

FUNGOS ASSOCIADOS AS LIXAS DO COQUEIRO (*Cocos nucifera*
L.) E POTENCIAL DE BIOCONTROLE

JOSÉ MOREIRA GONÇALVES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO/2020

FUNGOS ASSOCIADOS AS LIXAS DO COQUEIRO (*Cocos nucifera*
L.) E POTENCIAL DE BIOCONTROLE

JOSÉ MOREIRA GONÇALVES

Dissertação apresentado ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Silvaldo Felipe da Silveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO/2020

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

G635 Gonçalves, José Moreira.

FUNGOS ASSOCIADOS AS LIXAS DO COQUEIRO (*Cocos nucifera* L.) E POTENCIAL DE BIOCONTROLE / José Moreira Gonçalves. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

138 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2020.

Orientador: Silvaldo Felipe da Silveira.

I. *Cocos nucifera*. 2. doenças. 3. fungos hiperparasitas. 4. controle biológico. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

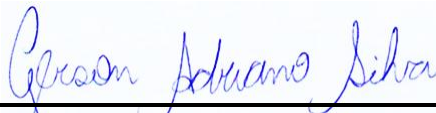
FUNGOS ASSOCIADOS AS LIXAS DO COQUEIRO (*Cocos nucifera*
L.) E POTENCIAL DE BIOCONTROLE

JOSÉ MOREIRA GONÇALVES

Dissertação apresentado ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovado em 02 de março de 2020.

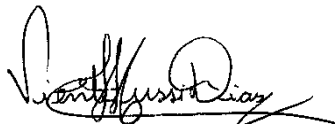
Comissão examinadora:



Prof. Gerson Adriano Silva (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF



Prof. Vicente Martins Gomes (D.Sc., Produção Vegetal) - IFF



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



Prof. Silvaldo Felipe da Silveira (D.Sc., Fitopatologia) - UENF
(Orientador)

Você não sabe o quanto eu caminhei
Pra chegar até aqui
Percorri milhas e milhas antes de dormir
Eu nem cochilei
Os mais belos montes escalei
Nas noites escuras de frio chorei,

A vida ensina e o tempo traz o tom
Pra nascer uma canção
Com a fé do dia a dia encontro a solução
Encontro a solução

Quando bate a saudade eu vou pro mar
Fecho os meus olhos.....

A estrada

(Artista: Cidade Negra)

Aos meus pais Isaulina Moreira Gonçalves (*in memoriam*) e Sivaldo Gonçalves Neto, por todo amor e carinho.

DÉDICO

À todos que se esforçaram para que eu chegasse até aqui.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Jesus.

A Nossa Senhora, Maria, mãe do salvador.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF e ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias – CCTA, pela oportunidade e realização do curso de Mestrado em Produção Vegetal.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudo.

Aos professores do Departamento de Geografia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, por terem me dado a chance de cursar o mestrado, sem vocês não estaria aqui.

Aos colegas do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia e do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, em especial a Prof.^a Dr.^a Maura da Cunha, o Dr. Saulo Pireda e a colaboradora Marcela, obrigado pelo apoio e atenção.

Ao Laboratório de Ciências Química, em nome do Professor Rodrigo Rodrigues e colaboradores.

Ao professor Silvaldo Felipe da Silveira, meus sinceros agradecimentos, por me proporcionar a viver uma experiência surreal. Obrigado pela confiança, dedicação e compreensão, sobretudo diante das minhas limitações.

Aos tchuris da Clínica Fitossanitária, Gleyce Kelly, Marcelo e Beatriz, pelo convívio e AMIZADE, por terem participado desse momento tão sublime em minha vida. Agradeço ao Dr. Vicente Mussi, profissional dedicado, amigo e sobretudo humano, com um coração gigante e acolhedor.

As minhas tchucas de residência (Casa dos amiguzus felizes), Carla Caroline e Vanessa Batista, muitíssimo obrigado por compartilhar e doar um pouco do carinho e amor que vocês transbordam.

Aos meus funguitus (fungos), meus sinceros agradecimentos e estima, vocês não sabem o quanto me fizeram feliz.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), por acreditar na importância desse projeto e auxiliar a pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Cultura do coqueiro (<i>Cocos nucifera</i> L.)	5
2.1. Doenças e “Lixas” do coqueiro	8
2.2. Hiperparasitas como agentes de biocontrole de doenças foliares.....	11
3. TRABALHOS	14
3.1. Isolamento e caracterização morfológica de fungos associados a lixas do coqueiro (<i>Cocos nucifera</i> L.)	14
3.1.1. RESUMO.....	14
3.1.2. ABSTRACT	16
3.1.3. INTRODUÇÃO	17
3.1.4. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1.5. RESULTADOS	22
3.1.6. DISCUSSÃO	52
3.1.7. CONCLUSÃO.....	57
3.1.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	58
3.2. Colonização e antagonismo de fungos <i>Acremonium</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp. a fungos associados aos estromas de lixa grande do coqueiro (<i>Cocos nucifera</i> L.)	64
3.2.1. Resumo.....	64
3.2.2. Abstract.....	65
3.2.3. INTRODUÇÃO	67

3.2.4. MATERIAIS E MÉTODOS	70
3.2.5. RESULTADOS.....	76
3.2.6. DISCUSSÃO.....	101
3.2.7. CONCLUSÃO	105
3.2.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	111
5. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICAS GERAL	113

RESUMO

GONÇALVES, J. M.; MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF); Março de 2020; “Fungos associados as lixas do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) e potencial de biocontrole”; Orientador: Ph.D. Silvaldo Felipe da Silveira.

O coqueiro é vastamente cultivado na maioria das unidades federativas do Brasil, principalmente nas regiões costeiras, garantindo renda aos cocoicultores por meio da comercialização do coco-fresco para consumo da água, para indústria envasadora de água-de-coco e dos demais subprodutos. No litoral fluminense, a cocoicultura e sua cadeia produtiva são comprometidos por problemas fitossanitários, sendo as doenças fúngicas foliares as mais danosas, destacando-se as “Lixas”, grande e pequena, causadas pelos ascomicetos *Camarotella acrocomiae* e *Camarotella torrendiella*, respectivamente. As lixas do coqueiro provocam queima dos folíolos e queda de folhas e de frutos, reduzindo o potencial econômica da cultura. Não há registros no Brasil de fungicidas para o controle destas doenças na cultura do coqueiro, embora, pulverizações de fungicidas sistêmicos via aplicações axilar tem demonstrado eficiência. Trabalhos anteriores conduzidos na baixada fluminense relatam o estabelecimento no campo de fungos hiperparasitas colonizando estromas das lixas do coqueiro. Entretanto, faltam estudos atuais sobre a diversidade taxonômica dos fungos hiperparasitas em estromas de lixas, sobre sua capacidade parasítica em estromas de lixas e se esta correlaciona-se com a redução no progresso das epidemias. Neste trabalho, objetivou-se: obter e manter isolados de fungos hiperparasitas de estromas de lixas do coqueiro; identificar e caracterizar as culturas puras obtidas quanto à morfologia e quanto à capacidade parasítica em estromas de lixas, visando-se selecionar potenciais agentes de biocontrole das lixas. Foram obtidos 25 fungos associados aos estromas de lixas do coqueiro, a partir de amostras de folíolos infestados

procedentes de diferentes regiões de Campos dos Goytacazes - RJ, Quissamã - RJ, Mimoso do Sul – ES. Após caracterização morfológica, estes foram classificados em nível de gênero: 16 isolados em *Acremonium* (CF/UENF450, CF/UENF451, CF/UENF452, CF/UENF453, CF/UENF454, CF/UENF455, CF/UENF456, CF/UENF457, CF/UENF458, CF/UENF459, CF/UENF460, CF/UENF461, CF/UENF462, CF/UENF463, CF/UENF464, CF/UENF465); dois em *Trichoderma* (CF/UENF466, CF/UENF467), e um mais um isolado de cada gênero em *Paecilomyces* (CF/UENF468), *Fusarium* (CF/UENF470), *Cladosporium* (CF/UENF471), *Curvularia* (CF/UENF472), *Pestalotiopsis* (CF/UENF473) e *Lasiodiplodia* (CF/UENF474), bem como uma cepa de levedura não-identificada (CF/UENF469). Ao se verificar o efeito da temperatura no crescimento e esporulação dos microrganismos selecionados, a maioria dos isolados de *Acremonium* cresceram bem e esporularam com ótimos entre 20 e 25 °C e não cresceram a 35°C; *Trichoderma* e *Paecilomyces*, cresceram bem entre 15 e 30°C, sendo que *Paecilomyces* e um isolado de *Trichoderma* (CF/UENF467) apresentaram crescimento a 35°C. A levedura apresentou crescimento máximo entre 25°C e 30°C. Em dois ensaios de colonização de estromas em folíolos destacados, utilizando-se uma concentração de 10⁶ conídios.mL⁻¹ como inóculo aplicado via atomização, os isolados CF/UENF 461 (*Acremonium* sp.) e CF/UENF 467 (*Trichoderma* sp.) foram os mais promissores. Em estudo de antibiose *in vitro* contra fungos pertencentes à microbiota contaminante de estromas (*Fusarium* sp., *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Lasiodiplodia* sp.), constatou-se que os isolados de *Acremonium* (CF/UENF455, CF/UENF459, CF/UENF461, CF/UENF463) e de *Trichoderma* (CF/UENF466 e CF/UENF467) apresentaram atividade inibitória contra todos os fungos confrontados. Porém os fungos contaminantes *Pestalotiopsis* sp. e *Lasiodiplodia* sp. foram pouco inibidos pelos demais isolados hiperparasitas de lixas do coqueiro testados. Conclui-se haver uma grande diversidade de fungos hiperparasitas e contaminantes associados a estromas de lixas do coqueiro na região. Alguns dos isolados de *Acremonium* e de *Trichoderma* apresentaram-se como potenciais agentes de biocontrole das lixas do coqueiro, o que deverá ser avaliado a campo no futuro.

Palavras-chave: *Cocos nucifera*, doenças, fungos hiperparasitas, controle biológico.

ABSTRACT

GONÇALVES, J. M.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). February, 2019. Fungi associated with coconut (*Cocos nucifera* L.) bands and biocontrol potential. Advisor: Prof. Dr. Silvaldo Felipe da Silveira.

The coconut tree is widely cultivated in most of the federative units of Brazil, mainly in the coastal regions, guaranteeing income to coconut farmers through the commercialization of fresh coconut for water consumption, for the bottling industry of coconut water and other by-products. On the coast of Rio de Janeiro, coconut cultivation and its production chain are compromised by phytosanitary problems, with foliar fungal diseases being the most damaging, especially the “Lixas”, large and small, caused by the ascomycetes *Camarotella acrocomiae* and *Camarotella torrendiella*, respectively. The sandpaper of the coconut tree causes the burning of the leaflets and the fall of leaves and fruits, making the economic exploitation of the crop unfeasible. There are no records in Brazil of fungicides for the control of these diseases in coconut cultivation, although systemic fungicide sprays via axillary applications have shown efficiency. Previous work carried out in the Baixada Fluminense region reports the establishment in the field of hyperparasitic fungi colonizing stroma of the sandpaper of the coconut tree. However, there is a lack of current studies on the taxonomic diversity of hyperparasitic fungi in sandpaper stroma, on their parasitic capacity in sandpaper stroma and whether this correlates with the reduction in the progress of epidemics. In this work, the objective was: to obtain and maintain isolated from hyperparasitic fungi of sandpaper stroma of coconut palm; identify and characterize the pure cultures obtained in terms of morphology and parasitic capacity in sandpaper stroma, aiming to select potential

sandpaper biocontrol agents. Twenty-five fungi associated with coconut palm stroma were obtained from samples of infested leaflets from different regions of Campos dos Goytacazes - RJ, Quissamã - RJ, Mimoso do Sul - ES. After morphological characterization, these were classified in gender level: 16 isolates in *Acremonium* (CF/UENF450, CF/UENF451, CF/UENF452, CF/UENF453, CF/UENF454, CF/UENF455, CF/UENF456, CF/UENF457, CF/UENF458, CF/UENF459, CF/UENF460, CF/UENF461, CF/UENF462, CF/UENF463, CF/UENF464, CF/UENF465): two in *Trichoderma* (CF/UENF466, CF/UENF467), and one plus one isolate of each genus in *Paecilomyces* (CF/UENF468), *Fusarium* (CF/UENF470), *Cladosporium* (CF/UENF471), *Curvularia* (CF/UENF472), *Pestalotiopsis* (CF/UENF473) and *Lasiodiplodia* (CF/UENF474), as well as an unidentified yeast strain (CF/UENF469). When verifying the effect of temperature on the growth and sporulation of the selected microorganisms, most of the *Acremonium* isolates grew well and sporulated with optimum between 20 and 25 ° C and did not grow at 35 ° C; *Trichoderma* and *Paecilomyces*, grew well between 15 and 30°C, with *Paecilomyces* and a *Trichoderma* isolate (CF/UENF467) growing at 35°C. Yeast showed maximum growth between 25°C and 30°C. In two stromal colonization assays in detached leaflets, using a concentration of 10⁶ conidia.mL⁻¹ as an inoculum applied via atomization, isolates CF/UENF 461 (*Acremonium* sp.) And CF/ ENF 467 (*Trichoderma* sp.) were the most promising. In an in vitro antibiosis study against fungi belonging to the stromal contaminating mycobiota (*Fusarium* sp., *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp., *Pestalotiopsis* sp. And *Lasiodiplodia* sp.), It was found that isolates of *Acremonium* (CF / UENF455, CF / UENF459, CF / UENF461, CF / UENF463) and *Trichoderma* (CF / UENF466 and CF / UENF467) showed inhibitory activity against all confronted fungi, however the contaminating fungi *Pestalotiopsis* sp. and *Lasiodiplodia* sp. Were little inhibited by the other hyperparasitic isolates of sandpaper of tested coconut palm It is concluded that there is a great diversity of hyperparasitic fungi and contaminants associated with stroma of sandpaper of coconut palm in the region. Some of the *Acremonium* and *Trichoderma* isolates presented themselves as potential biocontrol agents for coconut sandpaper, which should be evaluated in the field in the future.

Keywords: *Cocos nucifera*, diseases, hyperparasitic fungi, biological control.

1. INTRODUÇÃO

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma palmeira essencialmente tropical com grande expansão para terras baixas e litorâneas em regiões subtropicais do globo terrestre. Ao longo do seu ciclo, a cocoicultura ocupa mão de obra significativa para o manejo da cultura, e em toda cadeia de produção dos seus diversos produtos e derivados, gerando emprego e renda no meio rural, na indústria e no comércio (Brainer, 2018).

Conforme dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* – FAO, em 2019, os maiores produtores do coqueiro no cenário mundial são os países do Sul da Ásia (destacando a Indonésia, Filipinas e Índia) seguidos do Brasil e demais países. Dentre os produtos derivados dos frutos, a cobra ou amêndoa (polpa seca), utilizada para extração do óleo vegetal ou óleo de coco, é o principal produto e o de mais alto valor econômico no mercado internacional (Benassi et al., 2013; Brainer, 2017, FAO, 2020).

No Brasil, o leite de coco e o coco ralado são os principais produtos industriais derivados da copra. Contudo, subprodutos como a farinha, o próprio óleo, a água de coco, além da torta (destinado à nutrição animal) são igualmente explorados economicamente pelos produtores (Aragão & Ribeiro Melo, 2010; Fontes, 2010). Já, a comercialização do coco verde para atender o mercado crescente de água de coco tornou-se o principal seguimento comercial visando atender ao turismo praiano, resultando na expansão da cocoicultura para regiões costeiras do Sul, Sudeste, Norte e Nordeste do país (Benassi et al., 2013; Martins et al., 2014).

Com a consolidação do cultivo e o aumento do consumo de coco no país, do início de 1980 até os dias atuais, houve expansão da utilização de insumos

químicos e orgânicos e de sistemas de irrigação, dentre outras tecnologias que propiciam maior produtividade e qualidade da produção de coco brasileira (Cavalcante, 2016). Contudo, o coqueiro sofre frequentemente ataque de pragas e é acometido por muitas doenças, notadamente, doenças foliares. Dentre as doenças de importância econômica na cultura do coqueiro no Brasil, as “lixas”, causadas pelos fungos *Camarotella torrendiella* (Batista) Bezerra & Vitória (lixa-pequena) e *Camarotella acrocomiae* (Mont.) K.D. Hyde & P.F. Cannon (lixa-grande), são consideradas as doenças foliares mais importantes em várias regiões produtoras, de modo especial no sul da Bahia e no norte e noroeste fluminense (Warwick, 2003; Vitória et al., 2008; Monteiro et al., 2013; Araújo et al., 2016).

O controle das lixas do coqueiro é conduzido preventivamente com retiradas das folhas infectadas e uma boa adubação, juntamente ao controle químico. Warwick et al. (2001) recomendam pulverização de cyproconazole e propiconazole a cada quinze dias, alcançando a redução da taxa de desenvolvimento visando ao controle da lixa grande. Todavia, atualmente, só existem dois fungicidas autorizados no Brasil para o controle da queima das folhas e da helmintosporiose, via pulverização: difenoconazol (triazol) e tiabendazol (benzimidazol) (Souza, 2017). No Brasil, não há registro de fungicidas comerciais para o controle das lixas do coqueiro. Ademais, a pulverização de fungicidas esbarra em limitações decorrentes da falta de tecnologia apropriada de aplicação, considerando-se a estrutura elevada e a filotaxia da palmeira (Monteiro et al., 2013).

Devido a ocorrência crescente de fungos patogênicos cada vez mais resistentes aos fungicidas sistêmicos modernos, os mais usados atualmente, bem como as dificuldades de se proteger quimicamente plantas de maior porte, como o coqueiro, acredita-se que o controle biológico deva ser avaliado como uma alternativa atraente e potencialmente sustentável para o combate das lixas do coqueiro.

Microrganismos antagonistas de patógenos vegetais com potencial para reduzir inóculo e atividade patogênica em plantas e no solo têm sido pesquisados e atualmente existem vários produtos de biocontrole de doenças registrados no Brasil e no mundo (Michereff et al., 2005; Bettiol et al., 2009; Machado et al., 2012). Dentre os microrganismos empregados no biocontrole de doenças de plantas, *Trichoderma* spp. se destacam no cenário mundial e nacional e especialmente para o controle de patógenos do solo (Benitez et al., 2004; Bettiol et al., 2009). Para o

controle de patógenos foliares, existem trabalhos indicando o uso de *Gliocladium* spp. (Tarantino et al., 2007; Lisboa et al., 2007; Hamann, 2011), *Verticillium* (Melo & Azevedo, 1998), *Acremonium* spp. (Sudo, 1989; Warwick, 2001; Vivas et al., 2018), *Dicyma pulvinata* (Berk & M.A. Curtis) Arx [syn. *Hansfordia pulvinata* (Berk & Curtis)] (Junqueira, 1986, 1991; Warwick, 2001; Melo et al. 2007; Vivas et al., 2018), dentre outros fungos, além de leveduras (França et al., 2015; Heling et al., 2017), bactérias e actinomicetos (Minotto et al., 2016).

Estudos desenvolvidos por Sudo et al. (1989) conduzidos em campos experimentais, na década de 80, indicam a existência de fungos hiperparasitas identificados como *Acremonium alternatum* e *Acremonium persicinum*, de ocorrência natural e que poderiam ser usados no controle das lixas do coqueiro, com resultados considerados satisfatório pelos autores. Estudando as características dos fungos hiperparasitas, Warwick (2001) relatou a colonização dos estromas em folíolos como indicativo de parasitismo e de controle das lixas no campo. Segundo a autora, a colonização pela pulverização dos fungos citados acima no campo é maior quando esses foram aplicados no período vespertino, em época chuvosa. Junqueira et al. (1986) recomendam o micoparasita *Hansfordia pulvinata* para o controle de *Microcyclus ulei*, agente causal do mal das folhas da seringueira (*Hevea brasiliensis*). Os autores observaram redução da incidência da doença nos folíolos em seringais policlonais na região amazônica, após a aplicação de uma solução concentrada de 2×10^5 conídios.ml⁻¹ aos 6 dias depois da inoculação de uma raça virulenta de *M. ulei* nos clones Fx 3925 (*H. brasiliensis* x *H. benthamiana*) e Fx 4096 (*Hevea brasiliensis*), respectivamente.

Contudo, estudos relacionados ao desenvolvimento e o uso de hiperparasitas na redução da incidência das lixas do coqueiro são insuficientes e, comercialmente não existem produtos de biocontrole comerciais ou formulados. Há necessidade de se ampliar a pesquisa de prospecção, de identificação, de produção massal de agentes de biocontrole de doenças, em geral. Várias das pesquisas anteriores se sustentam em relatos e observações de campo, que necessitam de um embasamento científico mais aprofundado. Por exemplo, a simples presença de sinais de fungos hiperparasitas sobre estromas pode ser considerado controle de doença, ao ponto de reduzir a produção do inóculo do patógeno e de conter epidemias no campo? As aplicações de hiperparasitas em

estromas de lixas do coqueiro controlariam economicamente as doenças, reduzindo seus danos, a ponto de salvaguardar a produção?

Neste contexto, objetiva-se, nesta dissertação, alavancar os trabalhos de biocontrole das lixas do coqueiro no Brasil. Primeiramente, objetiva-se obter e manter isolados de fungos hiperparasitas de estromas de lixas do coqueiro. Num segundo momento, identificar e caracterizar as culturas puras obtidas e avaliá-las quanto ao hiperparasitismo/capacidade parasítica a estromas de lixas de coqueiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultura do coqueiro (*Cocos nucifera* L.)

O coqueiro (*Cocos nucifera* L) é uma frutífera tropical, encontrada na Ásia, África, América Latina e região do Pacífico (Siqueira et al., 2002; Neto, 2014). Em meios a distintas teorias a respeito do exórdio do coqueiro, a hipótese mais condizente é que a região Sudeste Asiático seja o provável centro de origem, provavelmente nas ilhas entre os oceanos Índico e Pacífico, que compreende uma vasta área que se estende da Malásia à Nova Guiné.

Num momento posterior, sementes e/ou mudas foram levados para a Índia e em seguida introduzido no leste africano, passando para as Américas (Purseglove, 1972; Child, 1974; Ohler, 1984; Aragão et al., 2010; Benassi et al., 2013), ganhando novas extensão do globo terrestre, chegando ao Brasil, especificamente na região da Bahia, em meados de 1553, com material procedente da Ilha de Cabo Verde, trazidos pelos portugueses, daí a denominação popular de “Coco-da-baía”. Da Bahia e do Nordeste, o coqueiro disseminou-se por quase todas as unidades federativas do país, recebendo uma atenção especial no Sudeste, Norte e Centro-Oeste, incluindo alguns plantios em terras baixas no Sul (Ferreira et al., 1998; Martins et al., 2014).

No território brasileiro, as maiores plantações estão na faixa litorânea, desde o Estado do Pará até o Rio de Janeiro, mas o coqueiro é encontrado também no estado de Roraima até o Paraná, com exceção dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina em decorrência das condições climáticas (Monteiro, 2009; Martins

et al., 2014). De acordo com a FAO (2018), a produção nacional de coco aumentou significativamente, entre os anos de 1961 até os dias atuais, conforme dados abaixo (Gráfico 1), alcançado níveis elevados, por conta do aumento da demanda, principalmente do consumo “*in natura*”, tornando-se o quarto maior produtor no cenário internacional, com uma produção estimada em 2.649.246 t, em uma área plantada de 234.012 mil há, no ano de 2016. A região do Nordeste é responsável por aproximadamente 73,5% da produção brasileira, com o estado da Bahia, despontando como a maior produtor, representando 31% da produção nacional (Santos, 2018; FAO, 2018).

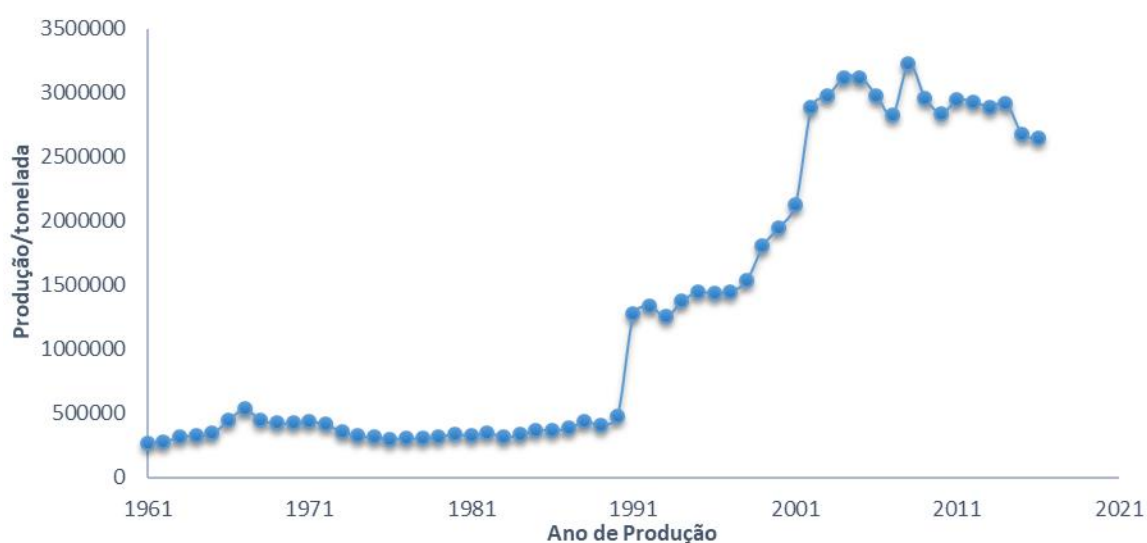


Gráfico 1. Produção de coco no Brasil entre os anos de 1961 a 2016. Fonte: FAO, 2018.

O estado do Rio de Janeiro, em 2017, ocupava a nona colocação em números de produção. A mesorregião do Norte Fluminense, detém 57% da produção fluminense. As cidades de Macaé (26%), Quissamã (26%) e a capital Rio de Janeiro (12%), são as regiões com maior produção, seguida dos municípios da Baixadas, Lagos, Itaguaí e Campos dos Goytacazes, este último produziu no mesmo ano, 5% em relação as demais urbes (FAO, 2018).

De acordo com Miranda (2017) ao correlacionar os empregos gerados na atividade da cocoicultura, pesquisas na área relatam que em cada 1 ha de coco plantado, ocupa em média, 3 pessoas em emprego direto e que em cada emprego direto origina 4 empregos indiretos. Estima-se que no ano de 2017, com uma área plantada de 215.683 mil ha (IBGE, 2017), foram gerados em torno de 647.049

empregos diretos e 2.588.196 empregos indiretos ao longo da cadeia produtiva do coco.

O coqueiro, *Cocos nucifera L.*, é uma espécie arbórea, perene, pertence à ordem *Palmales*, é uma entre aproximadamente 2.600 espécies da família das Palmáceas (*Aracaceae*), da subfamília *Cocoideae*, classe *Monocotyledoneae* (Virtual Palm Encyclopedia, 2009; Loiola, 2014; Santos, 2018). O gênero *Cocos* inclui cerca de 60 espécies, espalhadas na América Central e América do Sul (Benassi, 2013). As variedades mais importantes do ponto de vista socioeconômico e agroindustrial, estão a variedade típica Nar., (gigante) e a variedade nana Griff., (anã) (Purseglove, 1975; Martins et al., 2014; Benassi, 2013).

A variedade gigante, caracterizada por ser uma planta alógama (fecundação cruzado), rústica, de crescimento rápido, de germinação lenta, de fase vegetativa longa que inicia a floração aos 10 anos, de porte elevado podendo atingir de 20 a 30m de altura, produz de 50 a 80 frutos/planta/ano geralmente, tempo de vida útil de exploração da planta pode variar de 60 a 70 anos. No Brasil, os frutos são usados na forma “*in natura*” para uso culinário e a copra é usada na fabricação de derivados na agroindústria de alimentos. As principais subvariedades existentes no Brasil são: Gigante da praia do forte, Gigante do oeste africano, Gigante de renell, Gigante da malásia e Gigante da costa oeste (Mirisola Filho, 2002; Fontes et al., 2002; Bourdeix et al., 2005; Gunn et al., 2011; Martins, 2011).

A variedade Anã, é autógama; possui crescimento lento; produz cerca de 150 a 200 frutos/planta/ano; atinge de 10 a 12m de altura; inicia produção entre 2 a 3 anos; sua vida útil está entre 30 e 40 anos; e os frutos são mais adequados a ao consumo “*in natura*” e ao uso agroindustrial para produção de água de coco; sendo as subvariedades comerciais mais conhecidas: Anão verde de jiqui, Anão verde da malásia, Anão verde do brasil, Anão vermelho do brasil, Anão amarelo do brasil (Mirisola Filho, 2002; Fontes et al., 2002; Bourdeix et al., 2005; Gunn et al., 2011; Martins, 2011).

Diante da necessidade de cultivar exemplares de coqueiros vigorosos e produtivos, foi lançada no mercado o híbrido intervarietal, obtido do cruzamento de variedades anãs com gigantes. Plantas de coqueiros híbridos possuem características intermediária entre a variedade anã e o gigante: florescem aos 7 anos; atingem até 20 m de altura; podem produzir de 130 a 150 frutos/plantas/ano; os frutos são adequados ao consumo “*in natura*”, para fins de produção de fibras e

polpa (albúmen sólido) e para indústria (Sangare et al., 1988; Ferreira et al., 1998; Mirisola Filho, 2002; Fontes et al., 2002; Lins et al., 2003; Bourdeix et al., 2005; Gunn et al., 2011; Martins, 2011; Nunes, 2015).

2.1. Doenças e “Lixas” do coqueiro

O coqueiro é uma cultura susceptível ao ataque de diversos fitopatógenos, os quais provocam uma ampla diversidade de doenças: Mancha-foliar ou helmintosporiose (*Bipolaris incurvata* Drechs), na fase de mudas; Podridão-do-olho (*Phytophthora* sp. (Butier)), em épocas e regiões chuvosas; Queima das folhas (*Lasiodiplodia theobromae* Subileau.), em regiões quentes e secas; Anel-vermelho (*Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard); Murcha-de-phytomonas (*Phytophthora* sp.); Podridão-seca-do-olho (agente causal desconhecido, acredita-se que parece ser fitoplasma ou vírus) (Warwick, 2001); Lixa grande (*Camarotella acrocomiae* (Mont.) K.D. Hyde & P.F. Cannon); Lixa pequena (*Camarotella torrendiella* (Batista) Bezerra & Vitória); resinose ou podridão do estipe (*Ceratocystis paradoxa*) (Vitória, 2007; Warwick et al., 2009), dentre outras.

Dentre as doenças foliares importantes em coqueirais adultos, a Lixa grande (LIG) e Lixa pequena (LIP) se destacam nas regiões costeiras do Sul da Bahia e do Sudeste, sendo responsáveis por reduções do número de folhas e de até 50% de produção (Warwick, 2001; Vitória, 2007; Monteiro et al., 2013). As duas espécies tropicais de *Camarotella*, que atacam o coqueiro ocorrem em todas as regiões brasileiras onde se cultiva o coqueiro (Cannon, 1991; Vitória et al., 2008). As lixas incidem nas folhas e/ou nos frutos da palmeira e são consideradas de grande importância econômica, provocando a desfolha prematura, comprometendo o desenvolvimento do fruto, por conta do enfraquecimento físico e fisiológico de seus cachos, em consequência da redução da área foliar fotossinteticamente ativa (Araújo et al., 2016).

A lixa pequena foi diagnóstica e descrita pela primeira vez no Estado de Pernambuco, no ano de 1940, como “verrugose do coqueiro” (Garcia et al., 1999). Hoje em dia encontra-se disseminada em todas regiões onde a cultura está presente no país, causando prejuízos. No início das lavouras, os sintomas podem passar despercebidos, mas acentuando nos anos de início de produção, causando

redução do número de folhas e perdas de produção (Subileau, 1993; Mirisola Filho, 2002). No exterior, a verrugose ou lixa pequena já foi relatada em Cuba, Chile, Guiana Francesa, Paraguai (Hyde & Cannon 1999; Araújo et al., 2016). No Brasil é considerada a doença foliar mais importante que ataca a cultura nos Estados de Pernambuco, Pará, Alagoas, Ceará, Rio Grande do Norte, Sergipe, no Sul da Bahia e no Nordeste do Rio de Janeiro e Espírito Santo (Warwick et. al, 2001, 2003; Monteiro et al. 2013; Siqueira, 2013; Araújo et al., 2016; Souza, 2017).

A LIP é mais agressiva que a LIG, se manifesta em plantas adultas, quando elas atingem o pleno estágio de produção. Nas folhas inferiores surgem manchas necrosadas em alta frequência ao longo da nervura central nos folíolos, que no decorrer do tempo secam. Quando o ataque é severo, induz seca e desfolha, reduzindo o número de folhas e os cachos, por consequência, ficam sem sustentação, o que prejudica o desenvolvimento, afetando diretamente a produtividade (Warwick et. al, 2001, 2003, Mirisola Filho, 2002, Araújo et al., 2016).

A sintomatologia da doença é caracterizada por apresentar pequenos pontos negros, que são os estromas do fungo, ocorrendo em folíolos, ráquis e frutos. Os estromas aparecem isolados, em linhas ou aglomerações, na forma de losango, e se formam principalmente na face superior do limbo foliar (EMBRAPA, 1993; Mirisola Filho, 2002; Araújo et al., 2017).

O agente etiológico da lixa pequena é um fungo pertencente ao Filo Ascomycota, espécie *Camarotella torrendiella* (Batista) Bezerra & Vitória. Nos folíolos de coqueiro, produz estromas negros ascígeros, brilhantes, circulares, isolados em linhas ou coalescentes, uniloculados, formando os cordões estromáticos seguindo a direção das nervuras. As hifas vegetativas do fungo colonizam os tecidos epidérmicos, estromatizando-os, progredindo para os tecidos subjacentes e chega no parênquima circunvizinho que mais tarde tornam-se necrosados (Franco, 1965; Vitória et al., 2008; Araújo et al., 2016).

Os estromas se formam unicamente na face superior da folha (adaxial) e se apresenta em duas fases, 1ª fase espermogônica e a 2ª fase peritécica. Os peritécios quando maduros, contêm ascos com 8 ascósporos unicelulares, hialinos, com dimensões de 19 a 25 µm de comprimento e 7,5 a 10 µm de largura, formando-se em meio a paráfises filamentosas. Os peritécios aparecem após a formação dos espermagônios, ficando mais ao centro da lesão, com estruturas estromáticas esféricas de 600 a 2000 µm de diâmetro e de 100 a 800 µm de altura, mais o menos

globosos, contendo esporos filiformes, hialinos que não reproduzem doença, servindo para a fecundação do oogônio (Renard, 1982; Garcia et al., 1990).

Em condições favoráveis, como alta umidade relativa do ar e sob temperaturas baixas, ocorre o rompimento dos ascos e liberação dos ascósporos, que são disseminados pelo vento, água e materiais contaminados (EMBRAPA/CPATC, 1993).

O agente etiológico *Camarotella torrendiella* é um fungo originário da América do Sul, tendo evoluído provavelmente em alguma palmeira silvestre, entre suas hospedeiras nativas, estão: *Allagoptera brevicalyx* Moraes (caxandó/buriti-de-praia), *Acrocomia aculeata* (jacq.) Lodd. Ex Mart. (macaúba), *Acrocomia* sp., *Astrocaryum* sp., *A. funifera* Mart. Ex Spreng. (piaçava), *A. geraensis* Barb. Rodr. (Indaiá-do-cerrado), *Bactris ferruginea* Burret (mané véio) *Butia capitata* (Mrat.) Becc. (guariroba do campo), *Butia yatay* (Mrat.) Becc. (yataí), *C. nucifera*, *Cocos* sp., *Jubaea Chilensis* (Molina) Baill, *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. (licuri), *S. picrophylla* Barb. Rodr. (coco de quaresma)(Von Arx & Muller, 1954; Bezerra, 1982,1989; Hyde & Cannon, 1999; Warwick et al, 2002; Vitória et al., 2008). Não se sabe como o fungo rapidamente adaptou-se ao hospedeiro introduzido *Cocos nucifera* L..

Analogamente a LIP, o fungo causador da LIG é um Ascomiceto da espécie *Camarotella acrocomiae* (Mont.) K.D. Hyde & P.F. Cannon da Ordem Sphaeralies. A doença manifesta-se sobre o limbo, na nervura dos folíolos e na ráquis foliar, formando peritécios grossos de coloração marrons, rugosos, circulares, multiloculados, podendo atingir 2 mm de diâmetro, geralmente estão presente de forma isolada, em linha ou coalescentes na área afetada. Os estromas são encontrados em ambas as faces, em posições coincidentes e os peritécios quando maduros, contêm ascos com 8 ascósporos unicelulares, ovalados e pardos, em meio a paráfises basais (Renard, 1982; Garcia et al., 1990).

Para o controle tanto da lixa grande quanto da lixa pequena, são usadas técnicas de manejo semelhantes, desde a eliminação periódica queima das folhas infectadas; a adubação mineral com efeito sobre a incidência da lixa no primeiro ano de plantio (Leal *et al*, 1994). Recomenda-se a utilização de produtos protetores, com aplicações intercaladas de 20 a 40 dias, com a cobertura total das folhas (EMBRAPA/CPATC, 1994; Mirisola Filho, 2002, Warwick et al, 2002).

Monteiro et al., (2013) e Souza (2017) avaliaram a eficiência do controle químico de doenças foliares do coqueiro no Norte Fluminense pela aplicação axilar de fungicidas sistêmicos. Dentre inúmeros produtos testados, concluíram que os triazóis, à base de cyproconazol e flutriafol, foram os mais eficientes quando aplicados por via axilar. Os autores obtiveram aumentos significativos no número de folhas por planta e ótimo controle das lixas, com reflexos positivos na produtividade e com retornos econômicos razoáveis e consistentes. Todavia, ambos os fungicidas recomendados, de um mesmo grupo químico, apresentam mesmo mecanismo de ação (DMI's ou inibidores da síntese do ergosterol), o que propicia ao surgimento de biótipos resistentes na população dos patógenos. Acredita-se que mesmo por esta via de aplicação, havendo o registro dos produtos, estes podem perder a eficácia ao longo dos anos.

2.2. Hiperparasitas como agentes de biocontrole de doenças foliares

Diante da problemática notória, especialmente pelo acréscimo dos custos do controle químico, redução da biodiversidade, eliminação de organismos benéficos, desequilíbrio biológico, perda de eficiência de alguns produtos comerciais, os quais podem ocasionar no surgimento da resistência do patógeno, pragas e plantas invasoras a certos princípios ativos, suscitando aparecimento de doenças iatrogênicas (motivadas pelo uso intensivo de agrotóxicos) (Bettiol, 2009), evidencia-se a necessidade de se estabelecer alternativas ao controle químico de doenças de plantas.

