al., 2002; Silva et al., 2006; Poling et al., 2008).

Considerando a importância do gênero *Acremonium* e de sua diversidade, bem como a possibilidade de se relatar novas espécies com potencial micoparasita de *A. caricae* em mamoeiro, procedeu-se à caracterização morfológica e molecular dos isolados em estudo.

3.1.4. Material e Métodos

3.1.4.1. Fungos utilizados

No presente estudo, foram analisados cinco isolados de *Acremonium* spp. (COAD1731, CF/UENF446, COAD 1733, COAD 1731 e CF/UENF449) obtidos de folhas de mamoeiro em lesões de pinta-preta (Vivas et al., 2017). As culturas puras obtidas foram submetidas a reisolamentos monospóricos. Neste procedimento esporos diluídos em gota de água esterilizada foram espalhados em meio de ágar 2%, sobre lâminas, com auxílio de alça de Drigalsky, seguindo-se da incubação em câmara úmida, a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h. Ao microscópio de luz, esporos recém germinados foram transferidos para meio BDA em placas de Petri. As culturas puras foram mantidas em tubos com BDA inclinado a 10 °C e em água destilada esterilizada, segundo método Castellani (Gonçalves et al., 2016).

3.1.4.2 Estudos morfológicos

Para caracterização dos isolados, o meio padrão utilizado foi (BDA), ágar de 2% de extrato de malte (MEA) a 25 ° C com um regime de 12 h de luz-escuro, foram observados: o crescimento da colônia, aspecto visual, a coloração de frente e verso da colônia, o aspecto do micélio e a forma da margem das colônias. Características micro-morfológicas foram observadas e fotografadas com um microscópio Nikon E-400 equipado com uma câmera digital. Os isolados foram depositados na coleção de cultura "Coleção Octávio Almeida Drummond" (COAD) da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Brasil), as espécies adicionais foram mantidas na Coleção de Culturas da Clínica Fitosanitária da Universidade

Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (CF/UENF). Além disso, o holótipo das novas espécies propostas foi depositado (cultura metabolicamente inativa) no herbário da Universidade Federal de Viçosa (VIC).

3.1.4.3. Sequenciamento das regiões ITS, LSU e RPB2 de espécies de *Acremonium* micoparasitas de *A. caricae*.

O DNA genômico foi extraído de colônias oriundas de um único esporo, cultivado em PDA a 25° C com 12 horas diárias de luz por 12 dias. O micélio fúngico foi raspado nas margens da colônia e o DNA extraído de acordo com Pinho et al. (2012) usando o Kit de Purificação de ADN Genico Wizard (Promega Corporation, WI, E.U.A.). As sequências da região espaçadora interna (ITS) do gene 5.8S rDNA, do gene (LSU) e da segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2) foram amplificadas. Utilizaram-se, para tanto, os seguintes *primers*: para a região parcial do ITS 5.8S rDNA o *primer* ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG–3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). A região LSU foi amplificada, utilizando-se os iniciadores LR0R (5'-GTA CCC GCT GAA CTT AAG C-3') e LR5 (5'-TCC TGA GGG AAA CTT CG-3') (Rehner e Samuels, 1994; Vilgalys e Hester, 1990). Para (RPB2) utilizou-se os iniciadores 5F2 (5'-GGGGWGAYCAGAAGAAGGC-3') e 7cR (5'-CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT-3') (Reeb et al., 2004). As condições de amplificação para as regiões descritas acima foram semelhantes às descritas para ITS (Vivas et al., 2017), exceto as temperaturas de anelamento, que diferiram para 50° C, no PCR de amplificação do LSU.

Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados e comparados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa Kasvi DNA Ladder 100bp. As amostras foram purificadas e sequenciadas pela empresa Macrogen Inc., Coreia do Sul (www.macrogen.com), sendo sequenciados com *primers* “forward” and “reverse” para garantir sequências de boa qualidade.

3.1.4.4. Análise filogenética de espécies de fungos com potencial de micoparasitismo de *A. caricae*.

As sequências de nucleotídeos foram conferidas com o *software DNA Dragon* (Hepperle, 2011). Todas as sequências foram corrigidas manualmente e o arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas foram corrigidos utilizando as sequências dos iniciadores no sentido 5'–3' e 3'–5' (Pinho et al., 2012). Após essa conferência, as sequências foram submetidas a comparações via BLAST no banco de dados do GenBank/NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sequências com alta similaridade foram selecionadas como referências (Tab. 3) e foram alinhadas com as sequências obtidas neste estudo, utilizando o procedimento MUSCLE (Edgar, 2004) e corrigidas manualmente com o MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). A análise filogenética da inferência bayesiana foi realizada no portal CIPRES (Miller et al., 2010), usando MrBayes v. 3.2 (Ronquist et al., 2012), baseado em Markov Monte Carlo Chain (MCMC) com 10.000.000 gerações e o modelo de substituição de nucleotídica GTR+I+G e, para os três genes em estudo, utilizou-se o *Akaike Information Criterion* (AIC) pelo *software* MrModeltest v. 2.3 (Posada e Crandall, 1998). As árvores foram amostradas a cada 1000 gerações com *burning* de 25%. Probabilidades posteriores (Rannala e Yang, 1996) foram determinadas na árvore mais consensual entre as 15.000 árvores remanescentes. As árvores foram visualizadas no FigTree v. 1.4.3 (Rambaut, 2017) e editadas em programas gráficos.

3.1.5. Resultados

Com os *primers* usados foi possível amplificar e sequenciar 462-509 pb, 808-878 pb e 831-907 pb, respectivamente, para a região espaçadora ITS, região parcial do gene 28S rRNA (LSU) e região parcial do gene da segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2). A topologia da análise combinada apresentou resultado similar ao observado para as árvores considerando os genes analisados individualmente, com as três espécies agrupadas em um mesmo clado.

A análise filogenética combinada foi realizada com 69 taxas e resultou em um alinhamento das sequências contendo 3122 caracteres, dos quais 783 foram informativos para parcimônia, 1181 foram variáveis e 1465 foram conservados. Os cinco isolados agruparam-se com espécies representantes do subclado *Sclerotigenum*, o qual contém os isolados das espécies: *Acremonium sordidulum* W. Gams & D. Hawksw, *Acremonium charticola* (Lindau) W. Gams, *Acremonium sclerotigenum* (Moreau & R. Moreau ex Valenta) W. Gams, *Acremonium alternatum* Link, *Acremonium acutatum* W. Gams e *A. Acremonium brachyphenium* W. Gams (Figura 01). Os membros destes grupos possuem tipicamente conídios catenulados.

A taxonomia do grupo *Acremonium* é complicada pela existência de poucas características morfológicas na diferenciação das espécies, além das estruturas fúngicas possuírem tamanho diminuto, o que dificulta sua visualização. Os isolados obtidos neste trabalho apresentam características morfológicamente típicas de *Acremonium*, ou seja, colônias efusas e com a idade liberando exsudatos; micélio superficial, hifas septadas, ramificadas, plectonematogênicas; esporulação abundante. Células conidiogênicas em monofiálide, lateral ou terminal, ereta, simples, acicular, hialina e lisa; conídios unicelulares (ameroconidia), hialinos, produzidos em cadeia no vértice de cada monofiálide. Pelas análises morfológicas e filogenéticas, entre os isolados em estudo, foi possível identificar três novas espécies, tais como podem ser observadas pelas análises conduzidas com base nas sequências de ITS, LSU e RPB2, que separadas em três grupos de isolados: COAD 1733 e CF/UENF 446; COAD 1730 e CF/UENF 449 e, por último, o isolado COAD 1731.

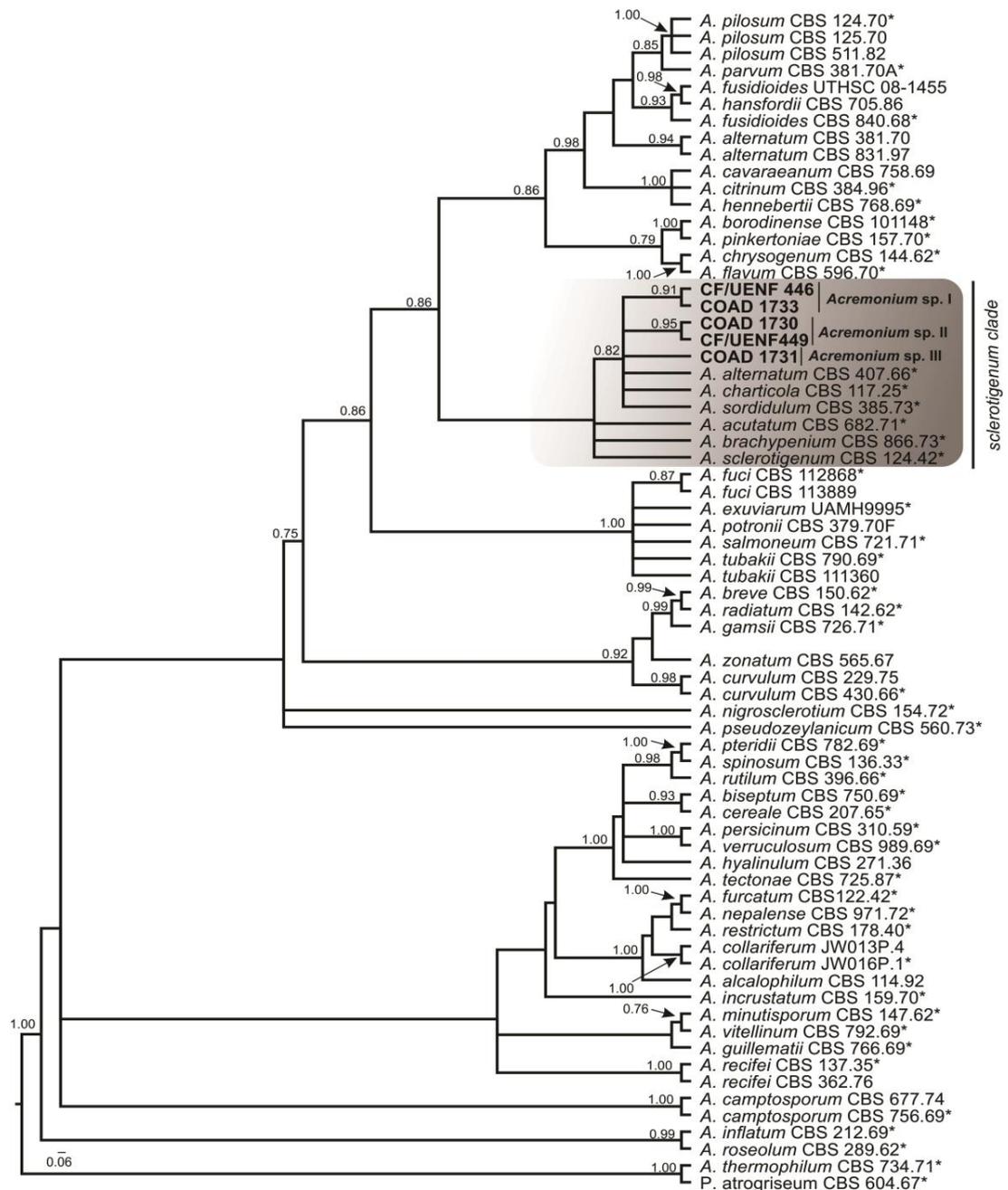


Figura 1. Filograma multilocus baseado na inferência Bayesiana composto da combinação das sequências dos genes ITS, LSU e RPB2 de isolados de *Acremonium* em Bionectriaceae. Valores de probabilidade posterior (pp) bayesiana estão indicados acima dos nós. Valores de pp menores que 0,75 não foram mostrados. *Espécie tipo.

Tabela 2. Números de acesso do GenBank de sequências da região parcial do gene 28S rRNA (LSU), região parcial do gene da segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2) e região espaçador interno transcrito (ITS) de espécies de *Acremonium* incluídas neste estudo, bem como suas referências.

Espécie	Isolado	Número de Acesso no GenBank			Referências
		LSU	RPB2	ITS	
<i>Acremonium acutatum</i>	CBS 682.71T	HQ231965	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium alcalophilum</i>	CBS 114.92	JX158443	JX158465	DQ825967	Zare et al. (2007), Grum-Grzhimaylo et al. (2013a)
<i>Acremonium alternatum</i>	CBS 407.66T	HQ231988	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium alternatum</i>	CBS 381.70AT	HQ231986	–	–	Summerbell et al. (2011),
<i>Acremonium alternatum</i>	CBS 831.97	HQ231989	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium bisseptum</i>	CBS 750.69T	HQ231998	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium borodinense</i>	CBS 101148T	HQ232003	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium brachyphenium</i>	CBS 866.73T	HQ232004	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium breve</i>	CBS 150.62T	HQ232005	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium camptosporum</i>	CBS 677.74	HQ232007	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium camptosporum</i>	CBS 756.69T	HQ232008	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium cavaraeanum</i>	CBS 758.69	HQ232012	–	–	Summerbell et al. (2011),
<i>Acremonium cerealis</i>	CBS 207.65	HQ232013	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium charticola</i>	CBS 117.25T	HQ232016	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium chrysogenum</i>	CBS 144.62T	HQ232017	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium citrinum</i>	CBS 384.96T	HF680217	–	HF680236	Giraldo et al. (2014)
<i>Acremonium collariferum</i>	JW013P.4	FJ765364	–	–	Weisenborn et al. (2010)
<i>Acremonium collariferum</i>	JW016P.1	FJ765366	–	–	Weisenborn et al. (2010)
<i>Acremonium curvulum</i>	CBS 430.66T	HQ232026	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium curvulum</i>	CBS 229.75	HQ232021	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium exuviarum</i>	UAMH 9995T	HQ232036	–	AY882946	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium flavum</i>	CBS 596.70T	HQ232037	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium fuci</i>	CBS 112868	–	–	AY632653	Zuccaro et al (2004)
<i>Acremonium fuci</i>	CBS 113889	–	–	AY632652	Zuccaro et al (2004)
<i>Acremonium furcatum</i>	CBS 122.42T	EF543831	–	AY378154	Zare et al. (2007)
<i>Acremonium fusidioides</i>	CBS 840.68T	HQ232039	–	FN706542	Summerbell et al. (2011) Perdomo et al. (2011)
<i>Acremonium fusidioides</i>	UTHSC 08-1455	HF680216	–	HF680235	Giraldo et al. (2014)
<i>Acremonium gamsii</i>	CBS 726.71T	HQ232040	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium guillematii</i>	CBS 766.69T	HQ232042	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium hansfordii</i>	CBS 705.86	HF680218	–	–	Giraldo et al. (2014)
<i>Acremonium hennebertii</i>	CBS 768.69T	HQ232044	–	HF680238	Summerbell et al. (2011) Giraldo et al. (2014)
<i>Acremonium hyalinulum</i>	CBS 271.36	HQ232045	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium incrustatum</i>	CBS 159.70T	HQ232049	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium inflatum</i>	CBS 212.69T	HQ232050	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium minutisporum</i>	CBS 147.62T	HQ232061	–	–	Summerbell et al. (2011)

Continua...

Continuação da Tabela 02

Espécie	Isolado	Número de Acesso no GenBank			Referências
		LSU	RPB2	ITS	
<i>Acremonium nepalense</i>	CBS 971.72T	HQ231970	–	DQ825971	Summerbell et al. (2011) Zare et al. (2007)
<i>Acremonium nigrosclerotium</i>	CBS 154.72T	HQ232069	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium parvum</i>	CBS 381.70 ^a	–	–	HF680219	Giraldo et al. (2014)
<i>Acremonium persicinum</i>	CBS 310.59T	HQ232077	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium pilosum</i>	CBS 124.70T	HF680209	–	HF680228	Giraldo et al. (2014)
<i>Acremonium pilosum</i>	CBS 125.70	HF680210	–	HF680229	Giraldo et al. (2014)
<i>Acremonium pilosum</i>	CBS 511.82	HF680207	–	HF680226	Giraldo et al. (2014)
<i>Acremonium pinkertoniae</i>	CBS 157.70T	HQ232089	–	–	Summerbell et al. (2011) Giraldo et al. (2012)
<i>Acremonium potronii</i>	CBS 379.70F	HQ232096	–	AY632655	Summerbell et al (2011) Zuccaro, et al (2004)
<i>Acremonium pseudozeylanicum</i>	CBS 560.73T	HQ232101	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium pteridii</i>	CBS 782.69T	HQ232102	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium radiatum</i>	CBS 142.62T	HQ232104	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium recifei</i>	CBS 137.35T	HQ232106	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium recifei</i>	CBS 362.76	HQ232108	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium restrictum</i>	CBS 178.40T	HQ232119	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium roseolum</i>	CBS 289.62T	HQ232123	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium rutilum</i>	CBS 396.66T	HQ232124	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium salmoneum</i>	CBS 721.71T	HQ232125	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium sclerotigenum</i>	CBS 124.42T	HQ232126	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium sordidulum</i>	CBS 385.73T	HQ232136	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium spinosum</i>	CBS 136.33T	HQ232137	–	–	Summerbell et al. (2011) Giraldo et al. (2012)
<i>Acremonium tectonae</i>	CBS 725.87T	HQ232144	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium thermophilum</i>	CBS 734.71T	HQ232145	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium tubakii</i>	CBS 790.69T	HQ232148	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium tubakii</i>	CBS 111360	–	–	AY632654	Zuccaro et al.(2004)
<i>Acremonium verruculosum</i>	CBS 989.69T	HQ232150	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium vitellinum</i>	CBS 792.69T	HQ232151	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Acremonium zonatum</i>	CBS 565.67	HQ232155	–	–	Summerbell et al. (2011)
<i>Phialemonium atrogriseum</i>	CBS 604.67T	HQ231981	–	–	Summerbell et al. (2011) Perdomo et al. (2013)

^a AFTOL, *Assembling the Fungal Tree of Life project*; CBS, CBS-KNAW *Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands*; UAMH, *University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium, Edmonton, Canada*; UTHSC, *Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA*; T, *isolado tipo*.

3.1.5.1. Taxonomia

***Acremonium* sp. I nov** (Figura 02)

Posição sistemática: Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Hypocreomycetidae, Hypocreales, *Acremonium*.

Tipo:- BRASIL. Espírito Santo, Mimoso do Sul 21°01'56.9"S 41°25'12.8"W em parasita de *Asperisporium caricae* em folhas de *Carica papaya* 02 julho de 2012, Vivas, J.M.S. holótipo, COAD 1733, VIC 42549.

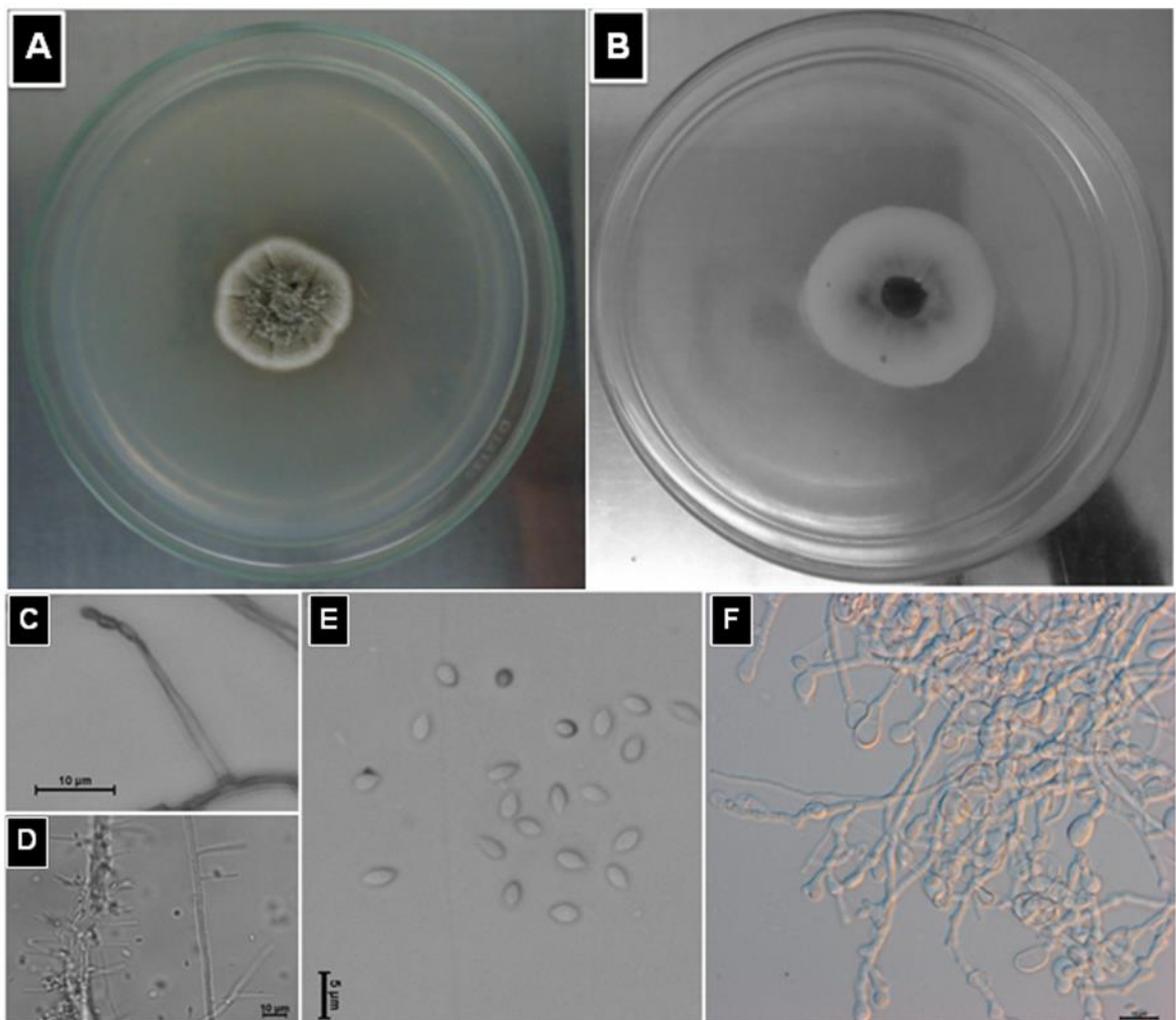


Figura 2. Aspecto morfológico do isolado de *Acremonium* sp. I nov. Frente (A) e verso (B) das colônias em BDA 10 dias a 25°C; Fialide e produção de conídios em cadeias (C); Micélio plectonemogênico (D); Conídios obovoide (E); clamidósporo (F).

Barras de escala (G-H-J) = 10 µm; (I) = 5 µm.

O crescimento micelial das colônias variaram de 11 a 18 mm e 6 a 8 mm de diâmetro, quando cultivada, respectivamente, em meio BDA e meio de MEA, a uma temperatura de 25°C, durante 10 dias. Possui a coloração da colônia cinza e o verso varia de branco a cinza. Apresenta aspecto da colônia rugoso, micélio com crescimento superficial, conidióforos fialídico incolor. As células conidiogênicas fialíticas, solitária e hialina, apresentando 15,0 -25,5 µm de comprimento e 1,5-2,5 µm de largura da base e afinando para o ápice. Os conídios ocorrem em longas cadeias, de formato obovoide, hialino e asseptados, medindo 2,3-4,0 x 1,5-2,5 µm. Nesta espécie foi observado clamidósforo de formato irregular 4,5 x 10,5 µm.

Notas:- A morfologia de *Acremonium* sp I é semelhante à da espécie *Acremonium sordidulum* Gams W., relatado como micoparasita de *Colletotrichum dematium* (Singh et al., 1978). No entanto, o fungo *A. sordidulum* apresenta em meio de cultura aspecto flocoso e coloração branca, tornando-se cinza-esverdeada, o que difere de *Acremonium* sp I. Ambos apresentam conídios produzidos em longas cadeias, porém os conídios de *A. sordidulum* são fusiformes com uma das extremidades mais apiculada ou periforme, a outra extremidade do conídio apresenta-se ligeiramente arredondada e na base, hialino ou levemente pigmentado. Ademais, esta espécie não possui clamidósforo, diferindo dos isolados apresentados nesse estudo. Pelas análises das sequências gênicas, estes isolados não são compatíveis com nenhuma espécie descrita, que tenha sequências depositadas em banco de dados.

Espécime adicional examinada:- Brasil. Espírito Santo: Alegre, 20°52'41.2"S 41°31'06.3"W em parasita de *Asperisporium caricae* em folhas de *Carica papaya*, 23 de maio de 2012, Vivas J.M.S. isolado CF/UENF 446.

***Acremonium* sp. II nov. (Figura 03)**

Posição sistemática: Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Hypocreomycetidae, Hypocreales, *Acremonium*.

Tipo:- BRASIL. Espírito Santo, Alegre, 20°53'41.8"S 41°30'23.9"W em parasita de *Asperisporium caricae* em folhas de *Carica papaya* 27 Junho de 2012, vivas, J.M.S. holotípo COAD 1730, VIC 42551.

O crescimento micelial das colônias é lento de 10 a 17 mm em BDA e de 4 a 8 mm em MEA, a uma temperatura de 25°C, após 10 dias. Os isolados apresentaram coloração da colônia branca na frente e no verso das placas de petri, possuíam aspecto rugoso a floculoso. (Figura 05, A e B), micélio com crescimento superficial, os conidióforos eram indistintos das hifas incolores. A célula conidiogênica é fialítica, solitária e hialina 17,5-38,0 µm comprimento e 1,5-3,0 µm largura da base e afinando para o ápice. Os conídios ocorrem em longas cadeias, possuem formato fusiforme, hialino e asseptado, medindo 3,0-6,0 x 1,5-2,5 µm. Foram observados clamidósporos de formato irregular de 3,0 x 6,0 µm.

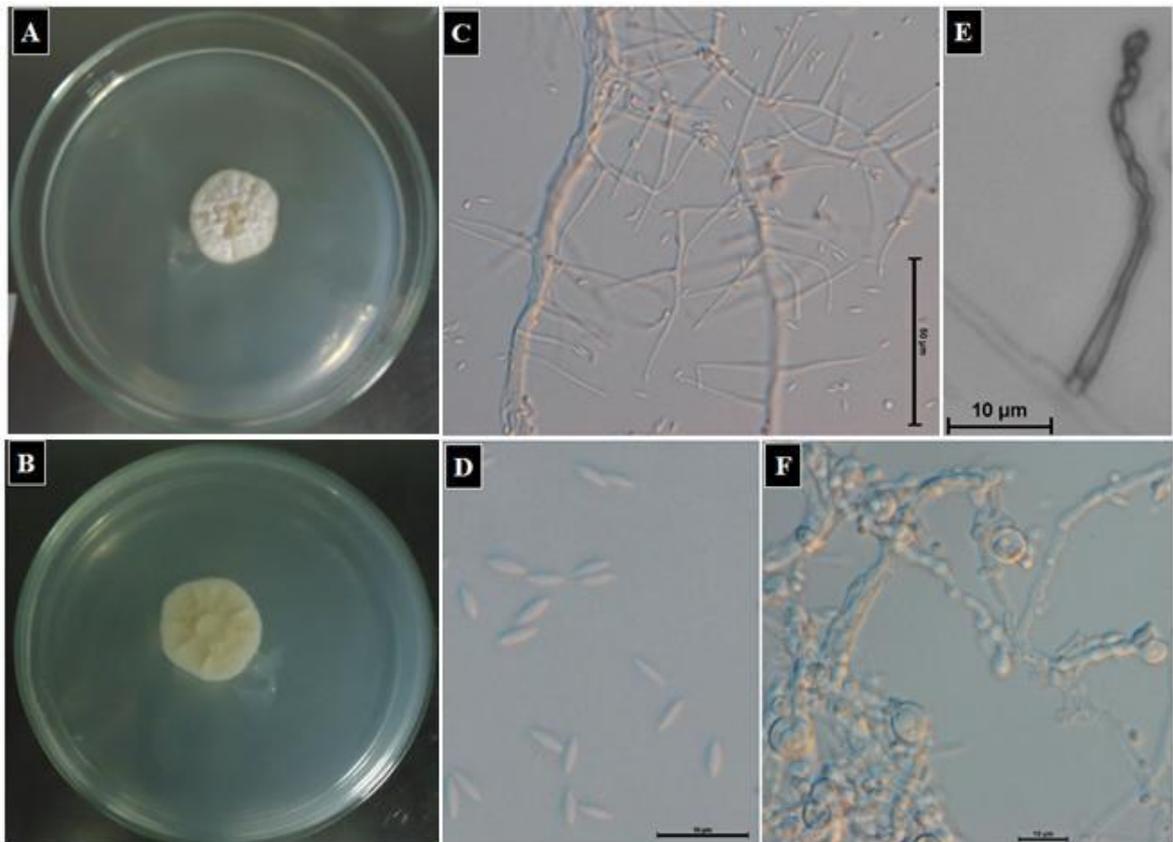


Figura 3. Aspecto morfológico dos isolados de *Acremonium* sp. II nov. Frente (A) e verso (B) das colônias em BDA 10 dias a 25°C; conidióforo (C); Conídios fusiforme (D); Conídio produzido em cadeia (E); clamidósporo (F). Barras de escala (C) = 50 µm; (D,E,F) = 10 µm.

