



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – RENORBIO

JENIFER STHEPHANIE ARAUJO DA SILVA

**FUNGOS CAUSADORES DE PODRIDÃO RADICULAR EM MANDIOCA
(*Manihot esculenta* Crantz) E DESENVOLVIMENTO DE INOCULANTE À
BASE DE BIOCHAR E *Trichoderma koningiopsis* URM 8972 PARA SUPRESSÃO
DA DOENÇA**

Recife

2024

JENIFER STHEPHANIE ARAUJO DA SILVA

**FUNGOS CAUSADORES DE PODRIDÃO RADICULAR EM MANDIOCA
(*Manihot esculenta* Crantz) E DESENVOLVIMENTO DE INOCULANTE À
BASE DE BIOCHAR E *Trichoderma koningiopsis* URM 8972 PARA SUPRESSÃO
DA DOENÇA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia tendo como ponto focal a Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Industrial

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Maria de Souza-Motta

Coorientadora: Érika Valente de Medeiros

Recife

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Silva, Jenifer Sthephanie Araujo da.

Fungos causadores de podridão radicular em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e desenvolvimento de inoculante à base de biochar e *Trichoderma koningiopsis* URM 8972 para supressão da doença / Jenifer Sthephanie Araujo da Silva. - Recife, 2024. 117f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, 2024.

Orientação: Cristina Maria de Souza-Motta.

Coorientação: Érika Valente de Medeiros.

1. Patógenos agrícolas; 2. Antagonismo; 3. Atividade enzimática; 4. Severidade. I. Souza-Motta, Cristina Maria de. II. Medeiros, Érika Valente de. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

JENIFER STHEPHANIE ARAUJO DA SILVA

**FUNGOS CAUSADORES DE PODRIDÃO RADICULAR EM MANDIOCA
(*Manihot esculenta* Crantz) E DESENVOLVIMENTO DE INOCULANTE À
BASE DE BIOCHAR E *Trichoderma koningiopsis* URM 8972 PARA SUPRESSÃO
DA DOENÇA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia tendo como ponto focal a Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito necessário para a obtenção do grau de DOUTORA em Biotecnologia.

APROVADA EM: 29/08/2024

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristina Maria de Souza-Motta
Presidente – Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Alexandre Reis Machado
Examinador Externo - Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Ana Carla da Silva Santos
Examinador Externo - Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. André Angelo Medeiros Gomes
Examinador Externo - Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Jadson Diogo Pereira Bezerra
Examinador Externo - Universidade Federal de Goiás

Dedico esta tese a Deus, que iluminou meu caminho durante toda esta jornada e foi socorro presente na hora da angústia; ao meu querido esposo, Saulo Ribeiro Pontes; à minha mãe, Jacqueline Araujo de Melo; à minha avó, Maria Vieira; e aos meus irmãos, Douglas, Giovana e Briana. Vocês foram e são a minha maior motivação. Sem o apoio, carinho e compreensão de cada um, certamente, eu não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, fonte de toda sabedoria e conhecimento, por me guiar e sustentar em cada passo desta jornada acadêmica. Sou grata a Ele pelo Seu amor e cuidado para comigo, por me conceder a força e o discernimento necessários para superar cada desafio durante a elaboração desta tese e por colocar em minha vida verdadeiros anjos que me possibilitaram chegar à conclusão deste trabalho.

Ao meu esposo Saulo, por todo o seu amor, carinho, apoio, incentivo e compreensão durante todas as etapas deste trabalho. Muito obrigada por estar ao meu lado desde o início, por acreditar em mim e me ajudar a concretizar mais um sonho. Obrigada por ter sido tão paciente e por ser meu refúgio e fortaleza durante todo o processo de pesquisa e escrita desta tese. Sua presença me deu a confiança necessária para concluir este trabalho. Meu amor, sem o seu apoio, essa vitória não seria possível.

À minha mãe, Jacqueline, por todos os sacrifícios feitos para que eu chegasse até aqui; por sempre acreditar em mim, mesmo nos momentos em que eu duvidei de mim mesma. Sua força e apoio inabaláveis me deram a coragem para continuar.

À minha avó, Maria Vieira, por todo o seu amor, carinho, apoio e cuidado durante toda a minha trajetória acadêmica.

Aos meus irmãos Douglas, Giovana e Briana, e a toda a minha família, por todo o apoio, incentivo e amor incondicional. Vocês são minha fortaleza e me inspiram a ser uma pessoa melhor e a nunca desistir dos meus sonhos. Esta conquista também é de vocês.

Às minhas queridas orientadoras Cristina Maria de Souza-Motta e Erika Valente de Medeiros, primeiramente, por terem me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho e por todo o apoio durante o processo. Agradeço a amizade, respeito, confiança e por acreditarem em mim.

Aos colegas do Laboratório de Taxonomia e Biotecnologia Utilizando Fungos e do Laboratório de Enzimologia e Microbiologia Ambiental: Laureana, Sílvia, Vitória, Joenny, Rafaela, José Vitorino, Amanda, Emily, Elisiane, Sabrina, Mateus, Layanne, Jordane e Julia. Agradeço todo o apoio, ajuda e ensinamentos ao longo desses anos. A forma como me receberam e a amizade sincera que me proporcionaram são algo que

vou guardar sempre comigo. Agradeço a todos pela convivência que tornava nosso dia a dia mais leve e divertido.

Agradeço especialmente aos professores Alexandre Machado, Ana Carla, Carlos Fragoso, Diogo Costa, Renan Barbosa, Laura Mesquita, Rodrigo Lira, Rafaela França e Jamily Barros, que foram fundamentais para o desenvolvimento desta tese. Obrigada por todo o apoio, ensinamentos, contribuições, parcerias e conselhos.

À UFPE, por meio do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO), por me permitir participar deste excelente programa de doutorado.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelos recursos financeiros e concessão de bolsa de estudo, que possibilitaram que eu me dedicasse integralmente ao projeto de doutorado.

RESUMO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma cultura de grande importância mundial. A podridão radicular é uma doença que causa grandes prejuízos e limita a produção de mandioca em todo o Brasil. Diversos patógenos estão associados a esta doença, o que dificulta ainda mais o seu controle. O controle químico é inviável para o manejo da podridão radicular devido ao alto custo e baixa eficiência desses produtos em doenças do solo, sendo necessário o estudo de controles alternativos. O presente estudo teve como objetivos 1) isolar e identificar patógenos da podridão radicular da mandioca, 2) confirmar a patogenicidade dos isolados, 3) produzir um bioinoculante a base de biochar e *Trichoderma* e 4) testar in vivo seus efeitos sobre a severidade de patógenos e a qualidade do solo. Raízes de plantas de mandioca com sintomas de podridão radicular foram coletadas em uma área de plantio de mandioca no município de Garanhuns, Pernambuco, Brasil. Na mesma área foram coletadas amostras de solo de plantas de mandioca assintomáticas, visando a obtenção de fungos biocontroladores. Os fungos patogênicos foram identificados com base em análises morfológicas e por Sequenciamento de DNA, e a patogenicidade testada em mudas e tubérculos de mandioca. Cepas de *Trichoderma* foram testadas quanto a produção da enzima quitinase e antagonismo contra os patógenos da mandioca. O biochar foi produzido a partir de resíduos de fermentação de uva. O bioinoculante foi produzido com a inoculação do biochar com o fungo *T. koningiopsis*, e posteriormente avaliado no controle de patógenos da podridão radicular em experimento em casa de vegetação. Das raízes da mandioca foram isolados *Curvularia* sp., *Diaporthe ueckeri*, *Fusarium agrestense*, *F. gossypinum*, *F. grosnichelii*, *F. triseptatum*, *Macrophomina phaseolina* e *Neocosmospora falciformis*. Todas as espécies causaram murcha e amarelecimento nas folhas e lesões necróticas em tubérculos e manivas de mandioca nos testes de patogenicidade. Este é o primeiro relato de *Curvularia* sp., *D. ueckeri*, *F. agrestense*, *F. gossypinum*, *F. grosnichelii*, e *F. triseptatum* causando podridão radicular em mandioca no mundo, e o primeiro relato de *M. phaseolina* causando esta doença no Brasil. Os isolados do solo foram identificados como *Trichoderma* sp., *T. koningiopsis* e *T. longibrachiatum*. As maiores atividades da enzima quitinase foram quantificadas em *T. koningiopsis* URM 8972 e *T. longibrachiatum* URM 6068, que apresentaram semelhante antagonismo e controle do crescimento micelial dos patógenos. No experimento em casa de vegetação, o bioinoculante de biochar e *T. koningiopsis* URM 8972 reduziu significativamente a severidade da podridão radicular da mandioca causada por *F. agrestense*. Melhora da qualidade do solo foi observada com o bioinoculante, que aumentou os teores de P e K no solo. A combinação de biochar da uva e *T. koningiopsis* URM 8972 é uma ferramenta promissora para controlar a podridão radicular da mandioca, aumentando o rendimento da cultura de forma sustentável e melhorando a fertilidade do solo.