Portanto, o controle biológico, é uma alternativa bem aceita e de maior sustentabilidade, havendo já no mercado brasileiro e internacional diversos fungicidas comerciais de base biológica registrados para culturas de maior porte, tais como: AGROTRICH® (Seis cepas de *Trichoderma* spp.) para o controle de *Phytophthora*, *Verticillium*, *Phomopsis* e *Roselinia*; POLYVERSUM® (*Pythium oligandrum*) indicado para controlar *Alternaria brassicae*, *Sclerotinia*, *Splwerotheca humulil*, *Tilletia caries*, *Plasmodiophora brassicaceae*; TRICHODERMIL® (*Trichoderma harzianum* ESALQ-1306 e ESALQ-1303) recomendado para manejo de *Rhizoctonia*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora palmivora*, *Botrytis ricini*, *Fusarium* spp. (Paulo Júnior et al., 2009).

O termo “Controle Biológico” é definido como a “uma redução da soma do inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismo que não o homem” (Cook & Baker, 1983).

No Brasil, diversos produtos biológicos são comercializados, dentre eles estão: Cepas hipovirulentas de CTV, usado para pré-imunização e proteção cruzada contra a tristeza dos citros; cepas hipovirulentas de PRSV-W para pré-imunização contra o mosaico da abobrinha; *Clonostachys rosea*, *Paecilomyces*, *Pochonia*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma stromaticum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma* spp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus licheniformis* para o controle de patógenos de solo, substrato e da parte aérea (Bettiol et al., 2014). *Hansfordia pulvinata*, *Acremonium* sp., são micoparasitas em fase de testes para o biocontrole da pinta preta (*Asperisporium caricae*) do mamoeiro (Vivas, 2018).

Estudos clássicos de Sudo et al. (1989), no Brasil, trazem evidências de que as lixas do coqueiro sofrem hiperparasitismo natural e podem ser controladas pela aplicação massal de inimigos naturais. Em estudos conduzidos na Faz. Mangereba, no Município de Lucena, PB, os autores detectaram a ocorrência natural de lixa pequena e grande hiperparasitadas por outros fungos, os quais foram isolados e identificados em *Acremonium alternatum* Liink e *Acremonium persicinum* (Nicot.). Testes realizados em laboratório e no campo, evidenciaram a capacidade desses fungos colonizarem os estromos das lixas do coqueiro, constatando o 1º relato de controle biológico dos agentes causal das lixas por microrganismos hiperparasitas no país (Sudo et al., 1989).

O hiperparasitismo pode ser de forma obrigatório ou facultativo, no qual a ocorrência consiste no parasitismo de uma espécie por uma outra espécie de microrganismo, podendo existir diversos níveis de hiperparasitismo. Esse pode ser secundários, onde se desenvolvem em um parasitoide primário; terciários, quando se crescem em um parasitoide secundário, ou quaternários, quando se multiplicam em um parasitoide terciário (Aguiar Menezes, 2003; Gasparotto, 2016).

Dicyma pulvinata foi relatada pela primeira vez na Índia, hiperparasitando *Isariopsis indica* K.R.G.Nair e em espécies de *Cercospora* Fresen (Rathaiiah & Pavgi, 1971; Krishna & Singh, 1979). No Brasil, espécies pertencentes ao gênero foram alvo de estudos em diversos trabalhos realizados por Junqueira et al. (1986), Junqueira & Gasparotto (1991), Gasparotto et al. (1991), Delmadi (2002),

Rodrigues (2002), Tavares et al. (2004), Warwick (2001, 2007, 2009), Vivas (2015, 2018).

Nos países como Estados Unidos da América e na França, em pesquisas para controle da mancha-preta (*Mycosphaerella berkeleyi* W.A. Jenkins (syn. *Cercosporidium personatum* Berk. & M. A. Curtis) Deighton) do amendoim (*Arachis hipogea* L.) e da cladosporiose – (*Passalora fulva* (Cooke) U.Braun & Crous (Syn. *Cladosporium fulvum* Cooke) do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Peresse & Le Picard, 1980; Tirilly et al., 1983; Mitchell et al., 1987) mencionam o uso do fungo *Dicyma pulvinata* (Berk & M.A. Curtis) Arx [syn. *Hansfordia pulvinata* (Berk & M.A. Curtis)] como espécie promissora para o uso em programas de controle biológico.

Junqueira et al. (1986) objetivando reduzir a incidência do mal das folhas da seringueira causada por diversas raças de *Microcyclus ulei*, testaram o biocontrole com aplicação de isolados de *Dicyma pulvinata* (Berk & M.A. Curtis) Arx [syn. *Hansfordia pulvinata* (Berk & M.A. Curtis) em condições de casa de vegetação. Os testes demonstraram que após aplicação do hiperparasita 100% das lesões de *M. ulei* foram colonizadas, ao passo que decorridos 8 (oito) dias não foram encontradas presença de micélio e conídios do patógeno.

Delmadi et. al. (2009) avaliou o potencial de uso do hiperparasitas *Dicyma pulvinata* ((Berk. & M. A.Curtis)) no controle do mal-das-folhas [*Microcyclus ulei* (Henn.) Arx] de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Wild. ex A. Juss.) Muell. Arg.], em comparação ao controle químico com princípios ativos Benomyl e Mancozeb. Em campo, as aplicações com diferentes concentrações do hiperparasita, apresentaram um efeito semelhante ao controle com fungicida Benomyl.

3. TRABALHOS

3.1. Isolamento e caracterização morfológica de fungos associados a lixas do coqueiro (*Cocos nucifera* L.)

3.1.1. RESUMO

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.), membro da família *Arecaceae*, é uma palmeira perene de clima tropical, com estipe solitário, heliófila, halófila, originária do Sudoeste Asiático, introduzido no Brasil no século XVI. Destaca-se, atualmente, por ser considerada uma das principais palmeiras de interesse econômico no Brasil, quiçá no mundo, dado o seu notável potencial mercadológico, gerando emprego e renda, desde o plantio a comercialização dos produtos derivados da planta. O coco-fresco para consumo da água é o principal produto comercializado no litoral fluminense para indústrias envasadoras de água-de-coco. Um dos principais fatores limitantes para o sucesso da cocoicultura fluminense e de toda cadeia produtiva prescinde do êxito do controle de doenças e pragas. O coqueiro sofre prejuízos significativos devido à incidência de diversas doenças que, quando instaladas na cultura podem reduzir drasticamente a produtividade das plantas. Dentre as doenças do coqueiro, o complexo das lixas, a Lixa grande (*Camarotella*

acrocomiae) e Lixa pequena (*Camarotella torrendiella*) se destacam nas regiões costeiras do Sul da Bahia e do Sudeste, sendo responsáveis por reduções de folhas, em até 50% de perda na produção de frutos. Em função de tais fatos, essa pesquisa teve como objetivo isolar fungos associados a estromas das lixas do coqueiro, visando selecionar microrganismo com potencial para uso no biocontrole dessas doenças. A obtenção dos fungos, seguiu a técnica de isolamento direto a partir de amostras de folíolos com estromas de lixas naturalmente colonizados. Após cultivo em microcultura, efetuou-se a caracterização macro e micromorfológicas dos isolados, bem como a determinação da temperatura ótima para o crescimento e esporulação. Como resultados, foram obtidos 25 fungos, sendo 16 isolados pertencentes ao gênero *Acremonium* (CF/UENF450, CF/UENF451, CF/UENF452, CF/UENF453, CF/UENF454, CF/UENF455, CF/UENF456, CF/UENF457, CF/UENF458, CF/UENF459, CF/UENF460, CF/UENF461, CF/UENF462, CF/UENF463, CF/UENF464, CF/UENF465); dois *Trichoderma* (CF/UENF466, CF/UENF467), um *Paecilomyces* (CF/UENF468), um *Fusarium* (CF/UENF470), *Cladosporium* (CF/UENF471), *Curvularia* (CF/UENF472), um *Pestalotiopsis* (CF/UENF473), um de *Lasiodiplodia* (CF/UENF474) e um isolado de levedura ainda não identificada (CF/UENF469). A temperatura ideal para o crescimento e esporulação de *Acremonium* spp. foi 20°C e 25°C, respectivamente e à temperatura de 35°C nenhum dos isolados desse gênero apresentou crescimento *in vitro*. Os isolados de *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces* sp., apresentaram similaridades na faixa ótima de crescimento e esporulação entre 15°C a 35°C, à exceção de um isolado de *Trichoderma* (CF/UENF467), que teve seu crescimento reduzido em 80%. A variabilidade em nível de gêneros hiperparasitas obtidos nas condições locais, possibilitou selecionar grande diversidade de isolados associados ao nicho ecológico estudo, podendo ser promissores os estudos para aplicação destes organismos no controle das lixas.

Palavras-chave: Biocontrole, diversidade de fungos, hiperparasitismo, doença foliares do coqueiro.

3.1.2. ABSTRACT

The coconut tree (*Cocos nucifera* L.), a member of the Arecaceae family, is a perennial palm tree with a tropical climate, with a solitary, heliophile, halophyte stem, originally from Southwest Asia, introduced in Brazil in the 16th century. Currently, it stands out for being considered one of the main palm trees of economic interest in Brazil, perhaps in the world, given its remarkable market potential, generating employment and income, from planting to commercialization of products derived from the plant. Fresh coconut for water consumption is the main product sold on the coast of Rio de Janeiro for industries that fill coconut water. One of the main limiting factors for the success of fluminense coconut farming and the entire production chain does not require the success of disease and pest control. The coconut tree suffers significant losses due to the incidence of several diseases that, when installed in the crop, can drastically reduce plant productivity. Among the diseases of the coconut tree, the sandpaper complex, the Large sandpaper (*Camarotella acrocomiae*) and Small sandpaper (*Camarotella torrendiella*) stand out in the coastal regions of the South of Bahia and the Southeast, being responsible for leaf reductions, by up to 50%. loss in fruit production. Due to these facts, this research aimed to isolate fungi associated with stroma of coconut sandpaper, aiming to select microorganisms with potential for use in the biocontrol of these diseases. The fungi obtained, followed the technique of direct isolation from samples of leaflets with stroma of naturally colonized sandpaper. After cultivation in microculture, macro and micromorphological characterization of the isolates was carried out, as well as the determination of the optimum temperature for growth and sporulation. As a result, 25 fungi were obtained, 16 isolates belonging to the *Acremonium* genus (CF / UENF450, CF / UENF451, CF / UENF452, CF / UENF453, CF / UENF454, CF / UENF455, CF / UENF456, CF / UENF457, CF / UENF458, CF / UENF459, CF / UENF460, CF / UENF461, CF / UENF462, CF / UENF463, CF / UENF464, CF / UENF465); two *Trichoderma* (CF / UENF466, CF / UENF467), one *Paecilomyces* (CF / UENF468), one *Fusarium* (CF / UENF470), *Cladosporium* (CF / UENF471), *Curvularia* (CF / UENF472), one *Pestalotiopsis* (CF / UENF473), one from *Lasiodiplodia* (CF / UENF474) and one yeast isolate not yet identified (CF / UENF469). The ideal temperature for the growth and sporulation of *Acremonium*

spp. it was 20°C and 25°C, respectively and at a temperature of 35°C none of the isolates of this genus showed growth in vitro. The isolates of *Trichoderma* spp. and *Peacilomyces* sp., showed similarities in the optimal range of growth and sporulation between 15°C to 35°C, except for a *Trichoderma* isolate (CF / UENF467), which had its growth reduced by 80%. The variability in the level of hyperparasitic genera obtained in local conditions, made it possible to select a great diversity of isolates associated with the ecological niche studied, and studies for the application of these organisms in the control of sandpaper may be promising.

Keywords: *Cocos nucifera* L., diversity of fungi, hyperparasite, coconut sandpaper.

3.1.3. INTRODUÇÃO

A cultura do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) foi introduzida no Brasil em meados do século XVI, por navegadores mercantis (Purseglove, 1975), chegando na Bahia por volta de 1553, com material procedente da Ilha de Cabo Verde, onde se adaptou e logo adiante foi sendo disseminada em todas as unidades federativas do país (Ferreira et al., 1998; Martins et al., 2014).

Essa palmeira é considerada uma das espécies de maior interesse econômico do mundo, já que seu cultivo é capaz de gerar emprego e, conseqüentemente, renda em vários países. Pode gerar mais de 100 produtos e subprodutos de valor econômico, da palmeira praticamente tudo é aproveitado, seja pela comercialização de seus frutos “*in natura*” ou pela industrialização do fruto, da raiz, estirpe, inflorescência, folhas e do palmito, ou ainda utilizada como item no paisagismo, ornamentando espaços públicos e privados, sendo denominadas pelos botânicos de “Príncipes das Florestas” (Costa et al., 2005, Matos, 2012).

A presença de fungos em diversas partes e órgãos dos vegetais são bastante constantes, e esses podem viver em diferentes associações interespecíficas, tanto simbióticas, quanto ecológicas com seus hospedeiros. Os microrganismos, por sua vez, podem conviver de forma associativa, mutualísticas

ou parasítica, auxiliando no desenvolvimento, por meio de mecanismo de defesa ou provocando doenças, as quais alteram todo o processo fisiológico do vegetal, depreciando frutos, flores, folhas ou podendo levar a destruição da planta. (Bettiol et al., 2009).

Dentre os principais patógenos foliares do coqueiro estão as lixas, *Camarotella torrendiella* (Batista) Bezerra & Vitória (lixa grande - LIG) e *Camarotella acrocomiae* (Mont.) K.D. Hyde & P.F. Cannon (lixa pequena - LIP). As lixas se destacam nas regiões costeiras do sudeste brasileiro e no sul da Bahia como responsáveis pela redução do número de folhas e de até 50% na produção de cocos. A desfolha prematura reduz o desenvolvimento dos frutos e predispõe a planta à quebra dos cachos (Warwick, 2003; Vitória et al., 2008; Monteiro et al., 2013; Araújo et al., 2016).

Nos folíolos do coqueiro ambas espécies de *Camarotella* produzem estromas (Gr. stroma= cama, colchão) carbonácios salientes e discretos, em cujo interior encontram-se as ascas e ascósporos. No campo, observa-se naturalmente a ocorrência de outros fungos colonizando os estromas das lixas do coqueiro, o que sugere ocorrência de hiperparasitismo e possível controle biológico natural (Sudo et al., 1989; Warwick et al., 2007; Araújo et al., 2016).

O controle biológico ao longo dos anos, vem surgindo como uma alternativa promissora para minimizar o uso dos produtos a bases de agroquímicos, alcançando um amplo potencial no controle de fungos e pragas. Assim, o biocontrole de doenças de plantas por meios de microrganismos é altamente desejável, podendo ser aplicado em associação com os demais métodos de controle existentes (Junqueira et al., 1991).

Dentre os grupos de fungos hiperparasitas de estromas de interesse no biocontrole, encontra-se o gênero *Acremonium* Link, cosmopolita, e relacionado a um grande grupo polifilético, com espécies pertencentes a diferentes ordens de Sordariomycetes, principalmente aos hipocreales (Glenn et al., 1996; Guarro et al., 2011; Perdomo et al., 2011; Summerbell et al., 2011).

O primeiro relato de hiperparasitas colonizando os estromas foliares do coqueiro foi descrito por Sudo et al. (1989) que identificou um grupo de fungos parasitando a filoplano estromática. Em meio aos fungos isolados, o pesquisador observou a presença do gênero *Acremonium*, o qual foi submetido a testes de

capacidade de colonização, comprovando sua efetividade na redução de inóculos das lixas do coqueiro.

O uso dos fungos hiperparasitas *Acremonium alternatum* Link, *A. persicinum* (Nicot) W. Gams e *Dycima pulvinata* (Berk. & M.A. Curtis) S. Hughes, isolados de estromas de *Camarotella torrendiella* (Batista) Bezerra & Vitória (lixa grande - LIG) e *Camarotella acrocomiae* (Mont.) K.D. Hyde & P.F. Cannon (lixa pequena - LIP), podem controlar efetivamente a lixa-grande quando pulverizados sobre a planta (Warwick, 2001).

O presente trabalho visa isolar fungos associados a estromas de lixas de coqueiro, com enfoque nos que apresentam reconhecida atividade hiperparasítica, passível de ser explorada no biocontrole das doenças. Os objetivos do trabalho foram obter em culturas puras isolados de fungos hiperparasitas de estromas de lixas do coqueiro e avaliar a influência da temperatura no crescimento micelial e produção de esporos dos isolados.

3.1.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.4.1. Obtenção e isolamento dos fungos associados aos estromas de lixas

Amostras de folíolos com estromas de lixas, com ou sem sinais de fungos hiperparasitas, foram coletados em diversas áreas do cultivo de coqueiro na região produtora dos municípios de Campos dos Goytacazes (Rio de Janeiro), Quissamã (Rio de Janeiro) e Mimoso do Sul, estado do Espírito Santo, no período de agosto de 2018 a maio de 2019 (VIDE SISGEN) e encaminhados para laboratório para análise Microscópica.

Das amostras apresentando sinais de fungos potenciais hiperparasitas, foram coletados e transportados em sacos de papel, e no laboratório realizaram-se o isolamento direto, sob auxílio do microscópio estereoscópico, transferindo-se estruturas dos fungos assepticamente para placas de Petri contendo o meio BDA (Alfenas et al., 2004, 2016).

Dos materiais sem sinais evidentes de fungos associados aos estromas, procedeu-se incubação em câmara úmida, para induzir crescimento e esporulação. Após 24 a 36 horas de incubação, sob balcão de laboratório, efetuou-se o isolamento direto, constatada a presença de estruturas fúngicas, bem como ao isolamento indireto. No segundo caso, isolamento indireto, fragmentos foliares com estromas serão desinfestados por imersão sequencial por 1 min em etanol 70%, hipoclorito de sódio 1% e água estéril e semeados em meio BDA (batata-dextrose-ágar) (Alfenas et al., 2016).

Em qualquer situação, as culturas em placas foram incubadas em BOD, a 25°C, sob escuro contínuo. Sempre que necessário, procedeu-se o reisolamento direto e a repicagem para o mesmo meio em placas ou tubos, até purificação das culturas. Os isolados obtidos foram preservados em tubos e placas contendo BDA (Dhingra & Sinclair, 1995) e em frascos de penicilina com água destilada esterilizada (Castellani, 1939), armazenadas em refrigerador com temperatura de 5 a 7°C.

3.1.4.2. Caracterização morfológicas e identificação dos isolados

Para a avaliação dos aspectos macroscópicos (coloração da colônia, textura, produção de pigmentação do verso e anverso dos cultivos) e descrição morfológica das estruturas do agente foi utilizado a técnica de microcultura. Para tanto, utilizou-se lâminas para elevação do bloco de ágar batata-dextrose - BDA (com dimensão de aproximadamente 1cm²), acondicionada no interior de placas de petri esterilizadas, contendo dois discos de papel germitest (estéril) umedecidos, para evitar a dessecação do meio de cultura durante o desenvolvimento do fungo (Koneman et al., 2001).

Com auxílio de uma agulha pequenos fragmentos de micélio foram inoculados equidistantes entre si sobre o meio BDA e uma lamínula foi posicionada sobre o bloco. O experimento foi conduzido em triplicata, as placas foram incubadas em BOD a 25°C, onde permaneceu até o crescimento micelial e aderência das estruturas fúngicas na lamínula e lâmina, promovendo uma melhor identificação das características dos fungos.

A caracterização de cada colônia dos isolados foi feita pelo cultivo centralizado em placas de Petri com meio BDA, por um período de 15 dias. Foram

registrados aspectos do micélio (tipificação), coloração (frente/reverso da cultura em placa) e a forma das colônias.

A identificação dos isolados foi realizado com o preparo de lâminas contendo lactofenol, com ou sem azul de algodão, como líquido de montagem. As lâminas foram observadas em microscópio Nikon E-400, sob aumento de objetiva de 40X e a confirmação morfológica dos gêneros fúngicos foi realizada com com auxílio de chaves de identificação (Sutton, 1980; Ellis, 1980; Carmichael, 1980; Seifert et al., 2011).

3.1.4.3. Efeito da temperatura no crescimento micelial e na esporulação

Para o experimento de crescimento micelial em função da temperatura, medição diárias do diâmetro das colônias crescidas em meio BDA foram realizadas utilizando-se um paquímetro. Para tanto, placas de Petri com aproximadamente 20 mL de BDA foram utilizadas, tendo sido repicado para o centro de cada uma, um disco de 5 mm de diâmetro retirados da periferia da cultura pura de cada isolado. As placas foram incubadas em BODs, a temperaturas pré-estabelecidas de 15°, 20°, 25°, 30° e 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), e fotoperíodo de 12 h. O crescimento foi mensurado através da progressão linear do diâmetro da colônia em dois sentidos ortogonais até o décimo dia de incubação.

As colônias crescidas, ao final do décimo dia, foram utilizadas para avaliação da esporulação em função de cada temperatura. Em cada colônia, foram retirados 3 discos de 5 mm cada, de forma aleatória da cultura (Intermediária/periférica) Cada conjunto de três discos foram transferidos para frascos tipo penicilina contendo 8 mL de água destilada. Os frascos foram agitados em agitador de tubos por 1 min. para a dispersão dos esporos, os quais foram quantificados em câmara de Neubauer.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados (DBC), analisado em esquema fatorial 18 x 5, cujos tratamentos corresponderam às combinações dos dezoitos isolados e das cinco temperaturas de incubação. Cada tratamento foi composto por 4 repetições ou placas. Os dados de crescimento e esporulação foram submetidos à análise de variância pelo teste F e efetuou-se análise de regressão linear em função da temperatura e esporulação. O modelo ajustado foi o

que apresentou maior coeficiente de determinação e menor tendenciosidade dos erros.

3.1.5. RESULTADOS

3.1.5.1. Isolamento

Amostras de folíolos com estromas provenientes de diferentes localidades foram analisadas. A presença de diversos fungos foram detectado, recorrendo a uma observação macroscópica e microscópica de 25 isolados. Foram identificados oito gêneros de fungos associados aos estromas das lixas do coqueiro, sendo eles; *Fusarium* (24%), *Cladosporium* (23%), *Curvularia* (16%), *Acremonium* (18%), *Pestalotiopsis* (11%), *Lasiodiplodia* (5%), *Trichoderma* (2%), *Paecilomyces* (1%) e uma Levedura não identificada (1%) (Figura 1). Cerca de 76% dos fungos isolados foram obtidos de estromas da lixa grande (*Camarotella acrocomiae*) e 24% de estroma da lixa pequena (*Camarotella torrendiella*).

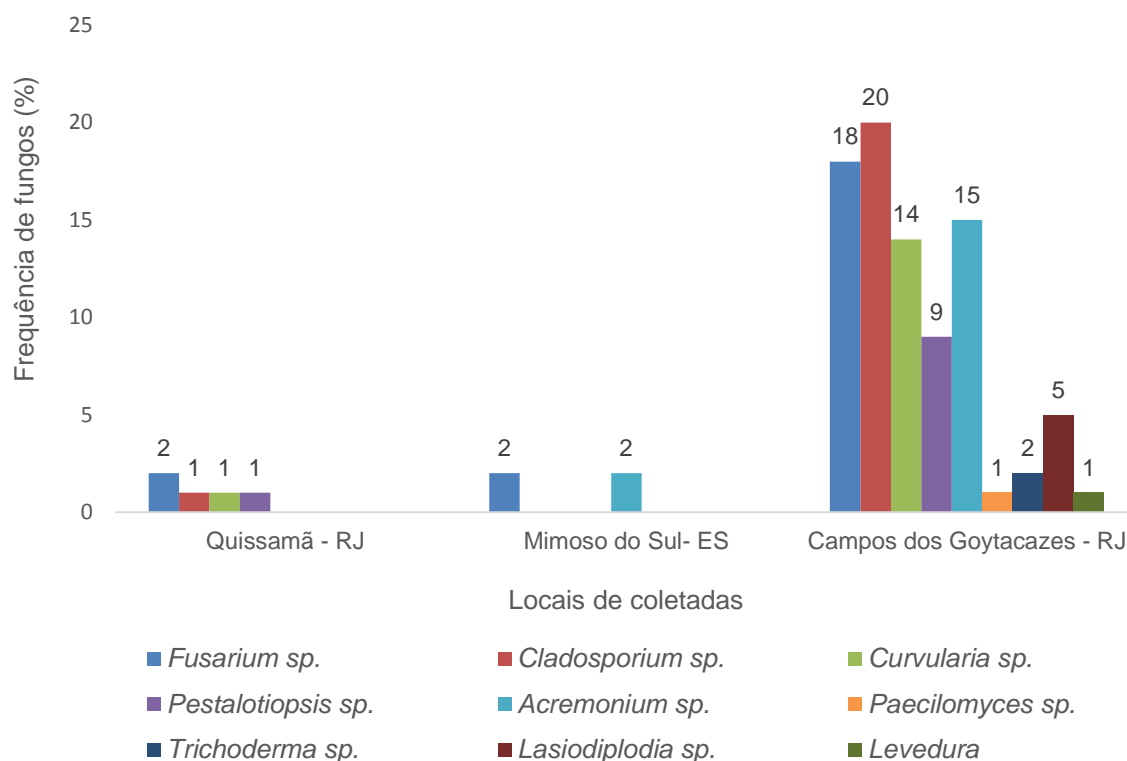


Figura 1. Distribuição de fungos obtidos em estromas de lixa grande e pequena em folíolos de coqueiro-anão em amostras de três municípios do litoral do norte fluminense e sul capixaba, nos anos de 2018-2019.

Dentre da grande diversidade de microrganismos isolados, no presente estudo foram classificados e descritos dois gêneros de hifomicetos que são de grande relevância em estudos de controle biológico, conforme as características macro e micromorfológicas, a conhecimento *Acremonium* e *Trichoderma*. Também foram identificados um *Paecilomyces* e uma levedura. Os isolados aqui descritos foram catalogados e registrados na Clínica Fitossanitária da Universidade Estadual do Norte Fluminense, sediada na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação e procedência dos isolados fúngicos obtidos em três municípios do litoral do norte fluminense e sul capixaba, nos anos de 2018-2019.

Código/Isolado	Gênero	Patógeno	Local da coleta	Data
CF/UENF450*	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes - RJ	30/08/2018
CF/UENF451	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	20/07/2018
CF/UENF452	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella torrendiella</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	26/07/2018
CF/UENF453	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	06/10/2018

CF/UENF454	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella torrendiella</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	06/10/2018
CF/UENF455	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	06/10/2018
CF/UENF456	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	06/10/2018
CF/UENF457	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	06/10/2018
CF/UENF458	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella torrendiella</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	06/10/2018
CF/UENF459	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella torrendiella</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	15/10/2018
CF/UENF460	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	06/11/2018
CF/UENF461	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	14/11/2018
CF/UENF462	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	10/02/2019
CF/UENF463	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella torrendiella</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	10/02/2019
CF/UENF464	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Mimoso do Sul - ES	20/05/2019
CF/UENF465	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Mimoso do Sul - ES	20/05/2019
CF/UENF466	<i>Trichoderma</i>	<i>Camarotella torrendiella</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	10/02/2019
CF/UENF467	<i>Trichoderma</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	07/09/2018
CF/UENF468	<i>Paecilomyces</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	10/02/2018
CF/UENF469	Levedura (não identificada).	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	21/11/2019

*O código dos isolados são referentes aos registros do armazenamento na Clínica Fitossanitária da Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, *campus* de Campos dos Goytacazes –Rio de Janeiro.

3.1.5.2. Caracterização macro e micromorfológicas e identificação dos isolados

Desesseis isolados foram classificados como pertencendo ao gênero *Acremonium* spp., a partir das características macro e micromorfológicas, como por exemplo formação e aspecto visual da colônias, coloração de verso e reverso, modo de crescimento, produção de pigmentação e características das estruturas reprodutivas, dentro desse gênero é possível identificar a formação de três grupo distintos entre si.

Além do gênero supracitado, foram identificados dois isolados pertencentes ao gênero de *Trichoderma* spp. (CF/UENF466, CF/UENF467), um isolado com características semelhantes a *Paecilomyces* sp. (CF/UENF468) esse isolado com

características de fungos nematófago (que produz anéis constritores) e uma levedura *pleomórfica* (CF/UENF469).

3.1.5.3. Isolado de *Acremonium* spp.

No primeiro grupo de *Acremonium* estão presente 13 isolados (CF/UENF 450, CF/UENF 451, CF/UENF 452, CF/UENF 453, CF/UENF 454, CF/UENF 456, CF/UENF 457, CF/UENF 458, CF/UENF 459, CF/UENF 460, CF/UENF 461, CF/UENF 462, CF/UENF 463) com características semelhante na produção de pigmentação de cor vermelha difusível no meio BDA. As culturas dos isolados desse grupo apresentaram colônias com textura cotonosa a rugosa, borda regular, colônias jovens brancas e amarelas quando maduras, com micélio aéreo de mesma cor; bem como grande produção de esporos, no reverso de cor rosácea/vermelho, por conta da produção de pigmentos difundida no meio.

Esses isolados exibiram na análise microscópica dimensões bastante distintas entre si, especificadamente o tamanho da fiálide, variando em média de 9,26 a 59,8 μ m de comprimento e largura variando de 0,86 a 3,41 μ m, o conídio obteve uma dimensão de 1,66 a 8,44 μ m de comprimento e largura de 0,94 a 4,43 μ m (Tabela 2). Em geral, os isolados desse grupo apresentaram hifas hialinas septadas, conídios simples e grandes para o gênero, alguns apresentaram a presença de clamidósporos (CF/UENF 460, CF/UENF 461, CF/UENF 463).

Tabela 2. Características morfológicas e produção de pigmento por isolados do fungo *Acremonium*, obtidos da superfície de estromas de lixas do coqueiro, com 10 dias de incubação em meio BDA.

ISOLADO	Fiálide		Conídio		Clamidóspero		Diâmetro da Colônia (mm)	Escleródio	Produção de Pigmentos
	Comp. (µm)	Lar. Base (µm)	Comp. (µm)	Largura (µm)	Comp. (µm)	Largura (µm)			
CF/UENF 450	14,63-41,69	1,55-2,7	3,2-4,86	1,18-2,29	ND*	ND*	36,4	Sim	Vermelho
CF/UENF 451	11,46-32,12	1,01-3,02	3,1-5,07	1,03-2,64	ND*	ND*	33,15	Sim	Vermelho
CF/UENF 452	9,26-25,01	1,19-2,57	2,62-4,35	1,19-2,09	ND*	ND*	32,5	Sim	Vermelho
CF/UENF 453	19,73-59,8	1,18-3,35	2,53-4,69	1,22-2,72	ND*	ND*	29	Sim	Vermelho
CF/UENF 454	15,78-26,79	1,27-2,87	4,93-8,44	2,39-4,43	ND*	ND*	24,8	Sim	Vermelho
CF/UENF 455	14,36-43,44	1,07-2,59	2,62-4,15	1,18-2,27	ND*	ND*	45,1	Não	Amarelo
CF/UENF 456	12,49-24,31	1,07-2,95	2,2-5,41	1,22-2,22	ND*	ND*	23,7	Sim	Vermelho
CF/UENF 457	13,52-27,54	1,6-3,41	2,41-4,72	1,18-2,37	ND*	ND*	27,8	Sim	Vermelho
CF/UENF 458	13,88-40,48	1,08-2,78	2,16-3,71	1,51-2,98	ND*	ND*	29,4	Não	Vermelho
CF/UENF 459	22,97-57,02	1,22-2,53	2,29-4,6	1,22-2,22	ND*	ND*	31,2	Não	Vermelho
CF/UENF 460	13,22-33,66	0,91-2,67	1,66-4,33	1,19-3,68	2,72-5,21	2,37-4,8	27,4	Sim	Vermelho
CF/UENF 461	16,34-39,86	1,29-3,06	4,9-2,41	1,29-2,55	3,31-5,82	2,04-4,01	33,7	Sim	Vermelho
CF/UENF 462	13,39-24,23	0,95-2,98	2,26-4,98	0,95-2,78	ND*	ND*	25,8	Não	Vermelho
CF/UENF 463	13,05-28,97	1,19-3,05	2,7-4,41	1,19-2,94	3,54-6,67	2,94-5,15	24,1	Sim	Vermelho
CF/UENF 464	12,46-31,91	1,18-2,43	2-3,16	0,98-2,11	1,92-5,17	1,38-4	30,1	Não	Verde
CF/UENF 465	17,51-47,3	0,86-2,64	1,82-3,65	0,94-2,11	2,87-5,14	1,76-3,48	26,5	Não	Ausente

* Não detectado presença de clamidóspero até o 10° dia de crescimento.

Após 10 dias de avaliação os isolados CF/UENF450, CF/UENF451, CF/UENF452, CF/UENF453, CF/UENF454, CF/UENF456, CF/UENF457, CF/UENF460, CF/UENF461 e CF/UENF463 apresentaram colônias muito parecidas, com o meio tingido de vermelho e presença de escleródios.

Esses isolados apresentam-se um crescimento lento, considerando as médias de formação da colônia, apresentaram um crescimento entre 23,7 mm a 45,1 mm de diâmetro em meio BDA, após período de 10 dias, em temperatura 25 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Os isolados CF/UENF450 (36,4 mm), CF/UENF451(33,15 mm), CF/UENF455 (45,1 mm), CF/UENF461 (33,7 mm), foram os que alcançou um maior diâmetro de desenvolvimento.

O isolado CF/UENF450, apresentou hifas hialinas com septos, apresentando anastomose, conidióforos apresentando septos na base, com ramificações; fíalides com conídios dispostos em cadeia longas; conídios cilíndricos a fusiformes, não foi detectada a presença de clamidósporos. Também apresentou coloração da colônia amarela, reverso vermelho com produção de exsudado e produção de escleródios no reverso da colônia (Figura 2).

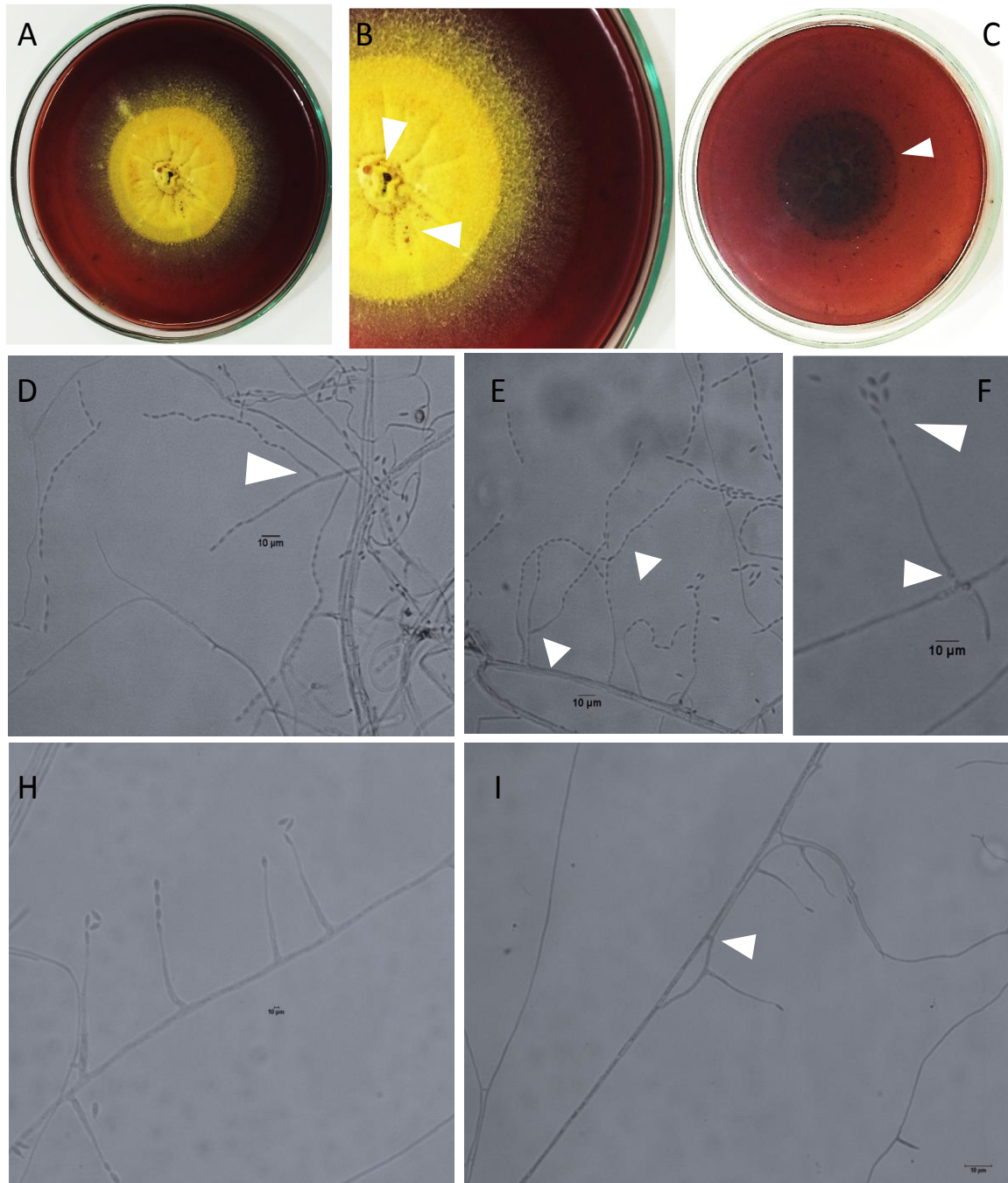


Figura 2 – Aspectos morfológicos do fungo *Acremonium* sp. (isolado CF/UENF 450) hiperparasita de estromas de lixas do coqueiro. Frente da colônia (A e B), reverso (C), quando cultivada em meio BDA por 10 dias a 25 °C. Ramificações do conidióforos (D, E), conídios em cadeia (F, H) e anastomose de hifas (I).

O isolado CF/UENF 453, produziu colônia cotonosa de cor amarela, com produção de escleródios, hifas vegetativas hialinas com septos, fiálides longos medindo 19,73 a 59,8 μm de comprimento por 1,18 a 3,35 μm de largura, com septo base. As fiálides são produzidas diretamente das hifas vegetativas, sem ramificações, dando origem a conídios obovóides hialinos dispostos em cadeia longas. Não foi detectada a produção de clamidósporos. Pigmento vermelho difuso produzido em meio BDA (Figura 3), testados em diferentes temperaturas de 15 a 30°C.