Notas:- Esta nova espécie apresenta-se semelhante à *Acremonium acutatum* Gams, W. O fungo *A. acutatum* foi encontrado hiperparasitando *Cercospora atromarginalis* em *Solanum nigrum* (Gams,1975). Ambas as espécies se assemelham por possuírem colônias de coloração branca para rosa pálido, aspecto flocoso, granuloso no centro; conídios produzidos em longas cadeias; e por produzirem clamidósporos. Porém, *A. acutatum* possui conídios mais ou menos simétricos, diferentemente dos isolados de *Acremonium* sp II, os quais apresentam conídios simétricos.

Espécime adicional examinada:- Brasil. Espírito Santo: Mimoso do Sul, 20°58'08.9"S 41°29'58.9"W em parasita de *Asperisporium caricae* em folhas de *Carica papaya*, 29 de junho de 2012, Vivas J.M.S. CF/UENF449.

***Acremonium* sp.III** nov. (Figura 04)

Posição sistemática: Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Hypocreomycetidae, Hypocreales, *Acremonium*.

Tipo:- BRASIL. Rio de Janeiro, Cachoeiras de macacu 22°27'59.0"S 42°39'36.2"W em parasita de *Asperisporium caricae* em folhas de *Carica papaya* 27 junho de 2012, vivas, J.M.S. holótipo COAD 1731, VIC 42552.

A colônia apresenta a média de crescimento micelial variando de 10 a 14,5 mm em meio BDA, 18 a 20 mm em MEA, após 10 dias à temperatura de 25 °C (Figura 06). As colônias apresentaram-se com coloração branca, no entanto ao longo do tempo tornaram-se de verso branco e reverso cinza claro, e em ambos os meios de cultura possuem aspecto felpudo. Os conidióforos são indistintos das hifas, sendo este incolor e aéreo. As células conidiogênicas surgem a partir de uma hifa única e hialina, com 18,0-35,5 µm comprimento e 2,0-2,5 µm de largura da base e afinando para o ápice. Conídios ocorreram em longas cadeias, hialina de formato oboval a periforme e asseptados; medindo 3,0-4,5 x 1,5-2,0 µm. Não foram observados clamidósporos.

Notas:- A morfologia desta espécie assemelha-se às de *Acremonium alternatum*, já relatado como hiperparasita de *Sphaerotheca fuliginea* (Malathrakis, 1985). As colônias de *A. alternatum* possuem aspecto pulverulento, lisas ou meio onduladas. O micélio em arranjo denso, alternando-se individualmente nas hifas. Conídios tipicamente em cadeias, ocasionalmente obovada, arredondada no ápice, apiculando distintamente na base, hialina, lisa. Não foram observados clamidósporos. Apesar das características morfológicas semelhantes, pela análise das sequências gênicas estudadas, *Acremonium* sp. III nov é filogeneticamente distante de *A. alternatum* e distinta das demais espécies com sequências conhecidas no GenBank.

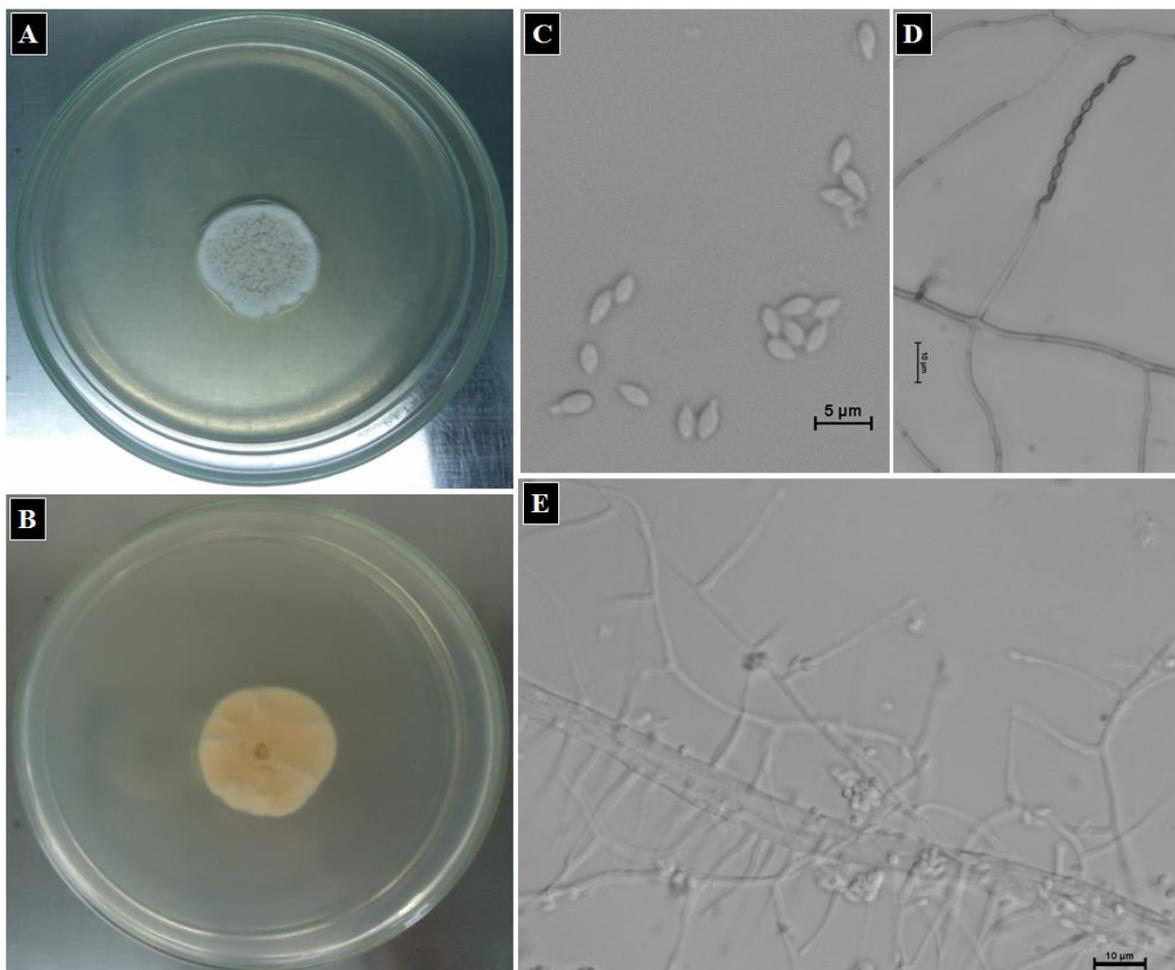


Figura 4. Aspecto morfológico do isola *Acremonium* sp. III nov. Frente (A) e verso (B) da colônia em BDA 10 dias a 25°C; Conídios oboval a periforme (C); Conídio produzido em cadeia (D); Micélio plectonemotogênico (E). Barras de escala (D, E) = 10 μ m; (C) = 5 μ m.

3.1.6. Discussão

A análise filogenética das regiões sequenciadas demonstra que os isolados formam um clado na família Bionectriaceae da ordem Hypocreales (Figura 01). Esta é uma família polifilética e tem como um grande representante o gênero *Acremonium*. Além da ordem de Hypocreales, espécies de *Acremonium* estão incluídas em diferentes ordens, tais como *Sordariomycetes*, algumas em *Sordariales* e um pequeno grupo alocado na família *Plectosphaerellaceae* em *Glomerellales* (Zare et al., 2007; Perdomo et al., 2011; Summerbell et al., 2011). Todavia, nenhum dos isolados em estudos, hiperparasitas de *A. caricae*, agrupou-se filogeneticamente a estes outros clados de Sordariales.

Os cinco isolados em estudo agruparam-se com espécies representantes do subclado de *A. sclerotigenum*. Tal subclado foi proposto por Summerbell et al. (2011) ao analisar filogeneticamente o gênero *Acremonium* pela região LSU. Os autores subdividiram os membros agrupados em *Bionectriaceae* em diferentes Subclados. O subclado *Sclerotigenum* contém as espécies de *A. sordidulum*, *A. sclerotigenum*, *A. charticola*, *A. alternatum*, *A. acutatum* e *A. brachyphenium* (Figura 1). Os fungos *A. acutatum*, *A. alternatum* e *A. sordidulum* já foram relatados como micoparasitas de, respectivamente, *Pseudocercospora atromarginalis* (Atk.) Deighton (Gams, 1975), *Sphaerotheca fuliginea* (Schltld.) Pollacci (Malathrakis, 1985) e *Colletotrichum dematium* (Pers.) Grove (Singh et al., 1978).

Pelo apresentado, percebe-se que alguns dos fungos presentes no subclado de *A. sclerotigenum* são micoparasitas. Embora, ao estabelecer esta classificação, Summerbell et al. (2011) não levaram em consideração características ecológicas e morfológicas, tornou-se possível agrupar neste subclado fungos com mesmo nicho associado ao micoparasitismo. Os cinco isolados de *Acremonium* deste estudo foram obtidos de lesões de pinta-preta do mamoeiro e apresentam potencial para o controle desta doença (Vivas et al., 2017).

Contudo, as análises morfológicas e filogenéticas entre os isolados em estudo, permitiram, ainda, diferenciar três novas espécies de *Acremonium* relacionadas ao micoparasitismo de *Asperisporium caricae* (Speg.) Maubl (figura 1). Um grupo formado pelos isolados COAD 1733 e CF/UENF 446 (*Acremonium* sp I), um outro grupo formado COAD 1730 e CF/UENF 449 (*Acremonium* sp II) e,

por último, o isolado COAD 1731 (*Acremonium* sp III). Além das características típicas do gênero, os estudos morfológicos permitiram diferenciá-los entre si. A espécie de *Acremonium* sp I possui como principal característica colônias rugosas e de coloração acinzentada, conídio de formato obovoide e a presença de clamidósporos. A espécie de *Acremonium* sp II possui colônias rugosas, coloração branca e possui o maior tamanho de conídio, este com formato fusiforme e a presença de clamidósporos. *Acremonium* sp III apresenta colônia de coloração branca, que ao longo do tempo torna-se cinza e com aspecto felpudo; os conídios são de formato oboval a periforme e não foram observados clamidósporos.

Outro ponto que corrobora a descrição de novas espécies de *Acremonium* está relacionada ao nicho e à origem geográfica dos isolados associados ao micoparasitismo de *Asperisporium caricae*. Neste aspecto, relata-se o ineditismo deste trabalho, sendo o primeiro a identificar espécies de *Acremonium* em lesões de pinta-preta em mamoeiro. O mamoeiro é amplamente cultivado em países da América Tropical, tendo sua diversidade genética máxima no Sul do México e Costa Rica, sendo essa região possivelmente o centro de origem e diversidade da espécie botânica (Dantas e Lima, 2001), sendo, provavelmente o centro de origem do patógeno *A. caricae*. Crous et al. (2015) também descreveram *Asperisporium caricicola* Crous & C. Nakash relacionados a lesões de mamoeiro nos trópicos. Dado o exposto, considerando a diversidade do hospedeiro, bem como a variação genética do patógeno e seus hiperparasitas, acredita-se que há possibilidade de serem identificadas outras espécies de *Acremonium* associados a esse patossistema, além das três descritas neste trabalho.

Por fim, relata-se que além de possuir potencial como micoparasita para uso na agricultura, o gênero *Acremonium* já foi relatado como endofítico (Poling et al., 2000, Choi et al., 2008), não se descartando a hipótese destas ou outras espécies de *Acremonium* endófitas serem encontradas em mamoeiro (*C. papaya*). *Acremonium* spp. endofíticas apresentam potencial de biocontrole em outros patossistemas (Gams, 1975; Singh et al., 1978; Malathrakis, 1985). Esta é a primeira vez que se investiga a posição taxonômica de fungos micoparasitas, possíveis agentes de biocontrole de *A. caricae*. A identificação de três novas espécies baseadas em pequena coleção de fungos ocupando um mesmo nicho

demonstra que a diversidade destes fungos na natureza permanece inexplorada, especialmente nos trópicos.

3.1.7. Conclusão

Pelas análises morfológicas e filogenéticas dos cinco isolados em estudo, foi possível identificar três novas espécies *Acremonium* sp I, *Acremonium* sp II e *Acremonium* sp III associados a pinta-peta do mamoeiro.

3.1.8. Referências

- Crous P.W.; Schumacher R.K.; Wingfield M.J.; Lombard L.; Giraldo A.; Christensen M.; Gardiennet A.; Nakashima C.; Pereira O.; Smith A.J.; Groenewald J.Z. (2015) *Fungal Systematics and Evolution: FUSE 1*. – *Sydowia* 67: 81-118.
- Choi, G.J.; Kim J.C.; Jang, K.S.; Cho, K.Y.; Kim, H.T. (2008) Mycoparasitism of *Acremonium strictum* BCP on *Botrytis cinerea*, the gray mold pathogen. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 18(1):167-70.
- Dantas, J.L.L.; Lima, J.F. (2001) Seleção e recomendação de variedades de mamoeiro - avaliação de linhagens e híbridos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23, 617-621.
- Domsch KH, Gams W, Anderson TH (2007) *Compendium of soil fungi*, 2 nd edn. IHW Verlag, Eching
- Edgar, R. C. (2004) Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32 (5):1792-1797.
- Gams W. (1975) Cephalosporium-like hyphomycetes: some tropical species. *Transactions of the British Mycological Society*, 64: 389-404.
- Giraldo, A.; Gene, J.; Cano, J.; de Hoog, S.; Guarro, J. (2012) Two new species of *Acremonium* from Spanish soils. *Mycologia*, 104 (6):1456-1465.

- Giraldo, A.; Gene, J.; Sutton, D.A.; Madrid, H.; de Hoog, G.S.; Cano, J.; Decock, C.; Crous, P.W.; Guarro, J. (2015) Phylogeny of *Sarocladium* (Hypocreales). *Persoonia*, 34, 10-24.
- Giraldo, A.; Sutton, D.A.; Guarro, J.; Gene, J.; Wiederhold, N.P.; Hoog de, G.S. (2017) New species of *Acremonium* from clinical samples and re-circumscription of some acremonioid species in Plectosphaerellaceae. *Mycological Progress*, 16(4): 349-368.
- Gonçalves, R. C.; Alfenas, A. C.; Mafia, R. G. (2016) Armazenamento de micro-organismo em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: Alfenas, A. C.; Mafia, R. G. *Métodos em fitopatologia*. Viçosa: Ed. UFV, p. 93-105.
- Grum-Grzhimaylo, A.A.; Debets, A.J.; van Diepeningen, A.D.; Georgieva, M.L.; Bilanenko, E.N. (2013) *Sodiomyces alkalinus*, a new holomorphic alkaliphilic ascomycete within the Plectosphaerellaceae. *Persoonia*, 31. 147-158.
- Hepperle, D. DNA dragon 1.4.1 - DNA sequence contig assembler software. (2011) Available at: <<http://www.dnadragon.com/>>. Access on: 22 out., 2014.
- Hoog GS, Guarro J, Gené J, FiguerasMJ (2015) *Atlas of clinical fungi*. USB version 4.1. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht.
- Kelemu, S.; Dongyi, H.; Guixiu, H. & Takayama, Y. A. (2002) PCR-based assay for specific detection of *Acremonium implicatum*, an endophytic fungus in species of *Brachiaria*. *Phytopathology*, 92:40-41.
- Kirk P M, Cannon P F, David J C, Stalpers J A (2001) *Dictionary of fungi*. CABI Publishing: Wallingford. 655p.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis: version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7):1870-1874.
- Malathrakis, N.E (1985) The fungus *Acremonium alternatum* Linc: Fr., a hyperparasite of the cucurbits powdery mildew pathogen *Sphaerotheca fuliginea*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 92 (5):509-515

- Miller, W.; Pfeiffer, T. Schwartz (2010) *Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, p. 1-8.
- Perdomo, H.; García, D.; Gené, J.; Cano, J.; Sutton, D.A.; Summerbell, R.; Guarro, J. (2013) *Phialemoniopsis*, a new genus of Sordariomycetes, and new species of *Phialemonium* and *Lecythophora*. *Mycologia*, 105(2): 398-421.
- Perdomo, H.; Sutton, D.A.; García, D.; Fothergill, A.W.; Cano, J.; Gené, J.; Summerbell, R.C.; Rinaldi, M.G.; Guarro, J. (2011) Spectrum of clinically relevant *Acremonium* species in the United States. *Journal of Clinical Microbiolog*, 49(1): 243-256.
- Persley, D.M; Ploetz, R.C. (2003) Diseases of Papaya. In: *Disiases of Fruits Crops* (eds. R.C. Ploetz). CABI Publishing. 379-382.
- Pinho, D.B.; Firmino, A.L.; Pereira, O.L.; Ferreira Junior, W.G (2012) An efficient protocol for DNA extraction from Meliolales and description of *Meliola centellae* sp. Nov. *Mycotaxon*, 122(1): 333-345.
- Poling, S.M.; Wicklow, D.T.; Rogers, K.D.; Gloer, J.B. (2008) *Acremonium zea* , a protective endophyte of maize, produces dihydroresorcylic acid and 7-Hydroxydihydroresorcylic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9): 3006-3009.
- Posada, D.; Crandall, K. A (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- Rannala B, Yang Z. (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*. 43:304–311.
- Rambaut, A. (2017) FigTree v. 1.4.3. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (accessed 10 May 2017)
- Reeb, V.; Lutzoni, F.; Roux, C. (2004) Contribution of RPB2 to multilocus phylogenetic studies of the euascomycetes (Pezizomycotina, Fungi) with special emphasis on the lichen-forming Acarosporaceae and evolution of polyspory. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 32(3):1036-60.

- Rehner, S A.; Samuels, G J. (1994) Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*, 98(6): 625-634.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. (2012) Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*. 61:539–542.
- Schoch, C.L.; Sung, G.H.; López-Giráldez, F.; Townsend, J.P.; Miadlikowska, J.; Hofstetter, V.; Robbertse, B.; et al. (2009) The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic Biology*, 58(2): 224-39.
- Singh, U. P.; Vishwakarma, S. N.; Basuchaudhury, K. C. (1978) *Acremonium sordidulum* Mycoparasitic on *Colletotrichum dematium* f. *truncata* in India. *Mycologia*, 70(2): 453-455.
- Silva, R. L. de O.; Luz, J. S.; Silveira, E. B. da; Cavalcante, U. M. T. (2006) Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.) *Acta Botanica Brasílica*. 20(3): 649-655.
- Summerbell, R.C.; Gueidan, C.; Schroers, H-J.; de Hoog, G.S.; Starink, M.; Arocha Rosete, Y.; Guarro, J. & Scott. J.A. (2011) *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Studies in Mycology*, 68.139–162.
- Ventura, J.A.; Rezende, J.A.M. (2016) Doenças do Mamoeiro. In: Amorim L, Bergamim Filho, A.; Camargo, L.F.A.; Rezende, J.A.M. *Manual de Fitopatologia -: Doenças das plantas cultivadas. Agr. Ceres*. São Paulo.
- Vilgalys, R.; Hester, M. (1990) Rapid genetic identification and Mapping of Enzymatically Amplified Ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172(8): 4238-4246.
- Vivas, J.M.S.; Silveira, S.F.; Santos, P.H.D.; Pinho, D.B.; Pereira, O.L. (2017) Seleção de fungos com potencial para biocontrole da pinta-preta do mamoeiro. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 47(4): 369-376.

- Weisenborn, J.L.F.; Kirschner, R.; Piepenbring, M. (2010) *A new darkly pigmented and keratinolytic species of Acremonium Link (hyphomycetes) with relationship to the Plectosphaerellaceae from human skin and nail lesions in Panama*. *Nova Hedwigia*, 90: (3-4):457-468
- Zare, R. and Gams, W. (2008) *A revision of the Verticillium fungicola species complex and its affinity with the genus Lecanicillium*. *Mycological Research*. 112 (PT 7): 811-824.
- Zare, R.; Gams, W.; Starink-Willemse, M. & Summerbell, R.C. (2007) *Gibellulopsis, a suitable genus for Verticilliumnigrescens, and Musicillium, a new genus for V. theobromae*. *Nova Hedwigia*, 85:463-489.
- Zuccaro, A.; Summerbell, R. C.; Gams, W.; Schroers, Hans-J; and Mitchell, J. I. (2004) *A new Acremonium species associated with Fucus spp., and its affinity with a phylogenetically distinct marine Emericellopsis clade*. *Studies in mycology*. 50: 283–297.

3.2. ANTAGONISMO DE FUNGOS COM POTENCIAL DE BIOCONTROLE DA PINTA-PRETA CAUSADO POR *Asperisporium caricae*

Trabalho aceito para publicação na revista *Australian Journal of Crop Science*

3.2.1. Resumo

A pinta-preta do mamoeiro é a doença foliar mais importante desta cultura e a ocorrência espontânea de fungos micoparasitas colonizando lesões de pinta-preta em áreas de produção pressupõe o uso do biocontrole como alternativa à pulverização de fungicidas convencionais. Visando embasar o biocontrole da pinta-preta do mamoeiro, investigou-se a atividade antagônica ao patógeno *Asperisporium caricae* dos seguintes isolados de fungos micoparasitas: H-611 (*Hansfordia pulvinata*); A-602, A-617 e A-598 (*Acremonium* spp.); S-599 (*Simplicillium lanosoniveum*); L-622 (*Lecanicillium lecanii*); e I-609 (*Sarocladium implicatum*). Avaliou-se o micoparasitismo direto, cada isolado fúngico foi analisado em co-cultivo junto a conídios germinantes de *A. caricae*. Avaliou-se ao microscópio de luz o crescimento direcionado e associado, bem como o entrelaçamento e a penetração nos esporos e nos tubos germinativos pelas hifas dos fungos testados. Em meios de ágar sólidos, as atividades enzimáticas de protease e de lipase dos mesmos fungos foram determinadas pela formação de halos de lise; bem como a antibiose sobre a germinação dos conídios, pela produção de compostos voláteis e não-voláteis. O micoparasitismo direto dos tubos germinativos de *A. caricae* foi verificado pelos isolados H-611, A-602, A-617, A-598, S-599 e L-622. Atividade de protease foi pronunciada para os

isolados I-609, S-599, A-602 e A-598 e de lipase, para os isolados H-611 e A-602. Não se observou efeito de compostos voláteis, mas no teste de difusão em ágar, A-617 inibiu em 100% a germinação dos conídios de *A. caricae*. Conclui-se que os isolados fúngicos testados possuem capacidade parasítica e de antibiose contra *A. caricae*. Os resultados sugerem novos estudos e indicam que interações antagônicas poderão se dar por diferentes mecanismos e em diferentes fases da patogênese.

3.1.2. Abstract

The black-spot of papaya is the most important leaf disease of this culture and the spontaneous occurrence of mycoparasite fungi colonizing black-spot lesions in production areas presupposes the use of biocontrol as an alternative to spraying conventional fungicides. Aiming to support the biocontrol of the papaya black-spot, the antagonistic activity of the pathogen *Asperisporium caricae* of the following isolates of mycoparasite fungi was investigated: H-611 (*Hansfordia pulvinata*); A-602, A-617 and A-598 (*Acremonium* spp.); S-599 (*Simplicillium lanosoniveum*); L-622 (*Lecanicillium lecanii*); and I-609 (*Sarocladium implicatum*). The direct micoparasitism was evaluated, each fungal isolate was cultivated in microculture together with germinating conidia of *A. caricae*. The directed and associated growth, as well as the interweaving and penetration in the spores and the germinative tubes by the hyphae of the fungi tested were evaluated under the light microscope. In solid agar media, the enzymatic activities of protease and lipase of the same fungi were determined by the formation of lysis halos; as well as the antibiotics on the germination of conidia, by the production of volatile and non-volatile compounds. The direct myoparasitism of the *A. caricae* germ tubes was verified by isolates H-611, A-602, A-617, A-598, S-599 and L-622. Protease activity was pronounced for the isolates I-609, S-599, A-602 and A-598 and, for lipase, isolates H-611 and A-602. No effect of volatile compounds was observed, but in the agar diffusion test, A-617 inhibited in 100% the germination of the conidia of *A. caricae*. It is concluded that the fungal isolates tested have parasitic and antibiose capacity against *A. caricae*. The results suggest new studies and

indicate that antagonistic interactions may occur through different mechanisms and at different stages of the pathogenesis.

3.2.3. Introdução

À medida que a população aumenta, a necessidade de alimentos e a produção agrícola são intensificadas, bem como a necessidade de se aumentar a proteção das plantas contra o ataque de pragas e doenças, principalmente pelo uso de agrotóxicos. No entanto, isso traz sérias consequências, tanto para o meio ambiente quanto para a saúde da população, agricultores e consumidores (Araujo e Oliveira, 2017), além de constituir barreira à comercialização, notadamente à exportação de frutas brasileiras.

Na cultura do mamoeiro, o fungo *Asperisporium caricae* (Speg.) Maubl., agente causal da pinta-preta encontra-se amplamente disseminado, atingindo tanto pomares comerciais quanto domésticos, exigindo intensas aplicações de fungicidas para o seu controle (Vawdrey et al., 2008; Barreto et al., 2011). As lesões de pinta-preta nas folhas reduzem a área fotossintética e resultam em desfolha severa nos frutos, tornam-os impróprios ao comércio (Adikaram e Wijepala, 1995; Ventura e Rezende, 2016). Além disso, frutos com lesões de pinta-preta são predispostos a podridões em pós-colheita, sendo rejeitados no mercado interno e no mercado estrangeiro. Sistemas de cultivo mais sustentáveis e ambientalmente amigáveis são exigidos pelo mercado de alimentos, que prioriza produtos livres de resíduos de agrotóxicos (Dianese et al., 2008; Martileto et al., 2008; Poltronieri et al., 2017). O surgimento frequente de isolados resistentes a fungicidas nas populações patogênicas tem direcionado cada vez mais investimentos em pesquisas com agentes de biocontrole, quer seja por parte de instituições de pesquisa públicas ou privadas (Ahmed, et al., 2003; Almeida et al., 2007)

O controle biológico é considerado uma medida alternativa aos fungicidas para o controle de fitopatógenos e, como componente do manejo integrado, agrega valor ao produto oferecido ao mercado, cada vez mais exigente em termos de qualidade. O controle biológico baseia-se na relação antagônica entre microrganismo e fitopatógenos, a qual pode ocorrer por diferentes mecanismos:

competição por espaço e nutrientes, antibiose, micoparasitismo, predação e indução de resistência da planta hospedeira (Brunner et al., 2005; Harman, 2006; Harman, 2011).

Na cultura do mamoeiro, embora já tenham sido isolados fungos a partir de lesões de pinta-preta, tanto em cultivos domésticos, não expostos a fungicidas, quanto em áreas comerciais (Vivas et al., 2015), não existem dados científicos comprobatórios de ocorrência de micoparasitismo, nem tampouco foram elucidados mecanismos de antagonismo a este patógeno. O conhecimento dos prováveis mecanismos de ação antagônica é importante para se presumir o potencial de biocontrole e embasar o programa de controle biológico da pinta-preta do mamoeiro. Objetivou-se neste trabalho investigar as atividades antagônicas de fungos potenciais micoparasitas de *A. caricae*. Determinaram-se atividades de micoparasitismo direto de hifas, bem como avaliou-se antibiose por compostos voláteis e não voláteis sobre esporos do patógeno em germinação. Em meios de cultura, determinou-se a presença de atividade enzimática de protease e lípase dos fungos potenciais micoparasitas de *A. caricae*.

3.2.4. Material e Método

3.2.4.1. Fungos utilizados nos ensaios.

Foram utilizados sete isolados de fungos com potencial de micoparasita: um isolado de *Hansfordia pulvinata* (H-611), três isolados do gênero *Acremonium* sp (A-598, A-602 e A-617), um isolado de *Sarocladium implicatum* (I-609), um isolado de *Lecanicillium lecanii* (L-622) e um isolado de *Simplicillium lanosoniveum* (S-599) (Figura 1). Após reisolamento monospórico, as culturas foram armazenadas em BDA (Batata, dextrose e Agar) em tubos, a 10°C e, em água destilada esterilizada, pelo método Castellani (Gonçalves et al., 2016).