Palavras-chave: Patógenos agrícolas; antagonismo; atividade enzimática; severidade.

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a crop of great global importance. Root rot is a disease that causes great damage and limits cassava production throughout Brazil. Several pathogens are associated with this disease, which makes its control even more difficult. Chemical control is unfeasible for managing root rot due to the high cost and low efficiency of these products in soil diseases, making it necessary to study alternative controls. The present study aimed to 1) isolate and identify cassava root rot pathogens, 2) confirm the pathogenicity of the isolates, 3) produce a bioinoculant based on biochar and *Trichoderma* and 4) test in vivo its effects on the severity of pathogens and soil quality. Roots of cassava plants with symptoms of root rot were collected in a cassava planting area in the municipality of Garanhuns, Pernambuco, Brazil. In the same area, soil samples were collected from asymptomatic cassava plants, using biocontrol fungi. Pathogenic fungi were identified based on morphological analyzes and DNA sequencing, and pathogenicity was tested on cassava seedlings and tubers. *Trichoderma* strains were tested for chitinase enzyme production and antagonism against cassava pathogens. Biochar was produced from grape fermentation residues. The bioinoculant was produced by inoculating biochar with the fungus *T. koningiopsis*, and subsequently evaluated in the control of root rot pathogens in a greenhouse experiment. *Curvularia* sp., *Diaporthe ueckeri*, *Fusarium agrestense*, *F. gossypinum*, *F. grosnichelii*, *F. triseptatum*, *Macrophomina phaseolina* and *Neocosmospora falciformis* were isolated from cassava roots. All species caused wilting and yellowing of leaves and necrotic lesions on cassava tubers and stems in pathogenicity tests. This is the first report of *Curvularia* sp., *D. ueckeri*, *F. agrestense*, *F. gossypinum*, *F. grosnichelii*, and *F. triseptatum* causing root rot in cassava in the world, and the first report of *M. phaseolina* causing this disease in the world. Brazil. The soil isolates were identified as *Trichoderma* sp., *T. koningiopsis* and *T. longibrachiatum*. The highest activities of the chitinase enzyme were quantified in *T. koningiopsis* URM 8972 and *T. longibrachiatum* URM 6068, which showed similar antagonism and control of mycelial growth of the pathogens. In the greenhouse experiment, the bioinoculant of biochar and *T. koningiopsis* URM 8972 significantly reduced the severity of cassava root rot caused by *F. agrestense*. Improvement in soil quality was observed with the bioinoculant, which increased P and K content in the soil. The combination of grape biochar and *T. koningiopsis* URM 8972 is a promising tool for controlling cassava root rot, sustainably increasing crop yield and improving soil fertility.

Keywords: Agricultural pathogens; antagonism; enzyme activity; severity.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO | 1 |
| REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 1. A cultura da mandioca | 3 |
| 1.1. Principais doenças que acometem a cultura da mandioca | 6 |
| 2. Podridão radicular da mandioca | 7 |
| 3. Identificação de fungos fitopatogênicos..... | 9 |
| 4. Manejo da podridão radicular da mandioca | 10 |
| 5. Uso de bioprodutos no crescimento vegetal e manejo de doenças | 12 |
| 6. Uso de biochar no manejo de doenças de plantas..... | 14 |
| 7. <i>Trichoderma</i> no manejo de doenças de plantas..... | 15 |
| 8. Referências | 18 |
| CAPÍTULO I | 31 |
| Identificação de espécies fusarióides associadas a podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brazil | 31 |
| Resumo | 31 |
| 1. Introdução | 31 |
| 2. Materiais e métodos..... | 33 |
| 2.1. Coleta e isolamento de fungos | 33 |
| 2.2. Extração de DNA, PCR e sequenciamento..... | 33 |
| 2.3. Alinhamento de sequencias de DNA e Análises filogenéticas..... | 34 |
| 2.4. Testes de patogenicidade..... | 34 |
| 3. Resultados | 35 |
| 4. Discussão | 45 |
| 5. Referências | 48 |
| CAPÍTULO II | 52 |
| <i>Diaporthe ueckeri</i> causando podridão radicular em mandioca no estado de Pernambuco, Brazil | 52 |
| Resumo | 52 |
| 1. Introdução | 52 |
| 2. Materiais e métodos..... | 53 |
| 2.1. Isolamento de fungos | 53 |
| 2.2. Análise morfológica | 54 |

| | | |
|---|---|------------|
| 2.3. | Extração de DNA, amplificação de PCR e sequenciamento..... | 54 |
| 2.4. | Análise filogenética..... | 55 |
| 2.5. | Testes de patogenicidade..... | 55 |
| 3. | Resultados | 56 |
| 4. | Discussão | 64 |
| 5. | Referências | 65 |
| CAPÍTULO III..... | | 69 |
| Biochar e <i>Trichoderma koningiopsis</i> URM 8972 no manejo de <i>Fusarium</i> <i>agrestense</i> e <i>Curvularia</i> sp., agentes causais da podridão radicular da mandioca | | 69 |
| Resumo..... | | 69 |
| 1. | Introdução | 69 |
| 2. | Materiais e métodos..... | 71 |
| 2.1. | Isolamento e identificação de fungos | 71 |
| 2.1.1. | Coleta e isolamento de fungos | 71 |
| 2.1.2. | Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento..... | 72 |
| 2.1.3. | Filogenia | 72 |
| 2.2. | Testes de patogenicidade..... | 72 |
| 2.3. | Atividade da enzima quitinase | 73 |
| 2.4. | Teste de antagonismo | 74 |
| 2.5. | Produção e inoculação de biochar..... | 74 |
| 2.6. | Experimento de Controle biológico de <i>Curvularia</i> sp. e <i>Fusarium</i> <i>agrestense</i> com biochar e <i>Trichoderma koningiopsis</i> URM 8972 | 75 |
| 2.7. | Análises de solo | 75 |
| 2.8. | Análise estatística..... | 76 |
| 3. | Resultados | 76 |
| 4. | Discussão | 92 |
| 5. | Referências | 98 |
| CONCLUSÕES | | 107 |

INTRODUÇÃO

Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta arbustiva e perene que pertence à família *Euphorbiaceae* (LI et al., 2010). As raízes de mandioca são ricas em carboidratos, sendo uma das principais fontes de energia para milhões de pessoas (SOUZA; KALID, 2022). A mandioca apresenta grande relevância na indústria brasileira, sendo utilizada na produção de uma variedade de produtos, incluindo gomas e farinhas (ADEDIRE et al., 2021). Devido ao alto valor nutritivo, uso expressivo na alimentação e na elaboração de produtos industriais, a mandioca tem sido considerada de grande importância econômica (HOHENFELD et al., 2024).

A cultura da mandioca apresenta grande importância socioeconômica, sendo a sua produção realizada predominantemente na agricultura familiar (MACHADO et al., 2018). A produção de mandioca é limitada em termos de tecnologias, além disso, enfrenta condições adversas, como a falta d'água, solos pobres e ácidos, materiais propagativos de baixa qualidade fisiológica e fitossanitária, o que favorece a ocorrência de doenças e quedas na produtividade (SOUZA, 2019).

Dentre as doenças que acometem a cultura da mandioca, as podridões radiculares estão entre as mais destrutivas para os cultivos (HOHENFELD et al., 2022) e aumento na incidência dessas doenças tem sido observado, principalmente em plantios das regiões Nordeste e Sudeste do país (BRITO et al., 2020). Vários patógenos causam podridão radicular na mandioca, dentre os principais estão *Fusarium* spp., *Phytophthora drechsleri* Tucker, *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.) Crous & Slippers, *Lasiodiplodia euphorbicola* Machado & Pereira, *L. pseudotheobromae* Phillips, Alves & Crous, *L. hormozganensis* Abdollahz., Zare & Phillips, *L. parva* Phillips, Alves & Crous, e *L. theobromae* Griffon & Maubl. (MACHADO et al., 2014; STEFANELLO et al., 2017; BRITO et al., 2020; HOHENFELD et al., 2022).