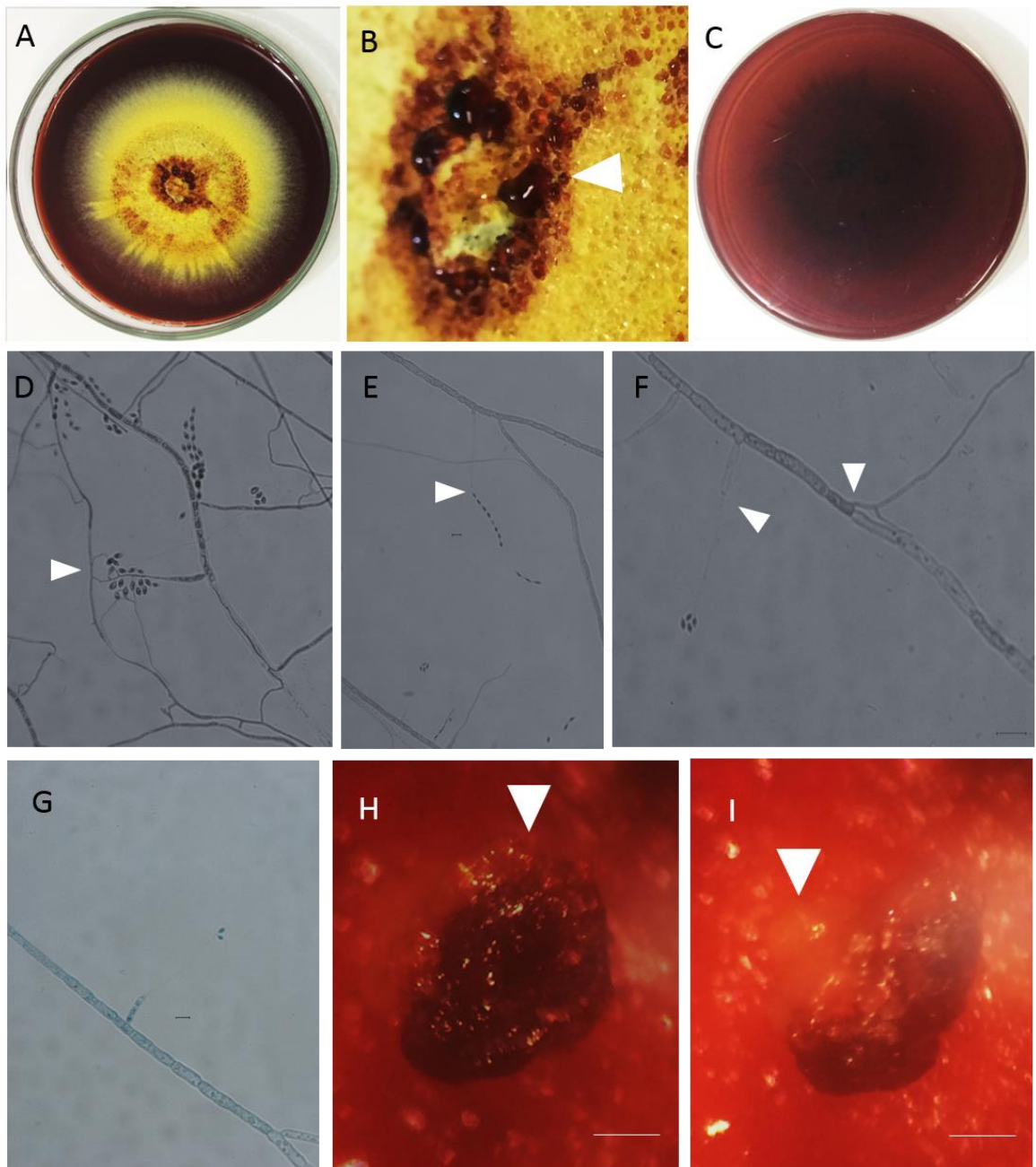


Figura 3 – Aspectos morfológicos do isolado de *Acremonium* sp. (CF/UENF 453) hiperparasita de estromas de coqueiro. Frente e verso da colônia em BDA incubado a 10 dias, 25°C (A, B, C). Excreção de pigmentos difusível (B). Cadeia longa de conídios (E). Hifas longas com septação na base e acima (F, G). Escleródios (H, I). Barras de escala: 5 μ m (D, E, G), 10 μ m (F), 5cm (H,I) (40X – 1,5X).

O isolado CF/UENF 461, apresentou colônia com tonalidade amarela no centro e esbranquiçada em direção à periferia, reverso vermelho pela produção de exsudados no meio de cultura. Produziu hifas septadas, hialinas de paredes lisas e finas. Fíalides eretas, simples, sem ramificação e septados na base, com 16,34 a 39,86 μ m comprimento apresentando conídios unicelulares, de dois tipos: conídios filiformes e globoso dispostos em cadeia longas. Presença de clamidósporos medido 3,31 a 5,82 μ m de comprimento e 2,04 a 4,01 μ m de largura e produção de escleródios no imerso do meio de cultura (Figura 4).

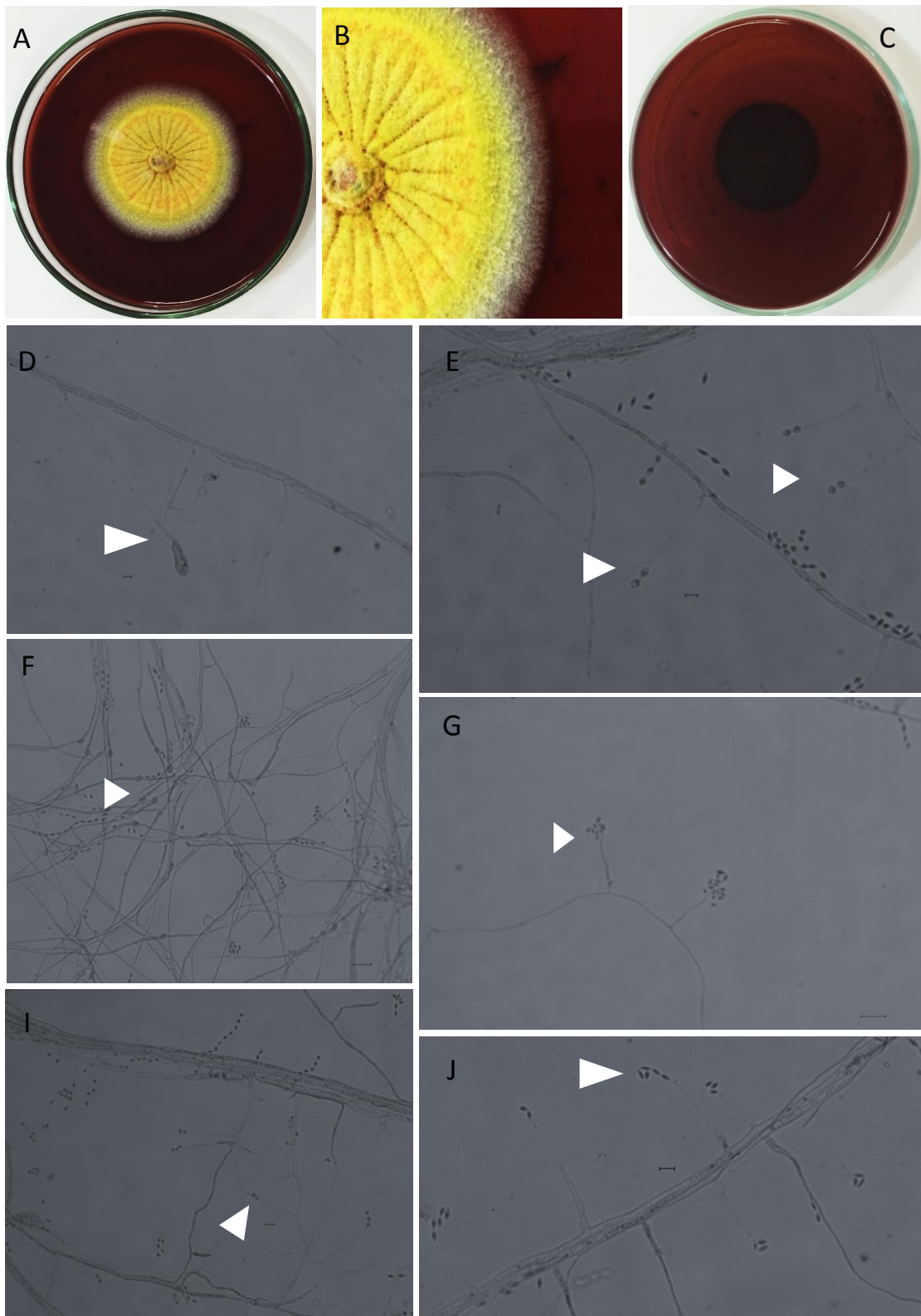


Figura 4 – Aspectos morfológicos do isolado de *Acremonium* sp. (CF/UENF 461) hiperparasita de estromas de coqueiro. Frente e verso da colônia em BDA incubado a 10 dias, 25°C (A, B, C). Colônia frente e verso (A, B, C). Vesícula (D). Fíalides com formação de conídios globosos e filiforme (E, I, G, J). Conjunto de clamidósporos (F). Barras de escala: 10 µm (F,G); 5 µm (D,E,I,J)(40X – 1,5X).

Os isolados CF/UENF 464 e CF/UENF 465, inclusos no segundo grupos, apresentaram colônias rugosas, bordas regulares, coloração de verso branca, reverso verde e branca na frente e no verso, com crescimento em média de 30,1 mm e 26,5 mm, respectivamente. Fíalides longas, distribuídas alternadamente na hifa, conídios em cadeia e falsa cadeia, com presença de clamidósporos e ausência de escleródios (Figura 5 e 6).

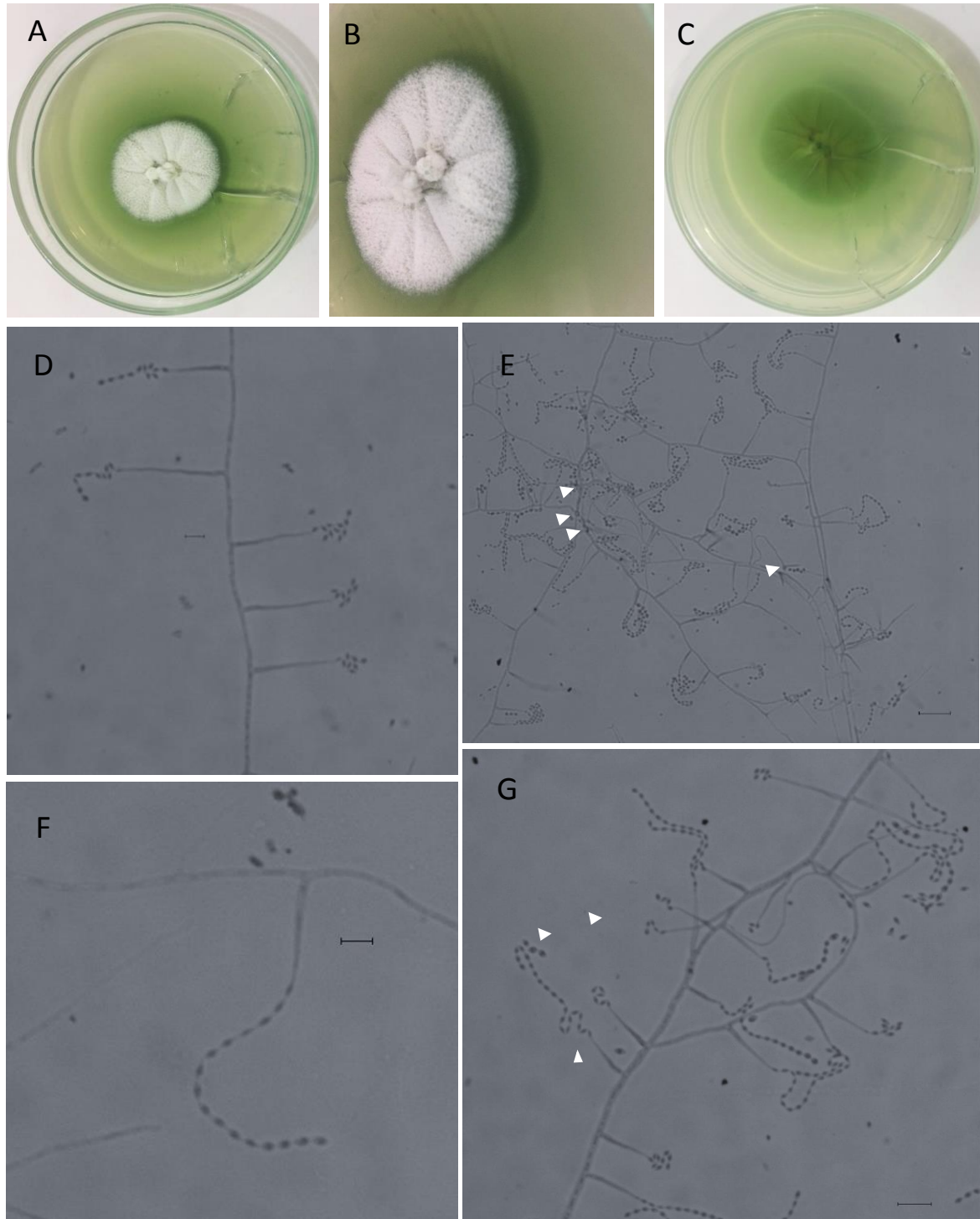


FIGURA 5 – Aspectos morfológicos do isolado de *Acremonium sp.* (CF/UENF 464) hiperparasita de estromas de coqueiro. Frente e verso da colônia em BDA incubado a 10 dias, 25°C (A, B, C). Conjunto de fialides alternadas na hifas (D, E, G). Clamidósporos (E). Cadeia longas de conídios (F, G). Barras de escala: 10 µm (E, G); 5 µm (D, F) (40X – 1,5X).

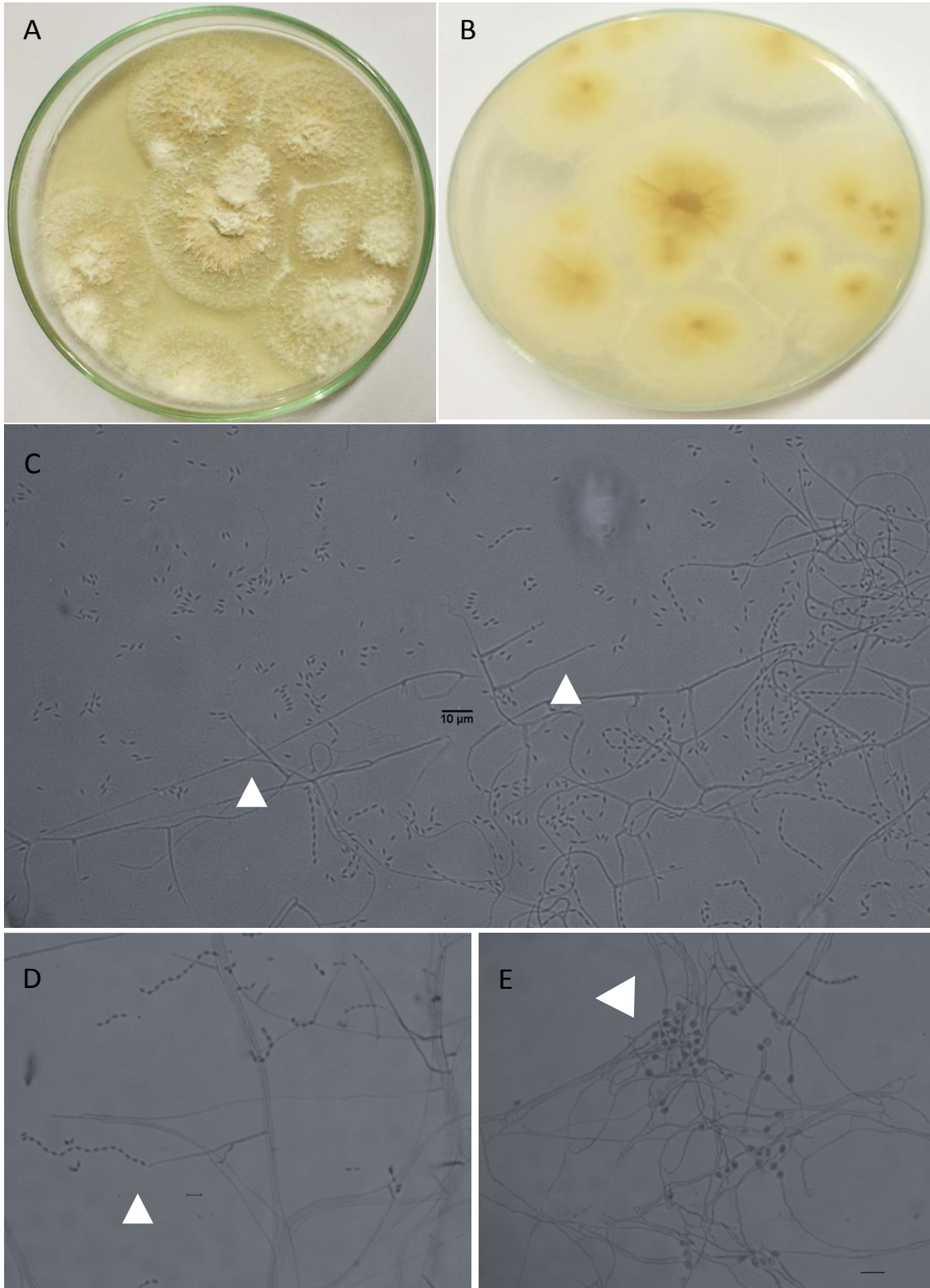


Figura 6 – Aspectos morfológicos do isolado de *Acremonium* sp. (CF/UENF 465) hiperparasita de estromas de coqueiro. Frente e verso da colônia em BDA incubado a 10 dias, 25°C (A, B). Fíalides longas, eretas (C). Conidióforo com ramificação e cadeia longa de conídios (D). Conjunto de clamidósporos (E). Barras de escala: 10 µm (C, E); 5 µm (D) (40X – 1,5X).

O terceiro e último grupo de *Acremonium* foi constituído por um único isolado, CF/UENF 455, que diferenciou-se dos demais por apresentar colônia com a tonalidade de verso amarela e reverso amarela, em função da produção de pigmento amarelado difusível no meio de cultura. O micélio área apresentou-se rugoso, borda regular, crescimento rápido comparando com os demais isolados de *Acremonium*, alcançando média de 45,1mm de diâmetro, produção de clamidósporos e ausência de escleródios (Figura 7).

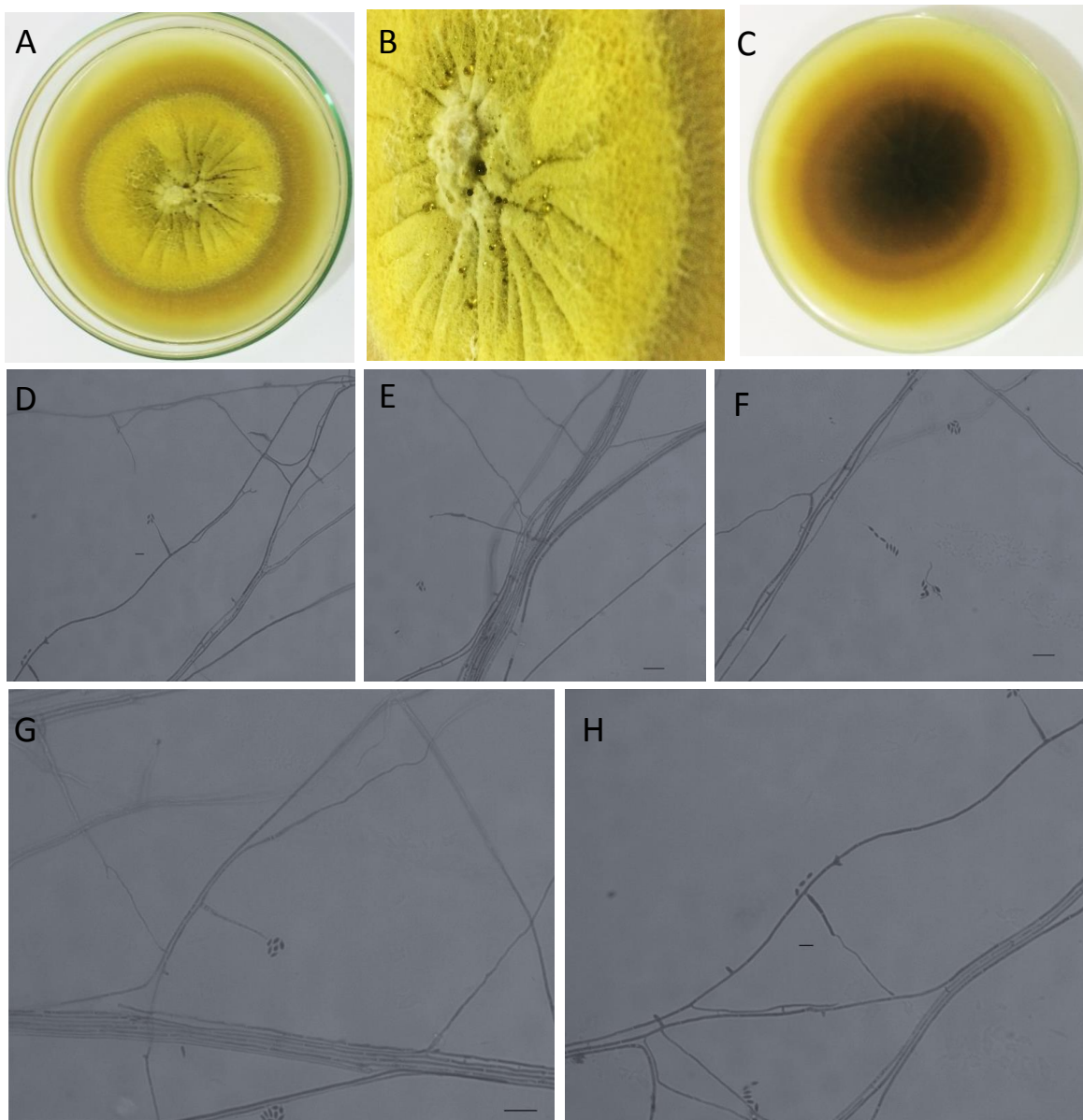


Figura 7 - Aspectos morfológicos do isolado de *Acremonium* sp. (CF/UENF 455) hiperparasita de estromas de coqueiro. Frente e verso da colônia em BDA incubado a 10 dias, 25°C (A, B, C). Excreção de pigmento (C). Cadeia de conídios (D, E, F, G). Anastomose hifal (H). Barras de escala: 10 μ m (E, F, G); 5 μ m (D, H) (40X – 1,5X).

3.1.5.4. *Trichoderma* spp.

Dentre do gênero *Trichoderma*, foram obtidos dois isolados CF/UENF 466 e CF/UENF 467, com características semelhantes, entre si para as estruturas reprodutivas de acordo com os parâmetros morfométricos (tabela 3). No entanto, os atributos macromorfológicos foram distintos para os dois isolados.

Tabela 3. Dimensões morfométricas das estruturas reprodutivas dos isolados de *Trichoderma* spp. obtidos da superfície de estromas de lixas em folíolos de coqueiro, após 10 dias de incubação em meio de cultura BDA.

Estruturas	Dimensões	Isolados (Código)	
		CF/UENF466	CF/UENF467
Ramificações Lateral	Comp. (µm)	10,69-23,78	17,16-41,04
	Lar. Base (µm)	1,36-4,01	1,86-3,57
Conidióforo central	Comp. (µm)	23,7-80,8	33,21-189,18
	Lar. Base (µm)	1,69-4,23	1,69-4,77
Fíalide	Comp. (µm)	6,58-13,49	6,09-13,37
	Lar. Base (µm)	1,6-3,58	1,76-3,54
Conídio	Comp. (µm)	2,67-4,92	2,35-4,75
	Lar. Base (µm)	1,67-3,11	1,55-3,8
Clamidósporo Terminal	Comp. (µm)	4,86-11,71	5,4-11,1
	Lar. Base (µm)	4,66-7,32	4,54-8,47
Clamidósporo Central	Comp. (µm)	7,42-14,08	6,11-15,26
	Lar. Base (µm)	4,01-8,18	3,61-12,14

*Não detectado presença de clamidósporo até o momento da observação.

O *Trichoderma* CF/UENF 466 (Figura 8), apresentou crescimento rápido, alcançando a média de 90mm de diâmetro em 48h. A coloração da colônia apresenta-se verde, caracterizada pela abundantes esporulação. O reverso da colônia em placa é amarelo. Este isolado apresentou conidióforos com eixo principal largo medindo em média 1,69-4,23 µm de largura e 23,7 a 80,8 µm de comprimento, com ramificações laterais, fiálides com forma característica de frasco com gargalo alongado, retas nas extremidades, medindo em torno de 6,58 a 13,49 µm de comprimento e 1,6-3,58 µm de largura. Os conídios de tom esverdeado,

formato globoso ou obvoide, medindo em média 2,67 a 4,92 μm . Clamidósporos com formato subgloboso a ovoide na extremidade da hifa, são lisos, de cor verde e medem de 4,86 a 11,71 μm de comprimento e 4,66 a 7,32 μm largura.

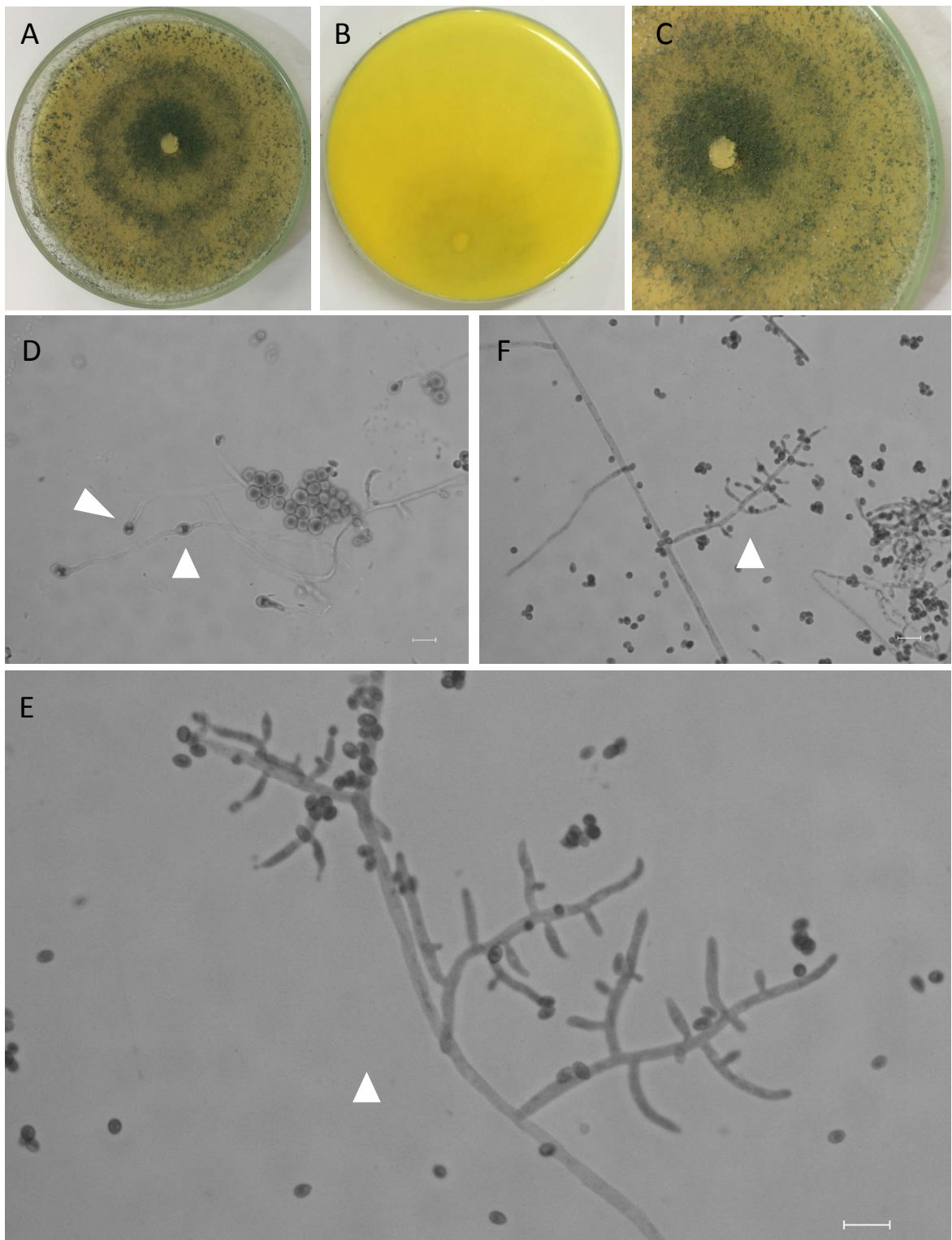


FIGURA 8 – Aspectos morfológicos do isolado de *Trichoderma sp.* (CF/UENF 466) hiperparasita de estromas de coqueiro. Frente e verso da colônia em BDA incubado a 10 dias, 25°C (A, B, C). Conjunto fialides isoladas ou em grupo (D). Conidióforo com ramificação (E, F). Barras de escala: 10 μm;(A, B, C, D, E) (40X – 1,5X).

Apresentando também crescimento rápido, o *Trichoderma* CF/UENF 467, produzindo colônias brancas com micélio aéreo esverdeada devido à elevada produção de esporos, reverso branco. Hifas hialinas, septadas, com presença abundante de clamidósporos centrais (periforme medindo de 6,11 a 15,26 μm de comprimento por 3,61 a 12,14 μm de largura. Os clamidósporos terminais apresentam-se subglobosos. Conidióforos são hialinos, de parede lisa, ramificados, medindo 1,69 a 4,77 μm de largura na base e ângulos menores na extremidade apical. Fíalides ampuliforme de 6,09 a 13,37 μm de comprimento por 1,76 a 3,54 μm de largura, estreitando-se na ponta, na qual, produz conídios solitários ou em grupos. Esses conídios são subglobosos a ovóide, verdes, com dimensões entre 2,35 a 4,75 μm de comprimento por 1,5-3,8 μm de largura (Figura 9).

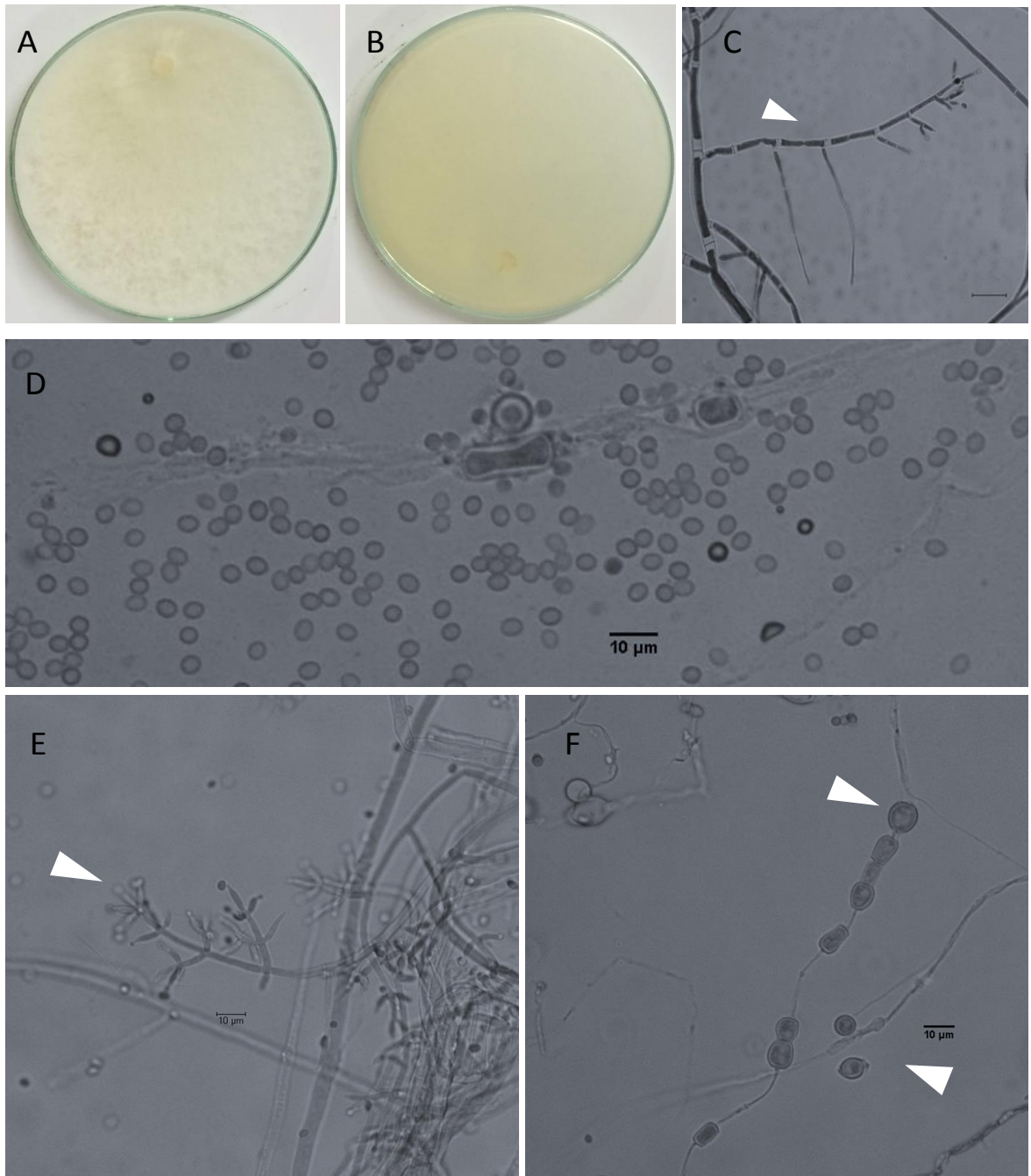


Figura 9 – Aspectos morfológicos do isolado de *Trichoderma* sp. (CF/UENF 467) hiperparasita de estromas de coqueiro. Frente e verso da colônia em BDA incubado a 10 dias, 25°C (A, B). Esporulação (C). Conjunto de esporos (D). Clamidósporos central e terminal (F, G). Conidióforo com ramificação (E). Fíalides com conídios solitário e grupo (E). Fíalides longa, ereta e com espessura fina (H). Barras de escala: 10 µm (A, B, C, D, E, F) (40X – 1,5X).

3.1.5.5. Isolado de *Paecilomyces*

Com um crescimento rápido, atingindo um diâmetro de 90 mm, a temperatura de 25 °C, após 4 dias de incubação em meio BDA, o isolado CF/UENF 468, exibiu colônia planas, com coloração variando de areia a amarelo-castanho quando nova, se tornando marrom ao passar do tempo (Figura 10), textura da colônia é bem pulverulenta. Conidióforos medindo 21,83 a 90,18µm e largura de 1,45 a 5,71µm. As fiálides (13,42 a 28,75µm comprimento e 2,26 a 6,04 µm de largura) ocorrem isoladas, aos pares ou em estruturas semelhantes às dos *Penicillium*, são engurgitadas na sua base, com um pescoço estreito em direção ao eixo apical. Cada fiálide emerge da hifa central, logo após a septação hifal, com longas cadeias de conídios unicelulares ovoides ou fusiformes. Com presença de clamidósporos.

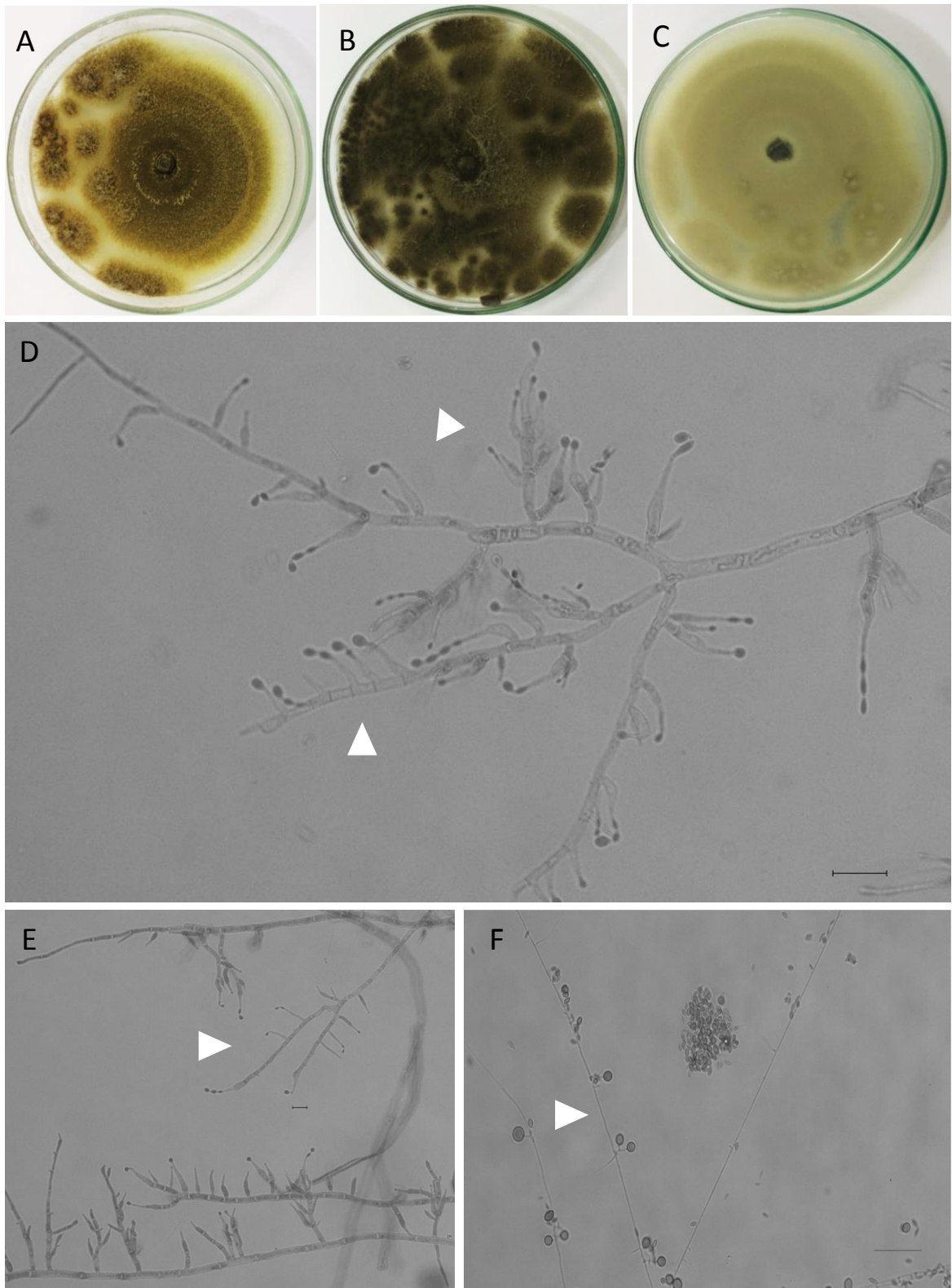


Figura 10 – Aspectos morfológicos do isolado de *Paecilomyces* sp. (CF/UENF 468) hiperparasita de estromas de coqueiro. Frente e verso da colônia em BDA incubado a 10 dias, 25°C (A, B, C). Fíalides solitárias ou em conjunto (D). Fíalides com dois tipos de conídios (D). Conidióforo com ramificação (E). Clamidósporos terminal, solitário (F). Barras de escala: 10 µm (D, F); 5 µm (E) (40X – 1,5X).

3.1.5.6. Levedura

A levedura (CF/UENF 469), apresentou colônias de coloração verde, opacas, com textura filamentosa, elevação umbiculada, com margem filamentosas, com crescimento lento, aproximadamente 24,5 mm, durante 10 dias de incubação, 25°C de temperatura. Microscopicamente apresentou células circulares com 2,77-7,24µm comprimento e 1,02-3,85 µm de largura. Produz hifas estreitas, septadas com 0,92-2,39 µm de largura e a reprodução assexuada por brotamento (Figura 11).