3.2.4.2. Descrição *in vitro* dos eventos de micoparasitismo em conídios germinantes de *A. caricae*, por meio de microscopia de luz.

Os fungos micoparasitas (Figura 1) foram analisados em co-cultivo juntamente a conídios de *A. caricae*. O delineamento adotado foi inteiramente casualizado com 4 repetições. Para o ensaio, meio de Ágar fundente foi depositado sob a superfície de lâminas de microscopia. Após a solidificação do meio, uma suspensão de 10^4 conídios/ml de cada gênero dos fungos micoparasitas foram depositadas sobre lâminas juntamente com a suspensão de 10^4 conídios/ml de *A. caricae*. Após a preparação das lâminas estas foram incubados em câmara úmida (caixa Gerbox®) a 25 °C, por 24, 48, 72 e 96h. As lâminas foram observadas ao microscópio óptico e os eventos de antagonismos foram descritos.

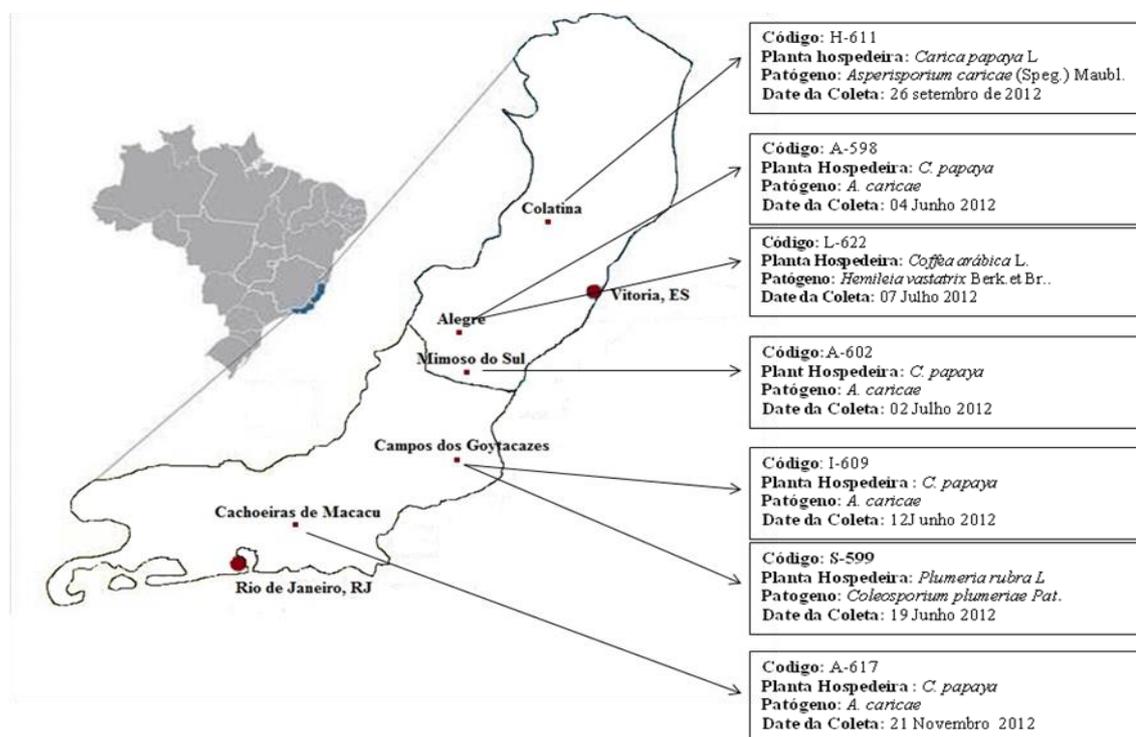


Figura 1. Relação dos isolados de fungos potenciais micoparasitas, local, data da coleta e substrato (patógeno) de origem. Código dos isolados A=*Acremonium* sp, H=*Hansfordia pulvinata*, I= *Sarocladium implicatum*, L= *Iecanicillium lecanii* e S=*Simplicillium lanosoniveum*

3.2.4.3. Enzimas hidrolíticas produzidas em meios sólidos pelos fungos micoparasitas.

Detectou-se a atividade de enzimas lípases e proteases dos fungos micoparasitas em meios específicos. A atividade lipolítica extracelular foi detectada em meio de cultura descritos por Cuzzi (2011). Foram utilizadas quatro repetições. Em todos os ensaios foram colocados 20 ml de meio de cultura em placa de Petri, posteriormente cada espécie do micoparasita foi repicada para o centro destas placas e incubadas em BOD a 25°C por 10 dias.

Para composição do meio foram utilizados: 0,38g. de NaNO_3 ; 1,19g de KH_2PO_4 ; 0,50g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,50g de KCl ; 0,01g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10g de $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$; e 20g de Agar, que foram adicionados em 1000 mL de água destilada e suplementado com 2% de Tween 20 (sorbitano monolaurato), em pH foi ajustado para 6,5. A atividade lipolítica foi evidenciada pela presença de halo de cristais de cálcio do ácido láurico, liberado pelas enzimas ao redor da colônia. Para a determinação da atividade enzimática (Pz), foi utilizada a metodologia descrita por Hankin & Anagnostakis (1975), onde a atividade (Pz) de cada espécie avaliada decorreu da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia, acrescido da zona de precipitação (dcp). As atividades foram classificadas de acordo com o valor do índice enzimático em negativas ($\text{Pz} = 1$), positivas ($0,64 = \text{Pz} < 1$) e fortemente positivas ($\text{Pz} < 0,64$).

Para a atividade da protease, os testes foram realizados segundo a metodologia descrita por Dingle, Reid e Salomons (1953). Inicialmente, preparou-se um meio líquido com a finalidade de estimular a secreção das enzimas em estudo. O meio foi composto de: 3,5g de $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$; 0,75g de K_2HPO_4 ; 0,2g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,25mL de solução traço de sais (0,1g de FeSO_4 ; 0,1g de MnCl_2 ; 0,1g de ZnSO_4 em 100mL de água destilada); 50mL de solução de $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ a 30%; e 0,25g de MgSO_4 , que foram adicionados em 500mL de água destilada. A esse meio foram adicionados os substratos de indução: 1,25g leite desnatado em pó + 1,25g gelatina (proteases), e o pH ajustado para 7,0. O meio foi transferido para frascos erlenmeyer ao qual foram adicionados dois discos de 7mm de meio de cultura contendo micélio fúngico. Os tratamentos foram incubados em agitador orbital, com agitação de 120 rpm, a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, durante dez dias. Após esse período, os meios de cultura foram filtrados em papel filtro qualitativo, para

separação do micélio, e o filtrado obtido foi utilizado nos testes de atividade enzimática.

No teste atividade enzimática da protease, um meio sólido foi preparado com 1,8g de ágar e 1g de leite em pó dissolvidos em 100mL de água destilada, esterilizados e distribuídos em placas de Petri, onde foram feitas perfurações circulares, com diâmetro de 0,5cm, sendo adicionados entre 50-100 µL dos filtrados do meio de indução. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 25°C por 24h. A atividade de protease foi aferida pela formação do halo incolor resultado da hidrólise da caseína do leite, ao redor do ponto de aplicação do filtrado. A avaliação comparativa da atividade enzimática foi determinada pelo diâmetro do halo.

Os dados de atividade enzimática foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-knott 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Genes (Cruz, 2013).

3.2.4.4. Avaliação *in vitro* de compostos voláteis e não voláteis na inibição da germinação de esporos de *A. caricae*

Devido ao crescimento lento de *A. caricae* em meio de cultura, os testes *in vitro* de antagonismo foram realizados avaliando-se apenas a germinação conidial. Para avaliar a ação de componentes voláteis, sobre a cultura de cada micoparasita com 10 dias de crescimento em meio BDA, à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h, foi colocado um suporte (fragmentos de ágar), acima deste foram postas lâminas de vidro contendo disco de ágar de 7 mm, sendo posteriormente adicionada uma suspensão de 10^4 conídios.ml⁻¹ de *A. caricae* sobre os discos. A placa de Petri de cada micoparasita foi vedada hermeticamente com Parafilm® e mantidos em B.O.D. onde permaneceram até a avaliação.

Para o estudo da antibiose por compostos não-voláteis, os isolados foram cultivados sobre papel celofane esterilizado sobreposto ao meio de BDA em placa de Petri. Após 10 dias de crescimento, à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h, o papel celofane foi retirado da superfície do meio e descartado juntamente com a cultura do antagonista. Discos de 7 mm do meio BDA foram retirados da cultura, na qual cresceu o micoparasita, e foram depositados sobre lâmina de

microscopia, sendo posteriormente adicionada uma suspensão de 10^4 conídios.ml⁻¹ de *A. caricae*. As lâminas foram colocadas em placa de Petri e vedadas com Parafilm® e incubadas em B.O.D., onde permaneceram até avaliação.

Os ensaios descritos acima foram repetidos uma vez. Tanto para o teste de componente volátil quanto para o não-volátil, foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, com 9 tratamentos (7 isolados + 1 controle + 1 controle negativo) e 4 repetições. Como controle, utilizaram-se placas sem crescimento de fungo. Como controle negativo, utilizou-se pré-cultivo do fungo *Cladosporium sp*, que é considerado um fungo de crescimento rápido, com a finalidade de saber se há efeito de componente volátil ou se houve efeito de acúmulo de gás carbônico, procedente da respiração, impedindo a germinação de *A. caricae*.

Após 24 h de incubação, ao microscópio ótico no aumento de 20x, foram contados em três campos de visualização, os conídios germinados e não-germinados. Estes foram comparados com as testemunhas (meio de BDA sem cultura prévia do antagonista) e com testemunha negativa (*Cladosporium sp*). Os dados de germinação dos conídios de *A. caricae* foram submetidos a análises de variância, com arranjo em fatorial. Quando constatado efeito significativo da interação isolados x ensaios, foram conduzidas análises de variâncias individuais e o agrupamento das médias por Scott-knott 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Genes (Cruz, 2013).

3.2.5. Resultado e Discussões

Para a descrição dos eventos de interação dos fungos micoparasita com o patógeno observou-se apenas a germinação dos conídios de *A. caricae* e dos micoparasitas, após 24 horas de instalação do teste (Figura 2: A1, B1, C1, D1, E1, F1 e G1). Após 48 e 72 h os isolados L-622 de *L. Lecanii* (Figura 1, F2 e F3), S-599 de *S. lanosoniveum* (Figura 2 E2 e E3), A-598, A-602 e A-617 de *Acremonium sp* (Figura 2, B2, B3, C2, C3, D2 e D4) e H-611 de *H. pulvinata* (Figura 2 A2 e A3) apresentaram crescimento direcionado e entrelaçamento de suas hifas com os tubos germinativos de *A. caricae*. O mesmo não foi observado para hifas do isolado I-609 de *S. implicatum* (Figura 2, G2 e G3).

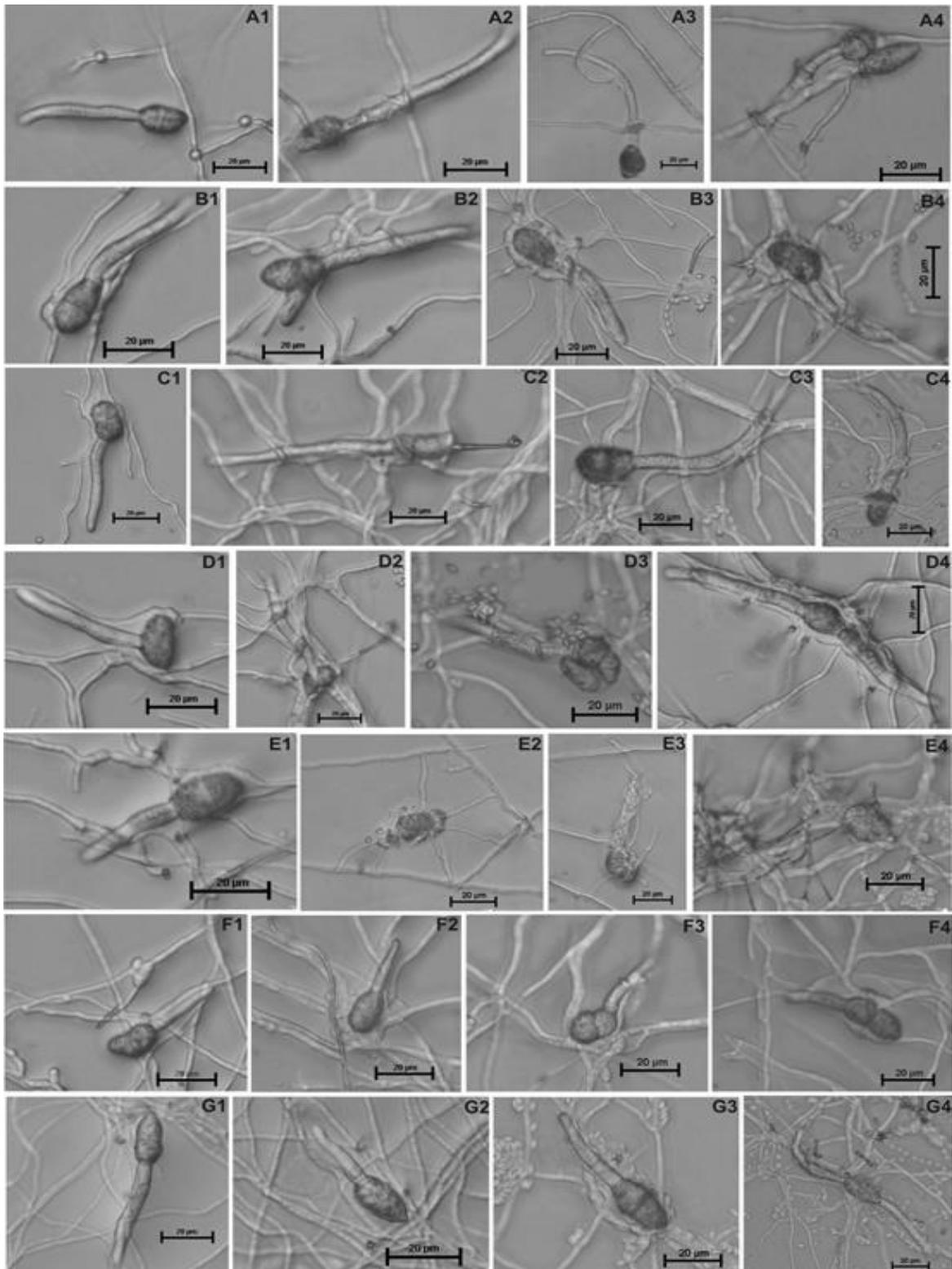


Figura 2. Imagens ao microscópio de luz obtida mediante a co-cultivo demonstrando a interação entre hifas dos fungos micoparasitas *Hansfordia pulvinata* H-611 (A1 a A4), *Acremonium* sp, A-602, A-617e A-598 (B1 a D4), *Simplicillium lanosoneum* S-599 (E1 a E4), *Lecanicillium lecanii* L-622 (F1 a F4), *Sarocladium implicatum* I-609 (G1 a G4) com conídios germinantes de *Asperisporium caricae*, após 24h (1), 48h (2), 72h (3) e 96h (4) de incubação em meio de ágar-água.

Todos os isolados de *L. lecanii*, *S. lanosoniveum*, *H. pulvinata* e *Acremonium* sp estabeleceram contato de hifas com o tubo germinativo do patógeno. Porém, observaram-se diferenças entre os diferentes isolados quanto às possíveis interações. Por exemplo, *H. pulvinata* apresentou estruturas especializadas semelhantes a 'apressórios' (Figura 2 A3) que se aderiram ao tubo germinativo de *A. caricae*. Após 96 horas, as hifas de H-611 enovelaram-se ao redor das hifas do hospedeiro, formando estruturas com forma de ganchos (Figura 2 A4).

Os isolados A-598, A-602 e A-617, do gênero *Acremonium* spp., foram semelhantes quanto ao micoparasitismo de *A. caricae*. Estes isolados apresentaram um contato mais denso e, também, apresentaram enovelamento de hifas ao redor do tubo germinativo e do conídio do patógeno (Figura 2 B3, C2, C3, D2, D4). O isolado de *L. lecanii* (L-622) também apresentou o mesmo padrão de parasitismo acima, porém com menor densidade de hifas. Entretanto, neste caso, observou-se uma redução do comprimento e do diâmetro do tubo germinativo de *A. caricace* para este isolado, após 96 h de incubação, o que pode significar alguma atividade antibiótica ou fungistática do micoparasita (Figura 2 F1, F2, F3 e F4).

O fungo micoparasita que mais se destacou foi o *S. lanosoniveum* que apresentou crescimento das hifas direcionado ao patógeno impedindo seu desenvolvimento. Para esse fungo observou-se, após 96 h, que os entrelaçamentos das hifas dos micoparasitas tornaram-se densos, os quais penetraram nos esporos de *A. caricae* (Figura 2 E4). Este isolado foi bastante agressivo, conferindo a esse antagonista uma enorme capacidade como micoparasita através da rápida e intensa colonização do substrato, causando a destruição da parede celular, provavelmente para obter nutrientes a partir das células mortas. Por outro lado, no isolado de *S. implicatum* (I-609), não foram visualizadas entrelaçamento das hifas com conídio do patógeno (Figura 2 G1, G2, G3 e G4).

Os fungos S-599, L-599, A-602, A-598, A-617 e H-611 apresentaram característica de micoparasitismo, pois de acordo com Almeida et al. (2007) e Harman (2011), o mecanismo de micoparasita é um processo de destruição física onde o antagonista detecta e localiza hifas de fungos suscetíveis, crescendo em sua direção, presumivelmente, em resposta a estímulos químicos, formando

estruturas semelhantes a apressórios e enrolando-se em toda a extensão da hifa hospedeira para, então, penetrar e consumir a hifa do hospedeiro. A ação de micoparasitismos é um importante mecanismo de antagonismo e de biocontrole, pois reduz a infecção e, conseqüentemente, a multiplicação e produção de inóculo do patógeno.

O crescimento e o enrolamento de hifas são importantes na interação parasítica, porém por si só, não garantem o sucesso do controle biológico. Alguns autores mencionam que a ação sinérgica atribuída à produção de enzimas e antibióticos, simultaneamente, possa explicar melhor desempenho da ação antagonista (Isaias et al., 2014). No micoparasitismo, após o processo de aderência às enzimas extracelulares, desempenham um papel chave na hidrólise do hospedeiro (Harman, 2000). Diversas enzimas, entre elas lipase e protease, são responsáveis pela hidrólise das paredes celulares do hospedeiro, possibilitando, assim, a sua invasão pelo micoparasita e a nutrição (Suarez et al., 2004).

Foi possível detectar a atividade da enzima lipase (Tabela 1), pela presença de halos de lise opacos em torno das colônias para maioria dos fungos testados. Os menores índices enzimáticos foram observados para os isolados A-602 (IE = 0,54) e H-611 (IE = 0,59). Salienta-se que quanto menor o valor do índice enzimático, maior é a atividade enzimática. Estes valores foram inferiores àqueles obtidos para o isolado comparador de *Aspergillus* sp., o que demonstra potencial dos fungos micoparasitas no que se refere à atividade desta enzima. Para os isolados I-609, A-598 e A-617 também foram observados halos de lise, porém o índice enzimático foi maior. Já os isolados S-599 e L-622 não apresentaram atividade lipase. De acordo com Hankin e Anagnostakis (1975), o halo opaco é proveniente da formação de cristais de cálcio do ácido láurico, liberado pela ação da enzima ou pela completa degradação dos sais lipídicos em meios contendo sorbitol monolaurato (Tween 20) como substrato lipídico. Segundo Kolattukudy (1985), existem evidências de que a cutinase, uma lipase capaz de degradar a cutina, esteja diretamente envolvida na penetração de fungos via cutícula, desempenhando papel importante na patogenicidade e no micoparasitismo.

Tabela 1. Atividade de enzimas protease e lipase de *Hansfordia pulvinata* (H-611), *Acremonium sp.* (A-598, A-602 e A-617), *Simplicillium lanosoniveum* (S-599), *Lecanicillium lecanii* (L-622), *Sarocladium implicatum* (I-609).

Isolados	Atividade Protease			Atividade Lipase		
	Halo (cm)		Classificação ¹	Índice		Classificação ²
I-609	1.35	A*	++	0.80	D	+
S-599	1.40	A	++	1.00	F	-
L-622	1.16	B	+	1.00	F	-
A-602	1.40	A	++	0.54	A	++
A-598	1.37	A	++	0.85	E	+
A-617	1.10	B	+	0.88	E	+
H-611	0.00	C	-	0.59	B	++
<i>Aspergillus sp</i>	1.54	A	++	0.67	C	+

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente, segundo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ¹Classificação estabelecida de acordo com o agrupamento das médias: negativo (-); positivo (+) e fortemente positivo (++) . ²Classificação estabelecida de acordo com o valor do índice enzimático: IE = 1, negativo (-); 0,64 = IE < 1, positivo (+) e IE < 0,64, fortemente positivo (++) .

Já as proteases desestabilizam a integridade da parede e da membrana celular do hospedeiro, facilitando a penetração e a colonização pelo antagonista (Howell, 2003; Suarez et al., 2004). A maior atividade proteolítica foi observada para o fungo comparador *Aspergillus sp.* (halo de 1,54 cm). No entanto, este halo foi estatisticamente do mesmo diâmetro dos halos observados para os fungos S-599, A-602, A-598 e I-609, que apresentaram as médias dos halos enzimáticos variando de 1,40 a 1,35 mm de diâmetro. Nestes casos, entretanto, a classificação da atividade enzimática foi de fortemente positiva (Tabela 1). Um segundo grupo de classificação positiva foi formado por L-622 (halo = 1,16 cm) e A-617 (halo = 1,10 cm). Já o isolado H-611 de *H pulvinata*, não formou halo claro que evidenciasse atividade proteolítica, sendo classificado como de atividade enzimática negativa.

Bettiol (1991) afirma que um agente de biocontrole pode atuar utilizando um ou mais mecanismos de interação antagonista. A ação sinérgica entre enzimas hidrolíticas e metabólitos secundários confere ao micoparasita um nível de antagonismo maior do que quando estes dois mecanismos agem separadamente (Benítez et al., 2004), aumentando, assim, as chances de êxito no controle biológico.

A antibiose é definida como a interação entre organismo na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm efeito danoso sobre o outro (Stadnik e Bettiol, 2000). Pode ocorrer inibição no crescimento e ou na germinação de esporos do hospedeiro. O metabólito produzido pode ser absorvido pela célula hospedeira e se ligar a proteínas em geral ou a proteínas específicas, desencadear lise e desestabilização estrutural (Ahmed et al., 2003), isso ocorre independente do contato físico entre os microrganismos, podendo ser por metabólitos voláteis e não-voláteis.

Nos ensaios para se avaliar presença de componentes voláteis *in vitro* não se observou diferença estatística entre as médias de germinação conidial dos tratamentos (fungos micoparasitas) em relação à testemunha (só meio de cultura). Portanto, neste teste não houve evidência que os isolados produzissem compostos voláteis capazes de inibir a germinação do patógeno *A. caricae*.

Alguns autores explicam que os antibióticos voláteis atuam sobre os fungos suscetíveis pela inibição do crescimento micelial e que isolados com capacidade para produzirem substâncias não-voláteis nem sempre produzem substâncias voláteis (Martins-Corder e Melo, 1998). Isto foi verificado neste estudo. Quando se avaliou o efeito de antibiose de micoparasitas por componentes não-voláteis e difusíveis em meio de cultura, houve redução na germinação conidial de *A. caricae*. Neste ensaio observou-se que o isolado A-617 de *Acremonium* sp se destacou por inibir totalmente a germinação de *A. caricae*. Um segundo grupo foi formado pelos isolados I-609 e H-611, respectivamente, com 10% dos conídios germinados. Por último os isolados A-598, S-599, A-602 e L-622 de *Acremonium* sp, *S. lanosoniveum* e *L. lecanii*, respectivamente, com apenas 30 a 35% dos conídios do patógeno germinação (Figura 3).

Martin-Corder e Melo (1998) observaram que a capacidade de *Trichoderma* spp produzirem metabólitos secundários e o efeito fungicida podem variar entre espécies e isolados da mesma espécie, bem como variam os compostos antifúngicos secretados (Sivasithamparam et al., 1998; Lorito et al., 2010). Para *Acremonium* sp. e *Hansfordia pulvinata*, já foram relatadas atividades de antibiose e a produção de compostos antifúngicos noutros patossistemas. Tirilly et al. (1983), investigando o mecanismo de micoparasitismo de *H. pulvinata* sobre *Cladosporium fulvum* Cook em folhas de tomateiro, comprovaram a produção *in vitro* de um composto sesquiterpene (13- desoxyphomenone) de ação fungistática. Wicklow et al. (2005), em seus estudos, concluíram que *Acremonium zeae* exibiu atividade antifúngica significativa contra *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*, e os metabólitos responsáveis por essas atividades foram os antibióticos pirrocininas A e B.

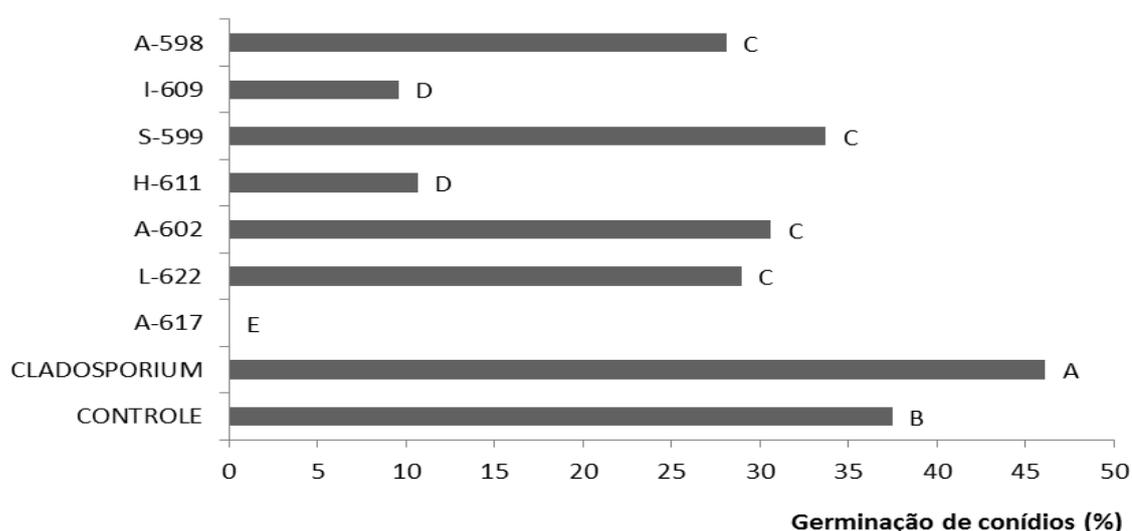


Figura 3. Efeito de compostos não-voláteis sobre a germinação de conídios de *A. caricae* produzidos por fungos micoparasitas, *Hansfordia pulvinata* (H-611), *Acremonium* sp, (A-598, A-602 e A-617), *Simplicillium lanosoniveum* (S-599), *Lecanicillium lecanii* (L-622) e *Sarocladium implicatum* (I-609) e no tratamento controle (somente o patógeno *A. caricae* e um fungo de crescimento rápido *Cladosporium* sp). Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

Os resultados deste trabalho indicam que os isolados de *Acremonium* sp, *H. pulvinata*, *S. lanosoniveum*, *L. lecanii* e *S. implicatum* são micoparasitas e possuem atividade antibiótica antagônica a *A. caricae*, agente causal da pinta-preta no mamoeiro. Tais atividades podem ser exploradas visando a seleção preliminar de agentes de biocontrole mais eficientes. No entanto, a atividade antagônica deve ser comprovada em experimentos de campo, associados ao controle da doença. Os resultados obtidos no presente estudo estimulam a busca da investigação científica no campo de biocontrole a partir de doenças de plantas com fungos micoparasitas e abrem a perspectiva para uma nova opção de controle alternativo da pinta-preta do mamoeiro.

3.2.6. Conclusão

Os isolados A-602, A-598, A-617, H-611, I-609, L622 apresentaram crescimento de hifas associado ao micoparasitismo em conídios e tubos germinativos de *A. caricae*.

Os isolados de I-609, S-599, A-602, A-598 apresentaram forte atividade protease, bem como, atividade protease-positiva foi constatada, também, para L-622, A-617. Quanto aos isolados H-611 e A-602, apresentaram forte atividade, e A-598, A-617, I-609 apresentaram atividade lipase-positiva mediana.