Diferentes estratégias de controle são estudadas para o manejo da podridão radicular da mandioca como alternativas ao controle químico, que para o controle dessa doença é inviável devido ao alto custo e baixa eficiência no controle de patógenos presentes pelo solo (STEFANELLO et al., 2017; ADEDIRE et al., 2021). Diante deste contexto, os inoculantes microbianos surgem como alternativa sustentável no manejo da doença (BASU et al., 2021). Inoculantes que combinam materiais orgânicos e microrganismos antagonistas apresentam potencial para suprimir doenças do solo e reduzir os impactos causados por produtos químicos ao meio ambiente (SILVA et al., 2022b).

A aplicação de biochar ao solo é uma prática alternativa sustentável que tem sido estudada para o controle de doenças de plantas causados por patógenos presentes no solo. O biochar, também conhecido como biocarvão, é um composto sólido que resulta da combustão de materiais orgânicos sob altas temperaturas e baixas concentrações de oxigênio (DASHTI et al., 2023). Dentre as vantagens atribuídas ao biochar destacam-se a melhora dos atributos físico-químicos do solo, aumento da disponibilidade de

nutrientes, aumento da abundância de microrganismos benéficos e supressão de fitopatógenos do solo (MEDEIROS et al., 2021a; 2024).

O uso de microrganismos biocontroladores, que limitam a ação de organismos nocivos às plantas, também tem sido estudado para o manejo de doenças do solo (SILVA et al., 2020). Dentre estes microrganismos destacam-se espécies do gênero *Trichoderma*, que são amplamente utilizadas na agricultura para promover o crescimento de plantas e auxiliar no controle de fitopatógenos presentes no solo (EKE et al., 2019; MEDEIROS et al., 2021a). A capacidade desses fungos em permanecer no solo durante longos períodos faz com que a sua utilização seja vantajosa no controle biológico de forma preventiva (BHANDARI et al., 2021). Além de antagonizar muitos patógenos, espécies de *Trichoderma* são capazes de estimular a resistência das plantas ao ataque de microrganismos patogênicos (MEYER et al., 2019).

Estudos relatam efeitos positivos da aplicação de *Trichoderma* e de biochar no controle de doenças de plantas causadas por patógenos do solo (LIMA, 2021; MEDEIROS et al., 2021b; SILVA et al., 2021a). No entanto, o efeito da aplicação combinada de biochar e *Trichoderma* no manejo de doenças de plantas é pouco conhecido (FORMISANO et al., 2021). Diante disso, o presente estudo teve como objetivos: identificar agentes causais da podridão radicular da mandioca; isolar e identificar espécies de *Trichoderma* do solo; testar o antagonismo dos isolados de *Trichoderma* frente aos patógenos identificados; desenvolver um bioinoculante a partir de biochar e *Trichoderma*; avaliar os efeitos do bioinoculante na supressão de patógenos da podridão radicular em mandioca; e avaliar os impactos do inoculante na qualidade do solo. Para tanto o presente estudo está dividido em revisão bibliográfica e capítulos. O Capítulo I diz respeito ao isolamento, identificação e patogenicidade de fungos fusarióides em plantas de mandioca. O Capítulo II diz respeito ao isolamento, identificação e patogenicidade de *Diaporthe ueckeri* em plantas de mandioca. O Capítulo III aborda o isolamento e identificação de patógenos da mandioca e espécies de *Trichoderma*; avaliação do potencial quitinolítico e antagonístico de *Trichoderma* e do potencial de biochar e *Trichoderma* no controle de patógenos e seus efeitos nas propriedades do solo.

REVISÃO DE LITERATURA

1. A cultura da mandioca

Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta arbustiva e perene que pertence à família *Euphorbiaceae* (LI et al., 2010). Aproximadamente 100 espécies nativas de regiões do Novo Mundo compõem o gênero *Manihot*, sendo a *Manihot esculenta* Crantz a espécie mais cultivada e de maior importância econômica (MEDEIROS, 2014). Nativa da América do Sul, acredita-se que o seu surgimento e domesticação tenham ocorrido em aldeias indígenas da Amazônia, no Brasil (NASSAR, 2008), e posteriormente, tenha atingido as Antilhas, América Central e Sul da América do Norte (VIEIRA; NECHET, 2010). Favorável a essa hipótese está o fato de que há uma grande diversidade de espécies selvagens nessa região, além disso, o Brasil é o centro mais rico em diversidade de espécies do gênero *Manihot* (NASSAR, 1978). Alguns pesquisadores sugerem que a mandioca apresenta um outro ponto de origem, a costa peruana, levantando a hipótese de que a cultura possa ter sofrido mais de uma domesticação (NASSAR, 2008; MORAIS, 2014).

A mandioca é amplamente cultivada nas regiões tropicais e é um dos tubérculos mais importantes do mundo (DARYANTO et al., 2016), sendo usada principalmente na alimentação humana, na produção de ração animal e produtos que tem como base o amido (ADEDIRE et al., 2021). A cultura da mandioca é caracterizada pela rusticidade, pois apresenta grande capacidade de adaptar-se à ambientes hostis, sendo comumente cultivada em condições adversas de clima, água, nutrição e solo, onde normalmente outras culturas não se desenvolvem bem (DARYANTO et al., 2016; FIALHO, 2013). Suas raízes são ricas em carboidratos, o que contribui para que seja a principal fonte de alimento para milhões de pessoas, destacando-se como elemento essencial na dieta de países em desenvolvimento (LEAL, 2019).

No Brasil, a mandioca pode receber denominações como mandioca de mesa, macaxeira, aipim e tapioca, a depender da região em que se encontra. Características da cultivar, como a cor das folhas, casca das raízes, e a forma de folhas, caules e pecíolo, costumam definir a denominação das variedades cultivadas (ALVES, 2002). Diversas variedades são cultivadas e comercializadas em todas as regiões do país, dentre as quais pode-se destacar as variedades Campinas, Caravela, BRS Campinas, Isabel de Souza e Sergipe (MORAIS et al., 2017).

As variedades de mandioca são comumente classificadas como doces ou amargas a depender do teor de ácido cianídrico presente nas raízes (FARIAS et al., 2006). Variedades classificadas como doces, são conhecidas como mandioca de mesa, mansa, macaxeira ou aipim, possuem baixo teor de ácido cianídrico, podem ser consumidas in natura, apenas com cozimento ou podem ser utilizadas na indústria (FIALHO et al., 2013). As variedades classificadas como amargas apresentam alto teor de ácido cianídrico, tornando-se necessário um processo que elimine o excesso dessa

substância para que seja consumida, sendo essas as variedades preferencialmente usadas na produção de farinhas e outros derivados da mandioca (PORTELLA, 2015).

Fatores como a cultivar e as condições de cultivo podem influenciar diretamente em atributos das raízes, como tamanho, forma, peso e composição química (ALVES, 2002). As raízes de mandioca apresentam altos teores de carboidratos e fibras, aproximadamente 65% de água, 33% de amido e 1% de proteína em sua composição nutricional, além de conter boas quantidades das vitaminas B1 e B2, e dos minerais: Ca, P, K e Fe. A alta concentração de carboidratos, mais especificamente o amido, é a característica responsável pela ampla utilização da mandioca como matéria-prima na produção de diversos produtos industriais (OLIVEIRA et al., 2017).

No mercado nacional é desejável que a raiz, órgão comercial de maior interesse econômico do cultivo da mandioca, apresente características que atendam às exigências tanto do consumo *in natura* quanto da indústria. As características desejáveis estão relacionadas a atributos fisiológicos das cultivares como número, comprimento, diâmetro, massa úmida e seca das raízes, além da composição bioquímica, como teor de ácido cianídrico, fibras e quantidade de amido (FIGUEIREDO et al., 2017; SILVA, 2020).

Parte considerável da produção da mandioca é utilizada na alimentação humana e uma pequena fração de toda a produção tem sido destinada a indústria para elaboração de diversos produtos, tais como bebidas alcoólicas, adesivos, produtos farmacêuticos e têxteis (PUSHPALATHA; GANGADHARAN, 2020). A elaboração de produtos a partir do beneficiamento da mandioca pode ser vista como uma estratégia financeira para os pequenos agricultores, como forma de agregar valor ao produto e alcançar novos nichos no mercado (ALMEIDA, 2005). A produção de mandioca doce nas regiões Norte e Nordeste é utilizada preferencialmente para o consumo humano, no entanto, a maior parte da produção dessas regiões é destinada a elaboração de farinha, divergindo um pouco das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, que destinam a produção de cultivos tecnificados ao abastecimento de indústrias e farinha e fécula (MORAIS, 2014).