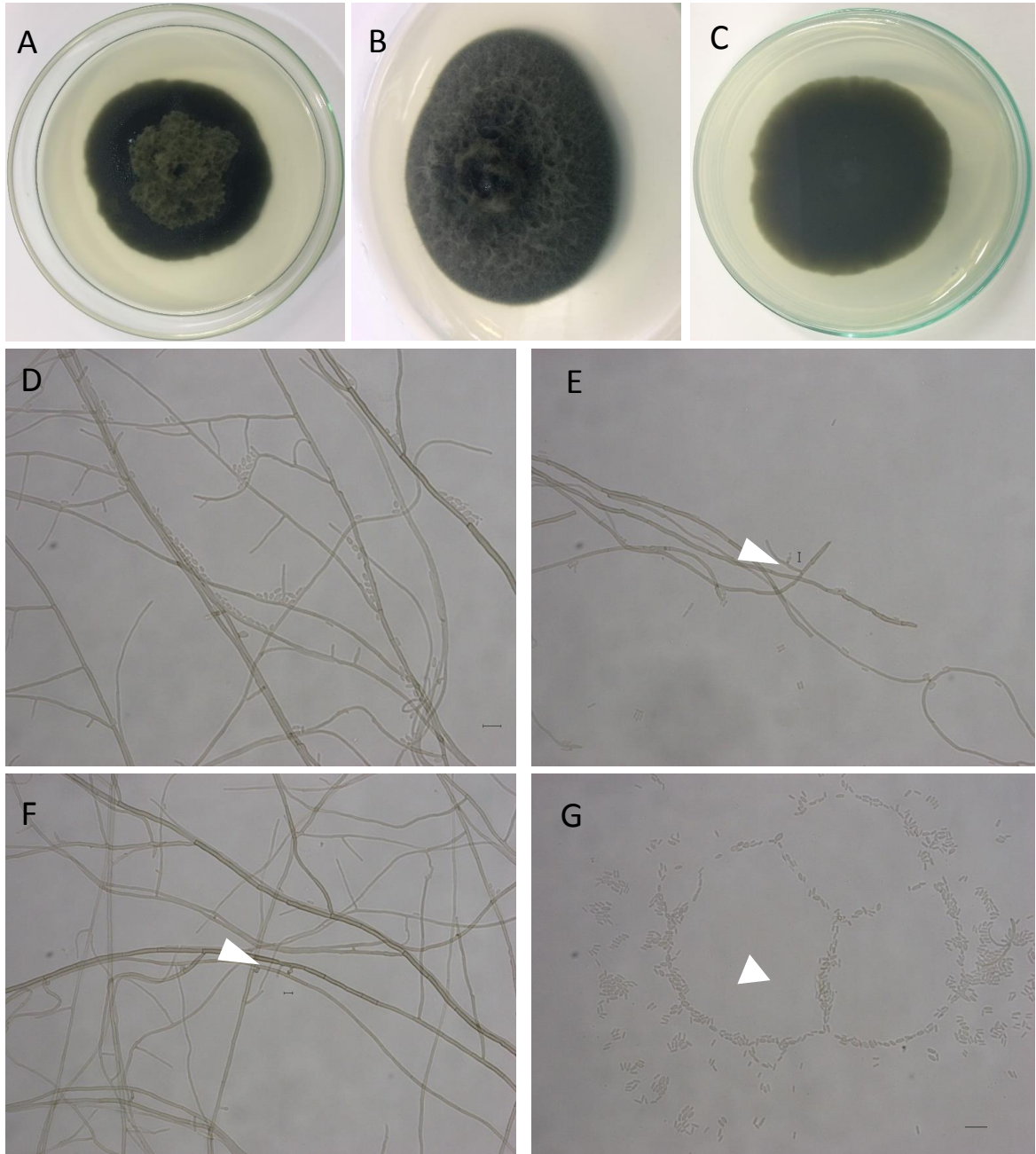


Figura 11 - Aspectos morfológicos do isolado de Levedura. (CF/UENF 469) hiperparasita de estromas de coqueiro. Frente e verso da colônia filamentosa (A, B, C), em BDA incubado a 10 dias, 25°C. Hifas estreitas com uma tonalidade de verde oliva (D, E, F). Emergência de células em hifa (E). Anastomose hifal (F). Conjunto de células e reprodução por brotamento (G). Barras de escala: 10 μ m (D, G); 5 μ m (E, F) (40X – 1,5X).

3.1.5.7. Efeito da temperatura no crescimento micelial e na esporulação de fungos hiperparasitas

As análises dos dois experimentos apresentaram resultados significativos semelhantes. Os resultados apresentaram interação significativa para o crescimento micelial e esporulação em diferentes temperaturas analisadas. A interação isolado e temperatura foi significativo, demonstrando haver diferença entre isolados frente às temperaturas.

Praticamente, quase todos isolados apresentaram comportamento semelhante, com uma única curva de regressão, revelando a significância para o polinômio de ordem dois. Assim, pôde-se estimar a temperatura ideal para o crescimento e esporulação, contudo os isolados de *Trichoderma spp.* (CF/UENF466 e CF/UENF467), não apresentou uma plotagem de curva que representasse os valores obtidos.

Ao verificar o crescimento micelial, os isolados de *Trichoderma spp.* (CF/UENF466 e CF/UENF467) e *Paecilomyces sp.* (CF/UENF468) apresentaram uma similaridade no crescimento nas diferentes temperaturas, atingindo toda superfície da placa (90 mm), contudo quando a temperatura avaliada foi de 15°C, o isolado CF/UENF468 teve sua taxa de crescimento reduzida. O mesmo foi observado no isolado CF/UENF467, na temperatura de 35°C, onde o crescimento foi retardado em todas as 4 repetições, com média de 16,73 mm de diâmetro, dado muito inferior quando comparada com as demais temperaturas.

A temperatura ideal para o desenvolvimento da levedura (CF/UENF469) ficou entre 20°C a 30°C, com diâmetro de crescimento da colônia foi de 15,73mm a 20,96mm, respectivamente. Nas demais temperaturas o crescimento foi afetado, reduzindo em aproximadamente 90% o seu desenvolvimento.

Para o grupo dos isolados do gênero de *Acremonium*, houve variação de crescimento dentro e entre as diferentes temperaturas testadas tendo a faixa ideal variando de 20°C e 25°C. Todos os isolados desenvolveram-se suas estruturas nessa escala de temperatura com um desempenho ótimo para os isolados CF/UENF450, CF/UENF452, CF/UENF454, CF/UENF455, CF/UENF456, CF/UENF457, CF/UENF458. Já os isolados CF/UENF461 e CF/UENF463, apresentaram um diâmetro média de colônia de 24,66mm e 22,74mm, respectivamente, na faixa supracitada (Figura 12 e 13).

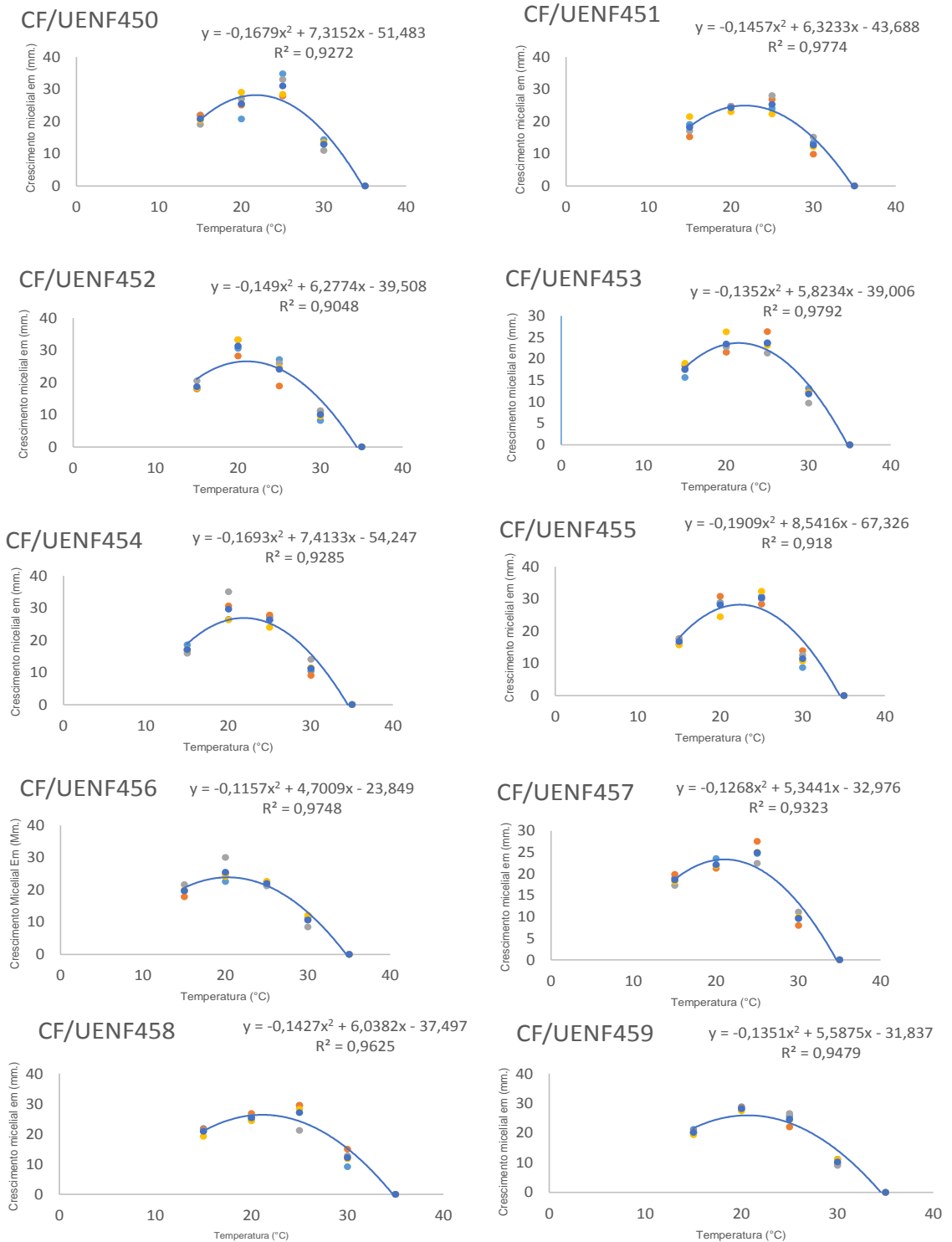


Figura 12. Curvas de crescimento micelial de isolados de *Acrenomium* spp., quando cultivados em meio de BDA, sob efeito de diferentes temperaturas, após 10 dias de incubação.

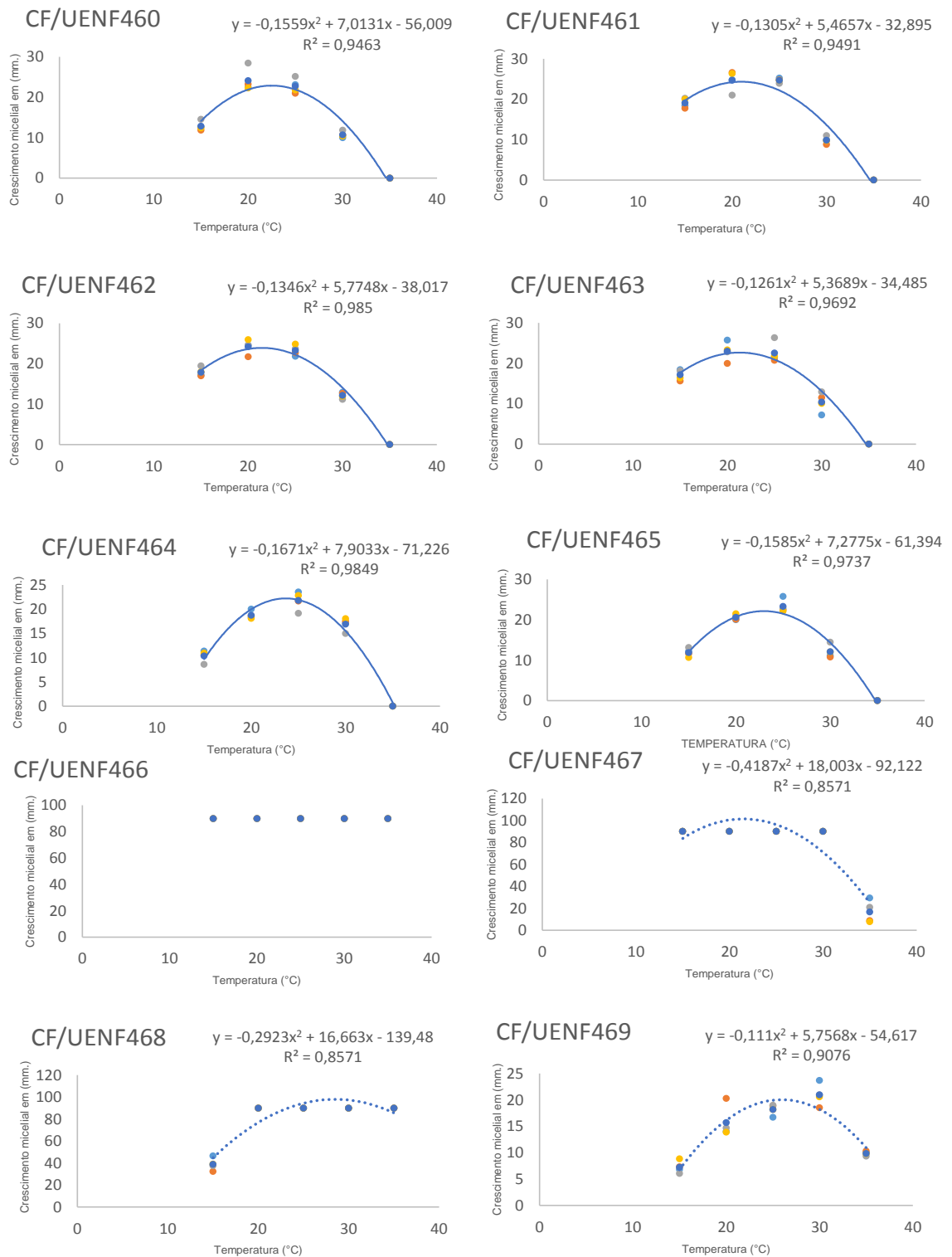


Figura 13. Curvas de crescimento micelial em diferentes temperaturas dos isolados de *Acremonium* spp. (CF/UENF460 a CF/UENF465), *Trichoderma* spp. (CF/UENF466 e CF/UENF467), *Paecilomyces* sp. (CF/UENF468) e *Levedura* (CF/UENF469), em meio de BDA, após 10 dias de incubação.

Quando a temperatura de 35°C foi utilizado, todos os isolados do gênero de *Acremonium* spp. (CF/UENF450 a CF/UENF465) não cresceram durante os 10 dias de incubação. Posteriormente essas placas foram organizadas em bancada de laboratório com temperatura ambiente de 25°C (± 2), para avaliar a existência de atividades dos isolado exposto a 35°C. Ao decorrer dos 10 dias, foi detectado que os isolados não sobreviveram o aumento de temperatura.

Nota-se que o comportamento dos isolados em relação a produção de esporos também sofreu influência das temperaturas testadas. Conforme pode ser observados na figura 14 e 15, a produção de esporos atingiu sua maior taxa na faixa de 20°C e 25°C, desempenho similar com o teste de crescimento micelial. Os isolados CF/UENF450, CF/UENF451, CF/UENF452, CF/UENF453, CF/UENF454, CF/UENF455, CF/UENF456, CF/UENF457, CF/UENF458, CF/UENF459, CF/UENF460, CF/UENF461, CF/UENF465 e CF/UENF469, apresentaram temperatura ótima para a esporulação e brotamento de 20°C (Figura 12 e 13).

Como pode ser analisado nas Figura 14 e 15, os isolados CF/UENF462, CF/UENF463 e CF/UENF464, não tiveram diferença significativa entre as faixas de 20°C e 25°C. Contudo, quando foram expostos a temperatura de 35°C, todos os isolados (CF/UENF450 a CF/UENF465) do gênero *Acremonium* spp. e da levedura tiveram seu desempenho afetado, incluindo a temperatura de 15°C e 35°C.

Para os demais isolados CF/UENF466, CF/UENF467, foi verificado que a temperatura ideal para esporulação foram de 20°C e 30°C, no caso do isolado e CF/UENF468, não apresentou diferença significativa nas temperatura de 15°C a 30°C, porém apontou um declínio na esporulação quando a temperatura foi elevada para 35°C (Figura 14).

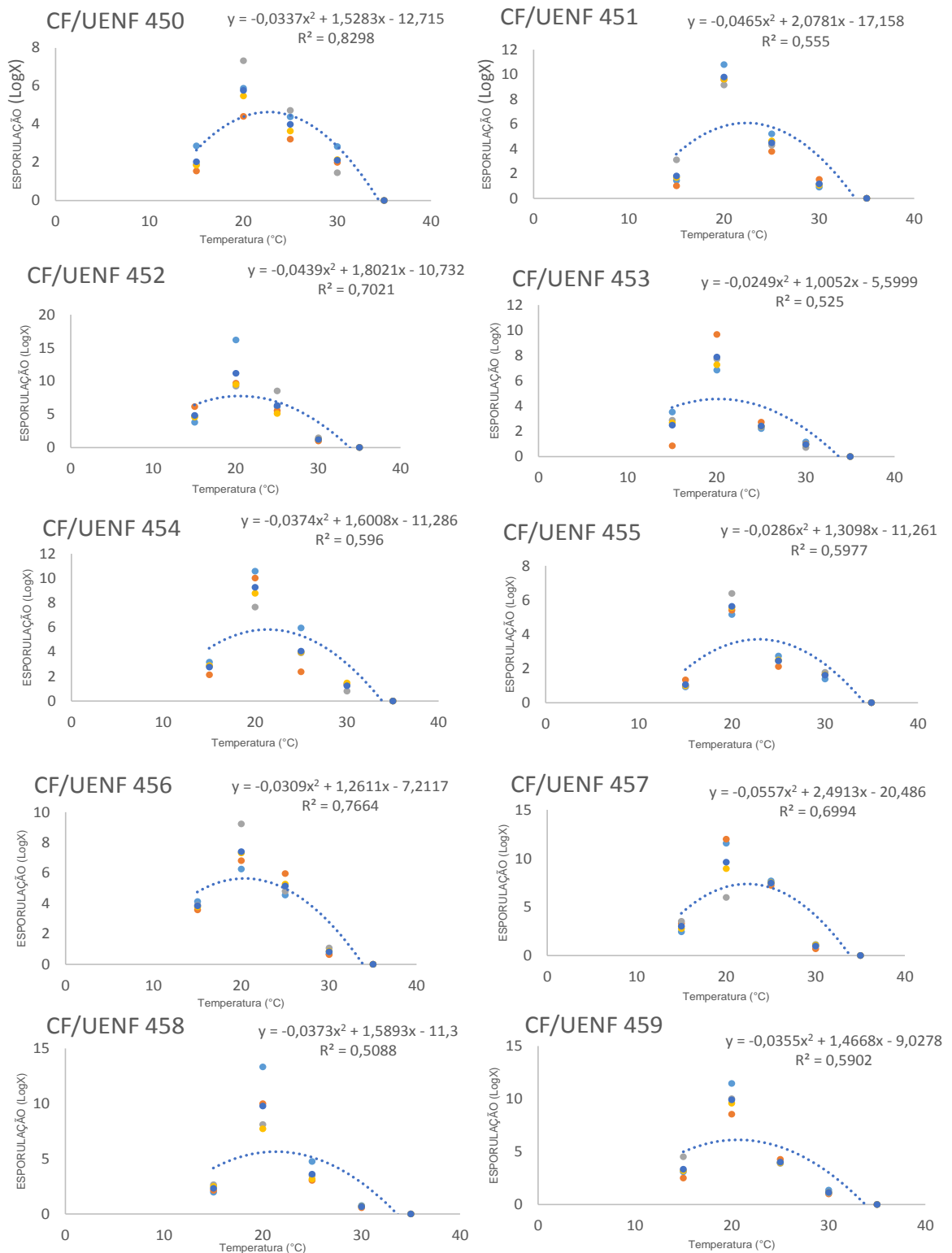


Figura 14. Curvas de produção de conídios em diferentes temperaturas dos isolados de *Acremonium* spp., em meio de BDA, após 10 dias de incubação.

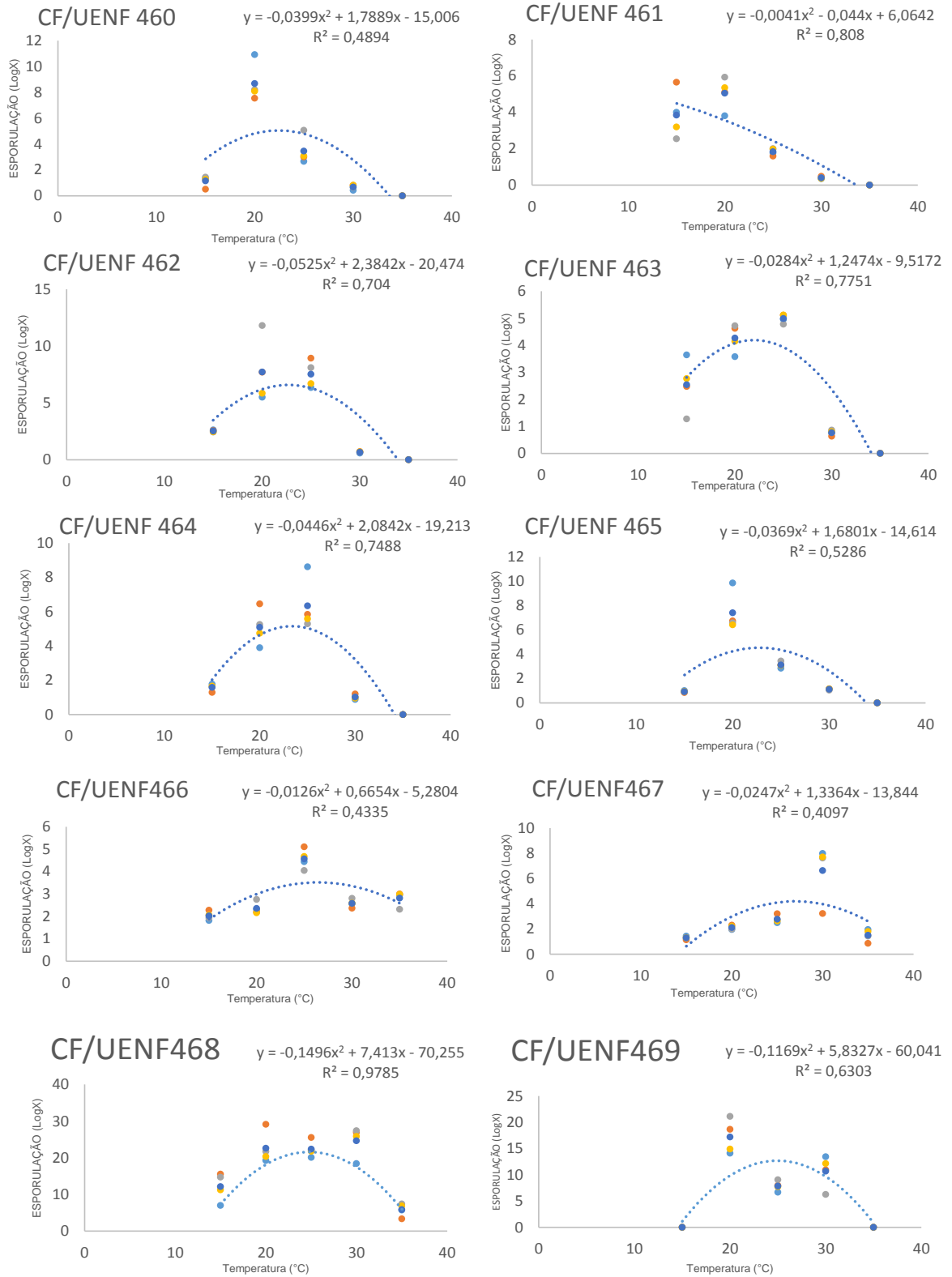


Figura 15. Curvas de produção de conídios em diferentes temperaturas dos isolados de *Acremonium* spp. (CF/UENF460 a CF/UENF465), *Trichoderma* spp. (CF/UENF466 e CF/UENF467), *Paecilomyces* sp. (CF/UENF468) e *Levedura* (CF/UENF469), em meio de BDA, após 10 dias de incubação.

3.1.6. DISCUSSÃO

No presente estudo foram obtidos 25 isolados associados a estromas de *Camarotella* spp. em folíolos de coqueiros. Com bases nas características avaliadas, esses foram agrupados nos seguintes gêneros: *Acremonium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Pestalotiopsis*, *Lasiodiplodia* e uma levedura (gênero desconhecido) dentre outros, que não puderam ser identificados, devido à ausência de esporos em meio.

Quando comparados com dados morfológicos de estudos anteriores (Gams, 1971, 1975; Sudo, 1989; Perdomo et al. 2011; Park et al, 2017 Warwick, 2001; Giraldo et al. 2014; Vivas et al., 2018), a maioria dos isolados é do gênero *Acremonium*, observando uma extensa diversidade nas características dos isolado, o que nos leva acreditar, o que nos leva acreditar que existam mais de uma espécie hiperparasitando estromas de lixas. A presença desses microrganismos parasitando o nicho estromático já foram detectados em diferentes regiões do Brasil (Sudo, 1989; Warwick et al., 2001, 2016; Vivas et al., 2018).

Sudo (1989), registrou o primeiro relato do gênero *Acremonium*, hiperparasitando as lixas do coqueiro. Em seu trabalho, isolou e identificou *Acremonium alternatum* Link e *Acremonium persicinum* (Nicot) W. Gams associados aos estromas de *Coccostroma palmicola* (Speg.) e *Catacauma torrendiella*, atualmente reclassificadas em Lixa grande (*Camarotella acrocomiae* (Mont.) K.D. Hyde & P.F. Cannon) e Lixa pequena (*Camarotella torrendiella* (Batista) Bezerra & Vitória, num pomar comercial no distrito de Lucena, Paraíba.

No Nordeste, os fungos *Hansfordia* spp. e *Acremonium* spp. são hiperparasitas, encontrados frequentemente sobre os estromas das lixas, sobretudo em períodos mais chuvosos. No estado do Pará é possível identificar a ocorrência de *Septofusidium elegans* sobre os peritécios das lixas, porém quando o estágio do patógeno se apresenta na fase espermogônia, o *Acremonium* spp. é mais parasitado (Warwick et al., 2001, 2016).

O gênero *Acremonium* tem se mostrado um aliado no controle biológico, reduzindo a incidência de atividades de fitopatógenos, além de apresentar um afinidade de sobrevivência em diferentes nichos. Vivas et al. (2018), estudando a etiologia do agente causal da pinta-preta do mamoeiro (*Carica papaya* L), causado

pelo fungo *Asperisporium caricae*, e o potencial do bicontrol, isolou três novas espécies de *Acremonium* spp. associadas as lesões da pinta-preta, *Acremonium* sp I (CF/UENF 446, COAD 1733), *Acremonium* sp II (CF/UENF 449, COAD 1730) e *Acremonium* sp III (COAD 1731), inclusos à família Bionectriaceae.

Revisado morfológicamente por Gams (1971, 1975), o qual descreveu as características típicas de espécies de *Acremonium*, que incluem geralmente crescimento lento de colônias, com uma diversidade de cor e textura; hifas hialinas, finas ou longas, com presença de septos; conidióforos simples, pouco ramificados ou verticilado podendo acontecer em determinadas espécies; fiálides ortotrópicas, gradualmente afinando em direção à ponta e com septo basal; os conídios são geralmente unicelulares (isto é, ameroconídios), hialinos ou pigmentados, globosos a cilíndricos, geralmente arranjados em cabeças ou correntes viscosas, às vezes em ambos pode estar presente em uma única cultura, localizado no ápice de cada fiálide; clamidosporos e esclerócios característicos são produzidos em algumas espécies.

O *Acremonium* é gênero anamorfo, pertencentes a diferentes ordens de Sordariomycetes, principalmente aos hipocreales (Glenn et al. 1996, Perdomo et al. 2011, Summerbell et al. 2011, Giraldo et al. 2014). Compreendem cerca de aproximadamente 207 registros associados ao gênero, de acordo com bases de dados do MycoBank (2019), das quais a maioria são saprófitos no solo, sendo isolada também de material vegetal, insetos e outros fungos.

Os isolados CF/UENF 450, CF/UENF 451, CF/UENF 452, CF/UENF 453, CF/UENF 454, CF/UENF 456, CF/UENF 457, CF/UENF 458, CF/UENF 459, CF/UENF 460, CF/UENF 461, CF/UENF 462, CF/UENF 463, quando comparados com os já descritos e identificados via testes moleculares, eles apresentaram uma semelhança comum, quando observando as estruturas reprodutivas a espécie *Acremonium persicinum* (Nicot) W.Gams, diferindo dos aspectos macromorfológicos, ao ser notado que os isolados do presente estudo apresentam coloração de colônia inicialmente branca e quando mais jovem se tornam amarelas (Sudo, 1985; Perdomo et al. 2011; Park et al, 2017).

O *Acremonium persicinum* (Nicot) W.Gams, isolados de solos, apresentam colônias inicialmente brancas, com a idade muda para rosadas, atingindo 53 mm de diâmetro após 15 dias em cultura a 25°C em BDA. No anverso da colônia, inicialmente branco escuro, ficando pálido quando a colônia se aproximou da borda.

Os conidióforos eretos, simples ou ramificados. Fíalides laterais e aciculares, medindo 1,5 a 2,5µm de largura × 18 a 43µm de comprimento. Os conídios ovais, medindo 1,0 a 2,0µm de largura × 2,5 a 3,0µm de comprimento (Sudo et al. 1985; Perdomo et al. 2011; Park et al, 2017).

No entanto, o isolado CF/UENF 461, apresentou aspectos semelhantes as espécies de *Acremonium fusidioides* e *Acremonium pilosum*, os quais produzem dois tipos de conídios, mas o primeiro cresce a 37 ° C e seus conídios são globosos, hialinos e possuem uma parede de averrugada. O *Acremonium pilosum* tem conídios globosos marrons pálidos e conídios filiformes, contudo não cresce a essa temperatura (Giraldo et al. 2014).

Acremonium citrinum (Giraldo, Guarro, Cano & Gené) quando cultivo no meio BDA, numa temperatura de 25 ° C, atinge de 4 a 5 mm de diâmetro após 14 d, apresentando um colônia de tonalidade amarelo claro, com uma textura rugosa, produção de pigmento difusível em amarelo claro, produzido em todos os meios testados em diferentes temperaturas (15 a 30°C). Conídios unicelulares, obovóides, às vezes elipsoidais, hialinos, de paredes finas e lisas, dispostos em cadeias, algumas vezes caindo na cabeça, clamidósporos não observados (Giraldo et al. 2014). Essas características aproximam-se do isolado CF/UENF 455, principalmente pela produção de colônia amarela rugosa, pigmentação de cor amarela e fialides longas.

O *Acremonium acutatum* obtido hiperparasitando *Cescorpora atromarginalis* em Erva Moura ou Erva-Gardiniana (*Solanum nigrum*), possuem colônias de coloração branca para rosa pálida, com aspecto flocoso e no centro granuloso; fíalides medindo 20 a 40µm de comprimento e 1,6 a 2µm de largura; conídios em cadeias longas; com presença de clamidósporos medindo 4 a 5µm de diâmetro (Gams, 1971, 1975). Essas características do *Acremonium acutatum* Gams, W. assemelham-se aos isolados CF/UENF 464 e CF/UENF 465.

Diante da extensa diversidade do gênero *Acremonium*, levando se em consideração as informações expostas, existem uma grande possibilidade dos fungos isolados neste trabalho possam integrar um grupo de espécies desconhecidas hiperparasitando os estromas das lixas do coqueiro, o que sugere uma análise mais criterioso, com estudos moleculares, envolvendo o sequenciamento do rDNA e análises filogenéticas.

Até a atual pesquisa não foram encontrados registros de hiperparasitismo de *Trichoderma* spp., *Paecilomyces* sp. e levedura associados aos estromas das lixas do coqueiro no Brasil, tornando esses registros os primeiros relato para o patossistema. Dois isolados apresentaram características bem contundentes ao gênero de *Trichoderma*, ocasionalmente são encontrados nos solos, como microorganismos de vida livre ou colonizando raízes de plantas, podendo habitar o interior dos tecidos vegetais, como simbiotes.

Trabalhando com diversidade de espécies de *Trichoderma* em solos de rizosfera NAHER et al. (2019), identificou espécies de *Trichoderma harzianum* habitantes de solo da rizosfera, em diferentes áreas cultivadas como arroz, dendê e plantações de banana. As colônias de *Trichoderma harzianum*, inicialmente forma micélios brancos que mudam para verde amarelado ou verde escuro com o progresso de sua maturação, o fungo apresentou crescimento rápido. Formação de micélios aéreos brancos e colônia de cores verdes, os conidióforos são dispostos de forma emparelhada ao longo dos ramos e eixo principais. Conidióforos com ramificação, fíalides caracteristicamente alongados, os conídios globosos para subglobosa, com presença de clamidósporos.

Observando correlação entre caracteres morfológicos e eficácia de biocontrole Muthu Kumar et al. (2016), identificou doze isolados, apresentando cor de colônia, cheiro de cultura, cor de micélio, conidiação, formato de conídio, parede de conídio e cor de conídio bem semelhantes, pertencentes a espécies de *Trichoderma harzianum*. Tanto o trabalho de Muthu Kumar et al. (2016) e NAHER et al, (2019), a espécie de *Trichoderma harzianum* apresentaram características semelhantes dos os isolados CF/UENF466 e CF/UENF467, obtidos de estromas folíolos de coqueiros.

O básico para os estudos taxonômicos é a caracterização morfológica, mesmo que seja uma técnica fundada há muito tempo, ainda possui grande aplicabilidade, contudo a morfologia por si só não é recomendada para diferenciação de espécie no gênero *Acremonium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces* por existir várias espécies com características morfológicas similares, tornando o ITS indispensável para a identificação de novas espécie no nível de complexidade.

A temperatura é um fator abiótico que tem uma grande influência no crescimento dos fungos, esses por sua vez, existem fungos que se desenvolvem em uma faixa de temperatura que compreende de uma temperatura mínima, ótima

e máxima. A temperatura pode variar de acordo com estágio do ciclo de vida do microrganismo, interferindo também no tipo de reprodução. Contudo nem sempre uma temperatura ideal para o crescimento seja necessariamente a mesma temperatura para toda atividade celular (Pelczar, 1996),

O efeito inibidor da temperatura sobre o crescimento dos fungos é bastante variável, porém a maioria dos isolados de *Acremonium* spp., apresentaram melhor desenvolvimento entre 20°C e 25°C. Por outro lado, todos os isolados reduziram seu crescimento ao elevar a temperatura, não apresentam desenvolvimento na faixa de 35°C.

Para a maioria dos isolados de *Acremonium* spp., adquiridos nesse estudo, a temperatura ideal para a produção de conídios também foi entre a faixa de 20°C a 25°C. Resultado semelhante foi obtido por Vivas et al. (2015), trabalhando com isolados de *Acremonium* spp. obtidos de lesões pinta-preta do mamoeiro (*Carica papaya* L), causado pelo fungo *Asperisporium caricae*, observou-se maior variação térmica de crescimento na faixa de 20-25°C, indicando que essa faixa avaliada seja ótima para crescimento micelial dos *Acremonium*, apresentando um menor crescimento micelial na faixa de temperatura de 25 e 30°C, contudo não afetou a esporulação.

A temperatura mais favorável para as espécies de *Trichoderma* se encontra entre 25 e 30°C, onde o crescimento médio foi registrado entre (53-90 mm de diâmetro) (Singh et al. 2009). Estudando o efeito de diferentes da temperatura na produção de biomassa de isolados de *Trichoderma*, Maurya et al. (2017), também identificou que o excelente crescimento de *Trichoderma* foi encontrado na faixa de temperatura de 25 a 30°C, concluindo que o crescimento radial máximo e a esporulação foram encontrados a 25°C e o mínimo a 20°C.

Resultado idênticos foram encontrados na presente pesquisa, quando os dois isolados de *Trichoderma* spp. (CF/UENF 467, CF/UENF 468), se desenvolveram bem em todas as faixas de temperatura avaliadas, incluindo a faixa de 25 e 30°C, com um declínio no crescimento quando a temperatura foi elevada para 35°C. Contudo, a produção de conídios variou entre 25°C e 30°C para os isolados CF/UENF 466, CF/UENF 467, simultaneamente.

Avaliando o crescimento micelial de *Trichoderma* spp. em diferentes temperaturas, Bomfim et al. (2010), observou que para todos os isolados as

melhores temperaturas para crescimento foi de 25°C e 30°C, não apresentando diferença significativas para os isolados.

3.1.7. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível observar a ocorrência de oito gêneros fúngicos, a saber: *Acremonium*, *Trichoderma* e *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Pestalotiopsis*, *Lasiodiplodia* e levedura hiperparasitando os estromas de lixas do coqueiro. Dentre eles o *Acremonium* apresentou uma maior frequência e variabilidade entre os isolados, com fortes indícios que haja a ocorrência de mais de uma espécie associado as lixas. Com a pesquisa foi possível identificar o hiperparasitismo de *Trichoderma*, *Paecilomyces* e levedura, aos estromas de lixas do coqueiro (lixa pequena e grande), tornando esses registros os primeiros relato para o patossistema

A temperatura ideal para a indução do crescimento e esporulação dos isolados de *Acremonium* spp. variou de 20°C a 25°C, exceto para os isolados CF/UENF466, CF/UENF467, foi verificado que a temperatura ideal para esporulação foram de 20°C e 30°C, no caso do isolado e CF/UENF468 não apresento diferença significativa nas temperatura de 15°C a 30°C. Contudo todos os isolados apontaram um declínio no crescimento/esporulação quando se elevou a temperatura para 35°C.

Já para o gênero de *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces* sp., ambos cresceram e esporularam bem nas temperaturas testas, contudo a faixa de 35°C, apresentou uma interferência para o desenvolvimento dos isolados.

3.1.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas, A. C.; Mafia, R. G. (2016) Métodos em Fitopatologia. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2016. v. 1. 516p.
- Araújo, K. L.; Silveira, S. F.; Mussi-Dias, V.; Rocabado, J. M. A.; Miguens, F. C. (2016) Local infection associated with vascular bundles: the colonization of coconut palm leaflets by two *Camarotella* species. EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY , v. 148, p. 413-422.
- Bettiol, W. & Morandi, M.A.B. (2009). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectiva. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 341p.
- Blackwell, M. (2011) The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? American Journal of Botany. 98(3): p. 426–438.
- Bomfim, M. P.; São-José, A. R.; Rebouças, T. N. H.; Almeida, S. S.; Souza, I. V. B.; Dias, N. O. (2010) Avaliação antagônica in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. Summa phytopathol. vol.36 n. 1, Botucatu, ISSN 0100-5405, p.61-67.
- Carmichael, J.K., Kendrick, W. B., Connors, I. L. & Sigler, L. (1980) Genera of Hyphomycetes. The university of Alberta Press, Alberta, Canada, 386p.