Houve produção de composto não-volátil do isolado A-617, com atividade antibiótica forte à germinação conidial de *A. caricae*.

Os isolados de *Acremonium* spp., *H. pulvinata*, *S. lanosoniveum*, *L. lecanii* e *S. implicatum* selecionados mostraram potencial antagônico a *A. caricae* *in vitro*.

3.2.7. Referências

- Adikaram, N.K.B.; Wijepala, M. (1995) *Asperisporium* black spopt in Carica papaya: a new disease in Sri Lanka. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 23(4): 213-219.
- Ahmed, A.S.; Ezziyyani, C.; Sánchez, C.P.; Candela, M.E. (2003) Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum*

- against root rot disease in pepper (*Capsicum annum*) plants. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 633-637.
- Ameida, F.B.; Cerqueira, F.M.; Silva, R.N.; Ulhoa, C.J.; Lima, A.L. (2007) Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 29: 1189-1193.
- Araujo, I.M.M.; Oliveira, A.G.R.C. (2017) Agronegócio e agrotóxicos: impactos à saúde dos trabalhadores agrícolas no nordeste brasileiro. *Revista Trabalho, Educação e Saúde*, 15(1): 117-129.
- Barreto, L.F.; Savan, P.A.L.; Lima, L.L.; Lodo, B.N. (2011) Avaliação de fungicidas no controle de *Asperisporium caricae* na cultura do mamoeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(spe1): 399-403.
- Benítez, T.; Rincon, A.M.; Limon, M.C.; Codon, A.C. (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249-260.
- Bettiol, W. (1991) Seleção de microrganismo antagônicos a fitopatógenos. In: Bettiol, W.(Org). *Controle biológico de doença de plantas*. Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de defesa da Agricultura, Jaquariúna.
- Brunner, K.; Zeilinger, S.; Ciliento, R.; Woo, S.L.; Lorito, M.; Kubicek, C.P.; Mach, R.L. (2005) Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and of plant systemic disease resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3959-3965.
- Cruz, C.D. (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics, *Acta Scientiarum. Agronomy*, 3(5): 271-276.
- Cuzzi, C.; Link, S.; Vilani, A.; Onofre, S.B. (2011) Enzimas Extracelulares Produzidas por Fungos Endofíticos Isolados de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (asteraeaceae), *Global Science and Technology*, 4(2): 47-57.
- Dianese, A.C.; Blum, L.E.B.; Dutra, J.J.; Lopes, L.F.; Sena, M.C.; Freitas, L.F. (2008) Avaliação do efeito de fosfitos na redução da variola (*Asperisporium caricae*) do mamoeiro (*Carica papaya*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30(3): 834-837

- Dingle, J.; Reid, W.W.; Solomons, G.L. (1953) The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides. II. Application of the "cup-plate" assay to the estimation of enzymes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 4: 149-155.
- Gonçalves, R.C.; Alfenas, A.C.; Mafia, R.G. (2016) Armazenamento de microorganismo em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: Alfenas AC, Mafia RG. *Métodos em Fitopatologia*. Publisher UFV, Viçosa
- Hankin, L.; Anagnostakis, S.L. (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67 (3): 597-607.
- Harman, G.E. (2011) Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytologist*, 189(3): 647-9.
- Harman, G.E. (2006) Overview of Mechanisms and uses *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2): 190-194.
- Harman, G.E. (2000) Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84(4): 376–393.
- Kolattukudy, P.E. (1985) Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 23: 223-250.
- Lorito, M.; Woo, S.L.; Harman, G.E.; Monte, E. (2010) Translational research on *Trichoderma*: from `omics to the field. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 395–417.
- Martelleto, L.A.P.; Ribeiro, R.L.D.; Sudo-martelleto, M.; Vasconcellos, M.A.S.; Marin, S.L.D.; Pereira, M.B. (2008) Cultivo orgânico do mamoeiro 'Baixinho de Santa Amália' em diferentes ambientes de proteção. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30(3): 662-666.
- Martins-corder, M.P.; Melo, I.S. (1998) Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. A *Verticillium dahliae* kleb. *Scientia Agricola*, 55(1): 1-7.
- Poltronieri, T.P.S.; Silveira, S.F.; Vivas, M.; Catarina, R.S.; Cortes, D.F.M.; Azevedo, A.O.N.; Pereira, M.G. (2017) Selecting black-spot resistant papaya genotypes derived from backcrossing and hybrids. *Genetics and Molecular Research*, 16(1): 1-11.

- Saias, C.O.; Martins, I.; Silva, J.B.T.; Silva, J.P.; Mello, S.C.M. (2014) Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. *Summa phytopathologica*, 40(1): 34-41.
- Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E.L. (1998) Secondary Metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Kubicek CP, Harman GE *Trichoderma* and *Gliocladium. Basic Biology, Taxonomy and Genetics*. Taylor and Francis, London.
- Stadnik, M.J.; Bettiol, W. (2000) Controle biológico de oídeos. In: Melo IS, Azevedo JL. *Controle biológico, Embrapa Meio Ambiente*, Jaguariúna.
- Suarez, B.; Rey, M.; Castillo, P. (2004) Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematicidal activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(1): 46-55.
- Tirilly, Y.; Kloosterman, J.; Sipma, G.; Bosch, J.J.K. van den (1983) A fungicidal Sesquiterpene from *Hansfordia pulvinata*. *Phytochemistry*, 22(9): 2082-2083.
- Vawdrey, L.L.; Grice, K.R.E.; Westerhuis, D. (2008) Field and laboratory evaluations of fungicides for the control of brown spot (*Corynespora cassiicola*) and black spot (*Asperisporium caricae*) of papaya in far north Queensland, Australia. *Australian Plant Pathology*, 37(6): 552-558.
- Vivas, J.M.S.; Vivas, M.; Silveira, S.F. (2015) Efeito da temperatura sobre o crescimento e esporulação in vitro de fungos micoparasitas de *Asperisporium caricae*. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 45(1): 73-81.
- Ventura, J.A.; Rezende, J.A.M. (2016) Doenças do Mamoeiro. In: Amorim L, Bergamim Filho A, Camargo LFA, Rezende JAM. Manual de Fitopatologia -: Doenças das plantas cultivadas. *Agr. Ceres*. São Paulo
- Wicklow D.T.; Roth, S.; Deyrup, S.T.; Gloer, J.B. (2005) A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research*, 109(05): 610-618.

3.3. SENSIBILIDADE DE FUNGOS MICOPARASITAS A PRODUTOS ALTERNATIVOS COM POTENCIAL DE USO NO CONTROLE DA PINTA-PRETA DO MAMOEIRO

3.3.1. Resumo

O manejo integrado de doenças é uma técnica de controle que pode potencializar a redução dos danos ocasionados pela pinta-preta (*Asperisporium caricae*) do mamoeiro. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade dos fungos *Hansfordia pulvinata* e *Acremonium* spp. a produtos alternativos, que podem apresentar atividade indutora de resistência em mamoeiro, a doenças foliares. Foram avaliados, *in vitro* e *in vivo*, a sensibilidade de quatro fungos micoparasitas de *A. caricae*, sendo três isolados de *Acremonium* spp. (A-598, A-602 e A-617) e um de *Hansfordia pulvinata* (H-611), a produtos alternativos indicados como indutores de resistência de plantas e fertilizantes foliares: Agro-Mos[®], Bion[®], Ecolife[®], Hortifospk[®], Matriz G[®], Vitaphol[®]. Em ensaios *in vitro*, os fungos micoparasitas foram cultivados em placas com meio BDA contendo os produtos acima. O fungicida Amistar 500WG[®] foi incluído como tratamento para comparação como controle positivo e BDA puro como controle negativo. A toxicidade dos produtos testados foi determinada com base nos índices biológicos obtidos pelos valores de crescimento micelial, esporulação e germinação dos conídios de cada fungo. Produtos classificados como compatível para todos os isolados foram selecionados para testes *in vivo*. Em telado, somente os fungos micoparasitas bem como os fungos juntamente com produtos selecionados foram pulverizados em plantas de mamoeiro com sintomas foliares de pinta-preta.

Avaliou-se a incidência de folhas com micoparasita e a porcentagem de lesões de pinta-preta colonizadas pelos isolados testados. O isolado H-611 foi compatível com a maioria dos produtos alternativos testados à exceção de Hortifos®. O Bion® e Matriz® apresentaram-se compatíveis com todos os isolados testados, podendo ser utilizados juntamente com *Acremonium* spp. e *H. pulvinata* no controle da pinta-preta do mamoeiro, pois estes produtos não tiveram efeito tóxico sobre os fungos micoparasitas.

3.3.2. Abstract

The integrated management of diseases is a control technique that can potentiate the reduction of damages caused by the black-winged peccary (*Asperisporium caricae*) of papaya. The objective of this work was to evaluate the sensitivity of *Hansfordia pulvinata* and *Acremonium* spp. fungi to alternative products which may present resistance inducing activity in papaya, foliar diseases. Four previously selected mycoparasites fungi of *A. caricae*, being three isolates of *Acremonium* spp. (A-598, A-602, and A-617) and one of *H. pulvinata* (H-611), were evaluated for *in vitro* and *in vivo* sensibility to alternative products with activity as plant resistance inducers and, or foliar fertilizers: Agro-Mos®, Bion®, Ecolife®, Hortifospk®, Matriz G®, Vitaphol®. On *in vitro* assays, the above mycoparasites fungi were grown in plates with PDA medium amended with the above products and, the fungicide Amistar 500WG® was included as a treatment for comparison control positive and, pure PDA as a negative control. The toxicity of the products tested was determined based on the biologic index from the values of mycelial growth, sporulation, and conidial germination on each fungi. Products classified as compatible for all isolates were selected for *in vivo* tests. Under greenhouse only the fungi mycoparasites as well as the isolates combined with *in vitro* selected products were sprayed on leaves of papaya plants presenting black spot lesions. The incidence of leaves with mycoparasites and the percentage of black spot lesions colonized by the isolates tested were evaluated. The H-611 isolate was compatible with most of the alternative products tested except Hortifos®. Bion® and Matriz® appeared compatible with all the isolates tested, being able to be used

together with *Acremonium* spp. and *H. pulvinata* to control papaya black spot, as these products did not have toxic effect on the mycoparasitic fungi.

3.3.3. Introdução

Medidas alternativas que reduzem a dependência das culturas agrícolas aos pesticidas podem melhorar a qualidade de produtos e seus derivados vegetais, reduzir a exposição humana e ambiental aos produtos químicos e, conseqüentemente, seus efeitos nocivos para a saúde humana, melhorando a qualidade de vida. Além disso, na agricultura convencional ao redor do mundo, nas zonas temperadas ou nos trópicos, muitas culturas agrícolas são altamente dependentes do uso de pesticidas, o que compromete a produção vegetal sustentável (Brauner e Graff, 2015). O desenvolvimento de medidas sustentáveis para controlar as pragas na agricultura deve basear-se na filosofia de Manejo Integrado de Pragas (MIP). No contexto da fitopatologia, no entanto, a adoção de práticas integradas para o controle de doenças é uma recomendação antiga, enquanto que manter a população de patógenos abaixo do limiar de danos econômicos é um grande desafio (Bergamin Filho, 2008).

Na cultura do mamoeiro, a pinta-preta, causada pelo fungo *Asperisporium caricae* (Speg.) Maubl, é uma doença que se destaca por ser danosa causando a redução da área foliar ativa da planta, bem como a depreciação do aspecto comercial do fruto (Ventura e Rezende, 2016), exigindo muitas aplicações de fungicidas para o seu controle (Barreto et al., 2011). Além da aplicação de fungicidas, algumas medidas recomendadas para o controle da pinta-preta são a retirada das folhas doentes do pomar, para reduzir o inóculo do fruto (Suzuki et al., 2007), aliada ao monitoramento da doença para minimizar aplicação de fungicidas (Ventura e Rezende, 2016).

Todavia são restritos os estudos na busca de estratégias de controle integrado sustentável. Segundo Martelleto et al. (2009), a dificuldade de controle da pinta-preta do mamoeiro é mais evidente no sistema orgânico de produção, dada aos escassos resultados de pesquisas e à restrição ao uso de fungicidas convencionais. Visando contribuir para o controle alternativo desta doença, a aplicação de fosfitos, fertilizantes foliares e indutores de resistência têm sido

estudados (Pratissoli et al., 2007; Oliveira e Nishijima, 2014; Santos et al., 2017). Oliveira e Nishijima (2014) concluíram que o produto à base de acibenzolar-S-methyl induz resistência parcial ao mamoeiro contra pinta-preta, podendo ser opção para o controle desta doença. No entanto, acredita-se que o controle da doença poderá ser potencializado com o uso de mais de uma técnica de controle.

O controle biológico é, por sua vez, uma alternativa que vem sendo estudada no mamoeiro (Vivas et al., 2017). Tal medida consiste no emprego de um organismo antagônico que reduz a multiplicação ou sobrevivência do patógeno, resultando no controle da doença. Na cultura do mamoeiro, os fungos micoparasitas *Hansfordia pulvinata* e o *Acremonium* spp, já foram relatados com potencial para o controle da pinta-preta (Vivas et al., 2017). O controle biológico trata-se de uma estratégia muito utilizada em sistemas agroecológicos, assim como na agricultura convencional que se vale do manejo integrado de pragas e doenças. Acredita-se que aliar esta medida de controle com o uso de produtos alternativos poderia proporcionar redução na população de patógenos abaixo do limiar de dano econômico. Uma vez que os produtos alternativos atuariam impedindo e, ou atrasando o aparecimento de novas lesões, enquanto os fungos micoparasitas atuariam em lesões já estabelecidas, reduzindo a produção de inóculo e a sobrevivência do patógeno nas lesões.

Assim, tornam-se necessários estudos visando avaliar a compatibilidade entre controle biológico e o uso de produtos alternativos, uma vez que tais produtos podem ser tóxicos aos fungos micoparasitas, comprometendo sua ação no controle de doenças. Pelo exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade dos isolados de fungos micoparasitas *Hansfordia pulvinata* e *Acremonium* spp. a produtos alternativos com potencial de uso no controle da pinta-preta do mamoeiro.

3.3.4. Material e Métodos

3.3.4.1. Micoparasitas e produtos alternativos utilizados

Foram utilizados três isolados de *Acremonium* spp. (A-598, A-602 e A-617) e um de *Hansfordia pulvinata* (H-611), previamente obtidos por isolamento direto de lesões de pinta-preta do mamoeiro com sinais de micoparasitas (Vivas et al., 2017). As culturas monospóricas obtidas foram preservadas em tubos sob refrigeração a 10 °C, repicadas quando necessário para placas de Petri contendo BDA, mantidas em BOD a 25 ± 0,5 °C, sob regime de 12 h de fotoperíodo, durante 12 dias.

Para determinação da compatibilidade dos micoparasitas com produtos alternativos, foram testados os produtos: Agro-mos[®], Bion[®], Ecolife[®], Hortifospk[®], Matriz G[®] e Vitaphol[®]. O fungicida Amistar 500WG[®] foi incluído como controle positivo para comparação e BDA puro como controle negativo (Tabela 1). Os isolados e os produtos foram utilizados tanto para conduções de testes *in vitro* quanto para testes em condições de telado.

3.3.4.2. Efeito dos diferentes produtos alternativos no crescimento micelial, esporulação e viabilidade do conídio

Os experimentos (um para cada isolado) foram conduzidos utilizando-se o delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições. Após a preparação do meio de cultura BDA, quando este ainda estava fundente, os produtos, presentes na tabela 1 foram adicionados diretamente no meio de cultura, sob agitação manual até a completa diluição dos produtos. O meio de cultura contendo os produtos foi vertido em placas de Petri (aproximadamente 20 mL/por placa). Depois de solidificado o meio de cultura, um disco de 7 mm da porção mediana da colônia da cultura monospórica do micoparasita foi depositada no centro de placas de Petri. Procedeu-se a incubação em BOD a 25 ± 0,5 °C por 15 dias, sob regime de 12 h de fotoperíodo.

Tabela 1. Produtos utilizados na avaliação de sensibilidade de fungos micoparasitas da pinta-preta do mamoeiro

Nome Comercial	Ingredientes Ativos	Doses /L
AGRO-MOS [®]	Mananoligossacarídeo fosforilado, Sulfato de cobre, sulfato de zinco	2mL
BION [®]	Acibenzolar-S-Methyl	0,06g
ECOLIFE [®]	Bioflavonóides, ácido ascórbico, ácido láctico e glicerina vegetal	2mL
HORTIFOS PK [®]	Fosfito de potássio (P ₂ O ₅ 28% e K ₂ O; 26%)	2mL
MATRIZ G [®]	Fósforo (P ₂ O ₅) 3,00%pp, Nitrogênio (N)1,00%pp, Potássio (K ₂ O)2,00 %pp, Enxofre (S)2,47% pp, Magnésio (Mg)1,00%pp, Boro (B)0,50%pp, Manganês (Mn)0,50%pp, Zinco (Zn)0,10%pp, Carbono (C)6,00%pp, Ácidos Fúlvicos12,00%pp	1mL
VITAPHOL [®]	Fósforo 6,0%, Potássio 15,0%, Silício 5,0%	2mL
AMISTRAR 500WG [®]	azoxistrobina.	0,16g
CONTROLE	Água	

O crescimento radial das colônias foi medido em dois sentidos ortogonais, sendo, posteriormente, obtida a média das duas medidas. Para avaliar a esporulação, discos de 7 mm de diâmetro foram retirados da região mediana das colônias, com o auxílio de um furador de rolhas, conforme metodologia descrita por Vias et al. (2015). Estes discos foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 1 mL de água com 0,3% de Tween a 20 %. Após agitação por 1 minuto, em agitador de tubos, retirou-se, com pipeta, a suspensão e procedeu-se à contagem dos esporos em câmara de Neubauer (hemacitômetro).

Um segundo experimento foi conduzido para avaliar a viabilidade (capacidade de germinação) dos conídios na presença dos produtos, o trabalho constituiu-se de teste de cultivo e exame direto em lâmina ao microscópio de luz, em delineamento de blocos casualizados com quatro repetições. Para tal, foram adicionados sob lâminas de vidro esterilizadas, discos de 7 mm retirados das placas de petri com BDA contendo os diferentes produtos alternativos conforme descrito na Tabela 1. Posteriormente, uma porção de 0,05 mL de suspensão de 1×10^4 conídios. mL⁻¹ do micoparasita foi depositada sobre o disco. As lâminas com os discos foram colocadas em Gerbox com um chumaço de algodão úmido (câmara úmida) e mantidas em BOD a $25 \pm 0,5$ °C, durante 12 horas, na presença de luz. Após esse período, efetuou-se a paralisação da germinação dos conídios com a adição de 20 µL de lactofenol. As lâminas foram levadas ao microscópio óptico, sendo amostrados 80 conídios por discos em 3 campos visuais, sob aumento de 200X. Contou-se o número de conídios germinados (aqueles com tubo germinativo de tamanho igual ou maior que o do conídio) e o número de conídios não-germinados, para estabelecer-se uma proporção.

Os experimentos foram repetidos uma vez, sendo os valores de crescimento micelial, esporulação e germinação (viabilidade) de conídios de cada isolado submetidos à análise de variância, considerando a análise de grupos de experimentos. As médias de cada produto para cada isolado foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As análises foram efetuadas utilizando o programa Genes (Cruz, 2013).

A compatibilidade entre os produtos e os fungos foi baseada no cálculo de toxicidade proposto por Rossi-zalaf et al. (2008), utilizando as variáveis crescimento micelial, esporulação do fungo e viabilidade dos conídios, por meio da seguinte expressão: $IB = \frac{47CM + 43ESP + 10GER}{100}$, sendo: IB = índice biológico; CM = porcentagem de crescimento micelial da colônia após 15 dias, em relação à testemunha; ESP = porcentagem de esporulação após 15 dias, em relação à testemunha; GER = porcentagem de germinação dos conídios após 15 horas, em relação à testemunha.

De acordo com os valores das estimativas obtidas para o índice biológico (IB), a toxicidade de cada produto aos fungos testados foi classificada como: Tóxico ($0 < IB < 41$); Moderadamente Tóxico ($42 < IB < 66$) e Compatível ($IB > 66$).

3.3.4.3. Efeito de produtos alternativos sobre a colonização dos fungos micoparasitas sobre lesões de pinta-preta do mamoeiro

Para se avaliar a interferência dos produtos alternativos no micoparasitismo em lesões de pinta-preta do mamoeiro conduziu-se em telado (50%), experimento com delineamento em blocos casualizados, com três repetições. A parcela experimental consistiu de um vaso de 5 L com uma planta de mamoeiro, cultivar *Golden* com aproximadamente 180 dias de plantio, apresentando sintomas e sinais típicos da pinta-preta. Sendo o experimento repetido uma vez. Nos dois experimentos, utilizaram-se plantas sem presença de micoparasita, e com quantidade semelhante de severidade de pinta-preta (2,32% no primeiro e 2,37% no segundo experimento), obtidos por avaliação com escala diagramática adotada por Vivas et al. (2011).

Os isolados micoparasitas utilizados foram um isolado de *H. pulvinata* e três isolados de *Acremonium sp*, os quais foram cultivados em meio de arroz autoclavado, mantidos em BOD a $25 \pm 0,5$ °C durante 15 dias com fotoperíodo por 12 horas. Já os produtos utilizados foram aqueles classificados como compatíveis aos quatro fungos testados *in vitro* (Bion® e Matriz G®). Foram pulverizadas, com pulverizador manual, 20 mL de cada produto juntamente com 3×10^4 conídios/ml dos fungos micoparasitas. No tratamento controle pulverizou-se suspensão de 3×10^4 conídios/ml dos fungos suspensos em água destilada esterilizada. Como controle negativo, plantas de mamoeiro apresentando sintomas e sinais típicos da pinta-preta foram pulverizadas apenas com água. Estas pulverizações ocorreram a cada 15 dias por um período de dois meses.

Quantificou-se, semanalmente, durante dois meses, o número de folhas com sintomas de pinta-preta, bem como o número de folhas com sintomas de pinta-preta e sinais de micoparasita. De posse destas informações, obteve-se a incidência (%) de folhas com sintoma de pinta-preta micoparasitadas. Para tanto, calculou-se a razão do número de folhas com sintomas de pinta-preta micoparasitadas pelo número total de folhas com sintoma de pinta-preta, multiplicado por 100.

Além da incidência, também se avaliaram a severidade de pinta-preta em folha e a severidade de pinta-preta micoparasitadas. Sendo estas, estimadas visualmente na última folha completamente viável, com o auxílio de escala

diagramática adotada por Vivas et al. (2011), direcionada para pinta-preta, mas que, também, foi utilizada para estimar pinta-branca (micoparasitas). Posteriormente, estimou-se a porcentagem de pinta-preta micoparasitadas, pela razão da severidade de lesões micoparasitadas pela severidade de pinta-preta total, multiplicado por 100.

Os valores de incidência e severidade foram convertidos em área abaixo da curva de progresso de doença segundo Campbell e Madden (1990). Os resultados foram submetidos à análise de variância, considerando a análise de grupos de experimentos. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), e as análises efetuadas utilizando o programa Genes (Cruz, 2013).

3.3.5. Resultados e Discussão

3.3.5.1. Sensibilidade *in vitro* de *Acremonium* spp. e *H. pulvinata* a produtos com potencial de uso no controle alternativo de *A. caricae*

Na análise de variância conjunta, conduzida para cada isolado, observou-se significância da fonte de variação produtos para as três variáveis em estudo (crescimento micelial, esporulação e germinação de conídios), não sendo observado efeito significativo da interação produtos *versus* experimentos. Pelos resultados obtidos, observa-se que produtos atuam de forma diferenciada sobre o fungo, sendo os resultados obtidos semelhantes nos dois experimentos conduzidos.

Ao analisar as variáveis no meio de cultivo considerado controle (BDA), observaram-se diferenças nos valores de crescimento micelial, esporulação e germinação de conídios, tanto entre (*Acremonium* spp. e *H. pulvinata*) quanto dentro do gênero (*Acremonium* spp.). Assim, a esporulação foi abundante para o isolado A-602 ($6,92 \times 10^7$ conídios. mL⁻¹) se comparado aos demais isolados (Tabela 2). Isto é explicado pelo fato de se tratar de diferenças de gêneros, mas pode ocorrer até na mesma linhagem de fungos. A variabilidade genética natural entre isolados de uma mesma espécie de fungo é conhecida e relatada na literatura para diversos parâmetros biológicos, inclusive para a sensibilidade a produtos químicos sintéticos (Liu et al., 1993).

Tabela 2. Índice biológico e classificação dos indutores de resistência quanto à toxicidade de fungos micoparasitas *in vitro*.

Produtos Testados	Crescimento Micelial (Cm)	Esporulação (10 ⁴ Conídios/ml)	Germinação (%)	Índice Biológico (%)	Classificação Toxicológica
A-617					
Amistar [®]	0.95 d*	262.50 b	0.89 e	19	T
Controle	3.08 ab	2618.75 a	100.00 a	100	C
Agro-Mos [®]	1.37 d	23.08 c	82.44 cd	30	T
Hortifos [®]	2.13 c	64.06 bc	88.95 bc	43	MT
Bion [®]	2.82 b	2951.04 a	91.90 b	95	C
Matriz [®]	2.16 c	1851.56 a	77.15 d	71	C
Ecolife [®]	1.36 d	1731.51 a	0.97 e	49	MT
Vitaphol [®]	3.28 a	2243.75 a	95.75 ab	93	C
A-598					
Amistar [®]	1.92 bcd	1417.97 a	84.93 b	88	C
Controle	2.49 ab	1284.90 a	97.25 a	100	C
Agro-Mos [®]	0.96 f	129.17 c	87.75 b	32	T
Hortifos [®]	1.34 def	65.24 c	92.92 ab	37	T
Bion [®]	1.83 cde	1086.46 ab	91.09 ab	80	C
Matriz [®]	1.98 bc	764.06 ab	92.61 ab	72	C
Ecolife [®]	1.30 ef	262.27 bc	0.33 c	33	T
Vitaphol [®]	2.58 a	287.50 bc	93.99 ab	66	MT
A-602					
Amistar [®]	1.22 c	868.75 b	0.17 c	26	T
Controle	2.77 ab	6925.00 a	92.96 ab	100	C
Agro-Mos [®]	1.15 c	103.91 c	90.55 ab	30	T
Hortifos [®]	1.24 c	51.56 c	95.95 ab	31	T
Bion [®]	2.50 ab	8150.00 a	89.65 b	95	C
Matriz [®]	2.25 b	7198.96 a	96.34 a	91	C
Ecolife [®]	1.22 c	2026.56 ab	1.49 c	33	T
Vitaphol [®]	2.84 a	840.63 b	96.56 a	62	MT
H-611					
Amistar [®]	0.90 c	370.83 ab	4.55 c	53	MT
Controle	2.50 a	442.97 a	98.15 a	100	C
Agro-Mos [®]	2.06 ab	291.15 ab	79.89 b	75	C
Hortifos [®]	1.04 c	207.03 b	95.69 a	49	MT
Bion [®]	2.34 ab	414.06 a	94.27 a	94	C
Matriz [®]	2.43 a	583.59 a	95.07 a	98	C
Ecolife [®]	1.82 b	419.79 a	95.22 a	85	C
Vitaphol [®]	2.35 ab	476.56 a	91.55 a	97	C

Classificação toxicológica: C = Compatível; MT = Moderadamente Tóxico; e, T = Tóxico; *Para cada uma das variáveis, os meios de produtos seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A média das variáveis avaliadas nos isolados cultivados em placas contendo o fungicida Amistar 500WG[®], à base de azoxistrobina, apresentaram as menores magnitudes, tanto para crescimento micelial quanto para esporulação sobre os isolados A-617, A-602 e H-611 (Tabela 2), e o resultado atingiu o efeito esperado uma vez que Amistar 500WG[®] é um fungicida pertencente ao grupo das estrobilurinas. Estes compostos atuam impedindo a cadeia bioquímica de transferência de elétrons no sítio da mitocôndria, interferindo na respiração do patógeno (Ghini e Kimati, 2000), ocasionando a morte e tornando-se tóxico para fungos.

Como observado, o fungicida foi classificado como tóxico (A-617 e A-602) ou moderadamente tóxico (H-611). No entanto, este efeito não foi observado para o isolado A-598, para esse isolado, o fungicida Amistar 500WG[®] teve classificação toxicológica compatível (Tabela 2). Esse fato pode ser indicativo de resistência do fungo ao fungicida utilizado em lavouras de mamão para o controle de doenças fúngicas.