A macaxeira ou mandioca de mesa, é encontrada em feiras livres e supermercados, onde é comercializada, podendo ser encontrada nas formas *in natura* ou minimamente processada (CARDOSO; GAMEIRO, 2006). A mandioca destinada ao consumo humano tem como principais subprodutos gerados a fécula, polvilho azedo, sagu, farinha de mandioca, farinha e goma de tapioca, tucupi, chips e pellets, além de produtos minimamente processados, como a mandioca descascada, congelada e embalada a vácuo (FIALHO, 2013). Dentre esses subprodutos, a farinha de mandioca se destaca, sendo um alimento considerado básico na dieta de brasileiros de várias regiões, principalmente Norte e Nordeste (SOUZA et al., 2008). O consumo dos produtos derivados da mandioca por muito tempo esteve associado aos estados das regiões Norte e Nordeste, como um alimento bastante apreciado e acessível, no entanto, hoje os derivados de mandioca são comercializados em todas as regiões do país.

As características que conferem a planta de mandioca rusticidade e tolerância às condições adversas de cultivo, favorecem a implantação da cultura por pequenos agricultores, que utilizam a planta de mandioca não apenas para o consumo humano, mas também na elaboração de ração animal (ALMEIDA, 2005). A planta de mandioca possui três componentes que podem ser comercializados: as manivas que são utilizadas no plantio, as raízes, principal órgão comercializado, é empregada na alimentação humana, animal e na indústria, e a parte aérea que também pode ser usada na alimentação animal (VIEIRA et al., 2011).

As raízes de mandioca apresentam grande relevância na indústria brasileira como matéria-prima na produção de farinha, fécula e uma diversidade de produtos (PINTO et al., 2010). A fécula de mandioca é um produto amiláceo extraído das raízes, apresenta neutralidade em cor, aromar e sabor, sendo o subproduto mais amplamente utilizado da cultura da mandioca, também o mais versátil e valorizado, por conter características físico-químicas desejáveis a industrialização (MORAIS, 2014; SILVA et al., 2018).

Nos processos industriais 69% de toda a fécula de mandioca produzida é utilizada como matéria-prima ou aditivo na elaboração de produtos alimentícios como: leite em pó, chocolates, balas, sopas, sobremesas, sagu, macarrões, pães, biscoitos e molhos (BUENSANTEAI; ATHINUWAT, 2012; FIALHO, 2013). Outros produtos de grande relevância industrial produzidos a partir do amido são produtos da indústria têxtil, de papel, farmacêutica, química e de bebidas alcoólicas (SILVA et al., 2018; BEZERRA et al., 2019).

Devido ao alto valor nutritivo e uso expressivo na alimentação humana, além de uso crescente na elaboração de produtos industriais, a mandioca tem sido considerada de grande importância econômica (SILVA et al., 2018). De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura – FAO, a produção mundial de mandioca foi superior a 300 milhões de toneladas em 2020, sendo possível observar crescimento na quantidade produzida em países da África e da Ásia, com destaque para países africanos, onde foram observados os maiores índices de crescimento.

A mandioca está entre as três maiores fontes de alimento do mundo, e exerce papel crucial na segurança alimentar de países em desenvolvimento, sendo responsável por alimentar cerca de 700 milhões de pessoas (MAXMEN, 2019). Dentre os continentes, a África se destaca como maior produtor mundial com 63,95%, em seguida vem a Ásia com 27,05% e América do Sul com 8,25%. Atualmente o Brasil é o quinto maior produtor mundial de mandioca, com uma produção de aproximadamente 18 milhões de toneladas de raízes, ficando atrás apenas da Nigéria (63 milhões), República Dominicana do Congo (45 milhões), Tailândia (30 milhões) e Gana (22 milhões) (FAO, 2023). As raízes da mandioca são bastante apreciadas na culinária brasileira e por apresentar resistência às condições adversas, podem ser cultivadas em quase todas as regiões do país (VEIGAS et., 2016; SÁNCHEZ et al., 2017). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2022), dentre as regiões brasileiras, a maior produção é proveniente da região Norte, com 35,7% da produção nacional,

seguida da região Nordeste (21,9%), Sul (21,7%), Sudeste (12,7%) e Centro Oeste (8%).

A produção da mandioca caracteriza-se como uma das mais importantes no agronegócio nacional, proporcionando a geração de emprego aos produtores (SILVA et al., 2012). A região Nordeste apresenta bom desempenho nesta atividade, sua produção é realizada predominantemente por pequenos produtores da agricultura familiar que destinam as raízes para o consumo humano *in natura*, fabricação de farinhas e ração animal, suprimindo a demanda da região e contribuindo significativamente para o abastecimento do mercado nacional (PORTELLA, 2015). O cultivo de mandioca representa parte considerável da renda desses produtores, no entanto, a atividade é conduzida em sua maioria com recursos limitados em termos de tecnologias, além disso, os produtores enfrentam condições adversas, como a falta d'água, solos pobres e ácidos, materiais propagativos de baixa qualidade fisiológica e fitossanitária, favorecendo a ocorrência de doenças e consequente baixa na produtividade (SOUZA, 2019).

2. Principais doenças que acometem a cultura da mandioca

A planta da mandioca é acometida por diversas doenças causadas por fungos, vírus, bactérias e fitoplasmas (JUNIOR, 2016). Essas doenças provocam quedas na produtividade da cultura, causando grande prejuízo econômico aos produtores (SOUZA, 2020). Dentre as doenças que afetam os plantios nacionais, destacam-se como de maior importância as podridões radiculares, antracnose, cercosporiose, viroses, bacterioses, super brotamento e super alongamento (PERUCH et al., 2013; NOTARO, et al., 2013; BEZERRA et al., 2019).

A murcha bacteriana é a principal doença causada por bactérias em mandioca, sendo considerada uma das doenças mais destrutivas e importantes economicamente (PERUCH et al., 2013). A bactéria *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* é o principal agente causal da murcha bacteriana em mandioca, é um patógeno de importância econômica mundial (OLIVEIRA et al., 2020), está entre as dez bactérias fitopatogênicas mais importantes devido ao alto poder destrutivo, e é responsável por prejuízos que variam de 30 a 100% de perdas na produtividade (MANSFIELD et al., 2012; FIALHO, 2013). Essas bactérias atacam diretamente o sistema vascular vegetal, causando sintomas de murcha em consequência do bloqueio da circulação de água na planta. Além da murcha, sintomas como manchas foliares de aparência aquosa, exsudação de látex, necrose do sistema vascular e morte descendente de folhas e ramos, são característicos de plantas de mandioca infectadas por esses patógenos (MARTINAZZO-PORTZ, 2017).

A cercosporiose em mandioca tem como agentes causais os fungos *Passalora henningsii* e *P. vicosae* (sinonímia de *Cercosporidium henningsii* Allesch. e *Cercospora vicosae* A.S. Mull.; Chupp., respectivamente) estando esta doença amplamente distribuída em todos os plantios (OLIVEIRA et al., 2020). O patógeno *P. henningsii*

provoca manchas de coloração marrom com extremidades escuras na face superior das folhas e manchas com o centro cinza na face inferior, já o fungo *P. vicosae* produz manchas grandes e irregulares, de coloração marrom na face superior e esverdeada na face inferior (FIALHO 2013).

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *manihotis* é o agente causal da antracnose em mandioca, doença que está amplamente disseminada em todas as regiões do Brasil, causando redução no rendimento da produção em todo o país (SOUZA, 2020). A qualidade fitossanitária e condições elevadas de umidade são fatores importantes na disseminação desta doença (PERUCH, 2013). Os sintomas característicos da antracnose são manchas aquosas nas folhas, cancrios severos nas hastes, ramos e frutos, que provocam murcha, queda das folhas e morte descendente da planta (OLIVEIRA et al., 2020).