- Castellani, A. (1939) The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 42: p.225-226.
- Chagas Júnior, A.F.; Santos, G.R; Reis, H.B.; Miller, L.O. & Chagas, L.F.B. (2012). Resposta de feijão-caupi a inoculação com rizóbio e *Trichoderma* sp. no cerrado, Gurupi-TO. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 7: p. 242-249.
- Costa, R.S.C., Nascente, A.S., Ribeiro, G.D., Ferreira, M.G.R.(2005) Cultivo do Coqueiro em Rondônia. Ed. Téc. NASCENTE, A.S. EMBRAPA Rondônia. Versão Eletrônica: ISSN 1807-1805. Porto Velho, Rondônia.
- Dhingra, O.D. & Sinclair, J.B (1995). *Basic Plant Pathology Methods*. 2. ed. Boca Rota: CRC Press Inc, 434p.
- Ellis, M. B. (1980) *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 494p.
- Fontes, H. R.; Ferreira, M. S.; Siqueira, L. A. (2002) Sistema de produção para a cultura do coqueiro. Editores: Humberto Rollemberg Fontes/Joana Maria Santos Ferreira/Luiz Alberto de Siqueira. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. 63p.
- 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 *Sarcocladium* (Hypocreales). *Persoonia*, 34, p.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): p.349-368

- Gams, W. (1971) *Cephalosporium-artige Schimmelpilze* (Hyphomycetes). G. Fischer, Stuttgart., 262p.
- Gams, W. (1975) *Cephalosporium-like Hyphomycetes: some tropical species*. Transactions of the British Mycological Society, 64, (3):p.389-404.
- Glenn, A.E.; Bacon, C.W.; Price, R. & Hanlin, R.T. (1996) Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. Mycologia .88:p.369–383.
- Guarro J, Gene´ J, Stchigel AM, Figueras MJ. (2011) Atlas of soil ascomycetes. Utrecht, the Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. 486p.
- Hoffmann, C.A.; Chagas, L.F.B.; Silva, D.P.; Chagas Junior, A.F. & Scheidt, G.N. (2015) Potencial de antagonismo de isolados de *Trichoderma* spp. contra o isolados de *Fusarium* sp.,in vitro. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável10(1): p. 236-242.
- 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:p.307-331.
- Koneman E, Winn Jr. W, Allen S, Janda W, Procop G, Schrec-kenberger P. (2001) Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Matos, E. H. S. F. (2012) Utilização e aplicação de palmeiras para paisagismo centro de apoio ao desenvolvimento tecnológico. CDT/UnB31/8/.
- Martins, C.R; Júnior, L. A. de J. (2013) Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional: panorama 2014/Carlos Roberto Martins, Luciano Alves de Jesus Júnior – Aracaju: Embrapa Tabuleiros

Costeiros. 51p. il.; color. Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1517-1329; 184p.

Maurya, M. K.; Srivastava, M.; Singh, A.; Sonika Pandey and Ved Ratan. (2017) Effect of Different Temperature and Culture Media on the Mycelia Growth of *Trichoderma viride* Isolates. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 6(2): p.266-269.

Monteiro, C. M. P.; Caron, E. S., Silveira; S. F., Almeida; A. M, Souza-Filho; G. R., Souza, A. L. (2013) Control of foliar diseases by the axillary application of systemic fungicides in Brazilian coconut palms. *Crop Protection*, v. 52, p.78–83.

Muthu Kumar, A.; Pratibha, S. (2016) Morphological Characterization of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* to Study the Correlation between Morphological Characters and Biocontrol Efficacy. *International Letters of Natural Sciences*, ISSN: 2300-9675, Vol. 55, p.57-67.

Naher, L.; Syawani, N.; Amieza, N.; Kamarudin, A. B.; Karim, S. M. R. (2019) *Trichoderma* species diversity in rhizosphere soils and potential antagonism with *fusarium oxysporum*. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 35, n. 1, p.13-26.

ParK, Se-Won; Nguyen, T.T.T.; Lee, H.B (2017). Characterization of Two Species of *Acremonium* (Unrecorded in Korea) from Soil Samples: *A. varicolor* and *A. persicinum*. *Mycobiology*. Division of Food Technology, Biotechnology & Agrochemistry, College of Agriculture. National University, Gwangju 61186, Korea.

Pelczar JR., J.M.; Chan, E.C.S. & KRIEG, N.R. (1996) *Microbiologia: conceitos e aplicações*. Vol.1, 2a ed. São Paulo, Makron Books. 524p.

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): p.243-256.
- Pinto, A. C.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. A. (2002) Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, Vol. 25, Supl. 1, p. 45-61.
- Purseglove, J. W. (1975). *Tropical crops monocotyledons*. 2ª Impress, Halsted Press, 607p.
- Seifert, K.; Morgan-Jones, G.; Gams, W & Kendrick, B. (2011) The genera of Hyphomycetes. CBS. Biodiversity, série 9. 997p.
- 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. 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* v.68, p.139–162.
- Sutton, B.C. (1980) *The Coelomycetes*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England, 696p.
- Seifert, K.; Morgan-Jones, G.; Gams, W.; Kendrick, B. (2011) The Genera of Hyphomycetes. CBS Biodiversity, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Netherlands. 9:997p.
- Vitoria, N. S.; Bezerra, J. L.; Gramacho, K. P.; Luz, E. D. M. N. (2008) *Camarotella torrendiella* comb. Nov. e *C. acrocomiae*: agentes etiológicos das lixas do coqueiro. *Trop. plant pathol.* [online]. vol.33, n.4, 1. ISSN 1982-5676. p.295-30.

- Vivas, J.M.S.; Silveira, S. F.; Santos, P. H. D.; Carvalho, B. M.; Poltronieri, T. P. S.; Jorge, T. S.; Santos, J. S.; Ferreira Kurosawa, R. N.; Moraes, R. (2018) Antagonism of fungi with biocontrol potential of papaya black spot caused by *Asperisporium caricae*. AUSTRALIAN JOURNAL OF CROP SCIENCE (ONLINE). v. 12, p.827-833.
- Warwick, D. R. N; Talamini, V. (2016) Manejo de doenças de fruteiras tropicais - Doenças do coqueiro. Informe Agropecuário, publicação da EPAMIG. Belo Horizonte, MG, 2016, v. 37, n.290.
- Warwick, D. R. N. (2007) Índices de parasitismo de Lixa-grande do coqueiro pelos fungos hiperparasitas: *Acremonium cavaraeanum* e *Dicyma pulvinata* / Dulce Regina Nunes Warwick. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, nº25. 13p.
- Warwick, D. R. N. & Leal, E. C. (2003) Principais doenças foliares. In: Ferreira, J.M.S. Coco: Fitossanidade. EMBRAPA/CPATC, EMBRAPA Informações tecnológicas, Brasília-DF, p.41-50.

3.2. Colonização e antagonismo de fungos *Acremonium* spp. e *Trichoderma* spp. a fungos associados aos estromas de lixa grande do coqueiro (*Cocos nucifera* L.).

3.2.1. Resumo

As doenças foliares conhecidas como lixas grande e pequena do coqueiro são responsáveis por reduzir o desenvolvimento da planta, a área foliar, o número de folhas por planta, e a produtividade, em decorrência da queda prematura de frutos. O controle biológico é indicado devido a ocorrência espontânea de inimigos naturais, especialmente fungos hiperparasitas de estromas das lixas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar, sob condições controladas, fungos isolados de estromas quanto a capacidade de colonização de estromas foliares da lixa grande em folíolos destacados de coqueiro. Adicionalmente, efetuaram-se testes de antibiose *in vitro*, por meio de pareamentos dos fungos hiperparasitas com outros fungos também isolados de folíolos de coqueiro, com ou sem sintomas de doenças. Os fungos hiperparasitas inoculados nos estromas proporcionaram uma excelente colonização da superfície dos mesmos, invadindo a parte interna do estroma. Dos 20 isolados inoculados, cinco isolados de *Acremonium* spp. (CF/UENF 450, CF/UENF 451, CF/UENF 453, CF/UENF 459 e CF/UENF 461) e dois isolados de *Trichoderma* spp. (CF/UENF 466 e CF/UENF 467) foram eficientes na colonização dos estromas, tanto externa quanto internamente, impedindo a formação ou

causando a deterioração do himênio e ascósporos. Foi averiguado também que a concentração de 10^6 conídios por mL, foi uma concentração que forneceu uma colonização efetiva durante o experimento realizado. Os ensaios *in vitro* consistiram de testes de antagonismo em confrontação direta. Quatro isolado de *Acremonium* spp. (CF/UENF 455, CF/UENF 459, CF/UENF 461, CF/UENF 463) e dois isolados de *Trichoderma* spp. (CF/UENF 466 e CF/UENF 467) foram testados contra fungos dos gênero *Fusarium* sp. (CF/UENF470), *Curvularia* sp. (CF/UENF471), *Cladosporium* sp. (CF/UENF472), *Pestalotiopsis* sp. (CF/UENF473), *Lasiodiplodia* sp. (CF/UENF474) associados aos estromas de lixas do coqueiro. Observou-se que isolado de *Acremonium* spp. (CF/UENF 459, CF/UENF 461, CF/UENF 463) apresentaram maiores médias na ação antagônica sobre os fungos confrontados. Os dois isolados de *Trichoderma* spp. (CF/UENF 466 e CF/UENF 467), não apresentaram diferença estatísticas entre si, contudo proporcionaram uma redução e inibição no crescimentos micelial dos fungos. Assim, os isolados de *Acremonium* spp. e *Trichoderma* spp. exibiram uma afinidade na colonização dos estromas de lixa grande e exerceram e exerceram ação antagônica quando confrontados por pelos fungos *Fusarium* sp., *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp., *Pestalotiopsis* sp. e, *Lasiodiplodia* sp., *in vitro*, demonstrando potencial para o uso em controle biológico.

Palavra-chave: Lixas do coqueiro, hiperparasitas, antibiose, controle biológico.

3.2.2. Abstract

The leaf diseases known as large and small sandpaper of the coconut tree are responsible for reducing the development of the plant, the leaf area, the number of leaves per plant, and the productivity, due to the premature fall of fruits. Biological control is indicated due to the spontaneous occurrence of natural enemies, especially hyperparasitic fungi from sandpaper stroma. The present study aimed to evaluate, under controlled conditions, isolated stromal fungi for the ability to colonize leaf stroma from large sandpaper in detached coconut palm leaflets. In addition,

antibiosis tests were performed in vitro, by pairing hyperparasitic fungi with other fungi also isolated from coconut palm leaflets, with or without disease symptoms. The hyperparasitic fungi inoculated in the stroma provided excellent colonization of the stroma's surface, invading the internal part of the stroma. Of the 20 inoculated isolates, five isolates of *Acremonium* spp. (CF / UENF 450, CF / UENF 451, CF / UENF 453, CF / UENF 459 and CF / UENF 461) and two isolates of *Trichoderma* spp. (CF / UENF 466 and CF / UENF 467) were efficient in colonizing stroma, both externally and internally, preventing formation or causing the deterioration of hymenium and ascospores. It was also found that the concentration of 106 conidia per mL was a concentration that provided effective colonization during the experiment. The in vitro tests consisted of direct antagonism tests. Four isolates of *Acremonium* spp. (CF / UENF 455, CF / UENF 459, CF / UENF 461, CF / UENF 463) and two isolates of *Trichoderma* spp. (CF / UENF 466 and CF / UENF 467) were tested against fungi of the genus *Fusarium* sp. (CF / UENF470), *Curvularia* sp. (CF / UENF471), *Cladosporium* sp. (CF / UENF472), *Pestalotiopsis* sp. (CF / UENF473), *Lasiodiplodia* sp. (CF / UENF474) associated with stroma of sandpaper of the coconut tree. It was observed that isolated from *Acremonium* spp. (CF / UENF 459, CF / UENF 461, CF / UENF 463) presented higher averages in the antagonistic action on the confronted fungi. The two isolates of *Trichoderma* spp. (CF / UENF 466 and CF / UENF 467), showed no statistical difference between them, however they provided a reduction and inhibition in the mycelial growth of fungi. Thus, isolates of *Acremonium* spp. and *Trichoderma* spp. exhibited an affinity in the colonization of large sandpaper stroma and exerted and exerted antagonistic action when confronted by the fungi *Fusarium* sp., *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp., *Pestalotiopsis* sp. and, *Lasiodiplodia* sp., in vitro, showing potential for use in biological control.

Keyword: Coconut trash, hyperparasites, parasitism, biological control.

3.2.3. INTRODUÇÃO

O cultivo do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) tem um papel fundamental para a economia do país, uma vez que é explorada principalmente por pequenos produtores, pode ser considerado uma das palmeiras de maior importância na atividade agrícola, gerando emprego e renda no processo de produção, além dos inúmeros empregos indiretos originados ao longo da cadeia produtiva e comercial dos subprodutos.

No Brasil, os cultivos são destinados a produção de coco seco, leite de coco, e consumo “*in natura*” de água de coco. Os subprodutos do coco podem ser utilizados para a produção de fibras, usadas em enchimentos de bancos de automóveis, já a casca do coco serve como substrato agrícola na cultura orgânica. Atualmente, é possível processar a casca do coco verde como ingrediente na formulação de ração para bovinos, originando assim mais de 200 produtos e subprodutos de significativo valor econômico (Costa et al., 2005; Brainer, 2018).

As doenças de plantas são responsáveis por grandes perdas nas culturas de importância econômica, sendo os fungos patogênicos os principais agentes dessas doenças. Entre as doenças foliares importantes que incidem sobre a cultura estão a Lixa grande (*Camarotella acrocomiae* (Mont.) K.D. Hyde & P.F. Cannon) e Lixa pequena (*Camarotella torrendiella* (Batista) Bezerra & Vitória) ocorrendo em destaque nas regiões costeiras do Sul da Bahia e do Sudeste, responsáveis por reduzir o número de folhas em até 50% de produção (Warwick, 2001; Vitória et al., 2007; Monteiro et al., 2013).

As lixas incidem nas folhas e/ou nos frutos da palmeira, provocando a desfolha prematura, comprometendo o desenvolvimento do fruto, por conta do enfraquecimento físico e fisiológico de seus cachos, em consequência da redução da área foliar fotossinteticamente ativa (Araújo et al., 2016).

Para o controle, tanto da lixa grande e da lixa pequena, são usadas técnicas de manejo semelhantes, desde a eliminação periódica e a queima das folhas infectadas à adubação mineral com efeito sobre a incidência da doença no primeiro ano de plantio (Leal et al., 1994). Para o controle, recomenda-se a utilização de produtos protetores, com aplicações intercaladas de 20 a 40 dias, com a cobertura total das folhas (EMBRAPA/CPATC, 1993; Mirisola Filho, 2002; Warwick et al., 2003).

No entanto, o controle químico das lixas do coqueiro, especialmente com fungicidas protetores, é limitado pela dificuldade de se pulverizar palmeiras de porte elevado, inviabilizando a cobertura das folhas e sua proteção e obrigando a adoção de altos volumes de pulverização, o que torna esta prática tecnicamente antieconômica (Monteiro et al., 2018). O uso de fungicidas sistêmicos aplicados por via axilar tem sido estudado por apresentar eficiência no controle das doenças foliares do complexo lixas-queima foliar do coqueiro, com resultados promissores no aumentando significativa no número de folhas por plantas em três aplicações por ano. A técnica, além de auxiliar na redução dos custos de manejo, preserva a integridade do estipe do coqueiro, em relação a aplicação por meio de perfuração do mesmo (Souza, 2017).

Entretanto, os fungicidas sistêmicos, até o momento selecionados para este fim, não se encontram com registro legal para a cultura no Brasil e apresentam vida útil limitada pelo provável surgimento de isolados resistentes de fungos patogênicos (Warwick et al., 2001; Monteiro et al., 2013). Ademais, o controle químico esbarra em problemas ectoxicológicas e no aparecimento de doenças iatrogênicas (Bettioli, 2009). Pelo fato das lixas do coqueiro serem constantes e onipresentes e, por se apresentarem naturalmente colonizadas por fungos hiperparasitas (Sudo, 1985, Warwick et al., 2002) vislumbra-se a possibilidade de se explorar o controle biológico das lixas do coqueiro.

O biocontrole pela aplicação de fungos hiperparasitas, inimigos naturais, tem potencial para redução na produção de inóculo nas folhas basais, que não são atingidas por fungicidas aplicados via axilar, complementando o controle da doença de modo mais sustentável e natural. Microrganismos antagonistas de patógenos vegetais com potencial para reduzir a fonte de inóculo e atividade patogênica em plantas e no solo têm sido pesquisados e, atualmente, existem vários produtos de biocontrole registrados no Brasil e no mundo (Michereff et al., 2005; Bettioli et al., 2009; Machado et al., 2012).

Trabalhos executados por Sudo et al. (1985), relatam a presença de fungos brancos hiperparasitando estromas de lixas em lavouras de coqueiro. Contudo, mesmo com a condução de testes de parasitismo do então fungo branco (hiperparasita) sobre as estruturas das lixas, pesquisas voltadas para a viabilização de produtos à base desses microrganismos são escassas, tornando a problemática pertinente e sem solução.

Trabalhos anteriores conduzidos na baixada fluminense comprovam o estabelecimento, no campo, de fungos hiperparasitas sobre estromas das lixas foliares do coqueiro. No entanto, faltam estudos atuais sobre a diversidade taxonômica desses fungos, da capacidade parasítica em estromas, da correlação desse parasitismo com a redução na produção de inóculo, além do progresso das epidemias, com aumento refletido no vigor e na produção de frutos.

Alguns desses estudos se sustentam apenas em dados de colonização externas os estromas, não observando a interação da presença do mofo branco com os fitopatógenos das lixas. A presença desses microrganismos na superfície dos estromas não são o bastante para afirmar que as doenças foram controladas.

Diante dessas informações, ficam diversos questionamento. Todos os fungos que mofam os estromas são mesmo hiperparasitas ou apenas contaminantes externos? Há variabilidade quanto a capacidade de colonizar estromas entre os fungos encontrados mofando lixas? Ainda, a diversidade de fungos hiperparasitas de estromas de lixa permanece inexplorada e não há estudos regionais visando o biocontrole das lixas do coqueiro no norte fluminense.

Portanto, a necessidade de desenvolver estudos para resolver esses questionamentos são essenciais para entender a relação patógeno-hospedeiro para então desenvolver um produto a base de microrganismo para o controle das lixas do coqueiro. Neste sentido, este estudo teve como objetivo avaliar o parasitismo em estromas da lixa grande e a antibiose *in vitro* de fungos potenciais hiperparasitas isolados de estromas de lixas do coqueiro, a fim de ampliar o conhecimento a respeito destes fungos e determinar seu potencial de biocontrole das doenças.

3.2.4. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.4.1. Origem dos isolados de hiperparasitas utilizados

Nos ensaios de avaliação hiperparasitismo de estromas em folíolos destacados de coqueiro (apresentando lesões com estromas), foram utilizados os isolados proveniente de estromas de lixas de coqueiro, mantidos na Clínica Fitossanitária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (CF/UENF), campus de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação, procedência dos isolados fúngicos com potencial hiperparasitas, obtidos da área estromatica dos folíolos do coqueiro, coletados em diferentes regiões, no período de 2018-2019.

Código/Isolado	Gênero	Patógeno	Local da coleta	Data
CF/UENF450*	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes - RJ	30/08/2018
CF/UENF451	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	20/07/2018
CF/UENF452	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella torrendiella</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	26/07/2018
CF/UENF453	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	06/10/2018
CF/UENF454	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella torrendiella</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	06/10/2018
CF/UENF455	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	06/10/2018
CF/UENF456	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	06/10/2018
CF/UENF457	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	06/10/2018
CF/UENF458	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella torrendiella</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	06/10/2018
CF/UENF459	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella torrendiella</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	15/10/2018
CF/UENF460	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	06/11/2018
CF/UENF461	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	14/11/2018
CF/UENF462	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	10/02/2019
CF/UENF463	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella torrendiella</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	10/02/2019

CF/UENF464	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Mimoso do Sul - ES	20/05/2019
CF/UENF465	<i>Acremonium</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Mimoso do Sul - ES	20/05/2019
CF/UENF466	<i>Trichoderma</i>	<i>Camarotella torrendiella</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	10/02/2019
CF/UENF467	<i>Trichoderma</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	07/09/2018
CF/UENF468	<i>Paecilomyces</i>	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	10/02/2018
CF/UENF469	Levedura (não identificada).	<i>Camarotella acrocomiae</i>	Campos dos Goytacazes – RJ	21/11/2019

*O código dos isolados são referentes aos registros do armazenamento na Clínica Fitossanitária da Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, *campus* de Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro.

3.2.4.2. Avaliação parasitismo em estroma de lixa grande

Para realização dos testes de colonização de estromas por fungos hiperparasitas, folíolos de coqueiro com estromas de lixa grande (*C. acrocomiae*) foram coletados em plantações de cocos da variedade anã, com aproximadamente 6 anos de plantio, em propriedade particular localizada no distrito de Praça João Pessoa, região territorial do município de São Francisco de Itabapoana (21°19' 50.98" de latitude sul e a 41°05' 30.83" de longitude oeste), estado do Rio de Janeiro.

No laboratório, após lavagem em água de torneira corrente, secos a sombra, os fragmentos de folíolos com estromas foram selecionados de acordo com o desenvolvimento dos estromas, em: fase inicial (I) e intermediária (II). Foram descartados os estromas mais velhos/secos ou colonizados por fungos hiperparasitas naturais (senso Araújo et al. 2016). Cada folíolo passou por uma contagem criteriosa dos estromas, ou seja, a quantidade de estromas presentes em cada folíolo que constituíram as parcelas do experimento, para auxiliar nos dados estatísticos do índice de colonização *in vitro*.

Os folíolos foram transferidas para caixas plásticas (tipo Germbox) (Figura 1), sobre folhas dupla de papel toalha umedecido com uma solução de água destilada estéril, contendo 4g/L de Cu/L, para evitar a proliferação fúngica no papel. Logo em seguida, procedeu-se a inoculação, por aspersão, de uma suspensão de 10^6 esporos.mL⁻¹ sobre os estromas, tendo sido a densidade de inóculo calibrada em câmara de Neubauer. Após inoculação, as amostras foram incubadas em câmara umidade, com temperatura controlada em torno de 25°C (±2), sob 12 h de

fotoperíodo. A umidade no interior das câmaras foi controlada utilizando umidificador de ar. Tanto no primeiro experimento como no segundo, a temperatura no interior da câmara umidade, foi de 25°C (± 2), com uma umidade variando de 58 a 65% para o primeiro experimento, e no segundo experimento foi de 62 a 78%.

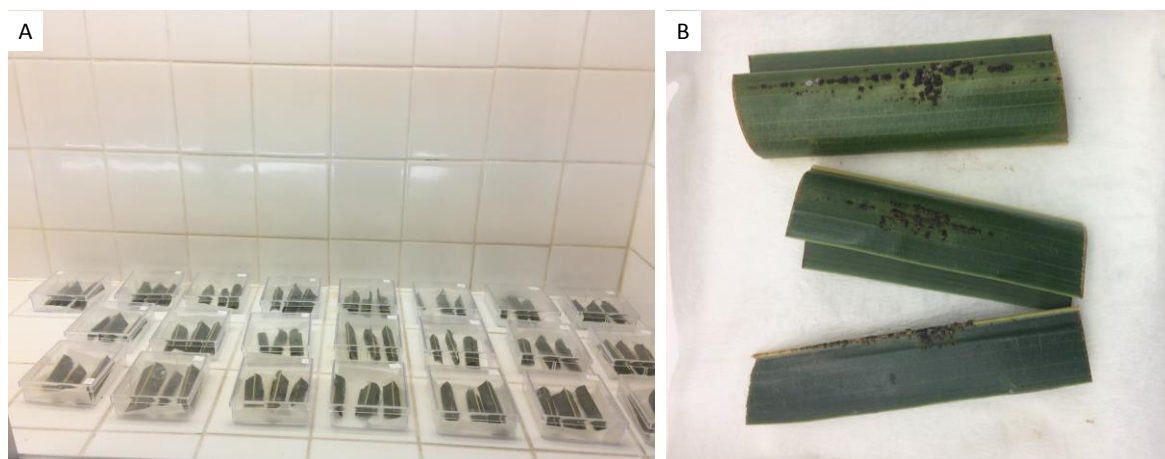


Figura 1. Parcelas experimentais compostas de caixas plásticas (tipo Germbox) contendo secções de folíolos de coqueiro-anão com estromas de lixa-grande, inoculados com fungos hiperparasitas (A), unidade experimental (B).

O delineamento experimental foi em blocos casualizados e os tratamentos consistiram de inoculação separadamente de 20 isolados de prováveis fungos hiperparasitas e a testemunha (inoculação apenas com água), num total de 21 tratamentos, com duas repetições. Cada Germbox contendo três folíolos inoculados com 1 dos isolados de fungo provável hiperparasita, consistiram a parcela experimental. O experimento foi repetido no tempo, sendo primeiro em agosto e o segundo em setembro de 2019.

Após três dias de incubação, realizaram-se as avaliações visuais (a olhos nus) da presença de crescimento dos fungos inoculados nos estromas. Após a contagem de estromas colonizados, realizou-se cortes paradérmicos das estruturas para verificação, sob microscópio estereoscópio, da colonização interna dos estromas, seguido do isolamento direto dos fungos observados. Para o reisolamento foram realizados retirando-se estruturas fúngicas de dentro do interior dos estromas, sob lupa, e transferindo-as para placas de petri contendo meio BDA. As placas foram incubadas em BOD, a 25°C, no escuro.

3.2.4.3. Teste de antibiose *in vitro*

A ação antagônica dos isolados de quatro *Acremonium* (CF/UENF 455, CF/UENF 459, CF/UENF 461, CF/UENF 463), dois isolados de *Trichoderma* (CF/UENF 466, CF/UENF 467), foram utilizados em confronto contra os fungos, *Fusarium* sp. (CF/UENF 470), *Cladosporium* sp. (CF/UENF 472), *Curvularia* sp. (CF/UENF 471), *Pestalotiopsis* sp. (CF/UENF 473), *Lasiodiplodia* sp. (CF/UENF 474), por meio do teste de pareamento de culturas (confronto direto), de acordo com Dennis & Webster (1971). Esses isolados foram selecionados com base no efeito do teste de colonização em três dias, ou seja, os que apresentam maior afinidade em colonizar os estromas da lixa grande e um isolado que obteve menor média de colonização.

Os isolados dos fungos foram repicados para placas de petri com meio de cultura BDA e incubados em incubadora do tipo BOD à temperatura de 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), sem fotoperíodo, onde permaneceram até o crescimento, tendo sido deixado o antagonista por 20 dias e, do fungo por 15 dias. Essa diferença de tempo foi em função da variação da velocidade de crescimento entre fungos pareados.

Para verificação da produção de substâncias difusíveis no meio pelo fungo *Acremonium*, um disco de colônia de 5 mm de diâmetro do isolado hiperparasita, foi disposto em um lado de uma placa de Petri (90mm de diâmetro), distânciado de 2 mm da borda da placa, contendo meio de cultura BDA. Os fungos foram então incubados por 4 dias. Em seguida, um disco com as mesmas dimensões de cada fitopatógeno foi repicado para a outra extremidade da placa, nas mesmas condições anteriores, e incubados a 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) (Campanile et al., 2007).

Quando confrontado o *Trichoderma* no pareamento com os fitopatógenos foram direto, ou seja, ambos os discos foram colocados ao mesmo tempo, utilizando discos de 5 mm de diâmetro, contendo o micélio de cada isolado (hiperparasita e do fitopatógeno), esses ficaram dispostos equidistantes da placa, a 2mm de distância da borda (Campanile et al., 2007).

Logo após o período de crescimento do cultivo pareado, foram realizadas as avaliações, com auxílio de um paquímetro. O raio do micélio dos fungos e dos antagonista foram medidos em intervalos de 24 horas, durante quatro dias de incubação. Os tratamentos foram arranados em esquema fatorial 6x5, organizado

no delineamento inteiramente ao acaso, com 20 tratamentos para cada antagonista, sendo 6 isolados do agente aspirante ao antagonismo, 5 isolados de fungos, mais as testemunhas (a testemunha consistiu de placas contendo discos de 5mm de diâmetro da colônia do fungo), com quatro repetição, totalizando 120 tratamentos.

Para determinar o índice de velocidade de crescimento do fungo – IVCF e velocidade de crescimento do antagonista - IVCA, mediu-se o diâmetro das colônias em dois sentidos opostos. Com os dados do diâmetro determinou-se o índice de velocidade, por meio das fórmulas a seguir:

$$\text{Equação (1) - IVCF} = (DCF - DCFA/N)$$

$$\text{Equação (2) - IVCA} = (DCA - DCAA/A)$$

Onde: DCF - diâmetro médio da colônia do fungo do dia atual; DCFA - diâmetro médio da colônia do fungo do dia anterior; DCA - diâmetro médio da colônia do antagonista do dia atual; DCAA - diâmetro médio da colônia do antagonista do dia anterior e N – número de dias de incubação em BOD. Com o índice de velocidade de crescimento do fungo e do antagonista (IVCF/IVCA) calculou-se a razão da velocidade de crescimento dos tratamentos em relação a testemunha, ou seja, as colônias que não foram submetidos a interação fungos versus antagonista com auxílio da formula abaixo.

$$\text{Equação (3) – RA} = IVCAI/IVCAT$$

$$\text{Equação (4) – RF} = IVCFI/IVCFT$$

Onde: RA – Razão do antagonista; IVCAI - índice de velocidade de crescimento do antagonista frente ao fungo (interação); IVCAT - índice de velocidade de crescimento do antagonista sem a presença do fungo (testemunha); IVCFI - índice de velocidade de crescimento do fungo frente ao antagonista (interação); IVCFT - índice de velocidade de crescimento do fungo sem a presença do antagonista (testemunha).

Com auxílio dos dados do índice de velocidade do crescimento do fungo e do antagonista, calculou-se o índice de inibição meciliar do fungo - INBF e índice de inibição meciliar do antagonista – INBA, aplicando as fórmulas:

$$\text{Equação (5) - INBF} = (\text{IVCF} - \text{IVCFI}/\text{IVCF})$$

$$\text{Equação (6) - INBA} = (\text{IVCA} - \text{IVCAI}/\text{IVCA})$$

Onde: IVCF – Índice de velocidade do crescimento do fungo na ausência do antagonista (testemunha), IVCFI - Índice de velocidade do crescimento do fungo frente ao antagonista (interação) e IVCA – Índice de velocidade do crescimento do antagonista na ausência do fungo (testemunha), IVCAI - Índice de velocidade do crescimento do antagonista frente ao fungo (interação).

3.2.4.4. Análises Estatísticas

Nos testes de colonização e Antibiose *in vitro*, quando constatado efeito significativo, pelo teste F, foram conduzidos testes de agrupamento de médias (Scott-Knott a 0,05 de probabilidade), visando selecionar os isolados mais promissores quanto a capacidade de colonizar os estromas da lixa grande do coqueiro e aqueles que apresentaram um maior efeito inibitório no teste de antibiose.

O experimento de colonização foi conduzido em Delineamento em Blocos Casualizados - BDC, em esquema fatorial 21x2, sendo 21 isolados e duas épocas. Já no experimento de Antibiose *in vitro*, utilizou-se o Delineamento Inteiramente Casualizado, com esquema fatorial de 6x5, sendo 6 isolados (antagônicos) e 5 fungos, com quatro repetições.

Para as análises estatísticas, utilizou-se os programas SAEG – Sistemas de Análises Estatísticas e Genéticas (Ribeiro-Junior, 1995).

3.2.5. RESULTADOS

3.2.5.1. Avaliação de patogenicidade e seleção dos isolados colonizadores de estromas

Os estromas das lixas em folíolos de coqueiro, após inoculados com *Acremonium* spp., *Trichoderma* spp., *Paecilomyces* sp. e Levedura, foram avaliadas quanto à colonização ao passar do tempo.

Por meio da análise de variância foi possível observar um efeito significativo, ao nível de 5% de probabilidade, para isolado e tempo, mas não houve efeito significativo para a interação isolado *versus* tempo quanto colonização de estromas por fungos hiperparasita. Isso indica que os fatores atuam de forma independente.

Analisando o efeito da colonização nos isolados, observamos que houve a formação de dois grandes grupos, o grupo que teve maior colonização foi composto por 14 isolados e o grupo que teve menor percentagem de colonização foi composto por seis isolados (Figura 2A). Em relação ao tempo, no tempo 2, ou seja, nos folíolos coletados em setembro, observamos uma maior média de colonização em relação ao experimento realizado em agosto (Figura 2B) em relação ao tempo 1.

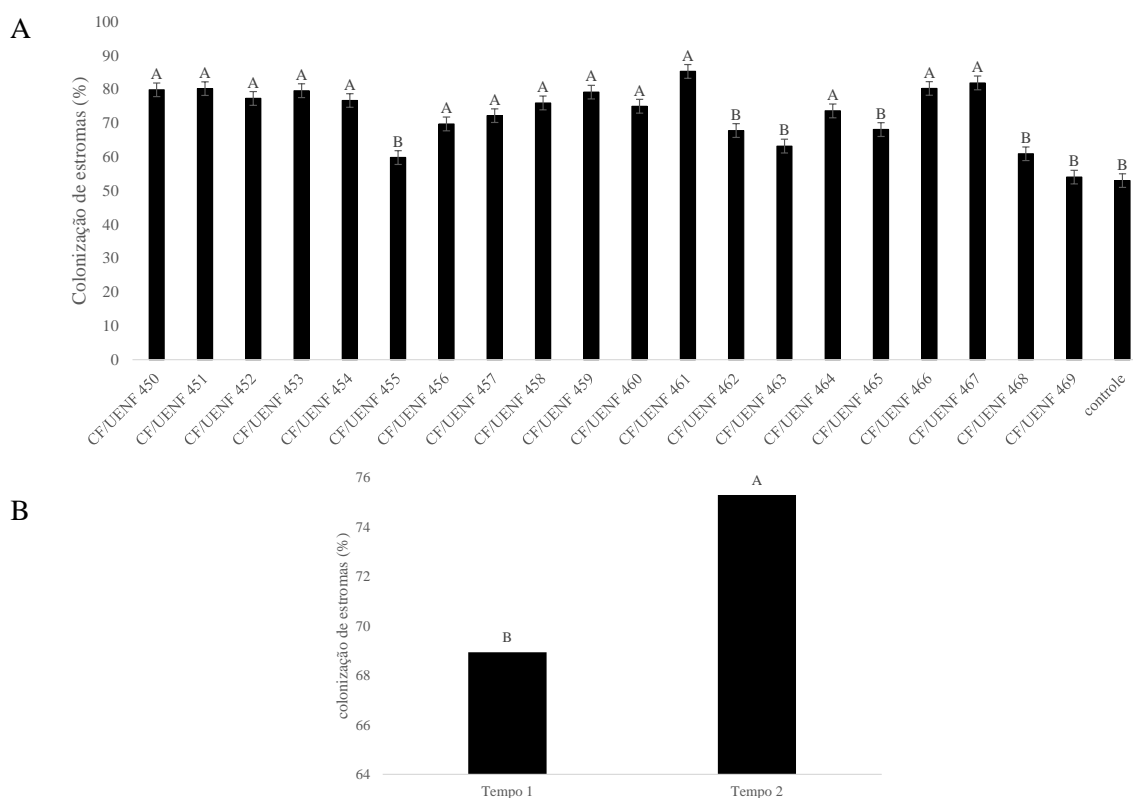


Figura 2. Colonização *in vitro* de estromas de lixas grande do coqueiro por isolados de fungos hiperparasitas. A) porcentagem média de colonização em função dos isolados; B) porcentagem da colonização avaliadas em agosto e setembro de 2019, (Tempo 1 e Tempo 2), respectivamente. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste skott-Knott (0,05).

Quando se faz uma análise dentro de cada gênero, foi possível observar que 12 isolados de *Acremonium* (CF/UENF450, CF/UENF451, CF/UENF452, CF/UENF453, CF/UENF454, CF/UENF456, CF/UENF457, CF/UENF458, CF/UENF459, CF/UENF460, CF/UENF461 e CF/UENF464) e dois de *Trichoderma* (CF/UENF466 e CF/UENF467), se destacaram com médias de colonização estromática mais elevadas. Os isolados de *Paecilomyces* (CF/UENF468) e da *Levedura* (CF/UENF469) foram os menos eficientes colonizadores dos estromas.

Ao observar a colonização das cavidades estromáticas, os isolados CF/UENF459, CF/UENF461, CF/UENF466, colonizaram tanto a superfície do estroma, formando uma massa clara e pulverulenta, quanto o lóculo interno do estroma, onde as da as ascas e ascósporos da lixa são produzidos. Foi observado também que, quando esses hiperparasitas colonizam o interior do estroma, não se

observa a massa gelatinosa produzida pelo patógeno, ou seja, os lóculos se apresentam vazios ou em processo de colonização por micélio dos hiperparasitas.

Imagens retiradas com auxílio da microscopia estereoscópica, mostram que o isolado CF/UENF466, produz um aglomerado de massa micelial na superfície do estroma, com coloração branca a verde (quando esporulado), típico dos fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* (Figura 3, C e D). Já os isolados CF/UENF459 e CF/UENF461 formaram um conjunto de micélio todo branco, invadindo as cavidades estromáticas.