Outros dois produtos, Agro-Mos[®] e Ecolife[®], foram classificados como tóxico e, ou moderadamente tóxico para os isolados de *Acremonium* spp (A-617, A-598 e A-602) e compatível para o isolado H-611, de *H. pulvinata* (Tabela 2). Este resultado permite inferir que o fungo *H. pulvinata*, apresenta potencial para uso em conjunto com Agro-Mos[®] e Ecolife[®] no controle da pinta-preta do mamoeiro, uma vez que o isolado H-611 apresentou as maiores magnitudes de crescimento micelial (2,06 cm para Agro-Mos[®] e 1,82cm para Ecolife[®]) e esporulação ($291,15 \times 10^4$ conídios.mL⁻¹ para Agro-Mos[®] e $419,79 \times 10^4$ conídios.mL⁻¹ para Ecolife[®]) se comparado aos outros isolados (Tabela 2). Por outro lado, esses produtos não foram compatíveis com os isolados de *Acremonium* spp, portanto, o uso de Agro-Mos[®] e Ecolife[®] em conjunto com o controle biológico torna-se inviável.

O Agro-Mos[®] é um produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado, derivado da parede da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e de um biocomplexo de cobre e zinco que tem sido utilizado na proteção de plantas contra doenças (Costa et al., 2010). Há relatos do efeito tóxico desse produto a diferentes fungos (Baldrian, 2003; Costa et al., 2010). Baldrian (2003) reporta que o efeito tóxico de Ago-Mos[®] pode ser atribuído à presença do cobre na sua composição, o autor relata, ainda, que alguns metais como o cobre são essenciais para o metabolismo

dos fungos, no entanto, são tóxicos quando presentes em excesso. Contudo os níveis de toxicidade podem variar de acordo com a espécie de microrganismo, tal como observado com os isolados de *Acremonium* spp e *H. pulvinata* (Tabela 2).

Assim como Agro-Mos[®], o produto Ecolife[®] apresentou-se compatível apenas com o isolado de *H. pulvinata*. Para os demais fungos observou-se que os parâmetros que mais foram influenciados por este produto foram o crescimento micelial e a germinação dos conídios, por outro lado a esporulação não foi inibida (Tabela 2). Pelo ocorrido pode-se constatar que não existe uma relação direta entre o tamanho da colônia e a quantidade de conídios produzidos. Uma explicação para esse fato é que o produto Ecolife[®] provoca estresse na colônia de fungos sem, contudo, causar sua morte, estimulando a produção de esporos. Estes resultados sugerem que o produto Ecolife[®] apresenta na sua constituição compostos biologicamente ativos, com a capacidade de exercer ação sobre o fungo. Os ácidos orgânicos (ascórbico, cítricos e lácticos) e os bioflavonoides conferem ao Ecolife[®] uma ação antioxidante e, juntamente com os peptídeos, atuam como microbiostáticos, auxiliando no equilíbrio da flora microbiana (Motoyama et al., 2003). Alguns autores relataram em suas pesquisas a capacidade fungistática de Ecolife[®] *in vitro* (Cruz et al., 2011; Gomes et al., 2016). Há ainda relatos que a atividade microbiana é dose-dependente (Motoyama et al., 2003, Barquil et al., 2005).

O produto Hortifos[®] à base de fosfito de potássio foi o menos compatível com os isolados testados, com classificação toxicológica variando de tóxico (A-598 e A-602) à moderadamente tóxico (A-617 e H-611). Observou-se ainda que este produto reduziu a esporulação e o crescimento micelial (Tabela 2). O resultado aqui obtido permite inferir que este produto não deve ser utilizado em conjunto com os fungos micoparasistas. Apesar de fosfitos presentes no Hortifos PK[®] atuarem ativando o sistema de defesa da planta hospedeira, eles podem também atuar diretamente inibindo o desenvolvimento dos fungos (Blum et al., 2007). A ação antifúngica dos fosfitos foi relatada inúmeras vezes contra diferentes patógenos. (Blum, 2007; King et al., 2010).

O produto Vitaphol[®] foi classificado como compatível para os isolados A-617 e H-611, e, moderadamente tóxico para os isolados A-598 e A-602, atuando principalmente na esporulação destes isolados (Tabela 2). Este produto também é

à base de fosfito de potássio assim como Hortifos[®], seu efeito sobre o fungo é dependente da concentração e da espécie testada. Ao analisar a classificação toxicológica destes dois produtos observa-se que houve uma atenuação da toxicidade apresentada para Hortifos[®] se comparada a Vitaphol[®], estando condizente com o esperado uma vez que a concentração de fosfito é maior no produto Hortifos[®]. Observa-se que o isolado H-611 também mostrou-se compatível com Vitaphol[®], apresentando médias de crescimento micelial (2,35cm), esporulação ($4,76 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹) e porcentagem de germinação de conídios (91,55) estatisticamente igual a do BDA (Tabela 2), ratificando assim, o potencial do fungo *H. pulvinata* para uso em conjunto com diferentes produtos alternativos no controle da pinta-preta do mamoeiro.

Dos produtos testados, apenas Bion[®] e Matriz[®] foram compatíveis com todos os isolados micoparasitas pelo índice biológico (Tabela 2). Este fato indica a possibilidade de uso de mais de uma técnica de controle: uso de indutores de resistência e, ou fertilizante foliar, bem como o uso de controle biológico. Neste caso, temos os produtos Bion[®] e Matriz[®] atuando sobre a planta e os fungos micoparasitas atuando sobre o patógeno, no entanto, há necessidade de estudos *in vivo* visando confirmar esta compatibilidade. Neste particular, sabe-se que estudos *in vitro* têm a vantagem de expor ao máximo o microrganismo à ação do produto químico.

3.3.5.2. Efeito *in vivo* de produtos alternativos sobre a colonização de fungos micoparasitas em lesões de *A. caricae*

Nos testes conduzidos em telado, não foi observado efeito significativo da interação tratamento *versus* experimentos, o que permitiu analisar o experimento de forma conjunta. Observou-se ainda efeito da fonte de variação tratamento, sendo essa, portanto, desmembrada em fungo, produto e interação fungo *versus* produto. A análise dessas fontes de variações revelou efeito significativo da interação apenas para a incidência de folhas com lesões de pinta-preta micoparasitadas. Desta forma, para a incidência de folhas com lesões de pinta-preta micoparasitadas, procedeu-se o desdobramento das somas de quadrados da interação e dos seus efeitos, para estudar o efeito de isolado dentro de fungo e

o efeito de fungo dentro de cada isolado. Para severidade de pinta-preta com sinais de micoparasitismo, analisou-se o efeito de fungo, com base na média de produtos, bem como o efeito de produtos com base na média dos fungos.

Observou-se que é possível a aplicação dos isolados em conjunto com os produtos testados, tendo o isolado H-611 as maiores médias da incidência de folhas com lesões de pinta-preta micoparasitadas (Figura 1 A). Este isolado também se destacou quando analisamos a severidade de lesões de pinta-preta micoparasitadas, apresentando o maior valor de severidade (Figura 2 A).

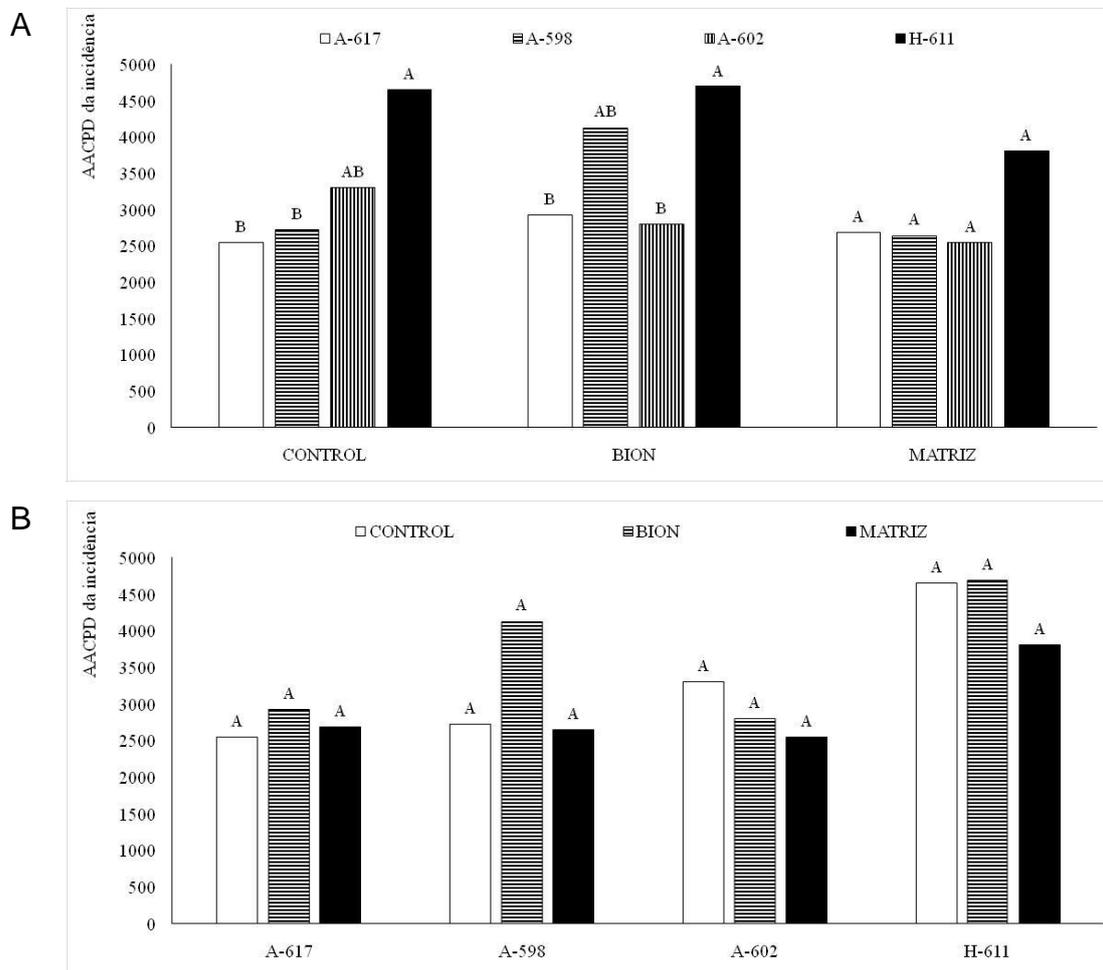


Figura 1. Médias de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da incidência de folhas com sintoma de pinta-preta micoparasitadas por isolados de *Acremonium spp* (A-617, A-598 e A-602) e *Hansfordia pulvinata* (H-611), aplicados juntamente com produtos alternativos Bion® e Matriz® a cada 15 dias e avaliados semanalmente durante dois meses: A) estimada para isolados dentro de cada produto; e, B) estimadas para produtos dentro de cada isolado. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados aqui obtidos permitem apontar o fungo *H. pulvinata* (isolado H-611) como o mais promissor, podendo ser utilizado em conjunto com diferentes produtos alternativos, pois apresentou a classificação toxicológica compatível para a maioria dos produtos alternativos com exceção do produto Hortifos® (Tabela 2), além de apresentar as maiores médias de colonização de lesões de pinta-preta. Outra opção para uso em conjunto com os produtos testados seria o isolado A-598, que apresentou as médias iguais a H-611, tanto para incidência quanto para severidade, nos produtos Bion® e Matriz® (Figuras 1A e 2A).

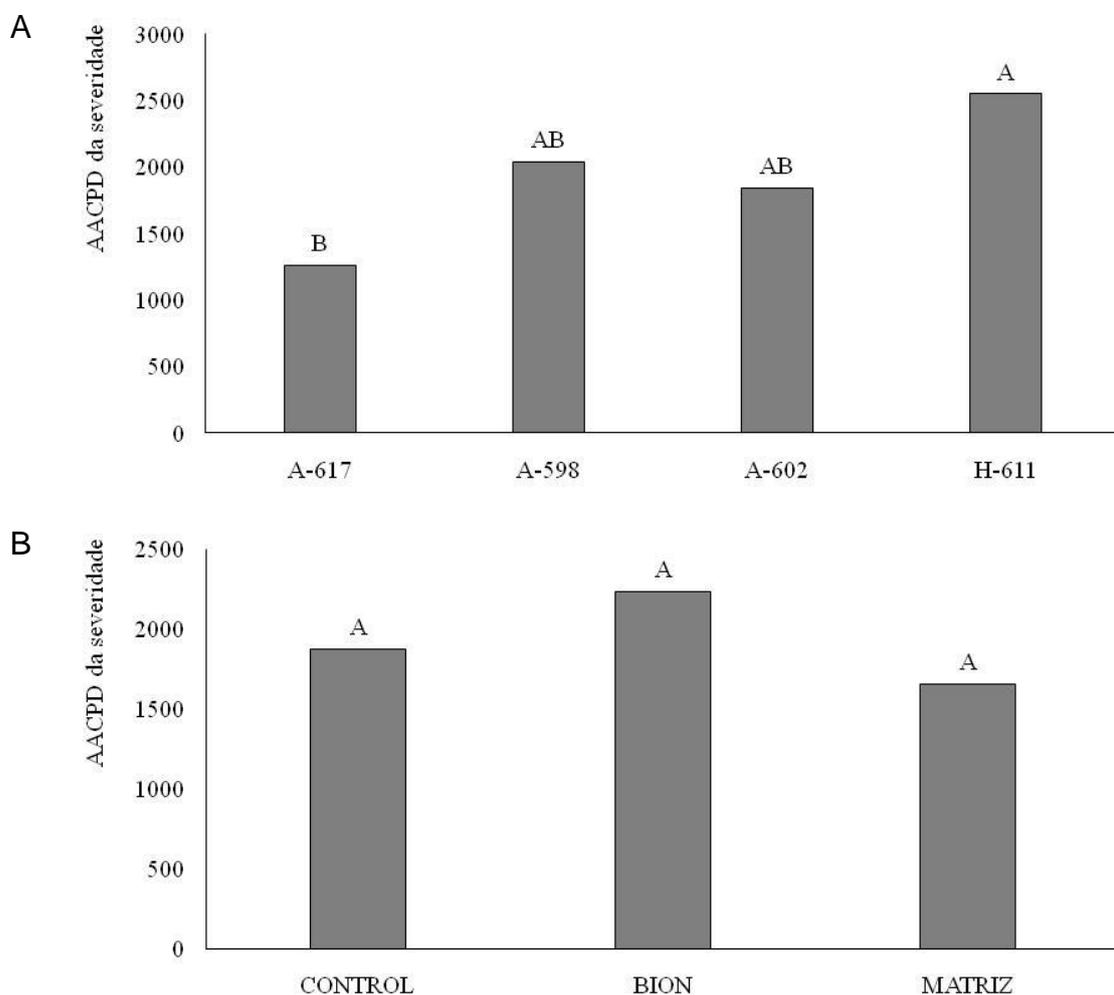


Figura 2. Médias de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da severidade de lesões de pinta-preta micoparasitadas por isolados de *Acremonium spp* (A-617, A-598 e A-602) e *Hansfordia pulvinata* (H-611) aplicados juntamente com produtos alternativos Bion® e Matriz® a cada 15 dias e avaliados semanalmente durante dois meses: A) estimada para isolados com base na média dos produtos e, B) estimadas para produtos com base na média dos isolados. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Observou-se, também, que as aplicações dos produtos não reduziram a média da incidência de folhas com lesões de pinta-preta micoparasitadas pelos diferentes isolados (Figura 1 B). Pela análise das médias dos produtos dentro dos isolados, observa-se que apenas dentro do isolado A-598 houve diferença significativa de produto, sendo o Bion[®] o que apresentou a maior média (Figura 1B). Nos testes de médias dos produtos para severidade de pinta-preta com sinais de micoparasitismo não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, embora os fungos aplicados em conjunto com o produto Bion[®] tenham apresentado as maiores médias, estas não foram estatisticamente diferentes (Figura 2 A, B). Os resultados obtidos no presente estudo confirmam os resultados obtidos nos testes *in vitro*, apontando a compatibilidade de uso dos produtos, Matriz[®] e Bion[®] em conjunto com os fungos micoparasitas.

O produto Matriz[®] é um fertilizante organomineral, que além de melhorar o estado nutricional das plantas, os nutrientes podem funcionar como cofatores de enzimas que participam do metabolismo de defesa das plantas. Pratissoli et al. (2007), testando produto similar ao Matriz[®], também considerado fertilizante organomineral, observaram que este reduziu a incidência e a severidade da pinta-preta do mamoeiro. Além de ser um produto que pode induzir o mecanismo de defesa na planta, este produto também não interferiu nos parâmetros biológicos dos isolados micoparasitas (Tabela 2). Talvez por conter em sua fórmula os mesmos elementos essenciais aos processos vitais de fungos e estar nas concentrações favoráveis, não teve influência sobre o índice biológico dos isolados testados. O produto Bion[®], à base de acibenzolar-S-methyl, tem sido citado como eficiente indutor de resistência, protegendo-as sistemicamente contra uma larga gama de doenças causadas por fungos e bactérias. Alguns autores testaram o efeito de Bion[®] sobre crescimento e esporulação de diferentes fungos e concluíram que não houve qualquer alteração na germinação e no desenvolvimento micelial (Galdeano et al., 2010, Bertocelli et al., 2015).

Por outro lado, experimentos realizados *in vitro* demonstraram que o Bion[®] e seus metabólitos, em altas concentrações afetaram significativamente o desenvolvimento dos fungos (Soares 2008). No entanto, a dosagem utilizada neste experimento não foi suficiente para interferir nos parâmetros biológicos do fungo *in vitro* tornando-se, assim, compatível com o produto. Além disso, a dose

utilizada também se mostrou eficiente para reduzir a intensidade de pinta-preta em mamoeiro (Santos et al., 2017). Desta forma, espera-se que este produto possa ser utilizado em conjunto com os micoparasitas testados, uma vez que não interferiu nos parâmetros biológicos *in vitro* (Tabela 2), bem como na sua colonização de lesões de pinta-preta em folhas de mamoeiro, como observado em telado (Figura1 e 2).

3.3.6. Conclusão

O fungo *H. pulvinata* H-611 foi o isolado que se destacou por ser compatível com a maioria dos produtos utilizados e o que mais colonizou lesões de pinta-preta, quando inoculado com Bion[®] e Matriz[®].

O produto Bion[®] e Matriz[®] podem ser utilizados juntamente com *Acremonium* sp e *H. pulvinata* no controle da pinta-preta do mamoeiro, pois estes produtos não tiveram efeito tóxico sobre os fungos micoparasitas.

3.3.7. Referências

- Baldrian, P. (2003) Interactions of heavy metals with white-hot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 78-91.
- Barguil, B.M.; Resende, M.L.V.; Resende, R.S.; Beserra Jr, J.E.A.; Salgado, S.L. (2005) Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricensis* of coffee plant. *Fitopatologia Brasileira*, 30: 535-537.
- Barreto, L.F.; Savan, P.A.L.; Lima, L.L.; Lodo, B.N. (2011) Avaliação de fungicidas no controle de *Asperisporium caricae* na cultura do mamoeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33: 399-403.
- Bergamin filho, A. (2008) Controle químico versus sustentabilidade na agricultura: o exemplo do huanglongbing dos citros. In: Zambolim, L.; Picanço, M. C.; Silva, A. A.; Ferreira, L. R.; Ferreira, F. A.; Jesus Junior, W. C. *Produtos*

fitossanitários (fungicidas, inseticidas, acaricidas e herbicidas). Viçosa, MG: UFV/ DFP, 1-26.

- Bertoncelli, D.J.; Mazaro, S.M.; Rocha, R.C.D.S.; Possenti, J.C.; Júnior A.W. (2015) Acibenzolar-S-metil na indução de resistência de tomateiro e controle de *Rhizoctonia solani* kuhn in vitro. *Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science*, 8: 43-50.
- Blum, L.E.B.; Amarante, C.V.T.; Dezanet, A.; Lima, E.B.; Neto, P.H.; Ávila, R.D.; Siega, V. (2007) Fosfitos aplicados em pós-colheita reduzem o mofo-azul em maçãs 'Fuji' e 'Gala'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29: 265-268.
- Campbell, C.L.; Madden, L.V. (1990) *Introduction to plant disease epidemiology*. New York NY. John Wiley & Sons.
- Costa, J.C.B.; Resende, M.L.V.; Júnior, P.M.R.; Camilo, F.R.; Monteiro, A.C.A.; Pereira, R.B. (2010) Indução de resistência em mudas de cacaueteiro contra *Moniliophthora perniciosa* por produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado. *Tropical Plant Pathology*, 35: 285-294.
- Cruz, S.M.C.; Rodrigues, A.A.C.; Coelho, R.S.B.; Sardinha, D. (2011) Ação indutora de produtos abióticos na resistência de tomateiro e efeito sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Idesia*, 29: 111-118.
- Cruz, C.D. (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*, 35: 271-276.
- Galdeano, D.M.; Guzzo, S.D.; Patricio, F.R.A.; Harakava, R. (2010) Proteção do cafeeiro contra cercosporiose por acibenzolar-S-metil e proteína harpina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45: 686-692.
- Ghini, R.; Kimati, H. (2000) Resistência de fungos a fungicidas. 1ª edição. Jaguariúna: *Embrapa Meio Ambiente*, 78p.
- Gomes, R.S.S.; Demartelaere, A.C.F.; Nascimento, L.C.; Maciel, W.O.; Wanderley, D.B.N.S. (2016) Bioatividade de indutores de resistência no manejo da antracnose da goiabeira (*Psidium guajava* L.) *Summa Phytopathologica*, 42: 149-154.

- King, M.; Reeve, W.; Van Der Hoek, M.B.; Williams, N.; McComb, J.; O'Brien, P.A.; Hardy, G.E.S.J. (2010) Defining the phophte- regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Genetics & Genomics*, 284: 425-435.
- Liu, Z.Y.; Milner, R.J.; Mcrae, C.F.; Lutton, G.G. (1993) The use of dodine in selective media for the isolation of *Metarhizium* spp. from soil. *Journal Invertebrate Pathology*, 62: 248-251.
- Martelleto, L.A.P.; RIBEIRO, R.L.D.; Carmo, M.G.F.do; Sudo-Martelleto, M.; Goes, A. de. (2009) Incidência da varíola, causada por *Asperisporium caricae*, em folhas de mamoeiros submetidos ao manejo orgânico em diferentes ambientes de cultivo. *Summa phytopathologica*, 35: 288-292.
- Motoyama, M.M.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Fiori-Tutida, A.C.G.; Scapim, C.A. (2003) Indução de fitoalexinas em soja e em sorgo e efeito fungitóxico de extratos cítricos sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 25: 491-496.
- Nojosa, G.B.A.; Resende, M.L.V.; Barguil, B.M.; Moraes, S.; Ra. G.I.; Boas, C.H.V. (2009) Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de Phoma. *Summa phytopathologica*, 35: 60-62.
- Oliveira, A.A.R.; Nishijima, W. (2014) Induction of Resistance to Papaya Black Spot Elicited by Acibenzolar-S-Methyl. *Plant Pathology Journal*, 13: 120-124.
- Pratissoli, D.; Almeida, G.D.de; Júnior, W.C.J.; Vicentini, V.B.; Holtz, A.M.; Cochetto, J.r G. (2007) *Fertilizante organomineral e argila silicatada como indutores de resistência à varíola do mamoeiro*. *Idesia*, 25: 63-67.
- Rossi-zalaf, L.S.; Alves. S.B.; Lopes, R.B.; Silveira neto, S.; Tanzini, M.R. (2008) Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Ed.). *Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios*. Piracicaba: FEALQ, p.270-302.
- Santos, M.C. dos; Barreto, M. (2003) Estudos epidemiológicos da varíola do mamoeiro em cultivares submetidas a tratamentos com fungicidas. *Summa Phytopathologica*, 29: 141-146.

- Santos, P.H.D.; Silveira, S.F.; Vivas, M.; Carvalho, B.M.; Pereira, M.G. (2017) Alternative control to black spot disease in papaya genotypes. *Summa Phytopathologica*, 43: 60-62.
- Soares, A.C.F.; Perez, J.O.; Sousa, C.S.; Garrido M. da S., Almeida, N.S. (2008) Eficiência do Acibenzolar-s-metil na Proteção de Plantas de Inhame à *Curvularia eragrostides*. *Revista Caatinga*, 21: 147-151.
- Suzuki, M.S.; Zambolim, L.; Liberato, J. R. (2007) Progresso de doenças fúngicas e correlação com variáveis climáticas em mamoeiro. *Summa Phytopathologica*, 33: 167-177.
- Ventura, J.A.; Rezende, J.A.M. (2016) Doenças do mamoeiro. In: Amorim, L., Rezende, J. A. M., Bergamim Filho, A., Camargo, L. F. A. Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas. 5ª. Edição. *Agronômica Ceres*, 497-510.
- Vivas, M.; Silveira, S.F.; Terra, C.E.P.S.; Pereira, M.G. (2011) Testers for combining ability and selection of papaya hybrids resistant to fungal diseases. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11: 36-42.
- Vivas, J.M.S.; Vivas, M.; Silveira, S.F. (2015) Efeito da temperatura sobre o crescimento e esporulação in vitro de fungos hiperparasitas de *Asperisporium caricae*. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 45: 73-81.
- Vivas, J.M.S.; Silveira, S.F.; Santos, P.H.D.; Pinho, D.B.; Pereira, O.L. (2017) Seleção de fungos com potencial para biocontrole da pinta-preta do mamoeiro. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 47: 369-376.

3.4. PROGRESSO DA PINTA-PRETA E FUNGOS MICOPARASITAS EM GENÓTIPOS DE MAMOEIRO SOB CONDIÇÕES NATURAIS DE INOCULAÇÃO

3.4.1. Resumo

O biocontrole da pinta-preta do mamoeiro mediante aplicação de fungos micoparasitas poderá contribuir para o manejo da doença em sistemas de produção alternativos, minimizando o emprego do controle químico. Com o objetivo de embasar e orientar o biocontrole avaliou-se, ao longo de um ano, a ocorrência natural da pinta-preta do mamoeiro e de fungos micoparasitas de *Asperisporium caricae*, em três genótipos de mamoeiro, que diferem quanto à resistência à doença. A área experimental, localizada em área rural de Mimoso do Sul-ES, constituiu do cultivo de três genótipos de mamoeiro ('Golden', 'Maradol' e 'Sekati'), em delineamento em blocos casualizados, com 10 repetições de 1 planta/parcela. Avaliou-se, mensalmente, a incidência e a severidade da doença e a incidência dos fungos micoparasitas em lesões nas folhas e a proporção de lesões com sinais (conídios) de fungos micoparasitas, na folha intermediária e na última folha verde. A frequência dos gêneros dos fungos micoparasitas foi monitorada pela confecção de lâminas e exame ao microscópio de luz, sendo a amostra não-destrutiva obtida com fita adesiva transparente a partir de lesões colonizadas. A doença foi mais incidente e severa, bem como o micoparasitismo foi mais intenso nos meses de temperaturas baixas (mais frios), de junho a agosto, e no segundo semestre do ano, coincidindo com as épocas mais úmidas e de maiores índices pluviométricos, independente do genótipo hospedeiro. Os

fungos micoparasitas predominantes foram *Hansfordia pulvinata*, e *Acremonium* sp, no entanto, *H. pulvinata* foi mais frequente em épocas mais frias, e *Acremonium* sp em épocas mais quentes.

3.4.2. Abstract

The biocontrol of papaya black-spot by application of mycoparasite fungi may contribute to the management of the disease in alternative production systems, minimizing the use of chemical control. In order to base and guide the biocontrol, the natural occurrence of the papaya black-spott and the mycoparasite fungi of *Asperisporium caricae* were evaluated in three papaya genotypes, which differ in their resistance to the disease. The experimental area, located in the rural area of Mimoso do Sul - ES, constituted the cultivation of three papaya genotypes ('Golden', 'Maradol' and 'Sekati'), in a randomized block design, with 10 replications of 1 plant / plot. The incidence and severity of the disease and the incidence of mycoparasite fungi on leaf lesions and the proportion of lesions with mycoparasite fungi (conidium) on the intermediate leaf and the last green leaf were evaluated monthly. The frequency of the genera of the mycoparasite fungi was monitored by the preparation of slides and examination under the light microscope, the non-destructive sample being obtained with transparent adhesive tape from colonized lesions. The disease was more severe and, the mycoparasitism was more intense in the months of colder temperatures, from June to August, and in the second half of the year, coinciding with the wetter seasons and higher rainfall frequencies, independent of the host genotype. The predominant mycoparasite fungi were *Hansfordia pulvinata*, and *Acremonium* sp; however, *H. pulvinata* were more frequent in colder seasons, and *Acremonium* sp in warmer ones.