As principais viroses que acometem cultivos de mandioca no Brasil são o vírus do mosaico comum, o vírus mosaico das nervuras e o vírus couro de sapo (SOUZA, 2020). O vírus do mosaico comum é causado pelo vírus Cassava Common Mosaic Virus (CsCMV). Os sintomas observados são mosaico com alternância de manchas verdes claras e escuras. O vírus Cassava Vein Mosaic Virus (CsVMV) causa o mosaico das nervuras, que apresenta como sintomas o clareamento das nervuras das folhas e enrolamento das extremidades dos folíolos. A virose couro de sapo (“cassava frogskin disease”, CFSD) é causada por um complexo de vírus que apresentam como sintomas característicos a queda na produção de raízes, raízes finas sem acúmulo de amido e com casca com aspecto rugoso (JUNIOR et al., 2016).

Os sintomas de podridão nas raízes variam de acordo com o patógeno que infecta a planta, no entanto, a parte aérea da planta apresenta sintomas como amarelecimento, seca, murcha parcial ou total das folhas seguida de queda, que são indícios de podridão nas raízes (JUNIOR et al., 2016). Grande número de fungos e alguns oomicetos são relatados como agentes causais de podridão radicular em mandioca, sendo os principais patógenos pertencentes aos gêneros *Fusarium* Link, *Phytophthora* de Bary, *Pythium* Nees, *Neoscytalidium* Crous & Slippers e *Lasiodiplodia* Ellis & Everh (OLIVEIRA et al., 2016; BOARI et al., 2018).

3. Podridão radicular da mandioca

As doenças radiculares limitam a produção da mandioca por afetar diretamente as raízes, que constituem o principal órgão de comercialização, sendo consideradas as doenças que mais afetam os cultivos desse vegetal (SILVA et al., 2020). Atualmente, tem-se observado aumento na incidência dessas doenças, principalmente em plantios das regiões Nordeste e Sudeste do Brasil (BRITO et al., 2020). Essa podridão radicular causa perdas expressivas na produtividade da cultura da mandioca, que podem chegar a 100% em alguns cultivos, gerando alto impacto socioeconômico nas regiões produtoras (ALVES et al., 2020).

Quando o sistema radicular e colo das plantas são afetados por essa podridão, há o impedimento da absorção de água e de nutrientes, tendo como consequência, sintomas de amarelecimento, seguido de queda das folhas e apodrecimento das raízes (FIALHO, 2013). As podridões radiculares em mandioca são classificadas como podridão mole, seca ou negra, dependendo do aspecto dos sintomas e dos patógenos que causam a doença (HOHENFELD et al., 2018).

Plantas de mandioca com podridão mole apresentam como sintomas o escurecimento e desintegração total dos tecidos radiculares, que liberam um odor de putrefação muito forte e característico, comumente acompanhado de estruturas fúngicas (micélio, picnídios ou esclerócios), além de amarelecimento e a murcha da parte aérea das plantas, em decorrência ao apodrecimento das raízes (MODESTO et al., 2016). Podridões moles ocorrem principalmente em períodos de alta pluviosidade e em áreas com solos mal drenados (FIALHO, 2013). Dentre os agentes causais da podridão mole os mais relatados são *Phytophthora drechsleri* Tucker, *Phytophthora nicotianae*, *Pythium scleroteichum* Drechsler, e *Fusarium fujikuroi* (Sin. *Fusarium moniliforme*) (MUNIZ, 2006; BOAS et al., 2017).

As podridões negras têm prejudicado plantios de mandioca em diversos países produtores, como o Brasil e principalmente países da África (MAXMEN et al., 2019). No Brasil, a podridão negra em raízes de mandioca tem sido associada a espécies dos gêneros *Lasiodiplodia* e *Neoscytalidium*, pertencentes a família *Botryosphaeriaceae* (MACHADO et al., 2014; BRITO et al., 2020). Os sintomas característicos da podridão negra são lesões necróticas, de aspecto seco e de coloração escura variando de cinza a preto nas raízes, sendo possível observar estruturas reprodutivas dos patógenos com o avanço da doença, já na parte aérea da planta pode ser observado amarelecimento e queda das folhas (BRITO et al., 2020). A podridão negra em mandioca pode ser causada por um ou mais patógenos, agindo de forma isolada ou conjuntamente, dentre os diversos agentes causais, os mais importantes são *Lasiodiplodia theobromae*, *L. hormozganensis*, *L. parva*, *L. euphorbicola* e *Neoscytalidium dimidiatum* (MACHADO et al., 2014; HOHENFELD et al., 2018; BRITO et al., 2020).

Os sintomas que caracterizam as podridões secas são o surgimento de estrias escuras, lesões necróticas com coloração, que varia de amarelo claro a marrom escuro e rosa nos tecidos internos e nas cascas das raízes de mandioca, além de amarelecimento, murcha e queda das folhas, que resultam na morte da planta (MASSOLA et al., 2016; BOAS et al., 2017). Vários patógenos são associados a podridão seca, no entanto, as espécies fusarióides são as mais citadas na literatura, sendo as mais importantes: *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. graminearum*, *F. proliferatum* e *F. chlamydosporum* (ONYEKA et al., 2005; BANDYOPADHYAY et al., 2006; MASSOLA et al., 2016; HOHENFELD et al., 2024). Fungos desse gênero são facilmente encontrados no solo, pois além de possuírem uma ampla gama de hospedeiros, são capazes de produzir estruturas de resistência que permitem a sua permanência no solo por longos períodos, o que dificulta ainda mais o controle da doença no campo (BELLÉ; FONTANA, 2018).

4. Identificação de fungos fitopatogênicos

A etapa de identificação de agentes causais da podridão radicular da mandioca é extremamente importante para o desenvolvimento de um manejo eficiente desta doença e de doenças de plantas em geral (ASLAM et al., 2017). A identificação acurada dos patógenos auxilia na seleção de estratégias de controle mais eficientes, permite compreender melhor a infecção, prevenir a propagação da doença, utilizar os recursos de forma mais eficiente, e adotar medidas mais específicas que resultam em resposta mais rápida ao manejo (KUMAR et al., 2016). Práticas estratégicas como o uso de microrganismos antagonistas e variedades resistentes podem ser mais eficientes e mais rapidamente empregadas por meio da correta identificação do patógenos da podridão radicular da mandioca (HOHENFELD et al., 2022; 2024).

Tradicionalmente, o processo de detecção de doenças e identificação de fungos fitopatogênicos compreende as etapas de observação de sintomas na planta e análises de características morfológicas do patógeno, no entanto, as técnicas moleculares trouxeram grandes avanços e estão se consolidando no campo da fitopatologia (HARIHARAN; PRASANNATH, 2021).

A observação de sintomas e sinais visíveis de infecções, como estruturas fúngicas nas superfícies das plantas, são essenciais para todos os métodos de identificação. A identificação morfológica consiste na descrição de caracteres importantes do agente patogênico, tais como cor e textura da colônia, e presença de estruturas fúngicas como esporos, hifas e estruturas de resistência (ALEXOPOULOS et al., 1962). Características morfológicas auxiliam na compreensão da patogenicidade dos fungos e na adoção de medidas de controle mais específicas, a partir da detecção de estruturas infectivas ou de resistência, de acordo com o ciclo de vida no qual o fungo se encontra (AGRIOS, 2005; KENDRICK, 2017). No entanto, a identificação através de técnicas morfológicas pode ser desafiadora diante de fitopatógenos que não podem ser diferenciados visualmente (VENBRUX et a., 2023).

A utilização de técnicas moleculares permitiu avanços e mudanças significativos na identificação de fungos (LUCHI et al., 2020). Esses avanços tornaram possível a identificação de patógenos mesmo sem a presença de características morfológicas claras (CROUS et al, 2021). Melhor compreensão das interações fungo-hospedeiro foi obtida por meio das análises moleculares, que se tornaram essenciais para a identificação precisa de fungos que pertencem a complexos de espécie, como *Lasiodiplodia* (MACHADO et al., 2014). As abordagens moleculares possibilitam distinguir com precisão espécies que são intimamente relacionadas (CROUS et al., 2021), o que é fundamental para a identificação de diversos patógenos da podridão radicular da mandioca, que pertencem a complexos, como os patógenos *Diaporthe ueckeri* (SILVA et al., 2024), *Neocosmospora falciformis* (SILVA et al., 2022a) e principalmente espécies fusarióides (HOHENFELD et al., 2022). As análises moleculares também permitiram esclarecer a correta associação de patógenos, por exemplo, o fungo *N. dimidiatum*, relatado como legítimo agente causal da podridão radicular da mandioca (MACHADO et al., 2014), que muitas vezes foi confundido com *Scytalidium lignicola*,

por desenvolver sinamorfos como os gêneros *Scytalidium* e *Botryosphaeria* sob condições específicas.