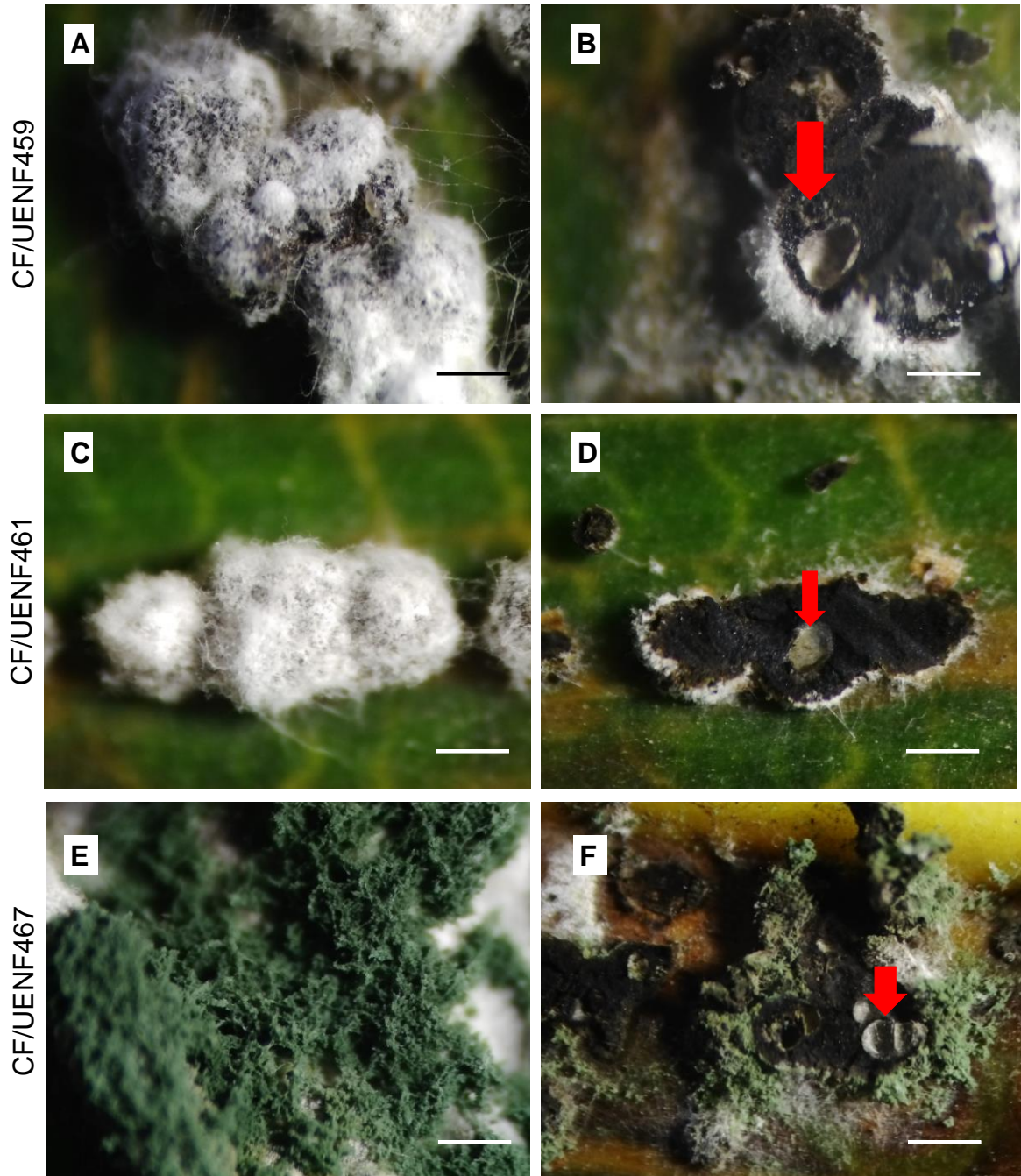


Figura 3. Colonização *in vitro* de estromas de lixa grande do coqueiro por fungos hiperparasitas. Colonização da superfície pelo fungo *Acremonium* (CF/UENF459) (A); (CF/UENF461) (C) e *Trichoderma* (CF/UENF467) (E). Corte paradérmico, exibindo a colonização interna do lóculo do estroma, *Acremonium* (CF/UENF459) (B); (CF/UENF461) (D) e *Trichoderma* (CF/UENF467) (F). Barras representam a seguinte escala: painéis A - F, 5 cm (imagens capturadas no mesmo plano).

Já o isolado CF/UENF455 (*Acremonium*), mesmo apresentando um índice de colonização externa moderada, aos 3 dias de inoculação, não conseguiram

desenvolver e expandir suas estruturas reprodutivas na área do estroma, demonstrando uma ineficiência diante do agente causal da lixa grande (Figura 4).

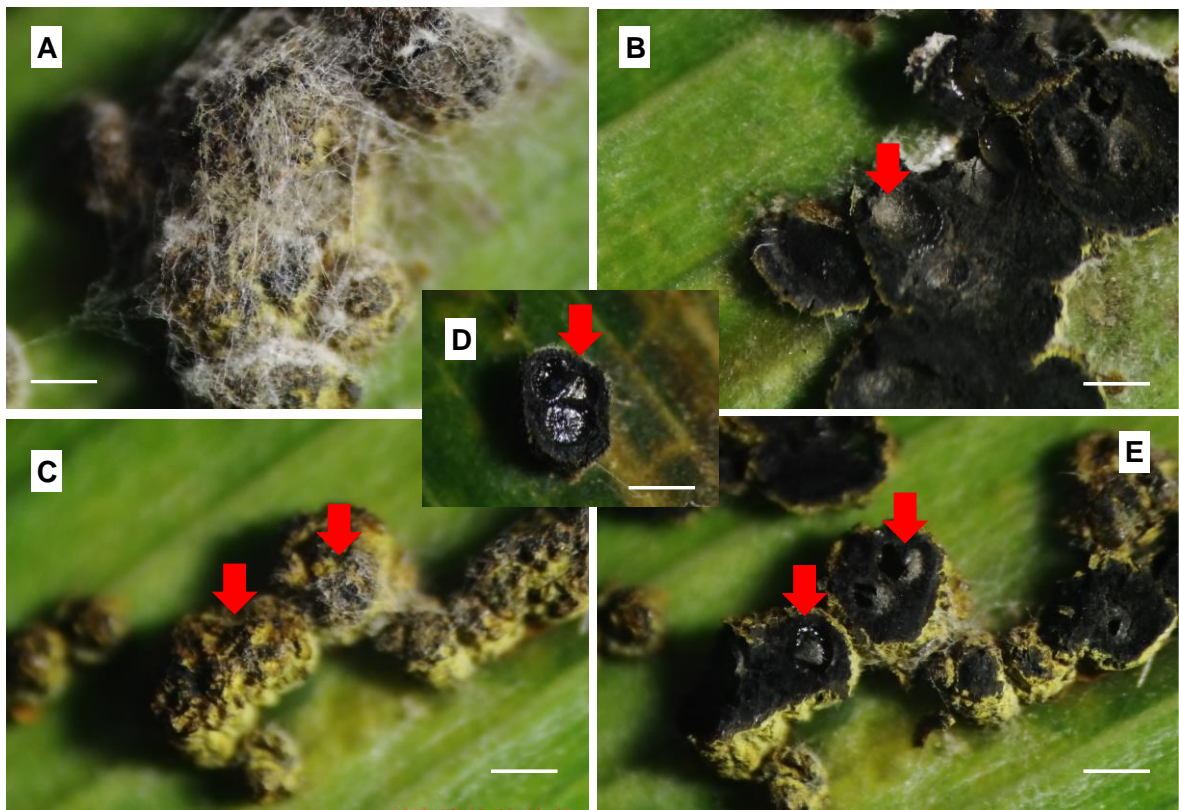


Figura 4. Colonização *in vitro* de estromas de lixa grande do coqueiro por fungos hiperparasitas. Colonização da superfície pelo fungo *Acremonium* (CF/UENF455) (A, C) e corte paradérmico, exibindo a colonização interna do lóculo do estroma (B, D, E). Barras representam a seguinte escala: painéis A-E, 5 cm.

Tanto nas avaliações de agosto quanto nas avaliações de setembro, o índice de colonização externa e interna da testemunha (controle), ou seja, dos tratamento que não foram inoculadas com os isolados hiperparasitas, ao tempo que houve um índice de colonização de agentes externos, que sobreviveram a assepsia, não apresentaram eficiência. Esses microrganismos não avançaram no interior da estrutura estromática, mesmo recobrando sua área externa. Isso pode também indicar que, nem todo fungo que coloniza superficialmente o estroma é capaz de invadir seu interior, ou até mesmo ser considerado hiperparasita. A existência de mucilagem do fitopatógeno causadores das lixas dentro das cavidades do estroma, estando esses colonizados externamente, pode demonstrar que nem todo fungo que seja capaz de se desenvolver nessas estruturas, possa apresentar ação inibitória ou hiperparasítica sobre as lixas (Figura 5).

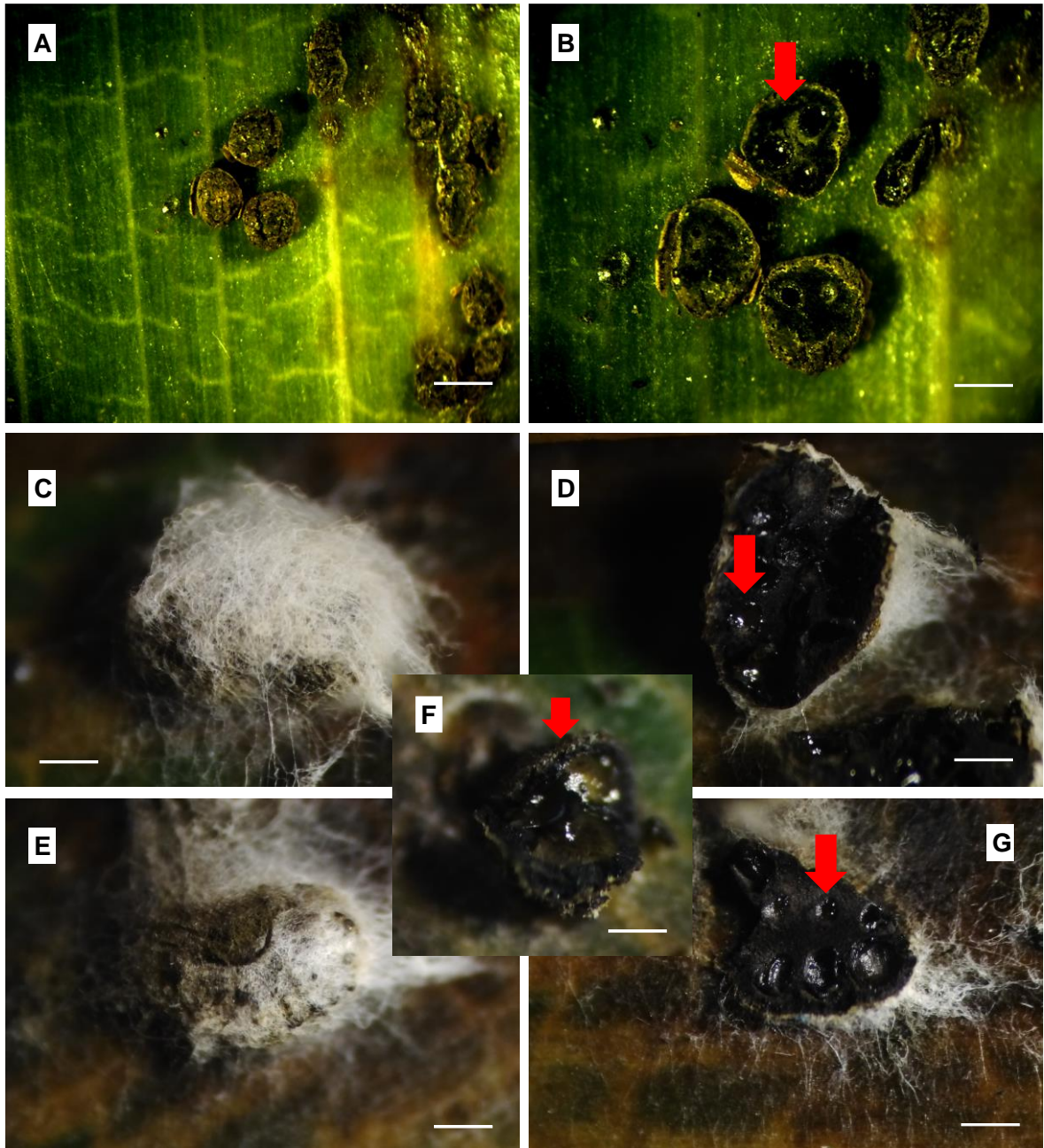


Figura 5. Colonização *in vitro* de estromas de lixa grande do coqueiro por fungos hiperparasitas. Estromas não colonizados (A). Colonização da superfície por fungos oriundos do meio ambiente (C, E) e corte paradérmico, exibindo a colonização interna do lóculo do estroma (D, F, G). Barras representam a seguinte escala: painéis A-E, 5 cm.

Ao término do experimento de colonização dos estromas, foram conduzidos o reisolamento dos microrganismos presentes no interior dos estromas (tabela 3), para confirmação e identificação dos isolados submetidos à inoculação artificial, a fim de estabelecer a relação causal entre associação constante patógeno/hospedeiro, afirmando o diagnóstico conforme princípios de avaliação da patogenicidade descrito por Robert Koch (1881) (Alfenas et al., 2004, 2016).

Tabela 2. Fungos reisolados a partir de estromas (área interna) de lixas grande do coqueiro inoculados para avaliação da colonização *in vitro*.

TRATAMENTO	BLOCO	PRIMEIRO EXPERIMENTO	SEGUNDO EXPERIMENTO
CF/UENF450	1	+	+
	2	+	+
CF/UENF451	1	+	+
	2	+	+
CF/UENF452	1	+	+
	2	+	+
CF/UENF453	1	+	+
	2	+	+
CF/UENF454	1	+	+
	2	+	+
CF/UENF455	1	+	+
	2	+	+
CF/UENF456	1	+	-
	2	+	+
CF/UENF457	1	+	+
	2	+	-
CF/UENF458	1	+	+
	2	+	+
CF/UENF459	1	-	+
	2	+	+
CF/UENF460	1	-	+
	2	+	+
CF/UENF461	1	+	+
	2	+	+
CF/UENF462	1	-	+
	2	+	+
CF/UENF463	1	-	+
	2	+	+
CF/UENF464	1	+	+
	2	+	-
CF/UENF465	1	+	+
	2	+	+
CF/UENF466	1	+	+
	2	+	+
CF/UENF467	1	+	+
	2	+	+
CF/UENF468	1	+	-
	2	+	+
CF/UENF469	1	-	-
	2	-	-
Controle	1	-	+
	2	-	-

Em ambos os experimentos a maioria dos isolados inoculados apresentam afinidade com o hospedeiro, dando uma importância aos isolados de *Acremonium*

(CF/UENF450, CF/UENF451, CF/UENF452, CF/UENF453, CF/UENF454, CF/UENF456, CF/UENF457, CF/UENF458, CF/UENF459, CF/UENF460, CF/UENF461, CF/UENF462, CF/UENF463, CF/UENF464, CF/UENF465) e de *Trichoderma* (CF/UENF466, CF/UENF467) que, além de colonizar, exerceu uma atividade inibitória de outros microrganismos.

A levedura, o isolado CF/UENF469, não apresentou eficiência na aderência do substrato. Depois do período de incubação, não foi identificado a presença de estruturas do isolado nos estromas, porém foram identificados a presença dos dos fungos: *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia* sp., e um Indeterminado. Os isolados de CF/UENF455 (*Acremonium*) e CF/UENF468 (*Peacilomyces*) apresentaram uma média de colonização abaixo, em comparação com os demais isolados.

No caso do controle, mesmo com um assepsia prévia, apresentou uma grande diversidade de microrganismo, sendo reisolados os seguintes gêneros fúngicos: *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Capnodium* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Periconia* sp., um isolado de um fungo indeterminado, além da presença de Bactérias.

3.2.5.2. Antibiose *in vitro*

Para os testes de antagonismo, os isolados que se desenvolveram e esporularam na superfície dos estromas inoculados, foram selecionados. Quatro isolados do gênero *Acremonium* sp. (CF/UENF 456, CF/UENF 459, CF/UENF 461, CF/UENF 463) e dois de *Trichoderma* sp. (CF/UENF 466, CF/UENF 467) foram confrontados com os fungos *Fusarium* sp. (CF/UENF 470), *Cladosporium* sp. (CF/UENF 472), *Curvularia* sp. (CF/UENF 471), *Pestalotiopsis* sp. (CF/UENF 473) e *Lasiodiplodia* sp. (CF/UENF 474) (Tabela 3), obtidos dos isolamentos direto e indireto dos estromas *C. torrendiella* e *C. acrocomae*.

No pareamento direto de cultura, após 4 dias de incubação, os antagonistas apresentaram diferenças estatísticas entre si, e para a maioria dos fungos utilizados nesse estudo com relação à testemunha.

Tabela 3. Fungos isolados da superfície de estromas de lixas do coqueiro, utilizados na avaliação de seu potencial como agentes de controle biológico

Código	LOCAL	ESTRUTURA ISOLADA	Tipo de LIXA	Mês/ano	LOCALIZAÇÃO
<i>Acremonium</i> (CF/UENF 455)	PESAGRO (Campos dos Goytacazes-RJ)	Estroma maduro	LIG	Fevereiro/2019	21°44'52"S 41°18'34"O
<i>Acremonium</i> (CF/UENF 459)	UFRRJ (Campos dos Goytacazes-RJ)	Estroma maduro	LIP	Março/2019	21°48'12"S 41°17'48"O
<i>Acremonium</i> (CF/UENF 461)	Zumbi 2 (Campos dos Goytacazes-RJ)	Estroma novo	LIP	Maio/2018	21°41'45"S 41°14'58"O
<i>Acremonium</i> (CF/UENF 463)	Matatum (Campos dos Goytacazes-RJ)	Estroma novo	LIG	Setembro/2018	21°38'12"S 41°16'34"O
<i>Trichoderma</i> (CF/UENF 466)	Zumbi 4 (Campos dos Goytacazes-RJ)	Estroma novo	LIP	Fevereiro/2019	21°43'33"S 41°15'44"O
<i>Trichoderma</i> (CF/UENF 467)	Campos dos Goytacazes-RJ	Estroma maduro	LIG	Outubro/2018	21°45'55"S 41°16'31"O
<i>Fusarium</i> (CF/UENF 470)	Quissamã – RJ	Estroma maduro	LIP	Agosto/2018	22°7'31"S 41°18'43"O
CF/UENF 472			LIG		
<i>Curvularia</i> (CF/UENF 471)			LIG		
<i>Pestalotiopsis</i> (CF/UENF 473)		Estroma novo	LIP		
<i>Lasioidiplodia</i> (CF/UENF 474)	UFRRJ (Campos dos Goytacazes -RJ)	Estroma novo	LIG	Março/2019	21°80'34"S 41°29'66"O

Os dois isoladas de *Trichoderma* (CF/UENF466 e CF/UENF467), apresentaram rápido crescimento micelial, sobrepondo as colônias dos fungos, e se desenvolvimento em toda extensão da área da placa, assim, verificou-se que os diâmetros médios das colônias dos fungos, após o pareamento das culturas, diferiram estatisticamente da testemunha, mostrando que os antagonistas exibiu uma eficiência, paralisando o desenvolvimento dos fungos testados. Como pode ser observado na (Figura 6), as colônias dos fungos *Fusarium*, *Curvularia*, *Cladosporium* e *Pestalotiopsis* reduziram seu crescimento pelo contato do antagonista (*Trichoderma*). Houve desenvolvimento de um halo de inibição, que é formado quando ocorre a inibição do fungo, manifestado por uma limitação do fungo contra o antagonista.

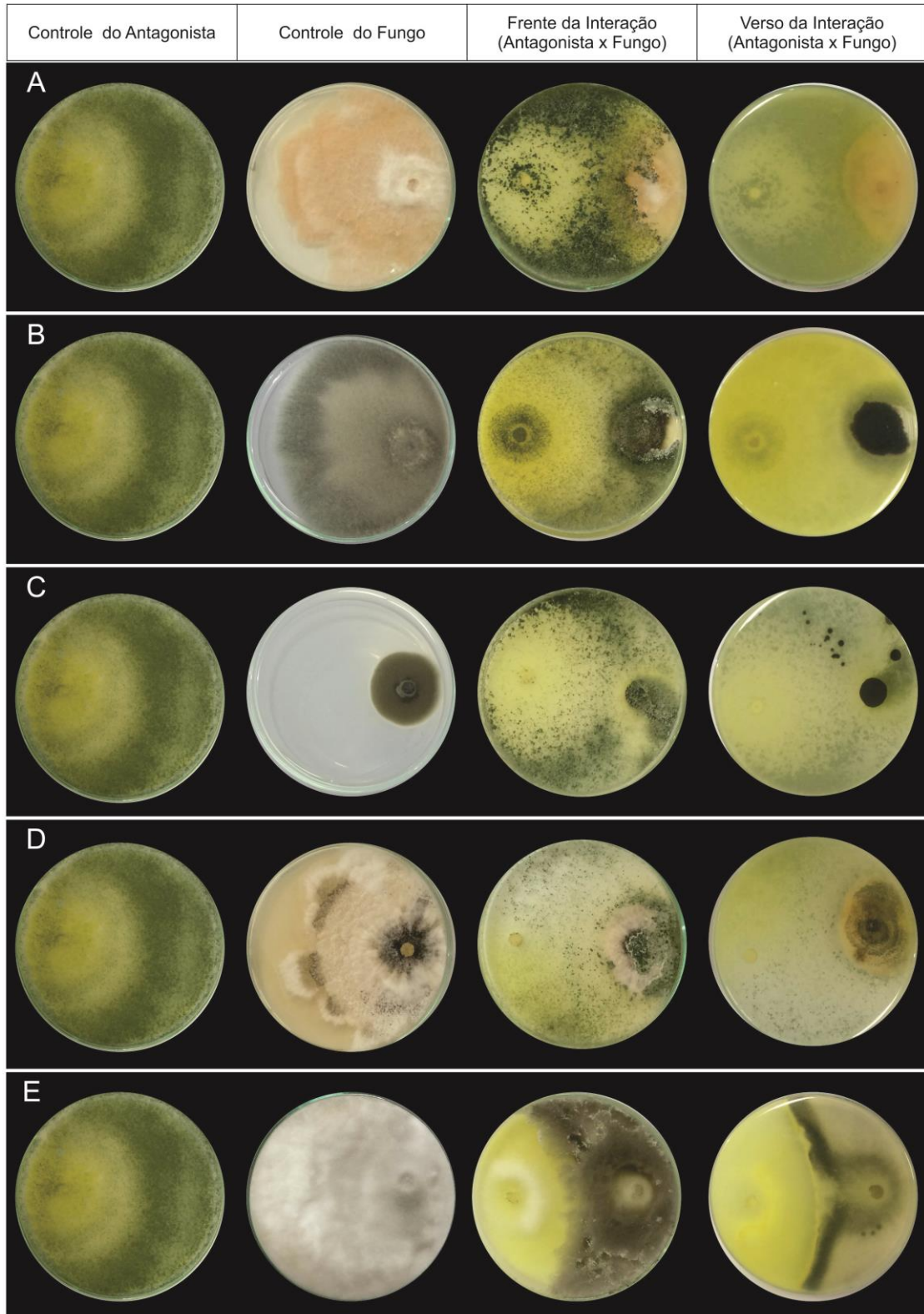


Figura 6. Cultivo pareado entre *Trichoderma* sp. (CF/UENF466 – Antagonista) e *Fusarium* sp. (CF/UENF470) (A), *Curvularia* sp. (CF/UENF471) (B), *Cladosporium* sp. (CF/UENF472) (C), *Pestalotiopsis* sp. (CF/UENF473) (D) e *Lasiodiplodia* sp. (CF/UENF474) (E).

Ao confrontar o isolado de *Acremonium* (CF/UENF455), mesmo apresentado um crescimento micelial lento, quando esses foram pareados com os fungos,

manteve seu índice de velocidade de crescimento constante, contudo o crescimento dos fungos apresentaram uma redução bastante acentuada como podem ser observado na Figura 7. A colônia do *Acremonium* manteve seu crescimento regular comparando-se com a do controle.

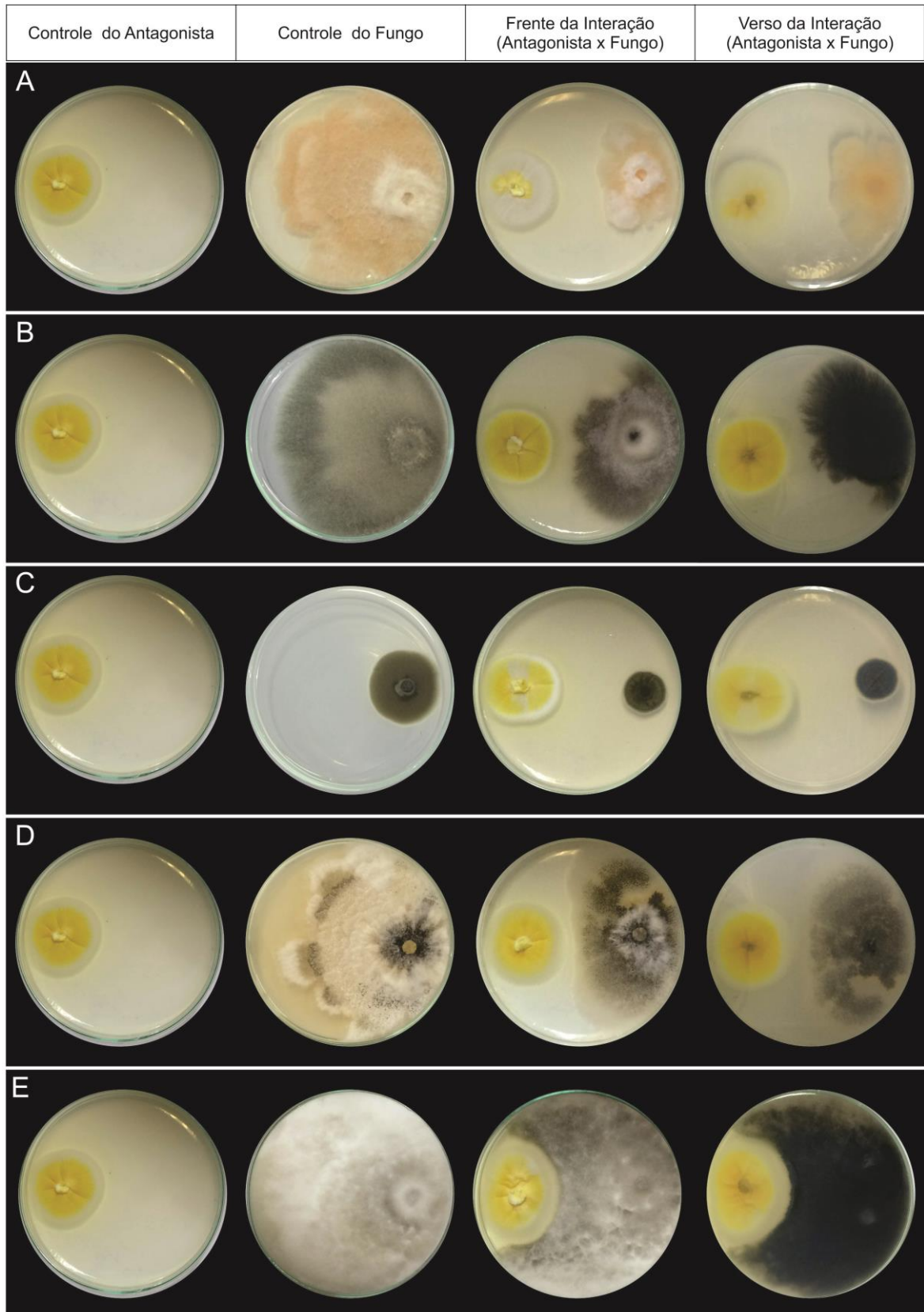


Figura 7. Cultivo pareado entre *Acremonium* sp. (CF/UENF455 – Antagonista) e *Fusarium* sp. (CF/UENF470) (A), *Curvularia* sp. (CF/UENF471) (B), *Cladosporium* sp. (CF/UENF472) (C), *Pestalotiopsis* sp. (CF/UENF473) (D) e *Lasiodiplodia* sp. (CF/UENF474) (E).

Os isolados de *Acremonium* spp. (CF/UENF 459, CF/UENF461 e CF/UENF463) que apresentam uma produção difusível de pigmentos. Foram os isolados que obtiveram maiores resultados quanto a redução do crescimento micelial dos demais fungos confrontados. Já nos primeiros dias de pareamentos, observamos que os antagonistas provocou uma inibição satisfatória no crescimento micelial dos fungos. Nas próximas figura (8 e 9) podem ser observados a ação dos isolados CF/UENF 459 e CF/UENF461 contra os fungos testados.

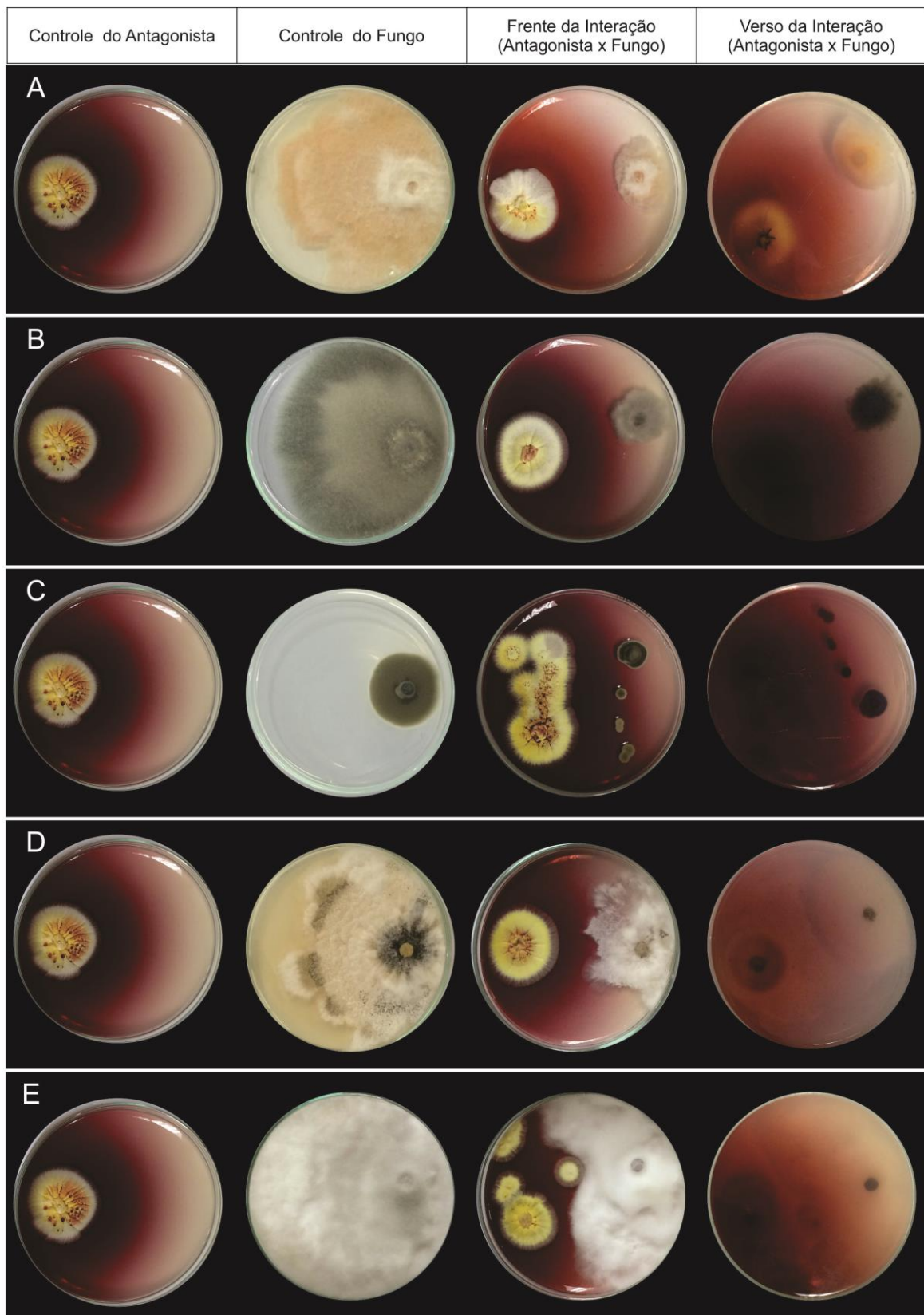


Figura 8. Cultivo pareado entre *Acremonium* sp. (CF/UENF459 – Antagonista) contra *Fusarium* sp. (CF/UENF470) (A), *Curvularia* sp. (CF/UENF471) (B), *Cladosporium* sp. (CF/UENF472) (C), *Pestalotiopsis* sp. (CF/UENF473) (D) e *Lasiodiplodia* sp. (CF/UENF474) (E), após quatro dias de incubação em BOD, a 25°C (± 1), sem fotoperíodo.

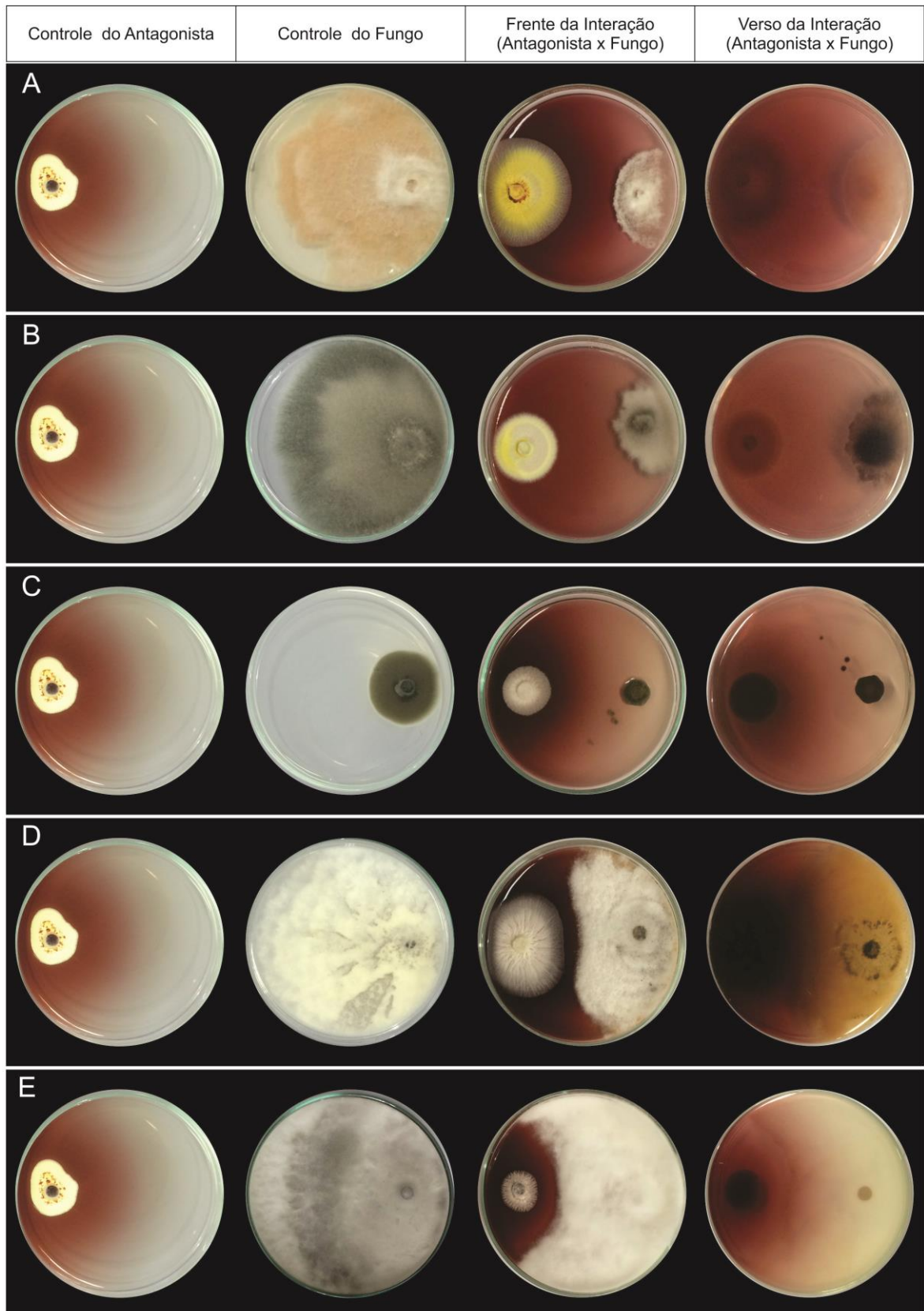


Figura 9. Cultivo pareado entre *Acremonium* sp. (CF/UENF461 – Antagonista) contra *Fusarium* sp. (CF/UENF470) (A), *Curvularia* sp. (CF/UENF471) (B), *Cladosporium* sp. (CF/UENF472) (C), *Pestalotiopsis* sp. (CF/UENF473) (D) e *Lasiodiplodia* sp. (CF/UENF474) (E), após quatro dias de incubação em BOD, a 25°C (±1), sem fotoperíodo.

Ao avaliar o índice de velocidade de crescimento do *Fusarium* sp. em relação aos antagonistas, nota-se que os antagonistas CF/UENF455, CF/UENF459, CF/UENF461 e CF/UENF463 diferiram dos CF/UENF466 E CF/UENF467, foram os que mais reduziram o crescimento do fungo em relação ao controle, ou seja, quando ele cresceu na ausência dos antagonistas (Figura 10B).

Quando avalia-se o inverso, o crescimento dos antagonistas em relação ao *Fusarium* sp., ou seja, quanto que cada isolado é inibido na presença do *Fusarium* sp., se observa que o CF/UENF461 foi o que não teve a razão do índice de crescimento praticamente reduzida, quando se comparado demais antagonistas (Figura 10A).

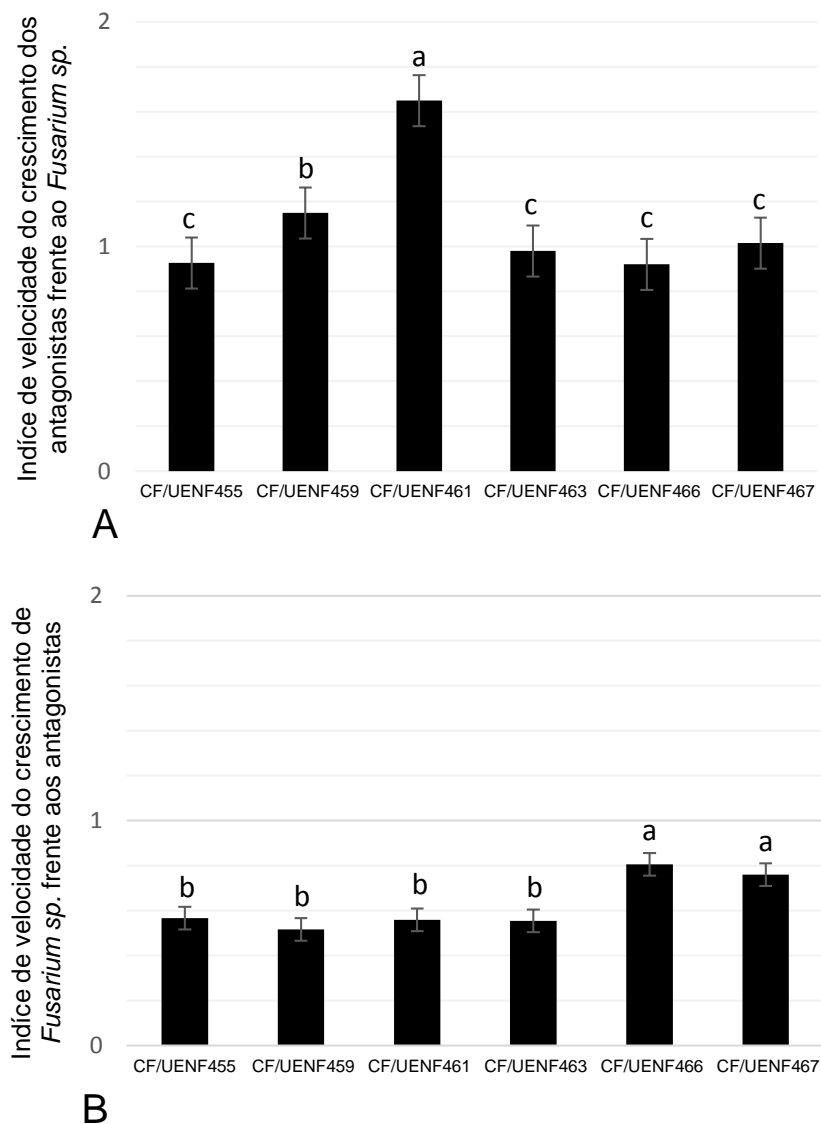


Figura 10. Índice de velocidade do crescimento do fungo *Fusarium* sp. frente aos fungos antagonistas (A), e Índice de velocidade do crescimento dos antagonistas frente ao *Fusarium* sp. (B). Médias com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-nott ($p \leq 0,05$).