3.4.3. Introdução

A pinta-preta causada pelo fungo *Asperisporium caricae* (Speg.) Maubl. é uma das principais doenças foliares do mamoeiro, apresentando significativa importância econômica, por afetar o desenvolvimento da planta. Inicialmente atacam as folhas causando lesões arredondadas de coloração escura que diminui a área fotossintética. Das folhas, estas lesões atingem o fruto, causando o endurecimento da casca. Embora os sintomas sejam superficiais, as lesões os tornam inadequados à comercialização (Ventura e Rezende, 2016). Embora a doença ocorra com intensidades diferentes a depender dos genótipos em que incide (Vivas et al., 2015a), ainda não há cultivar comercial ou genótipo de *C. papaya* que seja imune à doença.

Em lavouras convencionais, o controle da pinta-preta do mamoeiro exige pulverizações frequentes de fungicidas. O controle biológico, quando bem planejado, é considerado um método promissor para minimizar o uso de fungicidas em culturas agrícolas. Em mamoeiro, o biocontrole da pinta-preta é uma possibilidade em estudo, considerando a ocorrência natural de fungos micoparasitas *Acremonium* spp. Link e *Hansfordia pulvinata* (Berk. & M.A. Curtis) S. Hughes, potenciais antagonistas de *Asperisporium caricae* (Vivas et al., 2015b).

O controle biológico de doenças de plantas pode ser definido como “a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, através de um ou mais organismos (Cook e Baker, 1983). No contexto do controle biológico, a doença resulta de uma interação entre hospedeiro, patógeno e os demais organismos (não-patógenos) que habitam o sítio de infecção e que apresentam potencial para limitar a atividade do patógeno ou aumentar a resistência do hospedeiro (Cooke e Beker, 1983), sob a influência do ambiente (Bettioli e Morandi, 2009). No controle biológico clássico, o manejo da cultura deve priorizar e favorecer a ocorrência natural dos inimigos ou organismos antagônicos e, da mesma forma, o ambiente deve ser manejado de modo a favorecer a ação destes. Já a aplicação artificial de inimigos naturais (biocontrole convencional ou aplicação massal), requer estudos prévios, pois estes podem não ser efetivos se aplicados em épocas ou sob condições desfavoráveis ao seu estabelecimento na lavoura. Há necessidade de amplo conhecimento da ecologia dos sistemas

agrícolas para se implementar com sucesso o biocontrole de doenças de plantas (Morandi et al., 2009). A obtenção de informações biológicas, epidemiológicas, ecológicas do patógeno e de seus respectivos organismos antagônicos, da influência das condições climáticas e épocas do ano mais propícias à aplicação dos inimigos naturais são imprescindíveis para o sucesso do biocontrole de doenças de plantas (Morandi, Bettiol e Paula Júnior, 2014). Tais informações são inexistentes para fungos micoparasitas de *Asperisporium caricae* e para o biocontrole da pinta-preta, na cultura do mamoeiro.

Assim o objetivo deste trabalho foi estudar o progresso da pinta-preta e a ocorrência natural de fungos micoparasitas de *Asperisporium caricae* em condições de campo, em três genótipos de mamoeiro, que diferem quanto à resistência à pinta-preta. Ainda, quantificar a frequência dos principais fungos micoparasitas encontrados em lesões de pinta-preta, no campo, sob condições naturais de inoculação.

3.4.4. Material e Método

3.4.4.1. Localização e delineamento experimental

A área experimental foi localizada em região rural do município de Mimoso do Sul, estado de Espírito Santo (Latitude 20°54'04.6"S, Longitude 41°31'48.4"W). Adotou-se o delineamento em blocos casualizados com dez repetições e três genótipos de mamoeiro que diferem quanto à resistência à pinta-preta: cv *Golden* (mais suscetível), 'Maradol' e 'Sekati', com níveis intermediários de resistência parcial (Vivas et al., 2015a). A unidade experimental foi constituída de uma planta por parcela e o plantio foi em fileira simples no espaçamento 2 x 1,5 m. Os demais tratamentos culturais foram conduzidos de acordo com Marin et al. (1995). Considerando o objetivo do trabalho, não foram efetuadas pulverizações com fungicidas em toda área experimental. O transplantio foi efetuado em agosto de 2016 e as avaliações de doença e de micoparasitismo foram iniciadas três meses após.

3.4.4.2. Avaliação da intensidade da doença e do micoparasita

As avaliações foram realizadas mensalmente, durante um ano desde o início do aparecimento dos sintomas da doença. Avaliou-se visualmente a severidade da pinta-preta, a severidade da pinta-preta considerando apenas as lesões colonizadas por micoparasitas, a incidência de folhas com lesões de pinta-preta e a incidência de folhas com lesões colonizadas por fungos micoparasitas. Também foram conduzidos estudos da freqüência dos fungos micoparasitas de *Asperisporium caricae* em lesões de pinta-preta.

Assim, foi quantificado o número de folhas com pinta-preta, bem como o número de folhas com lesões colonizadas por micoparasitas. De posse destas informações obteve-se a incidência (%) de folhas com sinais de pinta-preta e de folhas com lesões com micoparasitas. Para a incidência de folhas com pinta-preta calculou-se a razão do número de folhas com sinais da doença pelo número de folhas totais. Para a incidência de folhas com pinta-preta micoparasitadas, calculou-se a razão do número de folhas com sinais de pinta-preta micoparasitada pelo número total de folhas com sinais de pinta-preta. As estimativas de incidência foram convertidas em porcentagem, multiplicando os valores obtidos por 100.

A severidade de pinta-preta em folhas (SPPT) e a severidade de pinta-preta com micoparasitas (SPPE) foram estimadas visualmente na última folha verde e em folha intermediária, correspondente àquela anexa à primeira flor recém-aberta. As estimativas de severidade foram visuais e com auxílio de escala diagramática adotada por Vivas et al. (2011). Com as estimativas de SSPT e SSPE, estimou-se para cada folha a proporção de pinta-preta micoparasitadas, pela razão: $[(SPPT - SPPE)/SPPT] \times 100$.

3.4.4.3. Variação populacional e estudo da freqüência de fungos micoparasitas de *A. caricae* no campo

Avaliou-se, a freqüência dos fungos micoparasitas de *A. caricae*, pela amostragem de lesões de pinta-preta com sinais de micoparasita, distribuídas na última folha e na folha intermediária do mamoeiro. Foram conduzidas avaliações mensais, acompanhando-se as avaliações de intensidade de doença e

micoparasita. Foram amostradas 20 lesões por planta, sendo 10 lesões em folha intermediária e 10 lesões na última folha, por amostragem não-destrutiva. As amostras foram obtidas pelo contato e pressão das lesões com fita adesiva transparente. As seções de fita adesiva contendo esporos aderidos foram vertidas em ácido láctico em lâminas de microscopia e examinadas ao microscópio de luz quanto à presença de estruturas reprodutivas (conidióforos e conídios).

Como referência para a identificação morfológica dos gêneros de micoparasitas encontrados, utilizou-se a referência *The Hyphomycetes* (Seifert et al., 2011). Calculou-se, ao final, a frequência de cada gênero fúngico encontrado nas lesões de pinta-preta em função da época de coleta das amostras, para posterior plotagem gráfica.

3.4.4.4. Monitoramento das condições climáticas no período experimental

Sabendo-se que o ambiente influencia as interações entre o hospedeiro, o patógeno e os agentes de controle biológico, foram monitoradas as condições climáticas nos meses deste estudo, sendo estas informações imprescindíveis para explicar a ocorrência das doenças e dos fungos micoparasitismo ao longo do tempo no campo. Para isso, durante a condução do experimento com registradores automatizados tipo *Data Logger*. (*Watch-Dog*, Modelo 450, Sprectrum®), obteve-se a umidade relativa do ar, bem como a temperatura máxima e mínima, os registros dos dados ocorreram com intervalos de uma hora. Obteve-se, ainda, a pluviosidade da região durante a condução do experimento. A pluviosidade na região foi obtida através de consultas ao CEMADEN - Centro Nacional de Monitoramento e Alertas de Desastres Naturais. Estação: Café (320020107A) localizada no município: Alegre/ES, a 5,6 km do experimento.

3.4.4.5. Análises Estatísticas

Efetuuou-se análise de variância dos dados de intensidade de doença, considerando-se, além das fontes de variação genótipos, também, a época de avaliação como fonte de avaliação.

Desta adotou-se o delineamento em parcela subdividida (Banzatto e Kronka, 2015), quando constatado efeito significativo para a interação genótipo (G) e época de avaliação (E). Conduziu-se o desdobramento da interação G x E, para estudar o efeito de época de avaliação dentro de cada genótipo em estudo. Conduziu-se, ainda, teste de comparação de médias das épocas de avaliação pelo teste de Tukey (0,05), visando caracterizar as épocas de maior e menor intensidade de doença e do micoparasita. Todas as análises descritas acima foram conduzidas com o uso do programa Genes (Cruz, 2013).

Visando caracterizar as condições climáticas durante o estudo, com os dados registrados de umidade relativa, temperatura e pluviosidade, geraram-se gráficos Boxplot (Bussab e Morettin, 2017), utilizando-se o programa R.

3.4.5. Resultados e Discussão

O ano experimental foi caracterizado como seco, em termos de precipitação e de temperaturas amenas a frias. A umidade relativa do ar apresentou valores máximos próximos a 100 % em todos os meses em que foram conduzidos os estudos (Figura 1A). Os menores valores da mediana foram observados nos meses de agosto de 2016, janeiro e fevereiro de 2017, sendo atingidos valores mínimos próximos a 22% de umidade relativa do ar no mês de agosto, caracterizando como mes mais seco. Os valores de precipitação acompanharam o observado para umidade relativa do ar, sendo o mês de agosto o mais seco, nos meses seguintes, a quantidade de chuva foi aumentando gradativamente até dezembro de 2016, onde foi registrado o maior volume de precipitação (270 mm). Nos meses seguintes, observou-se redução no volume de chuva, sendo observado outro pico (110 mm) no mês de maio de 2017 (Figura 1 C). Já a temperatura, de modo geral, variou de 8 a 33°C, sendo os meses de maio a agosto os mais frios e os meses de novembro a março, os mais quentes (Figura 1 B).

Para todas as variáveis de intensidade de doença e de micoparasita, na análise de variância, observou-se efeito significativo para interação genótipo (G) versus época de avaliação (E), indicando efeito de genótipo em relação à doença ao longo das avaliações. Evidenciou-se, assim, influência do ambiente e da época

do ano sobre a epidemia de pinta-preta e sobre a ocorrência de fungos micoparasitas de *A. caricae*. Conduziu-se, então, o desdobramento da interação G x E, para estudar o efeito de época de avaliação dentro de cada genótipo em estudo.

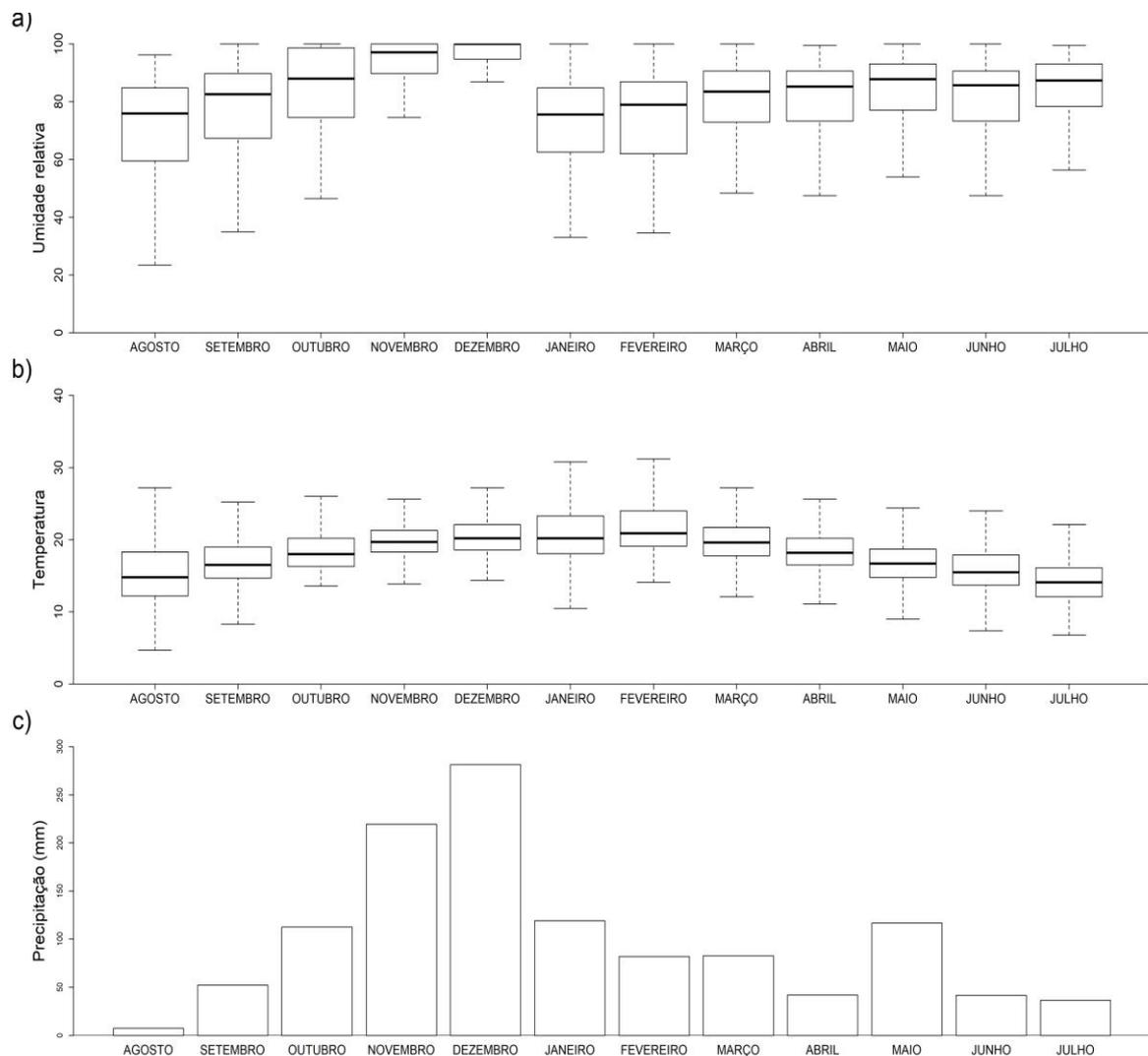


Figura 01. Dados meteorológicos da área experimental, localizada em Mimoso do Sul-ES, de agosto de 2016 a julho de 2017. a) Umidade Relativa do Ar; b) Temperatura; c) Precipitação.

Observou-se que a pinta-preta incidiu sobre os três genótipos durante todo o ano, variando de 50 a 90 % de incidência de folhas (Figura 2). Nos meses mais quentes do ano ocorrem as menores porcentagens de incidência da doença, sendo tal padrão de distribuição semelhante para os três genótipos em estudo: 'Golden', 'Maradol' e 'Sekati', embora esses genótipos tenham diferentes padrões de resistência à pinta-preta (Vivas et al., 2012, 2015a). Todavia, segundo Vivas et al. (2012), a incidência da doença em folhas de mamoeiro não é a melhor variável discriminante quanto à resistência à pinta-preta.

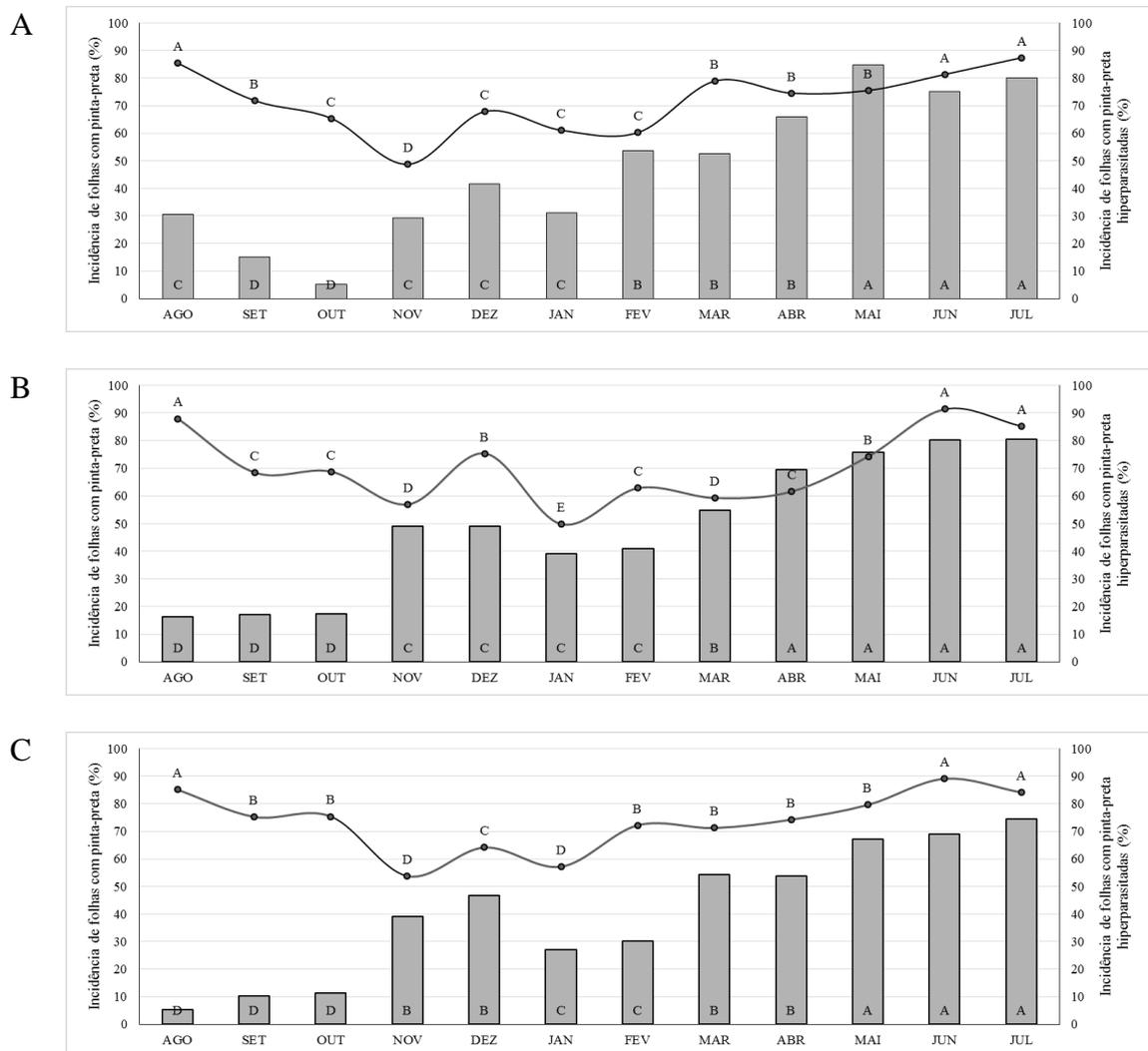


Figura 2. Incidência mensal de pinta-preta do mamoeiro em folhas (linha) e de micoparasitismo em folhas (barras) em três genótipos de mamoeiro, *Golden* (A), *Maradol* (B) e *Sekati* (C), em área experimental na região de Mimoso do Sul- ES, no período de agosto de 2016 a julho de 2017.

Ao analisar a incidência de folhas com pinta-preta micoparasitadas, observou-se padrão similar entre os três genótipos (Figura 2), sendo que entre agosto e outubro, a incidência de micoparasitas em folhas apresentou menores magnitudes estatisticamente diferentes dos outros meses. Este período foi caracterizado neste estudo como de epidemia inicial, tanto da doença quanto dos fungos micoparasitas. Assim, com o avanço da epidemia, observa-se um aumento gradual da incidência de folhas com lesões de pinta-preta micoparasitadas, embora, ocorreram flutuações em função de variações climáticas. Como exemplo, observa-se no mês de dezembro um aumento na intensidade (severidade e incidência) tanto da doença quanto de micoparasita (Figura 2), que foi concomitante ao aumento na precipitação e da umidade relativa do ar, com valores próximos a 100% de UR (Figura 1).

As maiores incidências de pinta-preta e de micoparasitas em folhas ocorreram nos meses mais frios, ou seja, de maio a julho. Neste período, a incidência da doença em folhas foi de até 90% nos três genótipos. Ao mesmo tempo, até 80% das folhas apresentavam igualmente sinais de colonização por fungos hiperparasitas, principalmente nos genótipos '*Golden*' e '*Maradol*' (Figura 2).

Variações análogas à incidência ocorreram para a severidade da pinta-preta e para a severidade da pinta-preta micoparasitada (Figura 3). Maiores magnitudes de severidade da doença e de lesões micoparasitadas ocorreram nos meses mais frios, indicando que, tanto o patógeno quanto o micoparasita tem uma preferência por temperaturas amenas. Logo as condições ambientais que favorecem a doença são as mesmas condições que favorecem o fungo micoparasita. É de se supor que esta interação sincronizada entre ambiente, patógeno e micoparasitas é essencial para que um antagonista seja eficaz no uso de controle biológico (Bettiol e Morandi, 2009).

A maior ocorrência da pinta-preta nas épocas de temperaturas amenas a frias diverge parcialmente dos resultados de Suzuki et al. (2007), que ao avaliarem a pinta-preta no Norte do Espírito Santo, concluíram que as condições favoráveis ao desenvolvimento de epidemias foram temperaturas variando de 25 a 30° C. Os mesmos autores afirmaram que o pico de intensidade da pinta-preta ocorreu nos meses mais quentes do ano, ou seja, entre novembro e março. Por outro lado, condizente a este estudo, Suzuki et al. (2007) afirmaram que a

umidade relativa do ar variando de 80 % a 100 % são favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, no presente estudo, no mês de dezembro (Figura 2 e 3), ocasião em que houve maior período de umidade relativa do ar (Figura 1 A), foram picos na intensidade de pinta-preta.

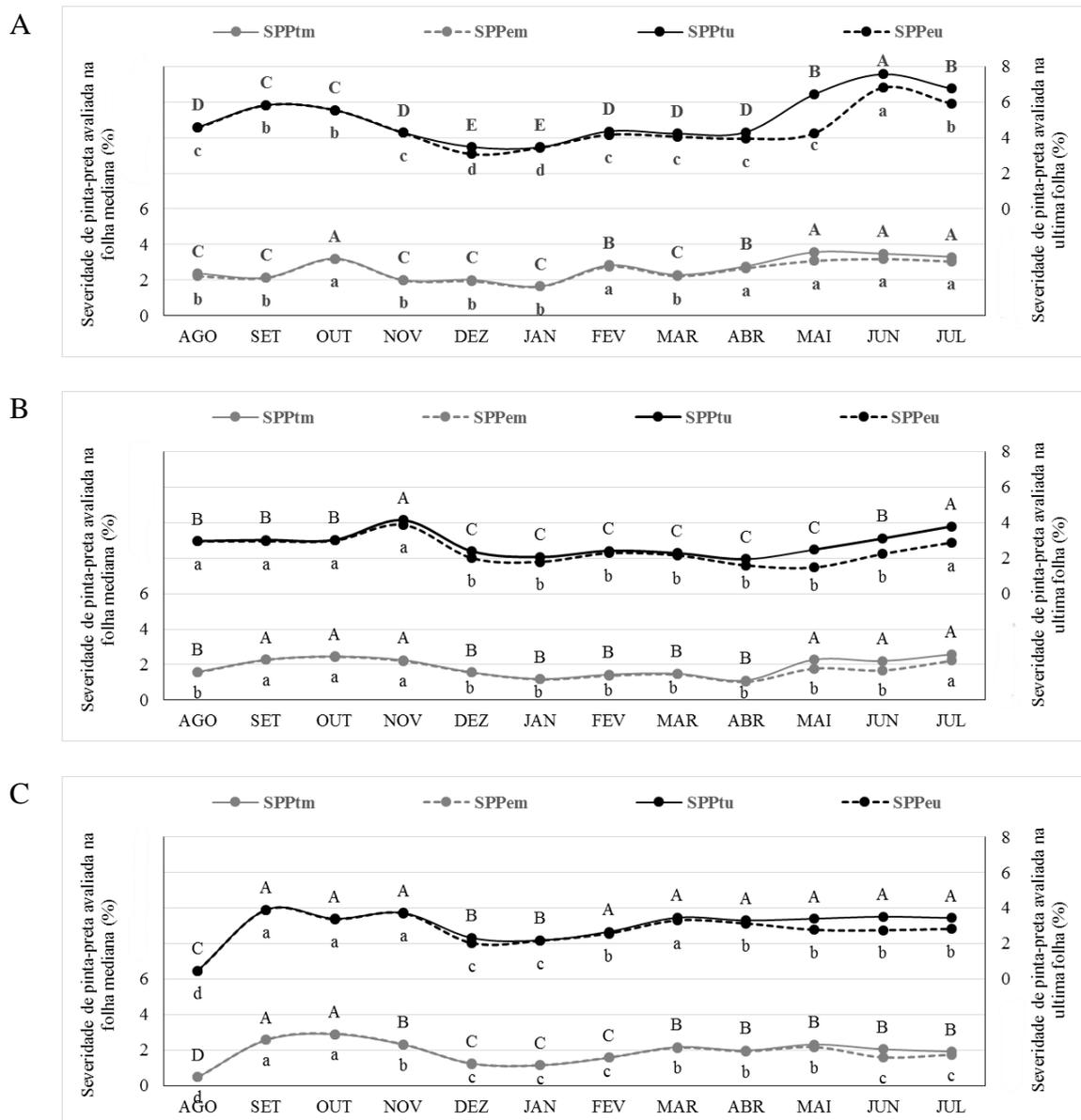


Figura 3. Severidade de pinta-preta com e sem micoparasita (linha contínua) e severidade de pinta-preta sem micoparasita (linha tracejada), estimados na folha mediana (linha cinza) e na última folha (linha preta) mensalmente (12 meses) nos genótipos: *Golden* (A), *Maradol* (B) e *Sekati* (C), em área experimental na região de Mimoso do Sul- ES, no período de agosto de 2016 a julho de 2017.

Neste trabalho, no mês de dezembro houve maior pluviosidade (Figura 1 C) tal fato também pode explicar o pico na intensidade da pinta-preta observada neste período. Outros trabalhos concluíram que a doença tem preferência por regiões com alta umidade relativa e em períodos chuvosos, afirmando que os sintomas da pinta-preta tendem a se intensificar e a doença torna-se mais severa nos períodos úmidos e chuvosos (Adikaram e Wijepala, 1995, Martelleto et al., 2009). Este fato também foi observado neste trabalho, apesar da doença ter sido favorecida por temperaturas baixas (maio a julho) e altos índices pluviométricos e de umidade relativa do ar (dezembro) também podem atuar para aumento da intensidade da doença, independente dos genótipos em estudo.

Os diferentes genótipos apresentaram as mesmas tendências, tanto em avaliações conduzidas na última folha quanto na folha intermediária, ou seja, maiores severidades ocorreram nos meses mais frios. As maiores magnitudes das severidades ocorreram na última folha avaliada (Figura 3 A) e o genótipo *Golden* apresentou as maiores magnitudes de severidade.

Quando se analisa a severidade de lesões micoparasitadas em folhas, pela diferença entre a severidade de pinta-preta, incluindo as lesões micoparasitadas e a severidade apenas da pinta preta, observa-se que as maiores magnitudes ocorreram nos meses mais frios (Figura 3). Essa tendência foi observada nos três genótipos em estudo, indicando que o alto índice de folha com fungo micoparasita foi observado em maior quantidade nas folhas com maior quantidade de doença, independentemente do genótipo. Apesar das lesões pinta-preta micoparasitadas já terem comprometido em área fotossinteticamente ativa, acredita-se que a colonização por micoparasitas possa reduzir a produção e a dispersão do inóculo, reduzindo infecções secundárias e o progresso da doença. Assim, o biocontrole pode ter efeito complementar de controle, quer seja conciliado ao uso de variedades mais resistentes, que limitam as infecções nas folhas superiores e fisiologicamente mais ativas da planta, ou conciliado ao controle químico, pela aplicação de fungicidas de ação sistêmica ou indutores de resistência, os quais conferem proteção às folhas novas, ainda sadias.

Quanto ao controle genético, embora não haja relatos de genótipos imunes à pinta-preta (Vivas et al., 2012, 2015a), há genótipos que apresentam redução na quantidade de lesões nas folhas, contribuindo, assim, para a redução do inóculo. Logo, a combinação de mais de uma estratégia de controle poderá contribuir para o manejo integrado da pinta-preta em mamoeiro.