As análises filogenéticas baseiam-se em sequências específicas do DNA para diferenciar as espécies de forma mais precisa (ASLAM et al., 2017). A região do espaçador transcrito interno (ITS) do DNA ribossômico nuclear é o marcador de código de barras mais utilizado encontrado em repositórios públicos (CROUS et al., 2021), sendo considerado o código de barras universal para a identificação de fungos (SCHOCH et al., 2012). Embora não exista uma abordagem única para a identificação molecular de fungos, a região ITS continua sendo uma opção de identificação inicial (LÜCKING et al., 2020). A região ITS não oferece precisão suficiente para a diferenciação de espécies de diversos grupos filogenéticos, sendo crescente a utilização de técnicas como as análises multilocus, que combinam códigos de barras de DNA secundários para a identificação de grupos, como os gêneros fusarióides, entre outros (ASLAM et al., 2017).

Os avanços dos estudos genômicos resultaram em mudanças nas divisões de gêneros do reino Fungi e diversas mudanças na classificação taxonômica de fungos fitopatogênicos (WIJAYAWARDENE et al., 2021). Atrelado a isto, muitas espécies foram consideradas complexas e deram origem a formação de novos gêneros, alguns contendo muitas espécies, novas ou sinonimizadas de outros gêneros (CROUS et al., 2021). Exemplo disso são as espécies do complexo *Fusarium solani* que agora são tratadas no gênero *Neocosmospora* (CROUS et al., 2021). Isto ressalta a importância de uma abordagem integrada de ferramentas sensíveis para identificação adequada dos fungos patogênicos da podridão radicular da mandioca (VENBRUX et al., 2023).

5. Manejo da podridão radicular da mandioca

O uso de material propagativo de baixa qualidade fisiológica e fitossanitária, a ausência de práticas culturais e o controle ineficiente de pragas e doenças são alguns dos fatores que favorecem a ocorrência e disseminação de doenças nos cultivos de mandioca (MORAIS, 2014; SILVA et al., 2017a). Doenças de plantas causadas por patógenos de solo, além de reduzirem a produtividade das culturas, são doenças de difícil diagnóstico e controle, principalmente quando os danos podem ser observados apenas nas raízes e nenhum sintoma é observado na parte aérea das plantas (GHORBANPOUR et al., 2018).

Estudos têm sido realizados com o objetivo de encontrar estratégias efetivas no controle da podridão radicular da mandioca. Dentre as alternativas estudadas para o manejo dessa doença encontram-se os métodos de rotação de culturas, práticas culturais no plantio, indução de supressividade no solo, uso cultivares resistentes, melhoramento genético e controle biológico (BARROS et al., 2014; HOHENFELD et al., 2018; BEZERRA et al., 2019).

O uso de produtos químicos sintéticos é o principal método de controle de pragas e doenças na agricultura. No entanto, o uso indiscriminado de produtos químicos

umenta a resistência de pragas e patógenos, prejudica o meio ambiente e afeta a saúde humana (MONTIEL-ROZAS et al., 2019). Este método envolve o uso de compostos químicos com mecanismos de ação não específicos que erradicam organismos não alvos (MEDEIROS et al., 2021a). Portanto, é uma prática que deve ser adotada com cautela devido aos riscos toxicológicos e ocorrência de fitopatógenos resistentes (COELHO et al., 2020).

O controle químico é o que apresenta menor eficiência no manejo da podridão radicular comparado a outros métodos de controle, podendo interferir negativamente na microbiota do solo e poluir o meio ambiente (SOUSA, 2020). No Brasil existe apenas um produto registrado, que mistura epoxiconazol e piraclostrobina para o controle da podridão seca da maniva, causada por *Lasiodiplodia theobromae*, e que deve ser usado apenas na planta e não no solo (MACHADO et al., 2018), no entanto, esse produto é classificado como muito perigoso para o meio ambiente.

O método de rotação de culturas consiste em alternar os cultivos com plantas de diferentes espécies, visando evitar o contato de patógenos com culturas suscetíveis, impedindo que o patógeno complete seu ciclo em uma planta hospedeira (HONG et al., 2020). Além disso, a introdução de novas culturas por meio deste método permite a entrada de microrganismos antagonistas contra vários fitopatógenos presentes no solo (PERALTA et al., 2018; LARKIN; BREWER, 2020). Culturas como milho, arroz e feijão são usadas em rotação com cultivos de mandioca (Modesto et al., 2016). No entanto, esse método não é tão viável quando a doença é causada por patógenos que possuem uma ampla gama de hospedeiros, como é o caso de espécies fusarióides (CROUS et al., 2021), o que ressalta a importância da identificação correta dos agentes causais da doença e da utilização de formas de manejo adicionais.

O controle cultural é um importante método para a prevenção de doenças nos cultivos, e quando realizado de forma correta pode reduzir a ocorrência de podridões radiculares. Esse método consiste no emprego de práticas de manejo cultural adequadas a cada tipo de cultivo, tais como adubação calculada para a planta cultivada, evitar ferir as raízes durante as capinas, realizar o plantio em áreas com solo bem drenado, no plantio fazer uso de manivas saudáveis, oriundas de áreas sem ocorrência de doenças radiculares, destruir e incinerar manivas e raízes provenientes de áreas com podridões radiculares, evitar práticas que potencializem a disseminação dos patógenos, adotando medidas sanitárias em todas as ferramentas e equipamentos oriundos de outras áreas de plantio (MASSOLA et al., 2016; HOHENFELD et al., 2018; MACHADO et al., 2018).

O método de indução da supressividade do solo é uma alternativa sustentável ao manejo de doenças de plantas, esse método consiste em diminuir a quantidade de inóculo e favorecer o desenvolvimento e crescimento da planta por meio da incorporação de material orgânico (SOUZA, 2020). O aumento do teor de matéria orgânica no solo pode ser um grande aliado no controle de fitopatógenos (BEZERRA et al., 2019), pois a matéria orgânica atua modificando a estrutura e fertilidade do solo, estimulando a atividade da comunidade microbiana e potencializando o crescimento de bactérias e fungos benéficos que desempenham papel importante em mecanismos de

antibiose, parasitismo, indução de resistência e competição por nutrientes (BARROS et al., 2014). Existem poucos relatos desse método para a cultura da mandioca, porém, estão sendo realizadas pesquisas aplicando essa estratégia de manejo na referida cultura (SILVA et al., 2017a; SOUZA, 2020).

O controle biológico utiliza microrganismos que reduzem o ataque de organismos patogênicos a partir de mecanismos, como a antibiose, em que um organismo pode produzir substâncias que inibem o desenvolvimento de outros (SILVA et al., 2017b). Vários microrganismos têm sido estudados quanto ao seu potencial uso como agentes de biocontrole (MEDEIROS et al., 2021a). A utilização de microrganismos antagonistas como *Trichoderma*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* e *Metarhizium*, tem crescido substancialmente nos últimos anos (SOUZA, 2020; SILVA et al., 2022b).

Espécies de *Trichoderma* possuem mecanismos, como micoparasitismo, predação, competição e até mesmo indução de resistência às plantas (ZIN; BADALUDDIN, 2020; MEDEIROS et al., 2021a). Em estudo anterior, a utilização de *Trichoderma aureoviride* no controle de podridão radicular da mandioca causada por *Fusarium solani*, foi bem-sucedida quando aplicada com biochar (SILVA et al., 2022b), sugerindo que o uso desses fungos pode ajudar a reduzir os prejuízos causados pelas podridões, no entanto, mais estudos são necessários para compreender como essa combinação pode atuar sobre outros patógenos da podridão radicular da mandioca.

6. Uso de bioprodutos no crescimento vegetal e manejo de doenças

Impactos ambientais gerados pela produção e aplicação de fertilizantes e outros produtos químicos utilizados na agricultura, ressaltam a necessidade de desenvolvimento de práticas agronômicas mais sustentáveis (BARROS et al., 2016). Os biofertilizantes e inoculantes microbianos surgem como alternativas mais sustentáveis e viáveis, comparados aos produtos químicos que causam impactos negativos no meio ambiente (Basu et al., 2021), e têm apresentado nos últimos anos um aumento crescente no consumo e comercialização, principalmente na forma líquida (FLORENCIO et al., 2022).

Todo produto ou processo tecnológico que apresente em sua composição agentes biológicos e que seja utilizado nas etapas de produção, beneficiamento e armazenamento de produtos agrícolas, é denominado bioinsumo (GOULET, 2021). A utilização de substâncias sintéticas para que o fungo produza esporos pode ser vista como um fator limitante na produção comercial de biocontroladores, pois essas substâncias costumam apresentar alto custo (MUNIZ et al., 2018), sendo um dos objetivos dos pesquisadores, encontrar fontes mais acessíveis.