Ao se comparar com a percentagem de inibição, justamente os antagonistas CF/UENF455, CF/UENF459, CF/UENF461, são o que apresentada inibição negativa, sendo que o CF/UENF461 cresceu bem na presença do *Fusarium* sp., ele não foi inibido, ele cresce mais, sendo que os antagonistas CF/UENF463, CF/UENF466 e CF/UENF467 são neutros, nem cresce mais nem mesmo. Por outro lados todos os antagonistas apresentaram contra *Fusarium* sp. uma redução no índice do crescimento ou inibição do crescimento (Figura 11).

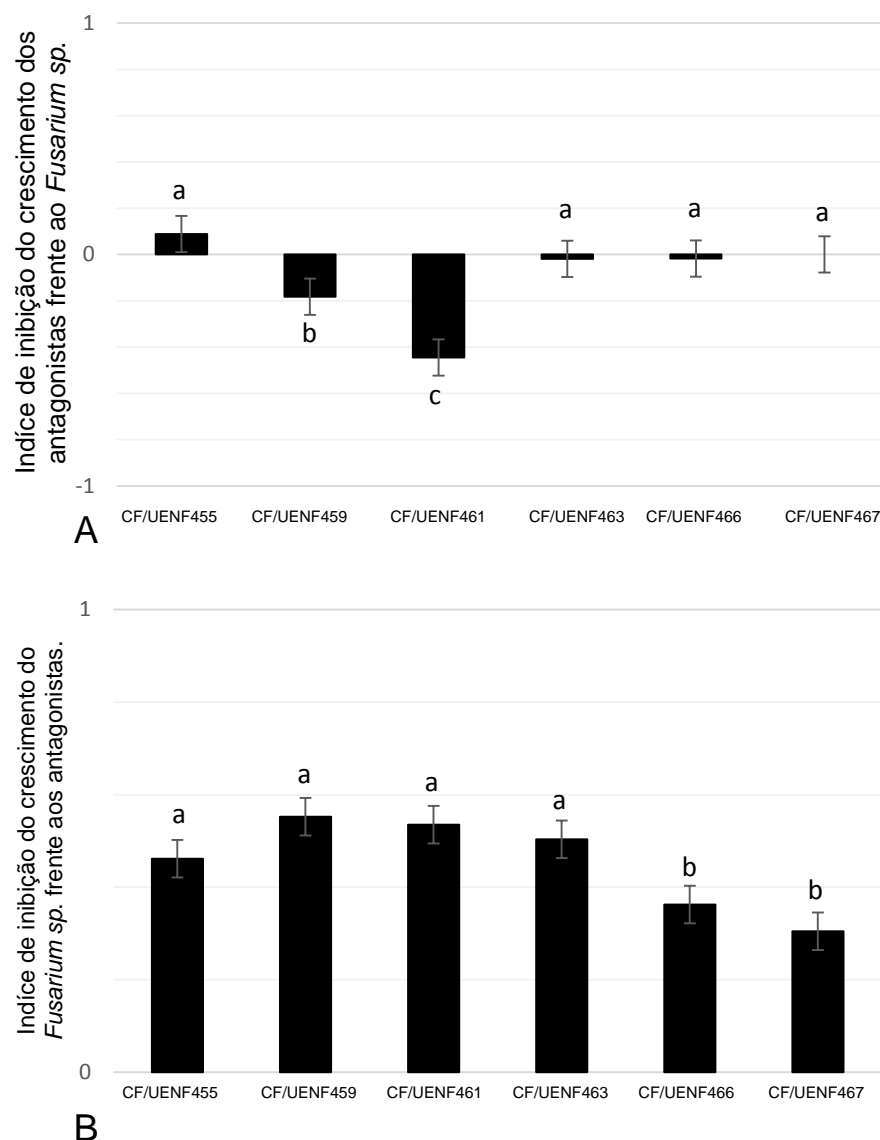


Figura 11. Índice de inibição do crescimento do fungo *Fusarium* sp. frente aos fungos antagonistas (A), e Índice de inibição do crescimento dos antagonistas frente ao *Fusarium* sp. (B). Médias com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-nott ($p \leq 0,05$).

A velocidade de crescimento micelial dos antagonistas quando pareado com o fungo *Curvularia* sp. (CF/UENF471), o antagonistas CF/UENF461 foi o que teve um índice superior dos demais, portanto a velocidade de crescimento não foi afetada na presença do fungo, já os demais sofreram uma pequena redução. Quando se avalia o índice da velocidade de crescimento do fungo na presença dos antagonistas é possível verificar um declínio no desenvolvimento do fungos por meio da interferência do CF/UENF459 e CF/UENF463, sendo que o último foi o que obteve um melhor resultado na redução, os demais isolados não diferiram estatisticamente entre si (Figura 12 A e B).

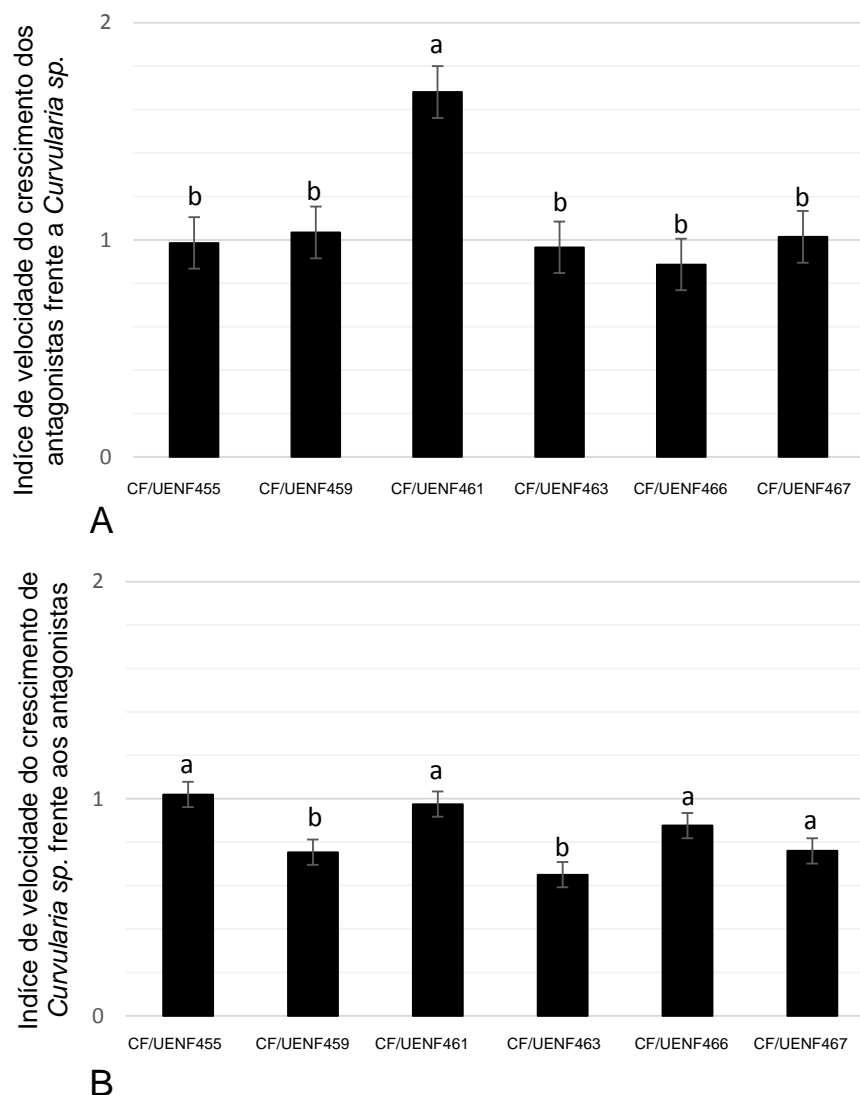


Figura 12. Índice de velocidade do crescimento do fungo *Curvularia* sp. frente aos fungos antagonistas (A), e Índice de velocidade do crescimento dos antagonistas frente ao *Curvularia* sp. (B). Médias com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-nott ($p \leq 0,05$).

Os tratamentos que promoveram maior controle in vitro do fungo *Curvularia* sp., em relação ao índice de inibição do crescimento, quando comparado a testemunha, foi o isolado de *Acremonium* (CF/UENF463), seguido do isolado *Acremonium* (CF/UENF459) e do *Trichoderma* sp. (CF/UENF466). Porém, o isolado CF/UENF455 auxiliou no crescimento do fungo com um acréscimo, levando seu índice de inibição a um valor negativo (Figura 13 B). Esse resultado quando comparado com o índice de inibição dos antagonistas, o único antagonistas que não sofreu interferência do fungo *Curvularia* sp. no crescimento foi o CF/UENF461 em relação aos demais tratamentos (Figura 13 A).

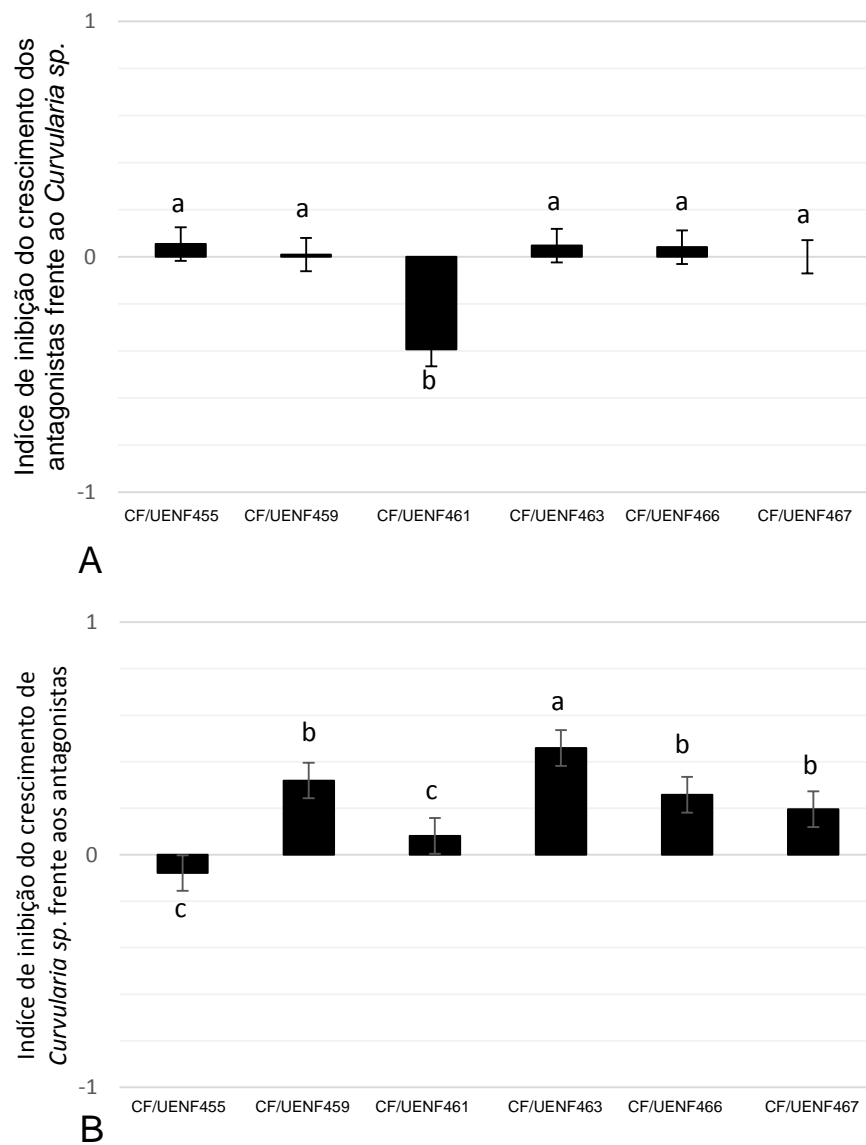


Figura 13. Índice de inibição do crescimento do fungo *Curvularia* sp. frente aos fungos antagonistas (A), e Índice de inibição do crescimento dos antagonistas frente ao *Curvularia* sp. (B). Médias com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-nott ($p \leq 0,05$).

Na figura 14A, observa-se que o diâmetro das colônias dos antagonistas foram maior nos tratamentos que foram confrontados os isolados CF/UENF459 e CF/UENF461 frente ao *Cladosporium* sp., contudo o fungo também cresceu quando pareado com o antagonistas CF/UENF461. Em relação ao crescimento do *Cladosporium* sp. houve menor crescimento das colônias que permaneceram pareadas com os isolados CF/UENF459 e CF/UENF463, durante 4 dias.

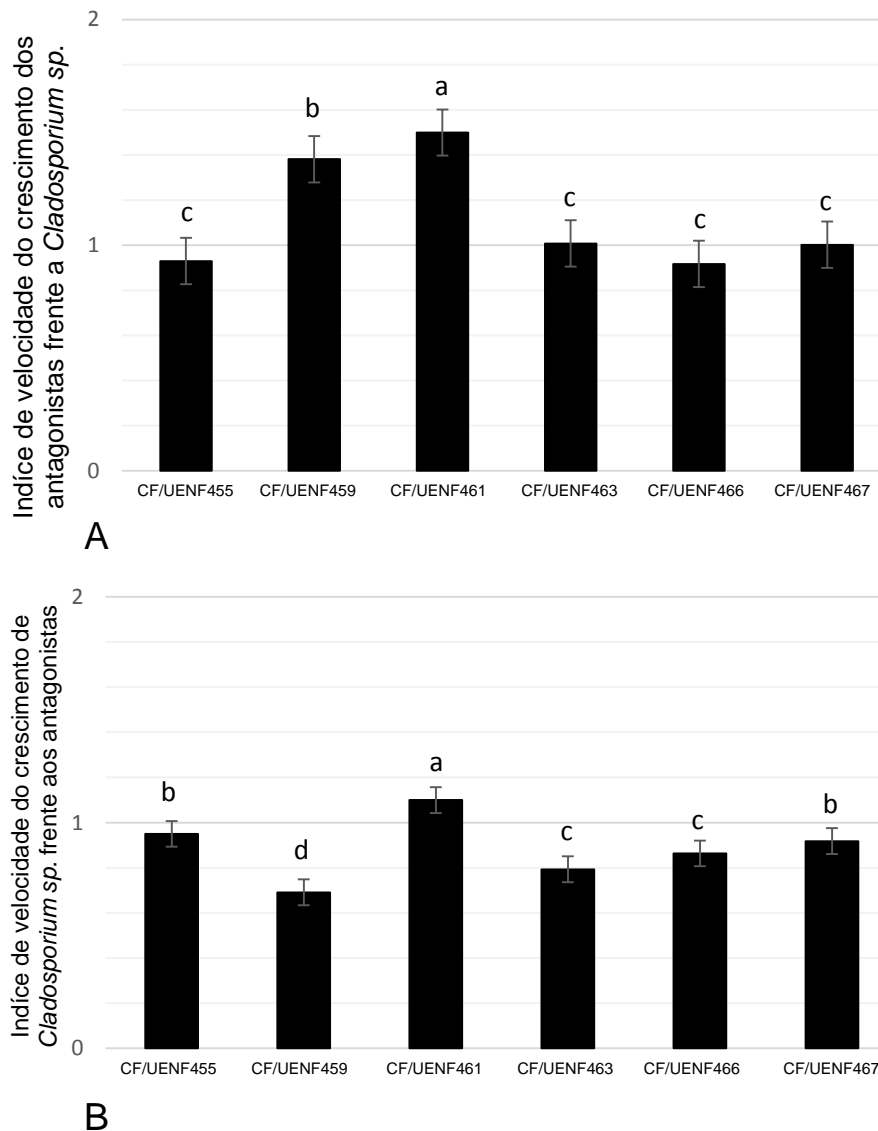
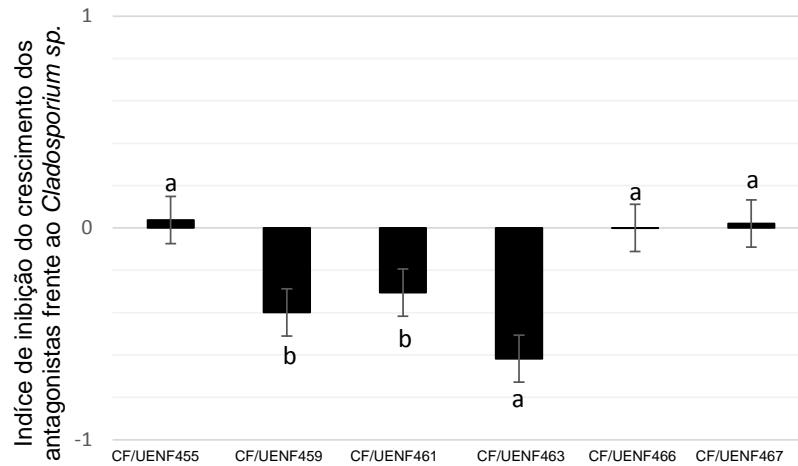
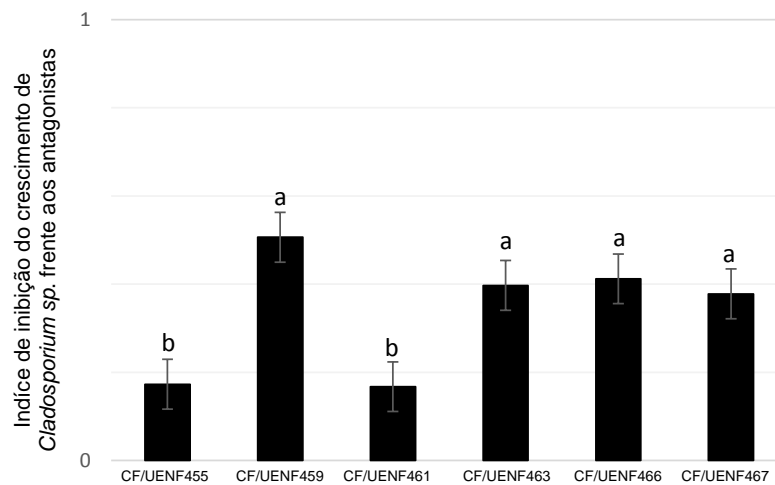


Figura 14. Índice de velocidade do crescimento do fungo *Cladosporium* sp. frente aos antagonistas (A), e Índice de velocidade do crescimento dos antagonistas frente ao *Cladosporium* sp. (B). Médias com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-nott ($p \leq 0,05$).

Ao expor o fungo *Cladosporium* sp., por 4 dias, pareados com *Acremonium* e *Trichoderma*, ele sofreu o efeito inibitório quando exposto na presença dos tratamentos CF/UENF459, CF/UENF463, CF/UENF466 e CF/UENF467. Competindo por nutrientes em mesmo ambiente os antagonistas CF/UENF459, CF/UENF461 e CF/UENF466 não interromperam seu crescimento diante do fungo.



A



B

Figura 15. Índice de inibição do crescimento do fungo *Cladosporium* sp. frente aos antagonistas (A), e Índice de inibição do crescimento dos antagonistas frente ao *Cladosporium* sp. (B). Médias com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-nott ($p \leq 0,05$).

Quando utilizou-se o fungo *Pestalotiopsis* sp. os índices de velocidade e inibição do crescimento continuou exibindo efeito significativo. Como pode ser observado na próxima figuras (16A), para a índice de velocidade de crescimento dos antagonistas, foi verificado que todos os tratamentos (CF/UENF455, CF/UENF459, CF/UENF461, CF/UENF463) exibiu um incremento no crescimento

das colônias, se destacando o isolado CF/UENF461, já os isolados CF/UENF466 e CF/UENF467, permaneceu com índice semelhante ao controle. Em relação ao fungo, os tratamentos não demonstraram efeitos significativos, ou seja, o *Pestalotiopsis* sp. cresceu por igual índice em analogia com o controle (Figura 16B).

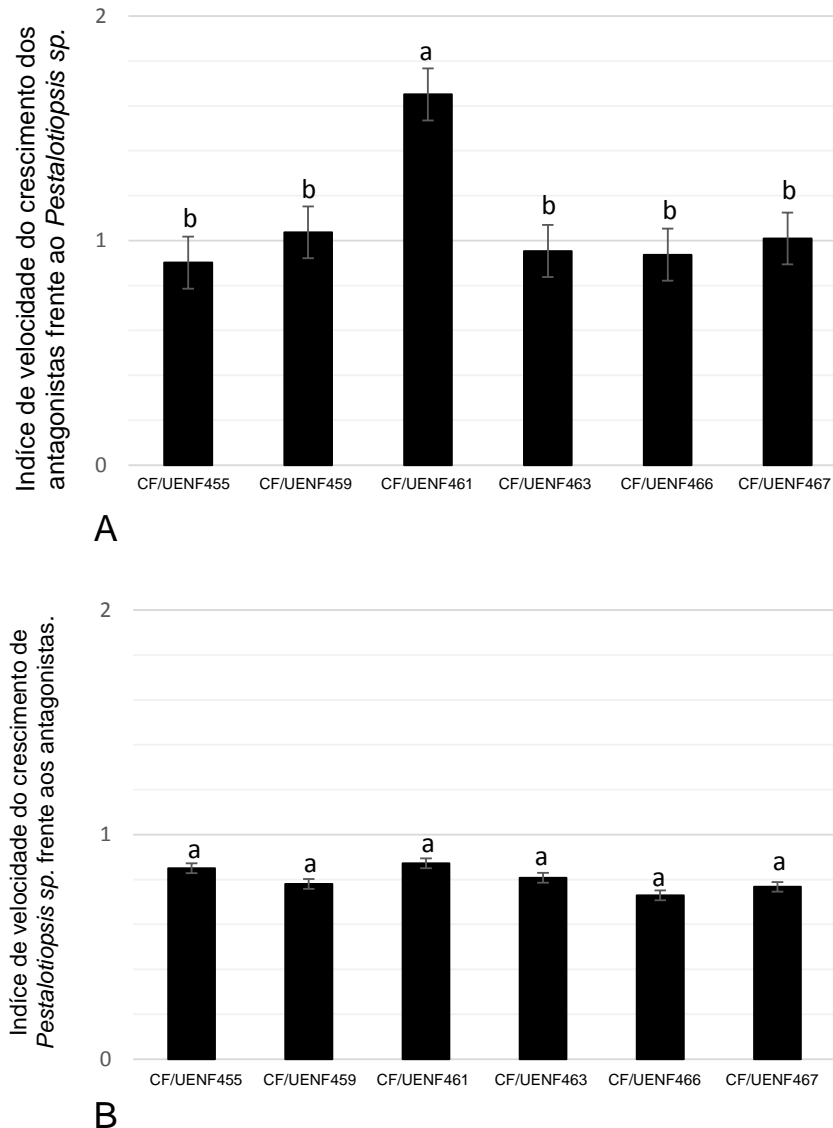


Figura 16. Índice de velocidade do crescimento do fungo *Pestalotiopsis* sp. frente aos fungos antagonistas (A), e Índice de velocidade do crescimento dos antagonistas frente ao *Pestalotiopsis* sp. (B). Médias com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-nott ($p \leq 0,05$).

Os antagonistas CF/UENF459 e CF/UENF461 exibiu um índice de inibição de crescimento negativo, demonstrando-se que eles não sofreram influência da presença do fungo, mesmo pareado continuou seu desenvolvimento micelial, bem como sua produção de pigmentos (Figura 17A). Contudo, o fungo em questão teve

seu desenvolvimento inibido pela ação antagônica dos isolados CF/UENF459, CF/UENF463, CF/UENF466 e CF/UENF467 (Figura 17B).

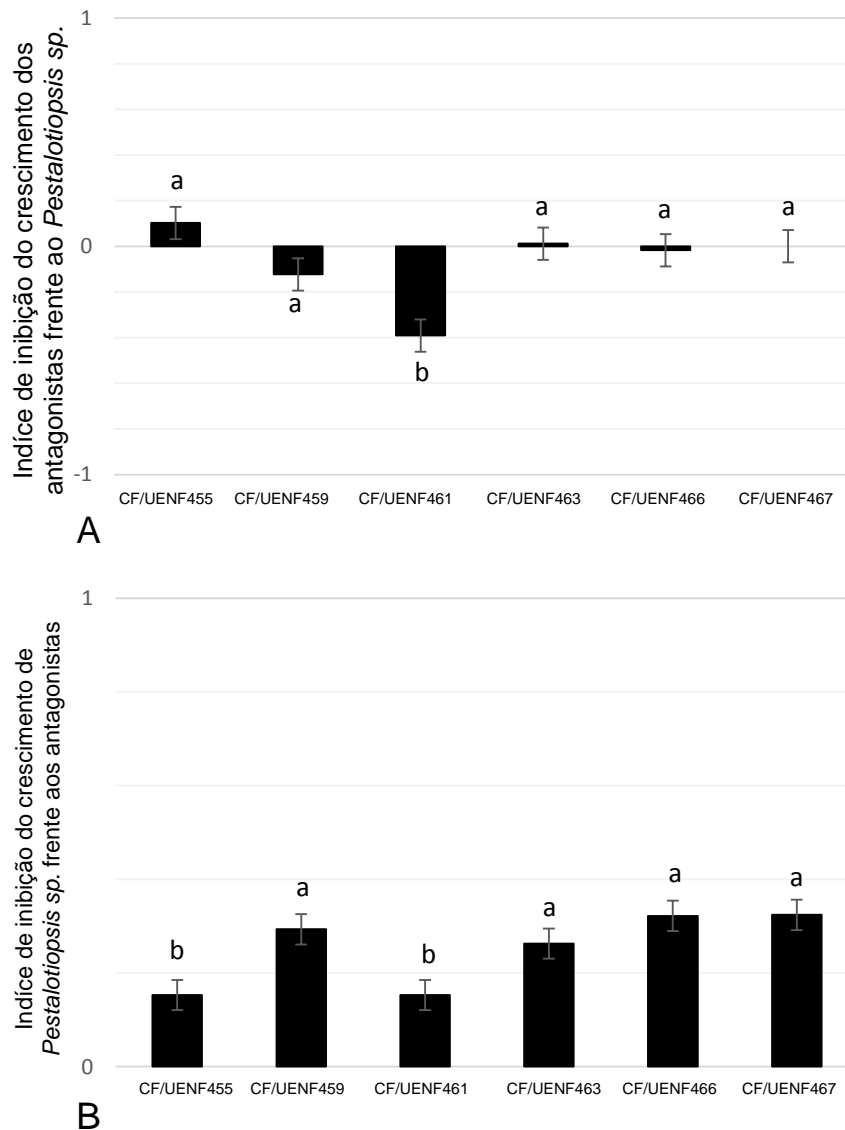


Figura 17. Índice de inibição do crescimento do fungo *Pestalotiopsis sp* frente aos fungos antagonistas (A), e Índice de inibição da velocidade do crescimento dos antagonistas frente ao *Pestalotiopsis sp.* (B). Médias com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-nott ($p \leq 0,05$).

Na figura 18 e 19 podem ser observado a ação dos antagonistas frente ao fungo *Lasiodiplodia sp.* e o inverso. Quando é verificado o comportamento do índice de velocidade do crescimento dos antagonistas, apenas o isolado CF/UENF461 obteve um incremento significativo no aumento do índice de velocidade, os demais obtiveram médias próximas ao controle. Algo parecido ocorreu quando se observa a velocidade de crescimento do *Lasiodiplodia sp.* frente aos antagonistas, o

tratamento que se obteve um maior índice foi quando estava pareado com isolado CF/UENF461.

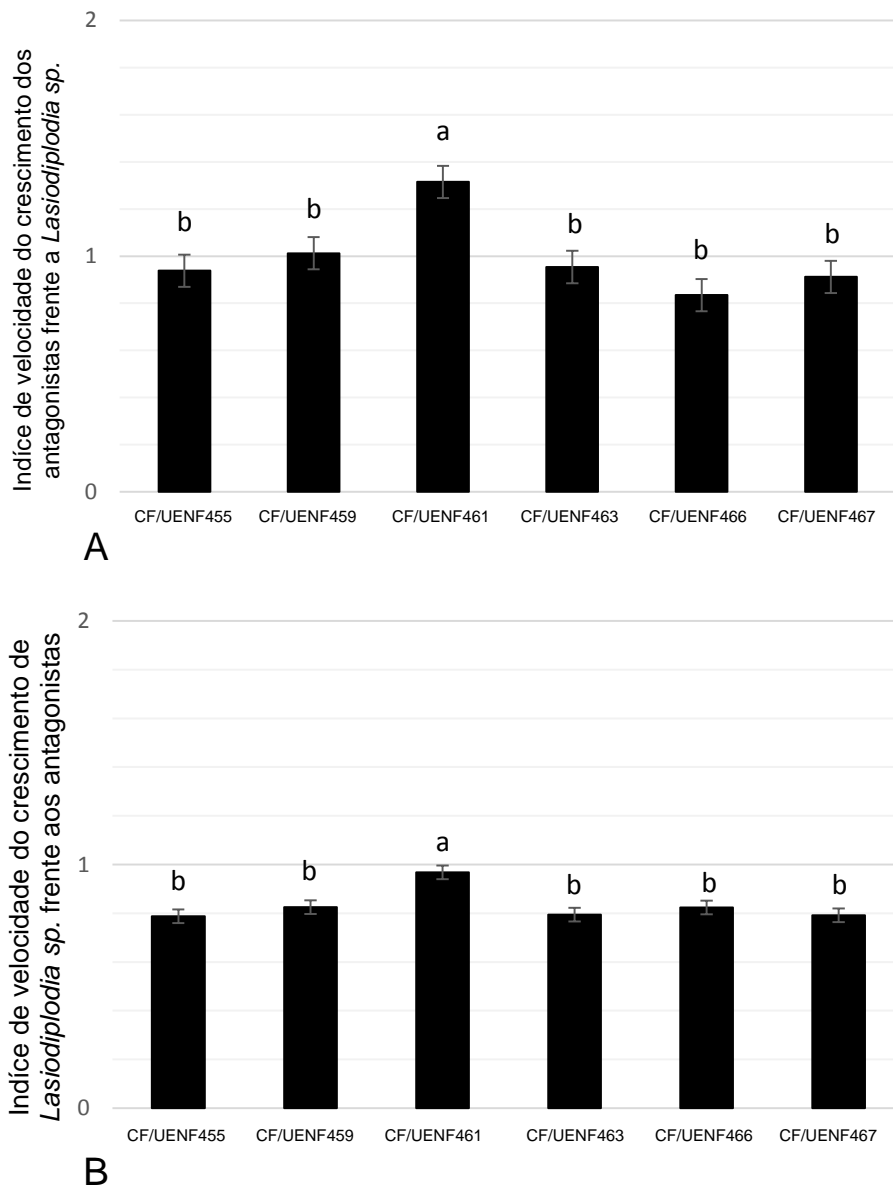


Figura 18. Índice de velocidade do crescimento do fungo *Lasiodiplodia* sp. frente aos fungos antagonistas (A), e Índice de velocidade do crescimento dos antagonistas frente ao *Lasiodiplodia* sp. (B). Médias com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-nott ($p \leq 0,05$).

No caso do pareamento dos antagonistas com o *Lasiodiplodia* sp. não foi verificado diferença significativa entre os antagonistas. O fungo *Lasiodiplodia* sp., apresentou expressou um crescimento relevante. Os antagonistas também reduziram seu crescimento diante do *Lasiodiplodia* sp., apenas os antagonistas CF/UENF459 e CF/UENF461 não sofreram influência do fungo.

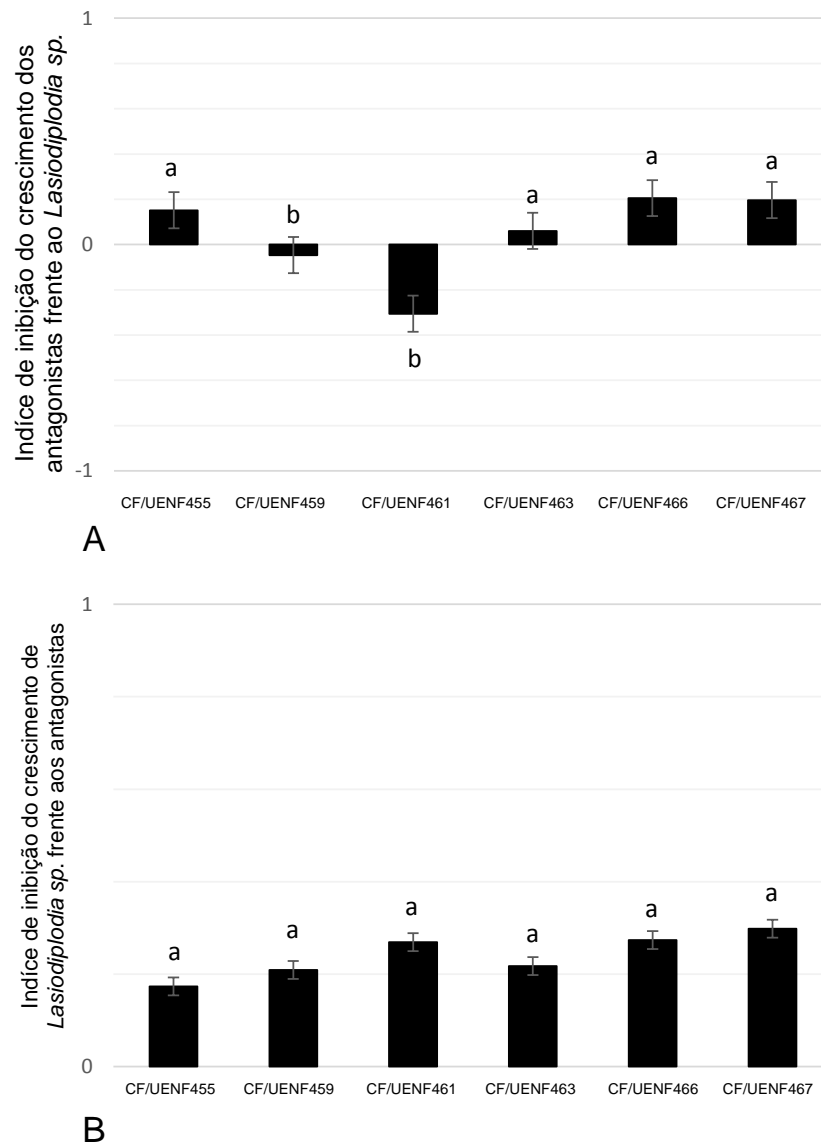


Figura 19. Índice de inibição do crescimento do fungo *Lasiodiplodia* sp. frente aos fungos antagonistas (A), e Índice de inibição da velocidade do crescimento dos antagonistas frente ao *Lasiodiplodia* sp. (B). Médias com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-nott ($p \leq 0,05$).

3.2.6. DISCUSSÃO

No teste de parasitismo, os fungos colonizaram superficialmente os estromas das folíolos presentes nas folhas amostradas, quando submetidas à câmara úmida, embora não tenha sido avaliada a colonização interna dos estromas.

No entanto, fotos obtidos em microscópio estereoscópio indicaram que esses microrganismos colonizam internamente as cavidades dos estromas. Deste modo, a identificação e isolamento desses organismos são primordiais nos estudos iniciais na prospecção de agentes eficientes no controle biológico das lixas do coqueiro.

Destacando-se como bioprotetor, o fungo *Trichoderma* spp. são simbioses endofíticas de plantas, ou de solo, atuando como antagonistas de diversos fitopatógenos de suma importância econômica, promovendo o crescimento e desenvolvimento de vegetais, sendo amplamente utilizados no tratamento de sementes para controle de doenças (Junges et al., 2016).

Trabalhando no tratamento de sementes de feijão 'Pérola' contra patógenos, Guimarães et al. (2014), aplicou suspensões de conídios de isolados de *Trichoderma*. Das espécies estudadas, verificaram que o *Trichoderma harzianum* foi a mais promissor, permitindo o maior percentual de plantas sobreviventes, proporcionando de 67 a 77% de controle de *Cladosporium Herbarum*.

Nesse estudo, os isolados de *Trichoderma* spp. aderiram bem a superfície do estromas, ao longo de 3 dias de avaliação, o qual esporularam e colonizaram internamente os lóculos dos substratos, promovendo a redução da área de disseminação dos agentes causais da lixas do coqueiro, demonstrando que o gênero apresenta uma afinidade com o substrato, o qual serviu como fonte de nutrientes.

A associação desses microrganismos podem indicar a utilização destas estruturas como fonte de nutrição para os mesmos, pois os estromas são constituídos por tecido pseudoparenquimatoso, formados por hifas estéreis soldadas entre si, de aspecto rígido, contendo em seu interior corpos de frutificação dos patógenos (Vitória et al., 2007; Gasparotto et al., 2016).

Sudo (1989) relatou o controle das lixas do coqueiro em experimento de campos, com *Acremonium alternatum* e *Acremonium persicinum*, hiperparasitas obtidos diretamente dos estromas dos fitopatógenos. Warwick (2001) constatou que a colonização dos estromas foram mais efetivas quando o hiperparasita foi aplicado no período vespertino da época chuvosa, alcançando uma percentagem média de colonização do estromas de 45% e 68%, com aplicação de 10^6 e 10^7 do fungo *A. persicinum*.

Trabalhando com a espécie *Acremonium cavaraeanum*, Warwick (2007) avaliou o índice de parasitismo de lixa grande em coqueiro em campos. De acordo com a autora, o hiperparasita proporcionou um aumento significativo no número de folhas verdes, no total de três folhas, contudo não interferiu na produtividade do coqueiro, porém aumentaram a produtividade em apenas 4,33%, e 2,94% um e dois anos após o início das aplicações.

No presente estudo foi observado que os fungos inoculados, colonizaram os estromas da lixa grande, mofando toda a extensão do substrato, além de esporular abundantemente em condições de câmara umidade. Estruturas dos isolados inoculados foram localizadas colonizando também a parte interna do substrato, onde são localizados estruturas dos fitopatogenos. Contudo, ao ser constatado a presença dos hiperparasitas no interior dos estromas, observa-se que não foi detectado a presença do himênio mucoso dos patógenos.

De acordo com Carvalho et al. (2003) um fator primordial para a efetivação da colonização dos estromas por hiperparasitas são as condições climáticas. No estudo foi possível verificar que as variáveis climáticas favoreceram o desenvolvimento tanto da doença, quanto na aparecimento dos fungos hiperparasitas, ou seja, quanto maior incidência das lixas, conseqüentemente ocorre uma multiplicação de hiperparasitas por conta da disponibilização de mais substrato.

O crescimento positivo sobre os estromas indicou a utilização dos mesmos como fonte nutricional pelo fungo, ainda que não tenha avaliado colonização interna e hiperparasitismo dos corpos de frutificação do patógeno por meio de microscopia eletrônica, bem como tipo de interação entre hiperparasita associado e fungo fitopatogênico exercem. Dessa forma, foi possível selecionar isolados promissores no controle biológico das lixas, descartando-se aqueles fungos que não se desenvolveram internamente e sobre os estromas.

Assim, o presente estudo tem demonstrado que, com a incorporação dos microrganismos *Trichoderma* spp. e *Acremonium* spp. à superfície dos estromas, torna-se possível a introdução desses organismos benéficos em áreas onde agentes patogênicos das lixas dos coqueiros estejam estabelecidos, afim de promover a controle biológico em substituição do controle químico.