O micoparasitismo expresso pela severidade de lesões colonizadas por micoparasitas foi maior na última folha em comparação com a folha mediana (Figura 3). Isso pode ser explicado pelo fato das folhas mais velhas conterem lesões antigas e expostas há mais tempo à colonização pelos fungos micoparasitas. No entanto, vale lembrar que as avaliações ocorreram em condições naturais de inoculação, sendo o potencial do controle biológico subestimado, uma vez que para a utilização em programas de controle biológico, estes micoparasitas deverão ser multiplicados em laboratório. A aplicação massal de micoparasitas em pulverização poderá reduzir esta diferença, antecipando a ação dos inimigos naturais em lesões e em folhas mais novas.

Observou-se a ocorrência de lesões com pinta-preta e sinais dos fungos micoparasitas em todos os meses de avaliação, tendo as maiores frequências *Hansfordia pulvinata* e *Acremonium* spp. Também se observou a ocorrência de outros gêneros de fungos esporádicos e em menor frequência, cuja morfologia é típica dos gêneros *Cladosporium*, *Fusarium*, *Cercospora*, *Alternaria*, *Periconia*, *Zygosporium* e *Helminthosporium*. Muitos destes fungos já foram relatados como saprófitos oportunistas e como fitopatógenos e até mesmo como micoparasitas de fungos fitopatogênicos em diferentes hospedeiros. No último caso, destacam-se *Cladosporium* (Minuto et al., 1991), *Zygosporium* (Carrion, 1999), *H. pulvinata* (Junqueira e Gasparotto, 1991) e *Acremonium* (Choi et al., 2008)

Não se associou a ocorrência dos fungos micoparasitas e seus diferentes gêneros ao genótipo da planta hospedeira, mas sim às variações ambientais (Figura 4). Os resultados apontam que cada um dos fungos predominantes, *Acremonium* spp. e *H. pulvinata*, é adaptado a uma condição climática diversa, podendo ser assim aplicadas em épocas diferentes visando ao biocontrole da pinta-preta do mamoeiro, *H. pulvinata* ocorreu com maior frequência e poderá ser aplicada nas épocas de temperaturas amenas a frias e no início das epidemias. Por outro lado, *Acremonium* spp ocorre com maior frequência nas épocas quentes e poderá ser aplicado nestas épocas de temperaturas mais elevadas. Estes

resultados estão de acordo com os obtidos por Vivas et al. (2015b), que pesquisando o efeito da temperatura sobre o crescimento e esporulação *in vitro* de fungos micoparasitas de *Asperisporium caricae*, observaram que temperaturas em torno de 21°C propiciam o crescimento micelial e a esporulação de isolados de *H. pulvinata*, enquanto que para os isolados de *Acremonium* spp., o ótimo para crescimento micelial e esporulação são as temperaturas maiores, próximas a 24 °C (Vivas et al., 2015b).

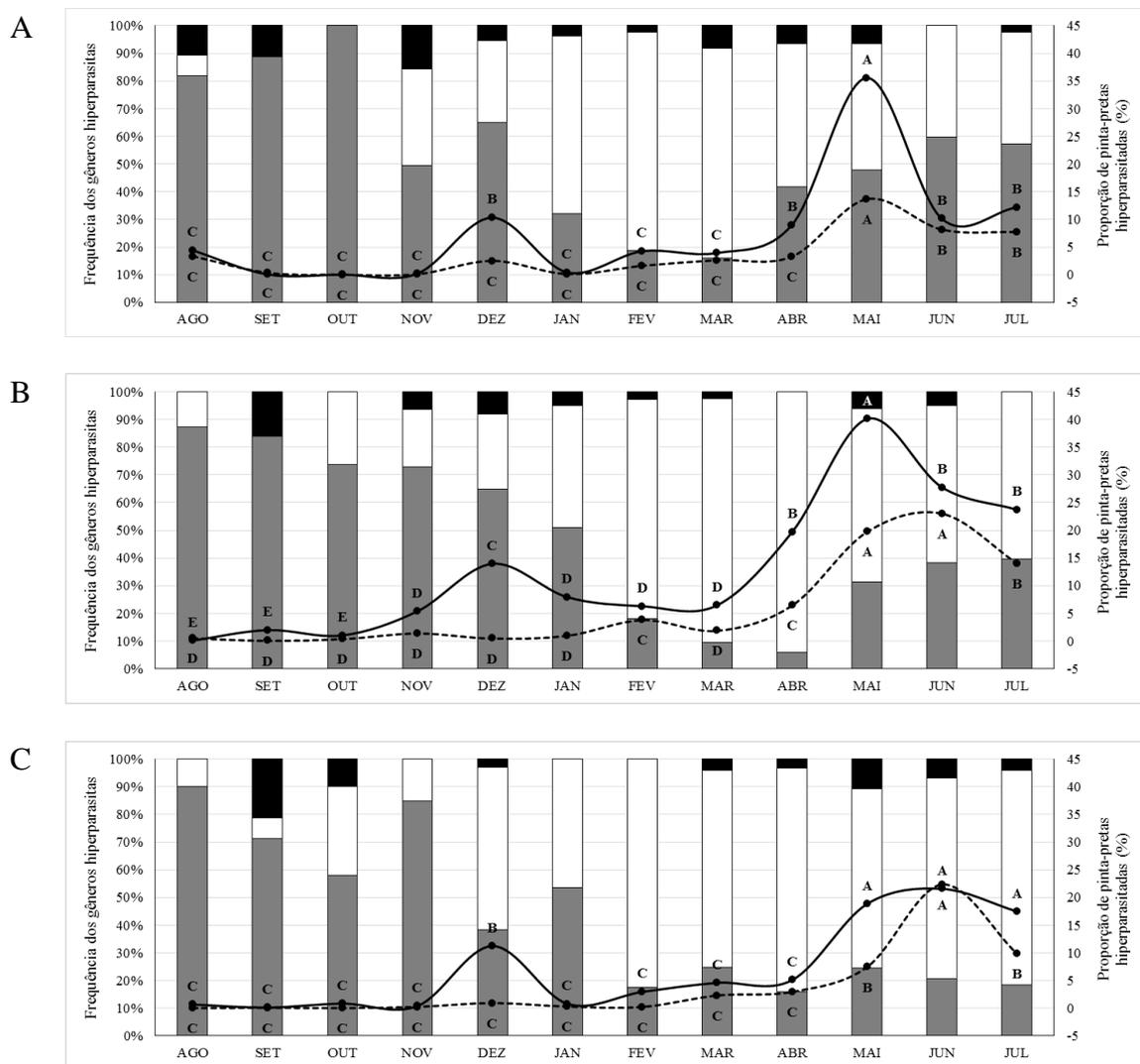


Figura 4. Frequência relativa de fungos micoparasitas encontrados nas lesões de pinta-preta do mamoeiro: *Hansfordia pulvinata* (barra cinza), *Acremonium* sp. (barra branca) e de outros gêneros (barra escura) e proporção de lesões totais de pinta-preta colonizadas por fungos micoparasitas em folhas medianas (linha tracejada) e última folha (linha contínua), em três genótipos de mamoeiro, Golden (A), Maradol (B) e Sekati (C), em área experimental de Mimoso do Sul – ES, no período de agosto de 2016 a julho de 2017.

A proporção de lesões de pinta-preta micoparasitadas na última folha foi maior nos genótipos 'Golden' e 'Maradol', atingindo uma porcentagem próxima a 40 % no mês de maio (Figura 4 A e B). Embora o genótipo 'Sekati' não tenha apresentado uma alta proporção de lesões de pinta-preta micoparasitadas (Figura 4 C), houve uma mesma tendência da variação, tal como observado nos genótipos 'Golden' e 'Maradol', tendo os meses de dezembro e maio alta proporção de micoparasitismo. Essa maior proporção de micoparasitas ocorreram nos mesmos meses de maior pluviosidade (Figura 1), demonstrando que apesar de cada gênero estar adaptado a climas diferentes, a incidência de fungos micoparasitas em lesões de pinta-preta também tende a aumentar nos períodos chuvosos, assim como observado para a doença (Figura 2). Estes resultados mostram-se importantes em relação ao comportamento do fungo em estudo, de forma a buscar o gênero mais adaptado e a melhor época de aplicação em condições de campo, para uma melhor atuação do agente de biocontrole sobre o patógeno.

Os estudos acima indicam um futuro promissor para o controle biológico da pinta-preta no mamoeiro, uma vez que o antagonista apresentou interação com a ocorrência da doença. Esta pesquisa abre ainda a possibilidade de se utilizar o biocontrole da pinta-preta do mamoeiro, mediante aplicação de fungos micoparasitas e como medida complementar a outras tecnologias. No entanto, novas pesquisas estão a caminho, na busca de uma melhor compreensão do antagonista para maior aperfeiçoamento na eficiência do controle do patógeno *A. caricae*, nas lavouras de mamão.

3.4.6. Conclusão

A doença bem como o micoparasitismo foram mais intensos nos meses de temperaturas baixas (mais frios), de junho a agosto, coincidindo com as épocas com maiores umidades noturnas e também nos períodos com maiores índices pluviométricos.

Os fungos micoparasitas predominantes foram *Hansfordia pulvinata* e *Acremonium* sp. No entanto, *H. pulvinata* foi mais frequente em épocas mais frias, enquanto *Acremonium* sp em épocas mais quentes, sugerindo a utilização destes fungos em épocas alternadas como estratégia para o biocontrole da pinta-preta do mamoeiro.

3.4.7. Referência

- Adikaram, N.K.B.; Wijepala, M. (1995) Asperisporium Black Spot in Carica papaya: a new disease in Sri Lanka. *Journal of the National Science Council of Sri Lanka*. 23(4): 213-218,
- Agrios, G. N. (2005) *Plant pathology*. 5 ed. Burlington: Elsevier Academic Press
- Banzato, A. D.; Kronka, N.do S. (2015) *Experimentação Agrícola*. 4ed. Funep, Jaboticabal SP.
- Bettiol, W.; Morandi, M.A.B. (2009) Biocontrole de doenças em plantas: uso e perspectivas. São Paulo: EMBRAPA-CNPDA, *Embrapa Meio Ambiente*. Cap 1
- Bettiol, W.; Ghini, R. (2009) Impacto das Mudanças Climáticas sobre o Controle Biológico de Doenças de Plantas. In: Bettiol, W.; Morandi, M.A.B ,Org. Biocontrole de doenças de Plantas: Usos e perspectivas, Jaquariúna-SP. *Embrapa meio Ambiente*. p.30
- Bussab, W.O.; Morettin P.A. (2017) *Estatística Básica*, Saraiva, Sao Paulo, 9ed.
- Carrión, G.; Romero, A. (1999) Primer registro de *Zygosporium gibbum* sobre Puccinia oxalidis. *Revista Mexicana de Micología*, 15: 111-114, 1999
- Choi, G.; Kim, J. C.; Jang, K.S.; Cho, K.Y.; Kim, H.T. (2008) Mycoparasitism of *Acremonium strictum* BCP on *Botrytis cinerea*, the Gray. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(1): 167-170.
- Cook, R.J.; Baker, K.F. (1983) The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul: *The American Phytopathological Society*. St. Paul, Minnesota. 539p.

- Cruz, C.D. (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*, 35(3): 271-276.
- Junqueira, N.T.V.; Gasparotto, L. (1991) Controle biológico de fungos estromáticos causadores de doenças foliares em seringueira. In: Bettiol, W. (Org.). *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna, SP: Embrapa-CNPDA, 1:307-331.
- Marin, S.L.D.; Gomes, J.A.; Salgado, J.S.; Martins, D.S., Fullin, E.A. (1995) *Recomendações para a cultura do mamoeiro dos grupos Solo e Formosa no Estado do Espírito Santo*. 4.ed. Vitória: EMCAPA, 57p. (Circular Técnica 3).
- Martelleto, L.A.P.; Ribeiro, R.L.D.; Carmo, M.G.F.; Sudo-martelleto, M.; GOES, A. (2009) Incidência da varíola, causada por *Asperisporium caricae*, em folhas de mamoeiros submetidos ao manejo orgânico, em diferentes ambientes de cultivo. *Summa Phytopathologica*, 35(4): 288-292.
- Minuto, G.; Garibaldi, A.; Gullino, M.L. (1991) *Antagonistic activity of some microorganisms against powdery mildew (Sphaerotheca fuliginea) of zucchini: preliminary results*. Bulletin OILB/SROP, Alassio, 14: 181-186.
- Morandi, M.A.B.; Bettiol, W.; Paulo Júnior, T.J. (2014) Controle biológico de doenças de plantas. In: Zambolim, L.; Jesus Júnior, W. C. de; Rodrigues, F. de A. (Ed.). *O essencial da fitopatologia: controle de doenças de plantas*. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. p. 175-234.
- Morandi, M.A.B.; Júnior Paula, T.J.; Bettiol, W.; Teixeiras, H. (2009) Controle Biológico de Fungos Fitopatogênicos. *Informe Agropecuário*, 30(251): 73-82.
- R Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. R *Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria.
- Seifert, K.; Morgan-Jones, G.; Gams, W.; Kendrick, B. (2011) The genera of Hyphomycetes. CBS Biodiversity, Series no. 9. CBS-KNAW *Fungal Biodiversity Centre*, Utrecht.
- Suzuki, M.S.; Zambolim, L.; Liberato; J.R. (2007) Progresso de doenças fúngicas e correlação com variáveis climáticas em mamoeiro. *Summa Phytopathologica*, 33(2): 167-177.

- Ventura, J.A.; Rezende, J.A.M. (2016) Doenças do mamoeiro. In: Amorim, L., Rezende, J. A. M., Bergamim Filho, A., Camargo, L. F. A. Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas. 5ª. Edição. *Agronômica Ceres*. p.497-510.
- Vivas, M.; Silveira, S.F.; Terra, C.E.P.S.; Pereira, M.G. (2011) Testers for combining ability and selection of papaya hybrids resistant to fungal diseases. *Crop Breeding and applied Biotechnology*, 11: 36-42.
- Vivas, M.; Silveira, S.F; Vivas, J.M.S; Pereira, M.G, (2012) Patometria, parâmetros genéticos e reação de progênies de mamoeiro à pinta-preta. *Bragantia*, 71: 235-238.
- Vivas, M.; Silveira, S.F; Viana, A.P; Amaral Junior, A.T; Ferregueti, G.A.; Pereira, M.G. (2015a) Resistance to multiple foliar diseases in papaya genotypes in Brazil. *Crop Protection*, 71: 138-143.
- Vivas, J.M.S.; Vivas, M.; Silveira, S.F. (2015b) Efeito da temperatura sobre o crescimento e esporulação in vitro de fungos hiperparasitas de *Asperisporium caricae*. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 45(1): 73-81.

4. RESUMO E CONCLUSÃO GERAL

Pelas análises morfológicas e filogenéticas, entre os nove isolados de *Acremonium* em estudo, foi possível identificar três novas espécies associadas ao micoparasitismo de *A. caricae*: *Acremonium* sp I, *Acremonium* sp II e *Acremonium* sp III.

As três espécies de *Acremonium*, *Hansfordia pulvinata*, *Simplicillium lanosoniveum* e *Lecanicillium lecanii* apresentaram comportamento de micoparasitismo agindo com eficiência ao antagonizar o fitopatógeno *A. caricae*. Tais espécies apresentaram ação das enzimas protease e lipase. Apresentaram também sinais de produção de composto não-voláteis, com destaque para a espécie de *Acremonium* (A-617) que inibiu totalmente a germinação de *A. caricae*. Em resumo, pode-se afirmar que os isolados de *Acremonium* sp, *H. pulvinata*, *S. lanosoniveum*, *L. lecanii* e *S. implicatum* selecionados através do teste de micoparasitismo, atividade enzimática e teste de compostos não-voláteis, mostraram ampla potencialidade para antagonizar *A. caricae* *in vitro*.

Observou-se em estudo *in vitro* e *in vivo* que o fungo *H. pulvinata* (isolado H-611) foi o isolado que destacou por ser compatível com a maioria dos produtos utilizados e o que mais colonizou lesões de pinta-preta, quando inoculado com Bion® e Matriz®, podendo estes produtos serem utilizados juntamente com espécies de *Acremonium* e *H. pulvinata* no controle da pinta-preta do mamoeiro, pois estes produtos não tiveram efeito tóxico sobre os fungos hipeparasitas.

Por fim, observou-se em estudo de campo que a doença, bem como o micoparasitismo, foi mais intensa nos meses de temperaturas baixas (mais frios),

coincidindo com as épocas mais úmidas e de maiores índices pluviométricos, independente do genótipo hospedeiro. Os fungos micoparasitas predominantes foram *Hansfordia pulvinata*, e *Acremonium* sp, no entanto, *H. pulvinata* foram mais frequentes em épocas mais frias, e *Acremonium* sp, em épocas mais quentes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, P.B. (1990) The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*. 28:59-72.
- Adikaram, N.K.B.; Wijepala, M. (1995) *Asperisporium* Black Spot in *Carica papaya*: a new disease in Sri Lanka. *Journal of the National Science Council of Sri Lanka*. 23(4): 213-218,
- AGRIANUAL. *Anuário da agricultura brasileira. Mamão*. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio. 2011. p, 325-332.
- Agrios, G. N. (2005) *Plant pathology*. 5 ed. Burlington: Elsevier Academic Press
- Ahmed, A.S.; Ezziyyani, C.; Sánchez, C.P.; Candela, M.E. (2003) Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annum*) plants. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 633-637.
- Almeida, W.K.D.S. (2009) Antagonismo de *Trichoderma viride* sobre fungos fitopatogênicos, *Colletotrichum* spp, *Cercospora musae* e *Asperisporium caricae* em fruteiras tropicais. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v. 4, n. 2, p.1374-1378.
- Ameida, F.B.; Cerqueira, F.M.; Silva, R.N.; Ulhoa, C.J.; Lima, A.L. (2007) Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 29: 1189-1193.

- Araujo, I.M.M.; Oliveira, A.G.R.C. (2017) Agronegócio e agrotóxicos: impactos à saúde dos trabalhadores agrícolas no nordeste brasileiro. *Revista Trabalho, Educação e Saúde*, 15(1): 117-129.
- Azevedo, L.J.; Araujo, L.W. & Walter Junior, M. (2000) *Importância dos Microorganismo endofítico no controle de insetos*. In Melo, I.S. & Azevedo, J.L. Controle biológico. Jaquariúna: Embrapa Meio Ambiente, 3:57-94.
- Baldrian, P. (2003) Interactions of heavy metals with white-hot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 78-91.
- Banzato, A. D.; Kronka, N.do S. (2015) *Experimentação Agrícola*. 4ed. Funep, Jaboticabal SP.
- Barguil, B.M.; Resende, M.L.V.; Resende, R.S.; Beserra Jr, J.E.A.; Salgado, S.L. (2005) Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricensis* of coffee plant. *Fitopatologia Brasileira*, 30: 535-537.
- Barreto, L.F.; Savan, P.A.L.; Lima, L.L.; Lodo, B.N. (2011) Avaliação de fungicidas no controle de *Asperisporium caricae* na cultura do mamoeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33: 399-403.
- Bélanger, R.R.; Benhamou, N.; Menzies, J.G. (2003) Mineral nutrition in the management of plant diseases. *Phytopathology*. 93, 402-412.
- Benítez, T.; Rincon, A.M.; Limon, M.C.; Codon, A.C. (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249-260.
- Bergamin filho, A. (2008) Controle químico versus sustentabilidade na agricultura: o exemplo do Huanglongbing dos citros. In: Zambolim, L.; Picanço, M. C.; Silva, A. A.; Ferreira, L. R.; Ferreira, F. A.; Jesus Junior, W. C. *Produtos fitossanitários (fungicidas, inseticidas, acaricidas e herbicidas)*. Viçosa, MG: UFV/ DFP, 1-26.
- Bertoncelli, D.J.; Mazaró, S.M.; Rocha, R.C.D.S.; Possenti, J.C.; Júnior A.W. (2015) Acibenzolar-S-metil na indução de resistência de tomateiro e controle de *Rhizoctonia solani* kuhn in vitro. *Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science*, 8: 43-50.
- Bettiol, W. (1991) *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaquariúna: EMBRAPA-CNPDA, 226p.

- Bettiol, W. (1991) Seleção de microrganismo antagônicos a fitopatógenos. In: Bettiol, W.(Org). *Controle biológico de doença de plantas*. Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de defesa da Agricultura, Jaquariúna.
- Bettiol, W.; Ghini, R. (2009) Impacto das Mudanças Climáticas sobre o Controle Biológico de Doenças de Plantas. In: Bettiol, W.; Morandi, M.A.B ,Org. *Biocontrole de doenças de Plantas: Usos e perspectivas*, Jaquariúna-SP. Embrapa Meio Ambiente. p.30
- Bettiol, W; Ghini.R; Morandi, M.A.B; Stadnik, M.J; Krass, U; Stefanova, M & Prado, A.M.C (2008) *Controle biológico de doenças de plantas na America Latina*. FEALQ. p.303-327.
- Bettiol, W; Morandi, M.A.B; (2009) *Biocontrole de doenças de plantas: Uso e Perspectiva*. Jaquariúna. Embrapa Meio Ambiente. 341p.
- Blaich, R; Grundhöfer, H. (1998) Silicate incrusts induced by powdery mildew in cell walls of diferent plant species. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, v.105, 114-120.
- Blum, L.E.B.; Amarante, C.V.T.; Dezanet, A.; Lima, E.B.; Neto, P.H.; Ávila, R.D.; Siega, V. (2007) Fosfitos aplicados em pós-colheita reduzem o mofo-azul em maçãs 'Fuji' e 'Gala'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29: 265-268.
- Brauner, M. C. C e Graff, L. (2015) *Segurança alimentar e produção agrícola: Reflexões sob a ótica da justiça ambiental*. *Veredas do Direito*, 12 (24):375-400.
- Brunner, K.; Zeilinger, S.; Ciliento, R.; Woo, S.L.; Lorito, M.; Kubicek, C.P.; Mach, R.L. (2005) Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and of plant systemic disease resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3959-3965.
- Bussab, W.O.; Morettin P.A. (2017) *Estatística Básica*, Saraiva, Sao Paulo, 9ed.
- Campanhola, C & Bettiol, W. (2003) Panorama sobre o uso de agrotóxico no Brasil.In; Campanhola, C. & Bettiol, W (Eds.) *Método Alternativo de Controle Fitossanitário*. Jaquariuma. Embrapa Meio Ambiente. p,13-51
- Campbell, C.L.; Madden, L.V. (1990) *Introduction to plant disease epidemiology*. New York NY. John Wiley & Sons.

- Carbone, I. e Kohn L. M. (1999) A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes. *Mycologia*, 91(3): 553-556.
- Carrión, G.; Romero, A. (1999) Primer registro de *Zygosporium gibbum* sobre *Puccinia oxalidis*. *Revista Mexicana de Micología*, 15: 111-114, 1999
- Chiacchio, F.P.B. (1985) *Doenças em fruteiras: mamão. Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 11, (123):27-30.
- Chérif, M.; Menzies, J.G.; Benhamou, N.; Bélanger, R.R. (1992) Studies of silicon distribution in wounded and *Pythium ultimum* infected cucumber plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 41, 371-385.
- Cho, K.Y.; Choi, G.J.; Kim, H.T.; Kim, J.C.; Jang, K.S. & Choi, Y.H. (1999) Novel *Acremonium strictum* strain, a hyperparasite of *Botrytis cinerea*, and method for the biological control of gray mold by using same. *Korea Patent*, 99-246p
- Choi, G.J.; Kim J.C.; Jang, K.S.; Cho, K.Y.; Kim, H.T. (2008) Mycoparasitism of *Acremonium strictum* BCP on *Botrytis cinerea*, the gray mold pathogen. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 18(1):167-70.
- CMI (1990) Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria n° 347, *Asperisporium caricae*. Great Britain by The Eastern Press Ltd., Surrey, England. *Mycopathologia*. v, 111p,91-108.
- Cook, R.J.; Baker, K.F. (1983) The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul: *The American Phytopathological Society*. St. Paul, Minnesota. 539p.
- Costa, J.C.B.; Resende, M.L.V.; Júnior, P.M.R.; Camilo, F.R.; Monteiro, A.C.A.; Pereira, R.B. (2010) Indução de resistência em mudas de cacaueteiro contra *Moniliophthora perniciosa* por produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado. *Tropical Plant Pathology*, 35: 285-294.
- Côté, F., Cheog, J. J., Alba, R., Hahn, M. G. (1995) Characterization of binding proteins that recognize oligoglucoside elicitors of phytoalexins in soybean. *Physiologia Plantarum*, v. 93: p.401-10.
- Crous P.W.; Schumacher R.K.; Wingfield M.J.; Lombard L.; Giraldo A.; Christensen M.; Gardiennet A.; Nakashima C.; Pereira O.; Smith A.J.; Groenewald J.Z. (2015). *Fungal Systematics and Evolution: FUSE 1*. – *Sydowia* 67: 81-118.

- Cruz, C.D. (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics, *Acta Scientiarum. Agronomy*, 3(5): 271-276.
- Cruz, J.L. Certificação em produção integrada de mamão: Informações básicas. 2008. Disponível em: http://www.cnpmf.embrapa.br/pic_bahia/certificacao_mamao.pdf. Acesso em: 22 de janeiro de 2014.
- Cruz, S.M.C.; Rodrigues, A.A.C.; Coelho, R.S.B.; Sardinha, D. (2011) Ação indutora de produtos abióticos na resistência de tomateiro e efeito sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Idesia*, 29: 111-118.
- Cuzzi, C.; Link, S.; Vilani, A.; Onofre, S.B. (2011) Enzimas Extracelulares Produzidas por Fungos Endofíticos Isolados de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (asteraceae), *Global Science and Technology*, 4(2): 47–57.
- Delmadi, L. C.; Cassetari N., D.; Freitas R., V. (2009) Avaliação do potencial de uso do hiperparasita *Dicyma pulvinata* (Berk. & M. A Curtis) no controle biológico do mal-das-folhas [*Microcyclus ulei* (Henn.) Arx] de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Wild. Ex A. Juss.) Muell. arg.] em São José do Rio Claro, MT *Ciência Florestal*, 19, (2): 183-193.
- Dianese, A. C.; Blum, L. E. B.; Dutra, J. B.; Lopes, L. F.; Sena, M. C.; Freitas, L. F., Yamanishi, O. K. (2007) Reação de genótipos de mamoeiro à varíola e à podridão-do-pé. *Fitopatologia Brasileira*, Lavras, v.32, n.5, p. 419-423.
- Dianese, A.C.; Blum, L.E.B.; Dutra, J.J.; Lopes, L.F.; Sena, M.C.; Freitas, L.F. (2008) Avaliação do efeito de fosfitos na redução da varíola (*Asperisporium caricae*) do mamoeiro (*Carica papaya*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30(3): 834-837
- Dingle, J.; Reid, W.W.; Solomons, G.L. (1953) The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides. II. Application of the “cup-plate” assay to the estimation of enzymes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 4: 149-155.
- Domsch, K.H.; Gams, W. & Anderson, T-H. (2007) *Compendium of soil fungi*. IHW-Verl., Eching, Germany. 672p.
- Edgar, R. C. (2004) *Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*. *Nucleic Acids Research*, 32 (5):1792-1797.

- Elder, R.J.; Macleod, W.N.B.; Bell, K.L.; Tyas, J.A. & Gillespie, R.L. (2000) Growth, yield and phenology of hybrid papayas (*Carica papaya* L.) as influenced by method of water application. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 40:739-746.
- Ellis, M.B. (1971) Dematiaceus hyphomycetes. *Common wealth Micological Institute*. Kew Surrey, England. p.273-274.
- FAO. faostat. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acessado em 26 de janeiro de 2018.
- Fenn, M.E.; Coffey, M.D. (1989) Quantification of phosphonate and ethyl phosphate in tobacco and tomato tissues and significance for the mode of action of two phosphonate fungicides. *Phytopathology*. 70(1): 76-82.
- Galdeano, D.M.; Guzzo, S.D.; Patricio, F.R.A.; Harakava, R. (2010) Proteção do cafeeiro contra cercosporiose por acibenzolar-S-metil e proteína harpina. *Pesquisa. Agropecuária Brasileira*, 45: 686-692.
- Gams W. (1975) Cephalosporium-like hyphomycetes: some tropical species. *Transactions of the British Mycological Society*, 64: 389-404.
- Gams, W. (1971) *Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes)*. 1–262. G. Fischer, Stuttgart, 262p.
- Gams, W. (1975) Cephalosporium-like Hyphomycetes: *Some tropical species*. *Transactions of the British Mycological Society*. 64(3):389-404.
- Garibaldi, A.; Bertetti, D.; Pensa, P.; Gullino, M.L. (2010) First Report of Verticillium Wilt Caused by *Verticillium dahliae* on Figmarigold in Italy. *Plant Disease*, 94 (1):129.
- Gauthier, N. W.; Maruthachalam, K.; Subbarao, K. V.; Brown, M.; Xiao, Y.; Robertson, C. L.; Schneider, R. W. (2014). Mycoparasitism of *Phakopsora pachyrhizi*, the soybean rust pathogen, by *Simplicillium lanosoniveum*. *Biological Control*, 76(1): 87-94.
- Ghini, R.; Kimati, H. (2000) *Resistência de fungos a fungicidas*. 1ª edição. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 78p.
- Giraldo, A.; Gene, J.; Cano, J.; de Hoog, S.; Guarro, J. (2012) Two new species of *Acremonium* from Spanish soils. *Mycologia*, 104 (6):1456-1465.