Os inoculantes microbianos são produtos obtidos a partir de microrganismos vivos, que podem proporcionar maior crescimento e desenvolvimento de plantas, quando utilizados em sementes, folhas ou solo (SANTOS et al., 2019). A produção de inoculantes microbianos depende de etapas importantes e a realização correta dessas

etapas é essencial para o desenvolvimento de um inoculante eficaz (VASSILEV et al., 2015). As principais etapas são: seleção de um microrganismo eficiente e competitivo, caracterização das condições ideais de crescimento, desenvolvimento de uma formulação que garanta a sobrevivência do microrganismo por mais tempo e até mesmo sob condições adversas, estudo de aplicação do inoculante, produção em escala industrial, método de controle da qualidade na produção, armazenamento adequado e forma de aplicação no campo que seja eficaz quanto ao pretendido (FLORENCIO et al., 2022). Além dessas etapas, parâmetros, como tipo de substrato, temperatura, agitação, aeração, pH, relação C/N, tempo de cultivo, umidade e tamanho de partícula, precisam ser ajustados em vista a otimização do processo de produção de inoculantes.

Outro aspecto importante a ser considerado no desenvolvimento de um inoculante é o material transportador a ser utilizado, pois esse tem como função aumentar a eficácia do inoculante e prolongar o tempo de atividade no campo (FLORENCIO et al., 2022). O transportador é caracterizado por ser um material inerte, acessível e de baixo custo, que possa manter os microrganismos em boas condições fisiológicas e liberá-los lentamente (BASHAN et al., 2014). As características desejáveis a um material transportador são: ser abundante e disponível na natureza, não ser tóxico ou poluente, ser biodegradável, ter baixo custo, ter fácil manipulação e esterilização, ser química e fisicamente estável, permitir adição de nutrientes, boa durabilidade em temperatura ambiente, alta capacidade de reter água e ser compatível com muitos microrganismos (BASHAN et al., 2016; FLORENCIO et al., 2022).

Técnicas que envolvem a utilização de microrganismos estão sendo desenvolvidas com o intuito de aumentar a produção de alimentos, produtos industriais e reduzir o impacto de doenças em plantas e animais (MEDEIROS et al., 2021a). Diversos mecanismos de ação são atribuídos aos microrganismos usados nesses bioprodutos, tais como: solubilização e disponibilização de nutrientes essenciais ao desenvolvimento das plantas, como nitrogênio, fósforo e potássio (MEDEIROS et al., 2020), promoção do crescimento vegetal, liberação de metabólitos secundários que induzem a resistência em plantas (EGAMBERDIEVA et al., 2017), e antagonismo a fitopatógenos (SILVA et al., 2022b).

Atualmente, muitos microrganismos são utilizados na agricultura, como os biocontroladores, que limitam a ação de organismos nocivos (FENG et al., 2015). Outro exemplo promissor são os organismos utilizados em inoculantes microbianos, dentre os quais as bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* são as mais utilizadas, principalmente nos cultivos de soja, com a finalidade de fixar o nitrogênio atmosférico, tornando o nutriente disponível para a planta (SANTOS et al., 2019). Muitos desses microrganismos apresentam mais de uma finalidade, como espécies de *Trichoderma*, que são amplamente utilizadas na agricultura para promover o crescimento de plantas e o controle de fitopatógenos do solo (MEDEIROS et al., 2021b; SILVA et al., 2022b).

São escassos os estudos a respeito da interação de transportadores e microrganismos em bioprodutos, sendo necessários trabalhos que forneçam informações sobre os mecanismos de atuação desses produtos e seus efeitos na microbiota

(MORAES et al., 2017). Além disso, a produção de um inoculante com matéria prima de baixo custo poderia ajudar na redução dos custos com controle fitossanitário, reduzir a aplicação de insumos e o impacto ambiental causado por produtos sintéticos (NETO et al., 2016).

7. Uso de biochar no manejo de doenças de plantas

Biochar ou biocarvão, como também é conhecido, foi descoberto a partir dos conhecimentos das faixas de solo conhecidas como terras pretas dos índios, encontradas em regiões amazônicas (SAXENA et al., 2013). O biochar é um composto sólido, altamente poroso, de coloração escura e que possui grandes quantidades de carbono, podendo ser obtido a partir da combustão de materiais orgânicos sob altas temperaturas e baixas concentrações de oxigênio (LEHMANN et al., 2011; FOSTER et al., 2016). Esse composto tem se destacado devido a capacidade de estocar carbono no solo, adsorver metais pesados e melhorar da qualidade do solo (ELZOB AIR et al., 2016; YANG et al., 2017).

O biochar pode ser produzido a partir de diferentes tipos de matéria-prima, tais como madeira, lodo de esgoto, palha de arroz, estrumes de origem bovina, suína e avícola (BURELL et al., 2017; FOSTER et al., 2016; PITERINA, et al., 2017). A origem e o processo de produção do biochar conferem a este produto propriedades físico-químicas e atributos benéficos ao meio ambiente, ao desenvolvimento de plantas e a qualidade do solo (MEDEIROS et al., 2021b). Silva et al. (2021) apontaram o uso do biocarvão como uma excelente estratégia para reduzir os custos de produção a partir do reaproveitamento de resíduos na agricultura, reduzindo o impacto no meio ambiente, beneficiando o solo e a microbiota benéfica, além de favorecer o desenvolvimento das plantas.

Estudos ecológicos consideram o biochar como um aspecto importante nas interações do solo, sendo atribuídas diversas vantagens ao seu uso. O biochar possui propriedades físico-químicas que na agricultura lhe permitem melhorar a qualidade do solo, sua estrutura, reduzir a acidez, aumentar a retenção de água, aumentar atividade dos microrganismos envolvidos na ciclagem de nutrientes, armazenar carbono e reduzir o impacto ambiental por meio da utilização de resíduos agroindustriais, sendo um meio viável para a produção de alimentos (PANEQUE et al., 2016; FOSTER et al., 2016).

Nos últimos anos, o biocarvão tem sido considerado uma ferramenta alternativa ao controle químico no manejo de doenças de plantas, uma vez que, fornece vários benefícios para a produção sustentável de alimentos. De acordo com Medeiros et al. (2021), o biocarvão aplicado ao solo atua de forma direta ou indireta na supressão de doenças de plantas por meio de mecanismos como indução à resistência de plantas, sorção de substâncias alelopáticas e compostos fungitóxicos à planta, aumento da população de microrganismos benéficos, e alterações nos atributos do solo, promovendo maior fertilidade e disponibilidade de nutrientes, todos esses fatores contribuem para

que o biochar seja utilizado no controle de doenças causadas por patógenos presentes no solo.

Além disso, a alta concentração de carbono em sua composição, o torna uma fonte potencial de substrato para microrganismos, como também, a alta porosidade e tamanho de poros fornecem um habitat ideal para o desenvolvimento de microrganismos, podendo favorecer a sobrevivência da microbiota benéfica do solo (MUTER et al., 2017; JAISWAL et al., 2018). De acordo com Liu et al. (2020), quando incorporado ao solo, o biochar desempenha papel fundamental na seleção de microrganismos funcionais importantes na comunidade microbiana. Além disso, o biochar tem se mostrado capaz de auxiliar na retenção de nutrientes que viriam a ser lixiviados ou metabolizados por fitopatógenos do solo (AJENG et al., 2020).

O desenvolvimento de bioprodutos que incorporem em seu processo de produção materiais orgânicos, como o biochar, apresenta-se como uma boa alternativa para a produção sustentável de alimentos, além de auxiliar na redução dos impactos causados por produtos químicos (SILVA et al., 2022b). A utilização de biochar no desenvolvimento de inoculantes pode contribuir para o aproveitamento de resíduos agroindustriais, sendo uma alternativa econômica para produtores ao diminuir sua dependência de fertilizantes químicos (LIMA et al., 2018).