O antagonismo entre os isolados selecionados no teste de colonização dos estromas foi realizado com os fungos obtidos diretamente de estromas, servindo para verificar a compatibilidade entre isolados, possivelmente presentes nas folhas de coqueiro colonizadas pelas lixas, e conhecer o tipo de interação entre os mesmos. Dois dos fungos, *Acremonium* e *Trichoderma* são conhecidos agentes de controle biológicos de inúmeras doenças de plantas. No entanto, espécies de *Fusarium*, *Cladosporium*, *Pestalotiopsis*, *Curvularia* e *Lasiodiplodia* são conhecidas como agentes causais de doenças de plantas e, principalmente, as três últimas podem causar importantes doenças foliares e de pós-colheita em coqueiro.

Com essa pesquisa, foram obtidos dados que indicam o potencial antagônico de isolados de *Acremonium* spp. (CF/UENF455, CF/UENF459, CF/UENF461 e CF/UENF463) e *Trichoderma* spp. (CF/UENF466 e CF/UENF467) provenientes de estromas de lixas do coqueiro, obtidos da região norte fluminense do Rio de Janeiro e sul do Espírito Santo, contra os fungos *Fusarium* sp. (CF/UENF470), *Curvularia* sp. (CF/UENF471), *Cladosporium* sp. (CF/UENF472), *Pestalotiopsis* sp. (CF/UENF473) e *Lasiodiplodia* sp. (CF/UENF474) também isolados dos estromas foliares do coqueiro.

Silva et al. (2013) estudando a eficiência de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *Pestalotiopsis clavispora*, observou-se que todos os isolados de *Trichoderma* apresentaram alta capacidade antagônica em confronto isolados de *P. clavispora*, havendo uma variação de resistência ao antagonista entre os dois isolados do patógeno, sendo que os isolados do antagonistas podem ser obtidos de isolamento de folhas da noqueira-pecã.

Em estudos realizados por Carvalho et al. (2011) avaliando o controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, "in vitro", mostraram que todos os isolados de *Trichoderma harzianum* apresentaram antagonismo contra o patógeno, reduzindo entre 35 e 51% da incidência do patógeno e proporcionando entre 73 e 81% de plântulas normais.

Trabalhos demonstram que o uso de *Trichoderma* sp. possuem potencial como antagonistas contra *Fusarium* sp., sendo responsável por inibir 37,0%, o crescimento do diâmetro da colônia do agente causal da fusariose responsável por danos em plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp (feijão-caupi) (Sá et al., 2019).

Avaliando o potencial antagônico de isolados de *Trichoderma* spp. no biocontrole in vitro de *Lasiodiplodia theobromae*, verificou-se que os isolados de *Trichoderma* spp. influenciaram no inibição crescimento micelial do fitopatógeno, de acordo com escala de notas Bell et al. (1992). Quatro dos isolados foram considerados antagônicos ou eficientes, do mesmo modo, os resultados adquiridos evidenciara um efeito inibidor de isolados de *Trichoderma* spp. sobre *L. theobromae* (SILVA et al., 2015).

Trabalhos desenvolvidos por Mello et al. (2018) também apresentaram resultados parecidos, nos quais constataram aumento no índice de inibição de crescimento micelial de *L. theobromae* por isolados de *Trichoderma*, sendo os isolado CEN162 e CEN1153 capazes de inibir completamente o crescimento micelial do fungo.

Neste trabalho, vários isolados se revelaram altamente efetivos *in vitro* contra *Fusarium* sp. (CF/UENF470), *Curvularia* sp. (CF/UENF471), *Cladosporium* sp. (CF/UENF472), *Pestalotiopsis* sp. (CF/UENF473) e *Lasiodiplodia* sp. (CF/UENF474). Os isolados CF/UENF459, CF/UENF461 e CF/UENF463, CF/UENF467 foram os que mais inibiram o crescimento de *Fusarium* sp., já os isolados CF/UENF459, CF/UENF463, CF/UENF467 obtive as melhores média no índice inibitório de *Curvularia* sp.

Todos os isolados testados apresentam eficiência na redução do crescimento radial da colônia do fungos *Cladosporium* sp. Quando foi confrontado com o fungo *Pestalotiopsis* sp. os isolados CF/UENF459, CF/UENF463, CF/UENF466 e CF/UENF467 apresentaram resultados relevantes na inibição do fungo. No entanto os demais isolados, mesmo com médias próximas do controle, também exibiram uma inibição no crescimento do *Pestalotiopsis* sp.

Mesmo apresentando um crescimento rápido o fungo *Lasiodiplodia* sp. foi inibido quando pareado com os isolados de *Acremonium* (CF/UENF461 e CF/UENF463) e *Trichoderma* (CF/UENF466 e CF/UENF467), além de retardar a velocidade do crescimento na presença dos isolado de *Acremonium* (CF/UENF455 e CF/UENF463) e *Trichoderma* (CF/UENF467), confirmando o que foi relatado por

Matos et al. (2012), que também conferiu a inibição do crescimento e a invasão micelial por *Trichoderma viride* sobre a colônia de *L. theobromae*.

Alfatah et al., (2019) estudando a fungo *Acremonium sp.* (F2434) relatou o isolamento e a determinação do modo de ação de um novo composto derivado do desoxifingóide chamado hipoculosídeo, até então não relatado. O hipoculosídeo tem atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, afetando a integridade da membrana plasmática das células das leveduras, além de apresentar ação antimicrobianas e citotóxicas.

Esses resultados demonstram que, além do parasitismo direto, diferentes mecanismos podem estar envolvidos na ação antagonista de fungos do gênero *Trichoderma spp* e *Acremonium spp.*, tais como antibiose e competição. Podendo também ser explicadas pela produção de antibióticos, como gliotoxina, viridina, trichodermina, suzucacilina, alameticina, dermadina e hipoculosídeo que possui alta capacidade de inibir o desenvolvimento de outros fungos (Benhamou et al., 1996; SANTOS, 2012; Baleiro et al., 2015; Alfatah et al., 2019).

3.2.7. CONCLUSÃO

Dos isolados obtidos quatorze apresentaram uma afinidade na colonização dos estromas da lixa grande do coqueiro, destacando os isolados *Acremonium* (CF/UENF450, CF/UENF451, CF/UENF452, CF/UENF453, CF/UENF454, CF/UENF456, CF/UENF457, CF/UENF458, CF/UENF459, CF/UENF460, CF/UENF461 e CF/UENF464) e os dois de *Trichoderma* (CF/UENF466 e CF/UENF467). Resultando em um efetivo desenvolvimento dos fungos hiperparasitas em toda estrutura, colonizando tanto externa e internamente.

Todos os isolados de *Acremonium spp.* e *Trichoderma spp.* testados, inibiram o crescimento micelial dos fungos *Fusarium sp.*, *Curvularia sp.*, *Cladosporium sp.*, *Pestalotiopsis sp.* e *Lasiodiplodia sp.*, reduzindo também o índice de velocidade de crescimento. Portanto, esses isolados apresentaram grande potencial como agentes de controle biológico. Assim, é necessário novos estudos

e testes desses isolados em bioensaios para comprovação da atividade antagônica no controle de fitopatógenos sob condições de campo.

3.2.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfenas, A. C.; Mafia, R. G. (2016) Métodos em Fitopatologia. 2. ed. Viçosa: Editora UFV. v. 1. 516p.

Alfatah, M.; Wong, J. H.; Nge, C. E.; Kong, K. W.; Low, K. N.; Leong, C. Y.; Crasta, S.; Munusamy, M.; Chang, A. M. L.; Hoon, S.; Ng, S. B.; Kanagasundaram, Y.; Arumugam, P. (2019) Hypoculoside a sphingoid baselikecompound from *Acremonium* disrupts the membrane integrity of yeast cells. Scientific Reports, 9:710p.

Aragão, W. M. & Ribeiro Melo, M. F. V. (2010). Cultivares de coqueiro para a produção de coco seco: coqueiro Gigante vs híbridos. In: Cintra, F. L.D.; Fontes, H. R.; Passos, E. E. M.; Ferreira, J. M. S. (Ed.). Fundamentos tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no nordeste do Brasil. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. p.37-60.

Araújo, K. L.; Silveira, S. F.; Mussi-Dias, V.; Rocabado, J. M. A.; Miguens, F. C. (2016) Local infection associated with vascular bundles: the colonization of coconut palm leaflets by two *Camarotella* species. EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY, v. 148, p.413-422.

Bell, D.K.; Wells, H.D.; Markham, C.R. (1982) "In vitro" antagonism of Trichoderma species against six fungal plant pathogens. Phytopathology, Sain Paul, v. 72, n.4, p. 379-382.

- Bettiol, W. & Morandi, M.A.B. (2009). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectiva. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 341p.
- Bettiol, W.; Maffia, L. A.; Castro, M. L. M. P de. (2014) Control biológico de enfermidades de plantas en Brasil. Control biológico de enfermidades de plantas en América Latina y el Caribe. Editores BETTIOL, W.; RIVERA, M. C.; MONDINO, P.; MONTEALEGRE A. J. R.; COLMENÁREZ, Y. C. Capítulo 3, p.91-139.
- Benhamou, N.; Chet, I. (1996) Parasitism de *Sclerotia* of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology*, v. 86, n. 4, p.405-416.
- Borges, R. C. F. B; Marques, E.; Macedo, M. A.; Martins, I.; Filho, J. G. S.; Mello, S. C. M. (2018) BIOCONTROL OF TEAK CANCKER CAUSED BY *Lasiodiplodia theobromae*. *Revista Árvore*. vol.42, n.3, e420304.
- Bomfim, M.P.; São José, A.R.; Rebouças, T.N.H.; Almeida, S.S.; Souza, I. V. B.; DIAS, N. O. (2010) Avaliação antagônica in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. *Summa Phytopathologica*, v. 36, n.1, p. 61-67.
- Brainer, M. S. DE C. P. (2018) A adaptação do Nordeste ao cenário de modernização da cocoicultura brasileira. BANCO DO NORDESTE DO BRASIL S.A. (2018). Caderno Setorial ETENE, ano 2, nº 18.
- Campanile, G., Ruscelli, A., & Luisi, N. (2007) Antagonistic activity fo endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in plant tests. *Eur. J. Plant Patho*, 117, p.237-246.
- Carvalho, D. D. C., Mello, S. C. M., Lobo Júnior, M. & Silva, M. C. (2011). Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. *Tropical Plant Pathology*, 36(1), p.28-34.

- Carvalho, R. A. G.; Araújo, E.; Barreto, A. F.; Cardoso, G. D.; Almeida, F. A. (2003) Severidade da LIXA-GRANDE do Coqueiro-anão e Incidência de Hiperparasitismo em Parnamirim, Rio Grande do Norte. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 25, n. 3, p.546-548.
- Costa, R.S.C., Nascente, A.S., Ribeiro, G.D., Ferreira, M.G.R.(2005) Cultivo do Coqueiro em Rondônia. Ed. Téc. NASCENTE, A.S. EMBRAPA Rondônia. Versão Eletrônica: ISSN 1807-1805.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro de pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros. Aracaju, SE. Recomendações técnicas para o cultivo do coqueiro. (EMBRAPA. CPATC. Circular Técnica, 01). Aracaju. 1993. 43p.
- Junges, E.; Muniz, M. F.; Mezzomo, R.; Bastos, B.; Machado, R. T. (2016) *Trichoderma* spp. na Produção de Mudanças de Espécies Florestais. Floresta e Ambiente, Rio de Janeiro, v.23, n.2, p.237 244.
- Machado, D. F. M.; Parzianello, F. R.; Silva, A. C. F.; Antonioli, Z. I. (2012.) *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. Revista de Ciências Agrárias (Lisboa), v. 35, p. 274-288.
- Matos, D.L.; David, G.Q.; Peres, W.M.; Eburneo, L.; Rodrigues, C.; Felito, R.A. (2012) Biocontrole de *Lasiodiplodia theobromae* com uso de *Trichoderma viride*, "in vitro". Tropical Plant Pathology, v. 38, n. 1, 283p.
- Michereff, S. J.; Andrade, D. E. G. T.; Menezes, M. (2005) Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais/eds. Sami J. Michereff, Domingos E. G. T. Andrade, Maria Menezes. – Recife: UFRPE, Imprensa Universitária. 398p.
- Mirisola Filho, L. A. (2002) Cultivo de coco Anão. Viçosa, MG: Aprenda Fácil. 344p.

- Monteiro, C. M. P.; Caron, E. S., Silveira, S. F.; Almeida, A. M, Souza-Filho, G. R.; Souza, A. L. (2013) Control of foliar diseases by the axillary application of systemic fungicides in Brazilian coconut palms. *Crop Protection*, v. 52, p.78–83.
- Monteiro, C.M.P. (2009.) Aplicação axilar de fungicidas sistêmicos no controle da queimadas-folhas do coqueiro (*Cocos nucifera*). Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes –RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 83p.
- Prado, P. K. B.; David, G. Q.; Campião, M. S.; Oliveira, T. D. S.; Pereira, A. C. A. (2015.) Antagonismo de *Trichoderma* sobre o *Colletotrichum sp* através de pareamento de Culturas. *Cáceres*, v. 2, n. 1. 2358-5978.
- Ribeiro Júnior, J.I. (1995) Análises estatísticas no SAEG. Viçosa: UFV. 301p.
- Sá, M. N. F.; Lima, J. S.; Jesus, F. N.; Perez, J. O.; Gava, C. A. T. (2019) Seleção in vitro de agentes de biocontrole visando o controle de *Fusarium sp*. *Acta Brasiliensis* 3(1), 14-16.
- Souza, A. L. de. (2017) Análise técnica e econômica da aplicação de fungicida sistêmico via axilar e estipe do coqueiro anão-verde no Norte Fluminense.. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.xi, 48p
- Silva, F. B.; Silva, F. J. T.; Fernandes, F.S.; Leal, L. V.; Poletto, I. (2013) Isolamento e seleção de *Trichoderma spp.* antagonistas à *Pestalotiopsis clavispora*, patógeno da noqueira-pecã. *Rev. Bras. de Agroecologia*. 8(3): p.109-118.
- 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. Piracicaba. Anais Piracicaba: USP/EMBRAPA. p.57-59.

- Vitoria, N. S. (2007) Espécies de *Camarotella* que causam doenças foliar no coqueiro e em outras palmeiras. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, 150p.
- Vitoria, N. S.; Bezerra, J. L.; Gramacho, K. P.; Luz, E. D. M. N. *Camarotella torrendiela* comb. Nov. e *C. acrocomiae*: agentes etiológicos das lixas do coqueiro. *Trop. plant pathol.* [online]. 2008, vol.33, n.4, p.295-301. ISSN 1982-5676.
- Vivas, J.M.S.; Silveira, S. F.; Santos, P. H. D.; Carvalho, B. M.; Poltronieri, T. P. S.; Jorge, T. S.; Santos, J. S.; Ferreira Kurosawa, R. N.; Moraes, R. (2018) Antagonism of fungi with biocontrol potential of papaya black spot caused by *Asperisporium caricae*. *AUSTRALIAN JOURNAL OF CROP SCIENCE (ONLINE)*, v. 12, p. 827-833.
- Warwick, D.R.N., Abakerli, R.B. (2001) Chemical control of lixas and leaf blight disease of coconut. *Palms*, 45 (4):p.168-170.
- WARWICK, D.R.N. (2001) Colonização de estromas de *Sphaerodothis acrocomiae* Agente causal da lixa grande do coqueiro por *Acremonium persicinum*. *Fitopatologia Brasileira* 26: 220p.
- Warwick, D. R. N. & Leal, E. C. (2003). Principais doenças foliares. In: Ferreira, J.M.S. *Coco: Fitossanidade*. EMBRAPA/CPATC, EMBRAPA Informações tecnológicas, Brasília-DF, p.41-50.
- Warwick, D. R. N. (2007) Índices de parasitismo de Lixa-grande do coqueiro pelos fungos hiperparasitas: *Acremonium cavaraeanum* e *Dicyma pulvinata* / Dulce Regina Nunes Warwick. -- Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 13p.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Com bases nas características macro e *micromorfológicas*, observou-se a ocorrência de oito gêneros fúngicos associado aos estromas das lixas do coqueiro (*Cocos nucifera* L.). Foram obtidos 25 fungos associados aos estromas, 16 isolados em *Acremonium* (CF/UENF450, CF/UENF451, CF/UENF452, CF/UENF453, CF/UENF454, CF/UENF455, CF/UENF456, CF/UENF457, CF/UENF458, CF/UENF459, CF/UENF460, CF/UENF461, CF/UENF462, CF/UENF463, CF/UENF464, CF/UENF465); dois em *Trichoderma* (CF/UENF466, CF/UENF467), e mais um isolado de cada gênero em *Paecilomyces* (CF/UENF468), *Fusarium* (CF/UENF470), *Cladosporium* (CF/UENF471), *Curvularia* (CF/UENF472), *Pestalotiopsis* (CF/UENF473) e *Lasiodiplodia* (CF/UENF474), bem como uma cepa de levedura não-identificada (CF/UENF469).

Entre os gêneros identificados, dois está relacionado com o potencial ao biocontrole, o *Trichoderma spp.* e o *Acremonium spp.*, sendo que esse último foi o que apresentou maior variabilidade entre os demais gêneros, existindo fortes provas circunstancial de ocorrência de mais de uma espécies de *Acremonium*.

A temperatura ótima para o crescimento mecelial dos isolados de *Acremonium*, de modo geral, foram na faixa de 20°C a 25°C, índices elevados de temperatura afeta o desenvolvimento dos isolados. Para os gêneros de *Trichoderma* e *Paecilomyces* variou de 15°C a 35°C, no entanto, o isolado CF/UENF467 (*Trichoderma*) reduziu seu desempenho a 35°C, já o CF/UENF468

(*Paecilomyces*) teve seu crescimento afetado a 15°C. A levedura obteve incidências ideais na faixa de 20° a 25°C, as demais não apresentaram diferença significativa.

No caso da esporulação, a temperatura variou de 20°C a 25°C para a grande maioria dos isolados de *Acremonium*, porém os isolados CF/UENF461, CF/UENF462, CF/UENF463 não apresentaram diferença expressiva entre 20°C a 25°C. Quando essa temperatura foi elevada para 35°C todos os isolados não registraram produção de conídio, por não exibirem crescimento micelial. Para o gênero *Trichoderma* ocorreu uma diferença entre os isolados, o CF/UENF466 apresentou uma esporulação ótima a 25°C e o CF/UENF467 em 30°C. No caso do *Paecilomyces* este variou de 20°C a 30°C. A cepa de levedura apresentou uma maior quantidade de células reprodutivas (brotos) a 20°C, entre a faixa de 15°C e 35°C, não foi constatada presença de brotos.

No teste in vitro verificou-se que praticamente todos os isolados examinados dos gêneros *Acremonium spp.*, *Trichoderma spp.*, *Paecilomyces sp.*, e uma cepa de levedura (não identificada) apresentaram uma afinidade em colonizar os estromas da lixa grande (*Camarotella acrocomiae*) do coqueiro. Os isolados CF/UENF450, CF/UENF451 e CF/UENF461 (isolados de *Acremonium*), e CF/UENF466 e CF/UENF467 (isolados de *Trichoderma*), foram os que apresentaram as maiores médias de estromas hiperparasitados, com um destaque para o isolado CF/UENF461 que obteve a maior média entre todos os isolados avaliados.

No estudo de antibiose in vitro, em culturas pareadas, constatou-se que todos os isolados dos antagonistas de *Acremonium* (CF/UENF455, CF/UENF459, CF/UENF461 e CF/UENF463) e *Trichoderma* (CF/UENF466 e CF/UENF467) apresentaram um efeito inibitório eficiente contra os fungos *Fusarium sp.*, *Curvularia sp.*, *Cladosporium sp.*, *Pestalotiopsis sp.* e *Lasiodiplodia sp.*. Os fungos *Pestalotiopsis sp.* e *Lasiodiplodia sp.* foram os microrganismos que apresentaram uma maior resistência ao efeito inibitório dos antagonistas. Dentre os antagonistas o isolado CF/UENF461 (*Acremonium*) foi o que apresentou maior efetividade na inibição dos fungos avaliados.

5. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICAS GERAL

Aguiar Menezes, E. de L. (2003) Controle biológico de pragas: princípios e estratégias de aplicação em ecossistemas agrícolas. Seropédica. Embrapa Agrobiologia Documentos, 164. 44 p.

Alfenas, A. C.; Mafia, R. G. (2016) Métodos em Fitopatologia. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, v. 1. 516.

Aragão, W. M. & Ribeiro Melo, M. F. V. (2010). Cultivares de coqueiro para a produção de coco seco: coqueiro Gigante vs híbridos. In: Cintra, F. L.D.; Fontes, H. R.; Passos, E. E. M.; Ferreira, J. M. S. (Ed.). Fundamentos tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no nordeste do Brasil. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. 232 p. p.37-60.

Araújo, K. L.; Silveira, S. F.; Mussi-Dias, V.; Rocabado, J. M. A.; Miguens, F. C. (2016) Local infection associated with vascular bundles: the colonization of coconut palm leaflets by two *Camarotella* species. EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY, v. 148, p.413-422.

Arx, J.A. von; Müller, E. (1954) Die Gattungen der amerosporen Pyrenomyceten. Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz. 11(1):p.1-434.

- Barnett, H. L. & Hunter, B. B. (1972) Illustrated Genera of Imperfect Fungi, ed. 3. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, USA. 241p.
- Benassi, A.C.O.; Fanton, C.J; Santana, E.N. de. (2013) Cultivo do coqueiro-anão-verde: tecnologias de produção/Antonio Carlos Benassi; César José Fanton; Enilton Nascimento de Santana. - Vitória, es: INCAPER, Documentos, 227. 120p.
- Benitez, T.; Rincon, A.M.; Limon, M.C; Codon, A.C. (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma Strains*. International Microbiology, 7, p.249-260.
- Bettiol, W. & Morandi, M.A.B. (2009). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectiva. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 341p.
- Bettiol, W.; Maffia, L. A.; Castro, M.L.M.P.de. (2014) Control biológico de enfermidades de plantas en Brasil. Control biológico de enfermidades de plantas en América Latina y el Caribe. Editores BETTIOL, W.; RIVERA, M. C.; MONDINO, P.; MONTEALEGRE A. J. R.; COLMENÁREZ, Y. C. Capítulo 3, p. 91-139.
- Bettiol, W.; Morandi, M. A. B.; Pinto, Z. V.; Paula Júnior, T. J.; Corrêa, E. B.; Moura, A. B.; Lucon, C. M. M.; Costa; J. C. B.; Bezerra, J. L. (2012) Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. Documento 88, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. 155p.
- Bezerra, J. L.; Figueiredo, J. M. de. (1982) Ocorrência de *Phytomonas staheli* Mc Ghee & Mc Ghee em coqueiro (*Cocos nucifera* L.) no estado da Bahia, Brasil. Fitopatologia Brasileira, v.7, p.139-143.
- Bezerra, J. L.; Silva, G. S. (1989) Doenças De Palmáceas. In: Francisco A Ferreira. (Org.). Doenças De Palmáceas. Viçosa: SOCIEDADE DE INVESTIGAÇÕES FLORESTAIS. v., p. 455-490.

- Bourdeix, R., Konan, J.L., N'cho, Y.P. (2005) Coconut – A guide to traditional and improved varieties.. Editions Diversiflora.104p.
- Brainer, M. S. DE C. P. A (2017) Adaptação do Nordeste ao cenário de modernização da cocoicultura brasileira. BANCO DO NORDESTE DO BRASIL S.A. Caderno Setorial ETENE, ano 2, nº 18, p.1-25
- Brilhante, R. S. (2004.) Evaluation of *Microsporum canis* in different methods of storage. *Medical Mycology*, 42: p.499-504.
- Cannon, P.F. (1991) A revision of *Phyllachora* and some similar genera on the host family Leguminosae. *Mycological Papers*. 163: p.1-302.
- Carmichael, J.K., Kendrick, W. B., Connors, I. L. & Sigler, L. (1980) Genera of Hyphomycetes. The university of Alberta Press, Alberta, Canada, 386p.
- Castellani, A. (1939) The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 42: p.225-226.
- Cavalcante, L. V. (2016) Reestruturação produtiva e a nova geografia do coco. *Campo - Território: revista de geografia agrária*, v. 11, p. 121-148.
- Child, R. (1974). *Coconuts*. 2nd ed. London: Longman, 335 p.
- Cook, R.J.; Baker, K. F. (1983) The nature and practice of biological control of plant pathogens. Fonte/Imprenta: St. Paul: APS Press. 539p.
- 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): p.183-193.

- Ellis, M. B. (1980) Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 494p.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (1993) Centro de pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros. Aracaju, SE. Recomendações técnicas para o cultivo do coqueiro. (EMBRAPA. CPATC. Circular Técnica, 01). Aracaju: 43p.
- FAO. Culturas ano 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>. Acesso em 14 abr. 2018.
- Ferreira, J. M. S.; Warwick, D. R. N.; Siqueira, L. A. (1998) Cultura do coqueiro no Brasil. 2º ed. Revisada e ampliada. Aracaju: EMBRAPA – SPI, 292p.
- Fontes, H.R., Ferreira, J.M.S., Siqueira, L.A. (2002) Sistema de produção para a cultura do coqueiro/ Humberto Rollemberg Fontes, Joana Maria Santos Ferreira, Luiz Alberto de Siqueira - Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Sistemas de Produção, 01). 63p..
- Fontes, H. R. (2010). Caracterização do quadro atual e principais ameaças à produção de coco seco no nordeste do Brasil. Portal do Agronegócio, Viçosa, MG. 70p.
- França, G. S.; Costa-Carvalho, R. R.; Neves, R. P.; Araújo, E. R.; Laranjeira, D. (2015) Controle pós-colheita da antracnose do pimentão pela levedura *Rhodotorula glutinis*. Bioscience Journal (UFU. Impresso), v. 31, n. 2, p. 451-459.
- Franco, E. (1965) A lixa preta das folhas do coqueiro. Boletim Fitossanitário, v.5, p.57-55.
- Gasparotto, L.; Junqueira, N. T. V.; Maffia, L.; Vale, F. X. R. (1991) Epidemiologia do mal-das-folhas da seringueira II. Região de Manaus. Fitopatologia Brasileira, Brasília-DF, v. 16, n.1, p.19-21.

- Gasparotto, L.; Pereira, J. C. R.; Hanada, R. E.; Cares, J. E.; Araújo, J. C. A.; Ângelo, P. C. S. (2016) Glossário de fitopatologia. Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica. 490 p.
- Garcia, A.; Ribeiro, G.D.; Rodrigues, A. N.A. (1999) Ocorrência das principais doenças do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) em Rondônia e medidas de controle. (EMBRAPA-CPAF Rondônia. Circular Técnica, 47). Porto Velho: EMBRAPA-CPAF Rondônia. 22p.
- Gunn, B.F., Baudouin, L., Olsen, K.M. (2011) Independent Origins of Cultivated Coconut (*Cocos nucifera* L.) in The Old World Tropics. PLoS ONE 6(6): 1 - 8. doi:10.1371/journal.pone.0021143.
- Hamann, F. A. (2011) Aspectos do controle biológico de *Botrytis cinérea* Pers. Ex. Fr. em videira. Dissertação (mestrado – Programa de pós-graduação em agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Rio grande do Sul – RS.
- Heling, A. L.; Kuhn, O. J. ; Stangarlin, J. R. ; Henkemeier, N. P. ; Roncato, S.C ; Goncalves, E. D. V. (2017) Biological control of anthracnose in the postharvest of manzano bananas using *Saccharomyces* spp. Summa Phytopathologica, v. 43, p. 49-51.
- Hyde, K.D, Cannon, P.F. (1999) Fungi causing tar spots on palms. Mycological Papers 175: 50-58.
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. (2019) Censo Agropecuário 2017.
- Junqueira, N. T. V., Silva, S. E. L. da, Silva, H. M., Silva, M. A. M. da. (1986) Controle biológico do "mal das folhas" da seringueira por *Hansfordia pulvinata*. Manaus: EMBRAPA-CNPDS. N. 40. p.1-5.

- 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:p.307-331.
- Krishna, A.; Singh, R. A. (1979) *Hansfordia pulvinata* mycoparasitic on *Cercospora* species causing “Tikka disease” of groundnut. Indian Phytopathology, New Delhi, v. 32, p.318-320.
- Leal, E.C.; Santos, Z.G. dos; Ram, C.; Warwick, D.R.N.; Leal, M. de L. da S.; Renard, J.L. (1994) Efeito da adubação mineral sobre a incidência das lixas *Sphaerodothis torrendiella* e *Sphaerodothis acrocomiae* no coqueiro *Cocos nucifera* L. Oléagineux, Montpellier, v.49, n.5, p.213-220.
- Lins, P. M. P.; Neto, J. T. DE F., Muller, A. A. (2003) Avaliação de híbrido de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) para produção de frutas e de albúmen sólido fresco. 2003. Rev. Bras. Frutic, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 3, p.468-470.
- Lisboa, B.B.; Bochese, C.C.; Vargas, L.K.; Silveira, J.R.P.; Radin, B.; Oliveira, A.M.R. (2007) Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. Ciência Rural, v.37, p.1255-1260.
- Loiola, C. M. (2014) Diversidade genética em coqueiro-gigante (*Cocos nucifera* L.) por meio de marcadores microssatélites e características morfoagronômicas. Dissertação (Doutor em Agronomia: Fitotecnia. Área de Concentração: Agricultura Tropical. Linha de Pesquisa: Melhoramento Genético Vegetal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró – Rio Grande do Norte.
- Machado, D. F. M.; Parzianello, F. R. ; Silva, A. C. F. ; Antoniulli, Z. I. (2012) *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. Revista de Ciências Agrárias (Lisboa), v. 35, p.274-288.

- Martins, C.R. (2011) Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional: panorama 2010 /Carlos Roberto Martins, Luciano Alves de Jesus Júnior – Aracaju: (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1517-1329; 164). 28p.
- Martins, C.R; Júnior, L. A. de J. (2013) Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional: panorama 2014/Carlos Roberto Martins, Luciano Alves de Jesus Júnior – Aracaju: (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1517-1329; 184). 51p.
- Melo, I.S. (1998) Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo, I.S. e Azevedo, J.L. (Ed.) - Controle Biológico, v.1. Jaguariúna, Embrapa, p.17–60.
- Melo, D. F.; Mello, S. C. M.; Mattos, C. R. R.; Cardoso, S. E. A. (2007.) *Dicyma pulvinata* como agente de biocontrole do mal-das-folhas da seringueira/Déborá Ferreira Melo ... [et al.]. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 16p.
- Michereff, S. J.; Andrade, D. E. G. T.; Menezes, M. (2005) Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais / eds. Sami J. Michereff, Domingos E. G. T. Andrade, Maria Menezes. – Recife: UFRPE, Imprensa Universitária. 398p.
- Michereff, S. J.; Barros, R. (2001) Proteção de plantas na agricultura sustentável / eds. Sami Jorge Michereff, Reginaldo Barros. – Recife : UFRPE, Imprensa Universitária. 368p.
- Minotto, E.; Milagre, L. P.; Spadari, C.; Feltrin, T.; Ballarini, A. E.; Germani, J.C.; Salamoni, S.P.; VAN DER SAND, S.T. (2016) Screening endophytic actinobacteria with potential antifungal activity against *Bipolaris sorokiniana* and growth promotion of wheat seedlings. African Journal of Microbiology Research **JCR**, v. 10, p.1494-1505.

- Miranda, A. M. (2017) Biossólido e pó de coco como substrato para produção de mudas de jacarandá-da-bahia em tubetes de diferentes volumes. Monografia (Bacharel em Engenharia Florestal - Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica – Rio de Janeiro. 210p.
- Mirisola Filho, L. A. (2002) Cultivo de coco Anão. Viçosa, MG: Aprenda Fácil. 344p.
- 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.
- Monteiro, C. M. P.; Caron, E. S.; Silveira, S. F.; Almeida, A. M, Souza-Filho, G. R.; Souza, A. L. (2013) Control of foliar diseases by the axillary application of systemic fungicides in Brazilian coconut palms. Crop Protection, v. 52, p.78–83.
- Monteiro, C.M.P. (2009) Aplicação axilar de fungicidas sistêmicos no controle da queimadas-folhas do coqueiro (*Cocos nucifera*). Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes –RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF, 83p.
- Morandi, M.A.B.; Paula Júnior, T.J.; Bettioli, W.; Teixeira, H. (2009) Controle biológico de fungos fitopatogênicos. Informe Agropecuário (Belo Horizonte), v.30, p.73-82.
- Nunes, A.O. (2015) Caracterização Morfológica, Agronômica e Molecular de Acessos de Coqueiro-gigante do Banco Ativo de Germoplasma de Coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Monografia. (Bacharelado em Biologia) - São Cristóvão - SE, Universidade Federal de Sergipe, 37p.
- Neto, M. F. (2014) Tamanho do genoma e cariotipagem convencional e diferencial em coqueiro (*Cocos nucifera* L.). Dissertação (Doutora em Produção Vegetal/Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual do

Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 170.

Ohler, J. G. (1984) Coconut Tree of Life. Roma: FAO. 446p.

Paula Júnior, T.J.; Venzon, M.; Morandi, M.A.B.; Bettiol, W.; Pallini, A.; Teixeira, H. (2009) Comercialização de produtos biológicos para o controle de doenças de plantas e pragas no Brasil. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.3D , n.251 , p.116-123.

Pinho, D.B.; Firmino, A.L.; Pereira, O.L.; Ferreira Junior, W.G.(2012) An efficient protocol for DNA extraction from Meliolales and the description of *Meliola centellae* sp. nov. Mycotaxon 122:333. p.345.

Peresse, M.; Le Picard, D. (1980) *Hansfordia pulvinata*, mycoparasite destructeur du *Cladosporium fulvum*. Mycopathologia, v.71, p.2330.

Purseglove, J. W. (1975). Tropical crops monocotyledons. 2ª Impress, Halsted Press, 607p.

Rathaiah, Y.; Pavgi, M. (1971) A species of *Hansfordia* mycoparasitic on *Cercospora*. Rivista di Patologia Vegetale, Padova, IT, v. 7, p. 203-211.

Renard, J. J. (1982) Missão de prospecção sobre as doenças do coqueiro e palmeira oleaginosa no Brasil. Paris: IHRO / GERDAT, 1982. 85p.

Renard, J. L. (1989) Le Hartrot du cocotier caracterization et moyens de lutte. Oléagineux, v.44, n.10, p.475-484.

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.

- Santos, M. M. S. (2018) Ecofisiologia do coqueiro gigante sob diferentes condições de umidade e salinidade do solo no litoral Oeste do estado do Ceará. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Fortaleza, 128p.
- Santos, P. H. D.; Carvalho, B. M.; Aguiar, K. P.; Aredes, F. A. S.; Poltronieri, T. P. S.; Vivas, J. M. S.; Mussi-Dias, V.; Bezerra, G. A.; Pinho, D. B.; Pereira, M. G.; Silveira, S.F. (2017) Phylogeography and Population Structure Analysis Reveals Diversity by Mutations in *Lasiodiplodia theobromae* With Distinct Sources of Selection. *GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH JCR*, v. 16, p.1-14.
- Seifert, K.; Morgan-Jones, G.; Gams, W & Kendrick, B. (2011) The genera of Hyphomycetes. CBS. Biodiversity, série 9. 997p.
- Sherf, A.F. (1943) A method for maintaining *Phytophthora septentrionalis* for long periods without transfer. *Phytopathology*, 33: p.30-32.
- Souza, A. L. de. (2017) Análise técnica e econômica da aplicação de fungicida sistêmico via axilar e estipe do coqueiro anão-verde no Norte Fluminense. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 48p.
- Siqueira, L.A., Aragão, W.M., Tupinambá, E.A. (2002) A Introdução do coqueiro no Brasil, importância histórica e agrônômica. Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 47, 24p.
- Subileau, C., Renard, J.L. e Denetiere, B. (1993). *Phyllachora torrendiella* (Batista) com. Nov. responsable de la maladie verruqueuse du cocotier. *Mycotaxon*, p. 175-185.
- 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. Piracicaba. Anais Piracicaba: USP/EMBRAPA. p.57-59.

Tarantino, P.; Caiazza, R.; Carella, A. & Lahoz, E. (2007) Control of *Rhizoctonia solani* in a tobacco-float using low rates of iprodione- and iprodione-resistant strains of *Gliocladium roseum*. *Crop Protection*, 26:298-1302.

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.

Torres, J. B., Michereff, J.S. Semana de Fitossanidade (sobre) Desafios do Manejo Integrado de Pragas e Doenças (1: 2000 : Recife, PE) Livro de Palestras e mini-Cursos I eds Jorge Braz Torres e Sami Jorge Michereff. - Recife: UFRPE, 2000. 247p.

Tirilly, Y.; Kloosterman, J.; Sipma, G. & Kettenes-van den Bosch J.J. (1983) A fungitoxic sesquiterpene from *Hansfordia pulvinata*. *Phytochemistry* 22:2082-2083.

Vitoria, N. S. (2007) Espécies de *Camarotella* que causam doenças foliar no coqueiro e em outras palmeiras. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus. 92p.

Vitoria, N. S.; Bezerra, J. L.; Gramacho, K. P.; Luz, E. D. M. N. (2008) *Camarotella torrendiela* comb. Nov. e *C. acrocomiae*: agentes etiológicos das lixas do coqueiro. *Trop. plant pathol.* [online], vol.33, n.4, ISSN 1982-5676. p.295-301.

Vivas, J.M.S.; Silveira, S. F.; Santos, P. H. D.; Carvalho, B. M.; Poltronieri, T. P. S.; Jorge, T. S.; Santos, J. S.; Ferreira Kurosawa, R. N.; Moraes, R. (2018) Antagonism of fungi with biocontrol potential of papaya black spot caused by *Asperisporium caricae*. *AUSTRALIAN JOURNAL OF CROP SCIENCE (ONLINE) JCR*, v. 12, p. 827-833.

- 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 (Online), v. 45, p.73-81.
- Warwick, D.R.N., Abakerli, R.B. (2001) Chemical control of lixas and leaf blight disease of coconut. *Palms*, 45 (4):168-170.
- Warwick, D.R.N. & Leal, E.C. (2003). Principais doenças foliares. In: Ferreira, J.M.S. Coco: Fitossanidade. EMBRAPA/CPATC, EMBRAPA Informações tecnológicas, Brasília-DF, p.41-50.
- Warwick, D.R.N. (2007) Índices de parasitismo de Lixa-grande do coqueiro pelos fungos hiperparasitas: *Acremonium cavaraeanum* e *Dicyma pulvinata* / Dulce Regina Nunes Warwick. -- Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 13p.
- Warwick, D. R. N.; Passos, E. E. M. (2009) Outbreak of stem bleeding in coconuts caused by *Thielaviopsis paradoxa* in Sergipe, Brazil. *Tropical Plant Pathology*, v. 34, n. 3, p.175-177.
- Zambenedetti Magnani, E.B., Alves, E. & Araújo, D.V. (2007) Eventos dos processos de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. *Fitopatologia Brasileira* 32: p.156-160.