- Giraldo, A.; Gene, J.; Sutton, D.A.; Madrid, H.; de Hoog, G.S.; Cano, J.; Decock, C.; Crous, P.W.; Guarro, J. (2015) Phylogeny of *Sarocladium* (Hypocreales). *Persoonia*, 34, 10-24.
- Giraldo, A.; Sutton, D.A.; Guarro, J.; Gene, J.; Wiederhold, N.P.; Hoog de, G.S. (2017) New species of *Acremonium* from clinical samples and re-circumscription of some acremonioid species in Plectosphaerellaceae. *Mycological Progress*, 16(4): 349-368.
- Glenn, A.E.; Bacon, C.W.; Price, R. & Hanlin, R.T. (1996) Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia*. 88:369–383.
- Gomes, R.S.S.; Demartelaere, A.C.F.; Nascimento, L.C.; Maciel, W.O.; Wanderley, D.B.N.S. (2016) Bioatividade de indutores de resistência no manejo da antracnose da goiabeira (*Psidium guajava* L.) *Summa Phytopathologica*, 42: 149-154.
- Gonçalves, R. C.; Alfenas, A. C.; Mafia, R. G. (2016) Armazenamento de micro-organismo em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: Alfenas, A. C.; Mafia, R. G. *Métodos em fitopatologia*. Viçosa: Ed. UFV, p. 93-105.
- Grum-Grzhimaylo, A.A.; Debets, A.J.; van Diepeningen, A.D.; Georgieva, M.L.; Bilanenko, E.N. (2013) *Sodiomyces alkalinus*, a new holomorphic alkaliphilic ascomycete within the Plectosphaerellaceae. *Persoonia*, 31. 147-158.
- Halleen, F.; Mostert, L.; Crous, P. W. (2007) Pathogenicity testing of lesser-known vascular fungi of grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 36(3):277–285.
- Hammerschmidt, R. (1999) Phytoalexins: what have we learned after 60 years *Annual Review Phytopathology*, Palo Alto.v, 37p, 285-306
- Hankin, L.; Anagnostakis, S.L. (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67 (3): 597-607.
- Harman, G.E. (2000) Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84(4): 376–393.
- Harman, G.E. (2006) Overview of Mechanisms and uses *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2): 190-194.
- Harman, G.E. (2011) Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytologist*, 189(3): 647-9.

- Hawksworth, D.L.; Kirk, P.M.; Sutton, B.C.; Pegler, D.N (1981) "Ainsworth & Bisby's" - Dictionary of the Fungi, ed. 7. *International Mycological Institute*, CAB International, University Press, Cambridge, UK, 616p.
- Hepperle, D. DNA dragon 1.4.1 - DNA sequence contig assembler software. (2011) Available at: <<http://www.dnadrageon.com/>>. Access on: 22 out, 2014.
- Holliday, P. (1980) *Fungus diseases of tropical crops*. Cambridge, Cambridge University Press, 607.
- INDEX FUNGORUM. Disponível em:<<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>>, acessado novembro de 2017.
- Jackson, D.; Skillman, J.; Vandermeer, J. (2012) Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. *Biological Control*, 61:89-97.
- Junqueira, N.T.V.; Gasparotto, L. (1991) Controle biológico de fungos estromáticos causadores de doenças foliares em seringueira. In: Bettiol, W. (Org.). *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna, SP: Embrapa-CNPDA, 1:307-331.
- Kelemu, S.; Dongyi, H.; Guixiu, H. & Takayama, Y. A. (2002) PCR-based assay for specific detection of *Acremonium implicatum*, an endophytic fungus in species of *Brachiaria*. *Phytopathology*, 92:40-41.
- Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A (2005) Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. *Agronômica Ceres*. Ed 4^a.v. 2, p. 479.
- King, M.; Reeve, W.; Van Der Hoek, M.B.; Williams, N.; McComb, J.; O'Brien, P.A.; Hardy, G.E.S.J. (2010) Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Genetics & Genomics*, 284: 425-435.
- Kirk P M, Cannon P F, David J C, Stalpers J A (2001) *Dictionary of fungi*. CABI Publishing: Wallingford. 655p.
- Koga, H.; Hiral, Y.; Kanda, K.; Tsukiboshi, T. & Uematsu, T. (1997) Successive transmission of resistance to bluegrass webworm to perennial ryegrass and tall fescue plants by artificial inoculation with *Acremonium* endophytes. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 31:109-115.

- Kolattukudy, P.E. (1985) Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 23: 223-250.
- Kouvelis, V.N.; Sialakouma, A.; Typas, M.A. (2008) Mitochondrial gene sequences alone or combined with ITS region sequences provide firm molecular criteria for the classification of *Lecanicillium* species. *Mycological Research*; 112 (Pt 7): 829-44.
- Krishna, A. & Singh, R.A. (1979) *Hansfordia pulvinata* mycoparasitic on *Cercosora* species causing "Tikka disease" of groundnut. *Indian Phytopathology* 32:318-320.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis: version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7):1870-1874.
- Leinhos, G. M. E.; Buchenauer, H. (1992) *Hyperparasitism of selected fungi on rust fungi of cereal*. *Z Pflanzenkr Pflanzenschutz*, 99(1): 482-498.
- Liberato, J. R., Tatagiba, J. S., Zambolim, L., Costa, H. (1999) Fitotoxicidade de Fungicidas Triazois ao Mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 24: 112-113.
- Liberato, J.R. & Zambolim, L. (2002) Controle das doenças causadas por fungos, bacterias e fitonematóides em mamoeiro. In: Zambolim, L., Vale, F.X.R., Monteiro, A.J.A. & Costa H (Eds.) *Controle de doenças de plantas fruteiras*. v.2. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa.1023-1169p
- Liberato, J.R., McTaggart, A.R. & Shivas, R.G. (2007) *Asperisporium Black Spot of Papaya (Asperisporium caricae)* Pest and Diseases Image Library. Updated on 2/20/2007 2:30:45 PM. Available online: <http://www.padil.gov.au>.
- Liu, L., Kloepper, J. W. & Tuzun, S. (1995) Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology*. v,85. p,1064–1068.
- Liu, Z.Y.; Milner, R.J.; Mcrae, C.F.; Lutton, G.G. (1993) The use of dodine in selective media for the isolation of *Metarhizium* spp. from soil. *Journal Invertebrate Pathology*, 62: 248-251.

- Lorito, M.; Woo, S.L.; Harman, G.E.; Monte, E. (2010) *Translational research on Trichoderma: from omics to the field Annual Review of Phytopathology*, 48: 395–417.
- Luna, J.V.U. (1986.) *Variedades de mamoeiro*. Epamig, Belo Horizonte, MG *Informe Agropecuário*. v. 12, n. 134, p. 14-18.
- Malathrakis, N.E (1985) The fungus *Acremonium alternatum* Linc: Fr., a hyperparasite of the cucurbits powdery mildew pathogen *Sphaerotheca fuliginea*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 92 (5):509-515.
- Marin, S.L.D.; Gomes, J.A.; Salgado, J.S.; Martins, D.S., Fullin, E.A. (1995) *Recomendações para a cultura do mamoeiro dos grupos Solo e Formosa no Estado do Espírito Santo*. 4.ed. Vitória: EMCAPA, 57p. (Circular Técnica 3).
- Martelleto, L.A.P.; Ribeiro, R.L.D.; Carmo, M.G.F.; Sudo-martelleto, M.; GOES, A. (2009) Incidência da varíola, causada por *Asperisporium caricae*, em folhas de mamoeiros submetidos ao manejo orgânico, em diferentes ambientes de cultivo. *Summa Phytopathologica*, 35(4): 288-292.
- Martelleto, L.A.P.; Ribeiro, R.L.D.; Sudo-martelleto, M.; Vasconcellos, M.A.S.; Marin, S.L.D.; Pereira, M.B. (2008) Cultivo orgânico do mamoeiro 'Baixinho de Santa Amália' em diferentes ambientes de proteção. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30(3): 662-666.
- Martins-corder, M.P.; Melo, I.S. (1998) Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. A *Verticillium dahliae* kleb. *Scientia Agricola*, 55(1): 1-7.
- Maublan, A. (1913) Uma moléstia do mamoeiro (*Carica papaya* L.). Boletim do Ministério da Agricultura Indústria e Comércio. Rio de Janeiro, v.2, (1):126-130
- Melo, I.S. (1996). *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 4: 261-395.
- Minuto, G.; Garibaldi, A.; Gullino, M.L. (1991) *Antagonistic activity of some microorganisms against powdery mildew (Sphaerotheca fuliginea) of zucchini: preliminary results*. Bulletin OILB/SROP, Alassio, 14: 181-186.
- Mitchell, J.K.; Smith, D.H. & Taber, R.A. (1987) Potential for biological control of *Cercosporidium personatum* leaf spot of peanuts by *Dicyma pulvinata*. *Canadian Journal of Botany*, 65:2263-2269.

- Moraes, W.B.; Moraes, W.B.; Cosmi, F.C.; Jesus Junior, W.C.; Cecílio, R.A.; Valadares Junior, R.; Souza, A. F. (2011) *Análise de risco do impacto das mudanças climáticas globais na distribuição espacial da pinta-preta do mamoeiro no Brasil*. Nucleus, 8: 1-12.
- Morandi, M.A.B.; Bettiol, W.; Paulo Júnior, T.J. (2014) Controle biológico de doenças de plantas. In: Zambolim, L.; Jesus Júnior, W. C. de; Rodrigues, F. de A. (Ed.). *O essencial da fitopatologia: controle de doenças de plantas*. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. p. 175-234.
- Morandi, M.A.B.; Júnior Paula, T.J.; Bettiol, W.; Teixeira, H. (2009) Controle Biológico de Fungos Fitopatogênicos. *Informe Agropecuário*, 30(251): 73-82.
- Motoyama, M.M.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Fiori-Tutida, A.C.G.; Scapim, C.A. (2003) Indução de fitoalexinas em soja e em sorgo e efeito fungitóxico de extratos cítricos sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium*. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 25: 491-496.
- Nascimento, R.J. (2009) *Caracterização de espécies de Colletotrichum associadas às podridões em frutos de mamoeiro*. Tese (Doutorado Fitopatologia) – Univ. Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Agronomia, Recife. p 89.
- Nishijima, W.; Zhu, I. J. (2004) *Developing a broad disease resistance in carica papaya against fungal diseases*. CTAHR/HARC Projet Proposal. p, 30.
- Nishijima, W.T., Dickman, M.B., Ko, W.H.; Ooka, J.J. (1994) Papaya diseases caused by fungi. In: Ploetz, R.C., Zentmyer, G.A., Nishijima, W.T., Rohrbach, K.G. & Ohr, H.D. (Eds.) *Compendium of tropical fruit diseases*. St. Paul. APS Press. p.58-64.
- Nojosa, G.B.A.; Resende, M.L.V.; Barguil, B.M.; Moraes, S.; Ra. G.I.; Boas, C.H.V. (2009) Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de Phoma. *Summa phytopathologica*, 35: 60-62.
- Oliveira C. R. R. de. (2015) *Resistência de mamoeiro a pinta-preta e variabilidade genética de Asperisporium caricae*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Oliveira, A. A. R (2005) *Developing disease resistance in Carica papaya L. against fungal diseases*. EMBRAPA/CNPMP. Post-doctoral Report.47p.

- Oliveira, A. A. R.; Santos Filho, H. P. Doenças. In: Ritzinger, C. H. S. P.; Souza, J. da S. (2000) (Org.) *Mamão: fitossanidade*. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. p. 37-46.
- Oliveira, A.A.R.; Nishijima, W. (2014) Induction of Resistance to Papaya Black Spot Elicited by Acibenzolar-S-Methyl. *Plant Pathology Journal*, 13: 120-124.
- Parra, J.R.P., Botelho, P.S.M., Corrêa-Ferreira, B.S & Bento, J.M. (2002) Controle biológico: terminologia. In: Parra, J.R.P., Botelho, P.S.M., Corrêa-Ferreira, B.S & Bento, J.M (Ed) *Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores*. São Paulo: Manole, 1-16p
- Pascholat, S. F. (2003) Indução de resistência: opção para o controle de doenças de plantas no século XXI. *Summa Phytopathologica*, v,29: p,115–116.
- Pelaez, F.; Gonzalez, V.; Platas, G; Sanchez-Ballesteros, J. (2008) Molecular phylogenetic studies within the family Xylariaceae based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity*, 31: 111-134.
- Perdomo, H.; García, D.; Gené, J.; Cano, J.; Sutton, D.A.; Summerbell, R.; Guarro, J. (2013) *Phialemoniopsis*, a new genus of Sordariomycetes, and new species of *Phialemonium* and *Lecythophora*. *Mycologia*, 105(2): 398-421.
- Perdomo, H.; Sutton, D.A.; García, D.; Fothergill, A.W.; Cano, J.; Gené, J.; Summerbell, R.C.; Rinaldi, M.G. & Guarro, J. (2011) Spectrum of clinically relevant *Acremonium* species in the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 49, (1):243-256,
- Peresse, M.; Le Picard, D. (1980) *Hansfordia pulvinata*, mycoparasite destructeur du *Cladosporium fulvum*. *Mycopathologia*, v.71, p.23-30.
- Persley, D.M; Ploetz, R.C. (2003) Diseases of Papaya. In: *Disiases of Fruits Crops* (eds. R.C. Ploetz). CABI Publishing. 379-382.
- Pinho, D.B.; Firmino, A.L.; Pereira, O.L.; Ferreira Junior, W.G (2012) *An efficient protocol for DNA extraction from Meliiales and description of Meliola centellae* sp. Nov. *Mycotaxon*, 122(1): 333-345.
- Poling, S.M.; Wicklow, D.T.; Rogers, K.D.; Gloer, J.B. (2008) *Acremonium zea*, a protective endophyte of maize, produces dihydroresorcylic acid and 7-Hydroxydihydroresorcylic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9): 3006-3009.

- Poltronieri, T.P.S.; Silveira, S.F.; Vivas, M.; Catarina, R.S.; Cortes, D.F.M.; Azevedo, A.O.N.; Pereira, M.G. (2017) Selecting black-spot resistant papaya genotypes derived from backcrossing and hybrids. *Genetics and Molecular Research*, 16(1): 1-11.
- Pratissoli, D.; Almeida, G.D.de; Júnior, W.C.J.; Vicentini, V.B.; Holtz, A.M.; Cochetto, J.r G. (2007) *Fertilizante organomineral e argila silicatada como indutores de resistência à varíola do mamoeiro*. Idesia, 25: 63-67.
- Rathaiah, Y. & Pavgi, M. (1971) A species of *Hansfordia* mycoparasitic on *Cercospora*. *Revista di Patologia Vegetale*, 7:203-211.
- R Core Team (2015) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Reeb, V.; Lutzoni, F.; Roux, C. (2004) Contribution of RPB2 to multilocus phylogenetic studies of the euascomycetes (Pezizomycotina, Fungi) with special emphasis on the lichen-forming Acarosporaceae and evolution of polyspory. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 32(3):1036-60.
- Rehner, S A.; Samuels, G J. (1994) Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*, 98(6): 625-634.
- Resende, M. L. V., Cavalcanti, F. R., Santos, F.S., Amaral, D. R., Ribeiro Júnior, Pedro Martins, Costa, J. C. B., Camilo, F. R., Ishida, A. K. N., Souza, R. M. (2007) Novos indutores de resistência contra doenças em cafeeiro, cacauero, algodoeiro e tomateiro: perspectivas de utilização. *In: Universidade Federal de Viçosa (org) Indução de Resistência em Plantas a Patógenos*. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora Ltda, p. 161-182.
- Rezende J.A.M., Martins, M.C. (2005) Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.). *In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. (Eds.). Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. Agronômica Ceres, São Paulo, p.435-443.*
- Rodrigues, A.M. (2002) *Influência da luz, do pH e de aditivos químicos sobre o crescimento micelial e esporulação de Dicyma pulvinata (Berk & M.A Curtis) Arx [Syn. Hansfordia pulvinta (Berk & Curt)] in vitro*. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá. 39p.
- Rossi-zalaf, L.S.; Alves. S.B.; Lopes, R.B.; Silveira neto, S.; Tanzini, M.R. (2008) Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e

doenças. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Ed.). *Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios*. Piracicaba: FEALQ, p.270-302.

Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y., Hunt, M. D. (1996) Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*. v. 8, p. 1809-1819.

Saias, C.O.; Martins, I.; Silva, J.B.T.; Silva, J.P.; Mello, S.C.M. (2014) Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. *Summa phytopathologica*, 40(1): 34-41.

Saitou, N.; Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*, 4(4):406-25.

Santos Filho, H.P.; Oliveira, A.A.R.; Noronha, A.C.S.; Sanches, N.F.; Lopes, F.F.; Andrade, P.R.O.; Osorio, A.C.B.; Souza, J.A.; Oliveira, A.M.G.; Santos, M.J. (2007) Monitoramento e controle da Pinta-preta do mamoeiro *Asperisporium caricae* (Speg.) Maubl. In: Martins (Ed.) *Papaya Brasil: Manejo, Qualidade e Mercado e inovações tecnológicas para o mamão*. Vitória: Incaper. p.472-475.

Santos, M.C.; Barreto, M. (2003) Estudo epidemiológico da varíola do mamoeiro em cultivares submetidos a tratamento com fungicidas. *Summa Phytopathologica*, 29, 141-146.

Santos, P.H.D.; Silveira, S.F.; Vivas, M.; Carvalho, B.M.; Pereira, M.G. (2017) Alternative control to black spot disease in papaya genotypes. *Summa Phytopathologica*, 43: 60-62.

Schoch, C.L.; Sung, G.H.; López-Giráldez, F.; Townsend, J.P.; Miadlikowska, J.; Hofstetter, V.; Robbertse, B.; et al. (2009) The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic Biology*, 58(2): 224-39.

Seifert, K.; Morgan-Jones, G.; Gams, W.; Kendrick, B. (2011) *The genera of Hyphomycetes*. CBS Biodiversity, Series no. 9. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht.

Silva, L. H. C. P., Resende, M. L. V. de. (2001) Resistência induzida em plantas contra patógenos. In: Silva, L.H.C.P.; Campos, J.R.; Nojosa, G.B.A. (eds.) *Manejo integrado de doenças e pragas em hortaliças*. Lavras: UFLA, p. 221 - 234.

- Silva, F. F.; Castro, E. de M.; Moreira, S. I.; Ferreira T. C.; Lima A.E.; Alves E. (2017) Emergência e análise ultraestrutural de plântulas de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* sob efeito da aplicação de *Trichoderma harzianum*. *Summa Phytopathol.* 43(1): 41-45.
- Singh, U. P.; Vishwakarma, S. N.; Basuchaudhury, K. C. (1978). *Acremonium sordidulum* Mycoparasitic on *Colletotrichum dematium* f. *truncata* in India. *Mycologia*, 70(2): 453-455.
- Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E.L. (1998) Secondary Metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Kubicek CP, Harman GE *Trichoderma* and *Gliocladium. Basic Biology, Taxonomy and Genetics*. Taylor and Francis, London.
- Soares, A.C.F.; Perez, J.O.; Sousa, C.S.; Garrido M. da S., Almeida, N.S. (2008) Eficiência do Acibenzolar-s-metil na Proteção de Plantas de Inhame à *Curvularia eragrostides*. *Revista Caatinga*, 21: 147-151.
- Stadnik, M.J.; Bettiol, W. (2000) Controle biológico de oídeos. In: Melo IS, Azevedo JL. *Controle biológico*, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna.
- Suarez, B.; Rey, M.; Castillo, P. (2004) Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(1): 46-55.
- Sudo, S. (1989) Biocontrole de *Catacauma torrendiella* e *Coccostroma palmicola*, agentes causadores da lixa preta do coqueiro. In: *Reunião brasileira sobre controle biológico de doenças de plantas*. 1989. Piracicaba. Anais Piracicaba: USP/EMBRAPA. p.57-59.
- Summerbell, R.C.; Gueidan, C.; Schroers, H-J.; de Hoog, G.S.; Starink, M.; Arocha Rosete, Y.; Guarro, J. & Scott. J.A. (2011) *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Studies in Mycology*, 68.139-162.
- Suzuki, M.S., Zambolim, L. & Liberato, J.R. (2007) Progresso de doenças fúngicas e correlações com variáveis climáticas em mamoeiro. *Summa Phytopathologica*. V. 23, n. 2, p. 167-177.
- Suzuki, M.S.; Zambolim, L.; Liberato; J.R. (2007) Progresso de doenças fúngicas e correlação com variáveis climáticas em mamoeiro. *Summa Phytopathologica*, 33(2): 167-177.

- Tatagiba, J.S.; Oliveira, K.V.; Aquilar, M. A. (2005) Avaliação da eficiência do *Trichoderma* PM no controle da podridão de *Phytophthora* na cultura do mamão. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília DF.v.30, p.79. Complemento.
- Tavares, E.T.; Tigano, M.S.; Mello, S.C.M.; Martins, I. & Cordeiro, C.M.T. (2004) Molecular characterization of Brazilian *Dicyma pulvinata* isolates. *Fitopatologia Brasileira*, 29:148-154.
- Tavares, G. M. (2009) *Podridão do pé do mamoeiro: infestação em solos de cultivo, controle alternativo com indutores de resistência e Trichoderma e avaliação dos mecanismos de defesa envolvidos*. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Recife – PE, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, 121p.
- Terra, C.E.P.S. (2009) *Avaliação de genótipos e indutores de resistência no controle da pinta-preta do mamoeiro*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF.
- Tirilly, Y.; Kloosterman, J.; Sipma, G.; Bosch, J.J.K. van den (1983) A fungi toxic Sesquiterpene from *Hansfordia pulvinata*. *Phytochemistry*, 22(9): 2082-2083.
- Trindade AV (2000) *Mamão produção: aspectos técnicos*. Cruz das Almas BA: EMBRAPA. Comunicação para Transferência de Tecnologia.
- Ueno, B.; Silva, L.P. Avaliação de controlbio (2001) (*Trichoderma* sp) no controle de *Phytophthora palmivora* do mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, V.26, p.387, suplemento.
- Vawdrey, L.L.; Grice, K.R.E.; Westerhuis, D. (2008) Field and laboratory evaluations of fungicides for the control of brown spot (*Corynespora cassiicola*) and black spot (*Asperisporium caricae*) of papaya in far north Queensland, Australia. *Australas Plant Pathology*, 37(6): 552-558.
- Ventura, J.A., Costa, H. & Tatagiba, J.S. (2004) Papaya diseases and integrated control. In: Naqvi, S.A.M.H. (ed.). Diseases of fruits and vegetables: Diagnosis and management. *Netherlands: Kluwer Academic Publishers*. p.201-268.
- Ventura, J.A.; Rezende, J.A.M. (2016) Doenças do mamoeiro. In: Amorim, L., Rezende, J. A. M., Bergamim Filho, A., Camargo, L. F. A. Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas. 5ª. Edição. *Agronômica Ceres*, 497-510.

- Vetrovsky, T.; Kolarik, M.; Zifcakova, L.; Zelenka, T.; Baldrian, P. (2016) The rpb2 gene represents a viable alternative molecular marker for the analysis of environmental fungal communities. *Molecular Ecology Resources*, 16(2): 388-401.
- Videiras, S.I.R.; Groenewald, J.Z.; Nakashima, C.; Braun, U.; Barreto, R.W.; Wit, P.J.G.; Crous, P.W. (2017) Mycosphaerellaceae – Chaos or clarity? *Studies in Mycology*. (87):257-421.
- Vilgalys, R.; Hester, M. (1990) Rapid genetic identification and Mapping of Enzymatically Amplified Ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species *Journal of Bacteriology*, 172(8): 4238-4246.
- Vivas, J.M.S. (2014) *Identificação e caracterização de fungos hiperparasitas de Asperisporium caricae*. Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Vivas, J.M.S.; Silveira, S.F.; Santos, P.H.D.; Pinho, D.B.; Pereira, O.L. (2017) Seleção de fungos com potencial para biocontrole da pinta-preta do mamoeiro. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 47(4): 369-376.
- Vivas, J.M.S.; Vivas, M.; Silveira, S.F. (2015b) Efeito da temperatura sobre o crescimento e esporulação in vitro de fungos hiperparasitas de *Asperisporium caricae*. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 45(1): 73-81.
- Vivas, M.; Silveira, S.F.; Terra, C.E.P.S.; Pereira, M.G. (2011) Testers for combining ability and selection of papaya hybrids resistant to fungal diseases. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11: 36-42.
- Vivas, M.; Silveira, S.F.; Viana, A.P.; Amaral Junior, A.T.; Ferregueti, G.A.; Pereira, M.G. (2015a) Resistance to multiple foliar diseases in papaya genotypes in Brazil. *Crop Protection*, 71: 138-143.
- Vivas, M.; Silveira, S.F.; Vivas, J.M.S.; Pereira, M.G. (2012) Patometria, parâmetros genéticos e reação de progênies de mamoeiro à pinta-preta. *Bragantia*, 71: 235-238.
- Warwick, D.R.N. (2001) Colonização de estromas de *Sphaerodothis acrocomiae* agente causal da lixa grande do coqueiro por *Acremonium persicinum*. *Fitopatologia Brasileira*, 26, (2):220.

- Warwick, D.R.N. (2007) Índices de parasitismo de lixa-grande do coqueiro pelos fungos hiperparasitas: *Acremonium cavaraeanum* e *Dicyma pulvinata* Aracaju: *Embrapa Tabuleiros Costeiros*, 13p.
- Weisenborn, J.L.F.; Kirschner, R.; Piepenbring, M. (2010) *A new darkly pigmented and keratinolytic species of Acremonium Link (hyphomycetes) with relationship to the Plectosphaerellaceae from human skin and nail lesions in Panama*. *Nova Hedwigia*, 90: (3-4):457-468
- White, T. J.; Bruns, T. D.; Lee, S. B.; Taylor, W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: *Academic Press*, p. 315-322.
- Wicklow D.T.; Roth, S.; Deyrup, S.T.; Gloer, J.B. (2005) A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research*, 109(05): 610-618.
- Wu, F.; Wu, G.; Liu, Y.; Tian, T.; Zhang, G.; He, D.; Xu, R.; Zhao, L.; Feng, H.; Wang, W. (2016) Fungal community composition on normal and moldy mural in Xu Xianxiu's tomb of Northern Qi Dynasty, Taiyuan. *Microbiology*, 43(3): 479-487.
- Zambolim, L; Jesus Júnior, W. C. Princípios de controle de doenças de plantas (2014) In. Zambolim, L.; Jesus Júnior, W. C.; Pereira O. L. *O essencial da fitopatologia - epidemiologia de doenças de plantas*. Ed. UFV - Departamento de Fitopatologia. Viçosa, MG. p. 291-367.
- Zambolim, L. Variabilidade genética em fungos (2014) In. Zambolim, L.; Jesus Júnior, W. C.; Pereira O. L. *O essencial da fitopatologia - epidemiologia de doenças de plantas*. Ed. UFV - Departamento de Fitopatologia. Viçosa, MG. p 1-35.
- Zambolim, L.; Vale, F.X.R. do; Monteiro, A.J.A. & Costa, H. (eds). (2002) Controle de doenças de plantas: fruteiras. Viçosa – MG, 2:1023-1170.
- Zare, R. and Gams, W. (2008) A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. *Mycological Research*. 112 (PT 7): 811-824.
- Zare, R.; Gams. W.; Starink-Willemse, M. & Summerbell, R.C. (2007) *Gibellulopsis*, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and *Musicillium*, a new genus for *V. theobromae*. *Nova Hedwigia*, 85:463-489.