Pouco se sabe sobre a interação do biochar com microrganismos antagonistas, e quais são os mecanismos de ação e os efeitos sobre a microbiota do solo. Alguns estudos relataram efeitos benéficos da aplicação de biochar no solo (LIMA, 2021; SILVA et al., 2021a, 2021b), outros relataram sucesso no manejo de doenças de plantas causadas por patógenos do solo (MEDEIROS et al., 2021b). Medeiros et al. (2020) relataram efeitos positivos da co-aplicação de biochar como transportador de *Trichoderma aureoviride* no crescimento de plantas de melão, e na qualidade de solos arenosos. Muter et al. (2017) observaram que o biochar combinado com *Trichoderma* promoveu o crescimento de plantas de milho (*Zea mays* L.). Sani et al. (2020) observaram que a combinação biochar e *Trichoderma* promoveu o crescimento e a floração em plantas de tomate. Em todos esses estudos o biochar mostrou potencial como transportador para inoculante microbiano, no entanto, mais estudos são necessários para compreender melhor os efeitos do biochar com microrganismos antagonistas e a eficiência da sua aplicação no controle de doenças.

8. *Trichoderma* no manejo de doenças de plantas

Trichoderma, um dos gêneros de maior importância micológica, pertencente à família *Hypocreaceae* De Not. Foi originalmente descrito por Persoon, em 1794 para acomodar quatro espécies (*T. aureum*, *T. nigrescens*, *T. roseurn*, e *T. viride*) (BISSETT, 1991; PERSON, 1974). Tipificado com *T. viride* Pers. (única espécie inicialmente descrita ainda incluída em *Trichoderma*), o gênero está, atualmente, classificado em *Hypocreaceae* De Not., *Hypocreales* Lindau, *Hypocreomycetidae* O.E. Erikss.; Winka, *Sordariomycetes* O.E. Erikss.; Winka, *Pezizomycotina* O.E. Erikss.; Winka, *Ascomycota*

Caval. Sm., e é o mais representativo em número de espécies em *Hypocreaceae* (ZENG; ZHUANG, 2019; CAI et al., 2022), mais de 400 espécies descritas de acordo com o MycoBank.

Com distribuição cosmopolita, o gênero *Trichoderma* constitui um grupo de fungos heterogêneo, com representantes micotróficos e fitosaprotroficos adaptados a uma ampla variedade de substratos (HYDE et al., 2019). São comumente isolados em ambientes edáficos, incluindo solos agrícolas, florestais, pântanos e desérticos, e em todas as zonas climáticas, as espécies de *Trichoderma* apresentam características heterotróficas bem-sucedidas, hábito sapróbio (decompondo material vegetal), parasitismo de outros fungos (micoparasitismo) e interações de endofitismo oportunista (HYDE et al., 2019; SHARMA et al., 2019).

Em geral, membros de *Trichoderma* apresentam rápido crescimento micelial, com faixa ideal de temperatura entre 25-30 °C, produzindo estruturas assexuais em abundância e colônias recobertas por massas de conídios, em maioria, de coloração verde (JAKLITSCH; VOGLMAY, 2015; GHAZANFAR et al., 2018; ABREU; PFENNING, 2019). A versatilidade adaptativa, inerente às espécies de *Trichoderma*, permite a bem-sucedida colonização de seus habitats, como reflexo da utilização eficiente do substrato, e consequente capacidade de secreção de metabólitos e síntese de uma ampla variedade de enzimas (MENDOZA-MENDOZA et al., 2018; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010). Tais características auxiliam na aclimatação aos diferentes ambientes como incluindo os artificiais como fermentadores biotecnológicos, regulando o crescimento e produção de enzimas. O que explica este ser um dos grupos de fungos mais explorados biotecnologicamente (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2016; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; SHARMA; SALWAL, 2017).

Além da aplicação industrial promissora, representantes deste gênero têm sido amplamente estudados em estratégias agrícolas mais seguras. A capacidade antagônica de *Trichoderma* tem se destacado dentre as aplicabilidades destes fungos na agricultura e os mecanismos associados a esta ação incluem a competição por espaço e nutrientes contra seus adversários, antibiose e micoparasitismo (MEDEIROS et al., 2020; RAMÍREZ-VALDESPINO et al., 2019). Além disso, a efetiva colonização de raízes e brotos de plantas, por espécimes do gênero, resultam em efeito positivo nas plantas, induzindo resistência e promovendo o crescimento vegetal, fortalecendo o uso potencial destes microrganismos na agricultura (MANGANIELLO et al., 2018).

Espécies do gênero despertam grande interesse por estarem associadas a promoção do crescimento radicular, ao estímulo da produção de fitohormônios em plantas de importância econômica (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2013), por produzir enzimas que aumentam a área de absorção radicular e melhorar a absorção de água e nutrientes (LA SPADA et al., 2020; FORMISANO et al., 2021), sendo também associadas ao aumento da taxa de germinação de sementes por reduzir as interferências abióticas (MENDOZA-MENDOZA et al., 2018). Outras vantagens da utilização desses fungos como promotores vegetais são o rápido crescimento, tolerância a substâncias tóxicas produzidas por outros microrganismos, produção de estruturas de resistência,

que conferem maior permanência no solo, e por conferir proteção às plantas por meio da prévia colonização de raízes (MEDEIROS et al., 2020).

Trichoderma apresenta diversos mecanismos usados para controlar doenças de plantas causadas por patógenos de solo como competição por espaço e nutrientes, indução de resistência sistêmica das plantas a patógenos, micoparasitismo, produção de enzimas e metabolismo secundário, decomposição de matéria orgânica e biorremediação (WANG et al., 2020). A capacidade de parasitar outros microrganismos é o mecanismo antagônico mais utilizado pelas espécies de *Trichoderma*. Esses fungos reconhecem e atacam patógenos diretamente, estrangulam as hifas, limitam o crescimento e levam à morte do patógeno (ALFIKY, 2019). Outro mecanismo bastante conhecido é a excreção de metabólitos secundários e enzimas, como exoglucanases, quitinases e proteases que degradam a parede celular de fungos fitopatogênicos (SILVA et al., 2016b).

Vários produtos agrícolas utilizam cepas de *Trichoderma* em sua composição. As espécies mais comercializadas e utilizadas mundialmente são *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. lignorum*, *T. catenulatum*, *T. koningiopsis*, *T. virens*, *T. fertile* e *T. stromaticum* (BETTIOL et al., 2019). Cepas comerciais de *Trichoderma* são utilizadas para promover o crescimento vegetal e reduzir o ataque de patógenos presentes no solo, por exemplo, as cepas comerciais *T. asperellum* T-211 (Trichodemax®), *T. asperellum* URM-5911 (Quality®) e *T. harzianum* ESALQ-1306 (Trichodermil®) que em estudo de microbiolização de sementes de feijão caupi reduziram a incidência de fungos fitopatogênicos, aumentaram a porcentagem de emergência das sementes e o crescimento inicial das mudas (CRUZ et al., 2022).

Trichoderma harzianum é a espécie mais estudada no manejo de doenças de plantas, destacando-se como um excelente agente biocontrolador. Esse fungo produz e libera peptídeos antimicrobianos (NAWROCKA; MAŁOLEPSZA, 2013) que inibem a atividade da enzima glucana síntase em fungos patogênicos, uma enzima importante na composição da parede celular dos fungos (ZIN; BADALUDDIN, 2020). Khalili et al. (2016) relataram que isolados de *T. harzianum* promoveram o crescimento de plantas de soja e inibiram o crescimento do fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goind, que é agente causal da podridão do carvão em soja e da podridão radicular da mandioca. Efeito antagônico de isolados de *Trichoderma* spp. também foi observado na inibição do crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, agente causal da murcha do tomateiro (SALLAM et al., 2019). Outro estudo observou que a progênie de plantas de tomate com *Trichoderma* pode herdar resistência e assim proporcionar proteção contra o ataque de nematoides (MEDEIROS et al., 2017), sugerindo a possibilidade de que não seja necessária a aplicação recorrente de bioprodutos a base de cepas de *Trichoderma*.

8.1. *Trichoderma koningiopsis*

A espécie *Trichoderma koningiopsis* foi descrita por Samuels et al. (2006), e está amplamente distribuída em regiões tropicais como América do Sul, Canadá,

Ethiopia, Europa e Leste da América do Norte (LUO et al., 2023). *Trichoderma koningiopsis* é uma espécie saprófita comumente encontrada em solos decompondo substâncias complexas (CAI et al., 2022; BEZERRA et al., 2021). O potencial de *T. koningiopsis* em promover o crescimento vegetal tem sido explorado na agricultura sustentável (SAXENA et al., 2015; BORDIN et al., 2018; TANDON et al., 2018). Este fungo provoca alterações nas plantas que resultam em efeitos positivos para o crescimento e indução de resistência sistêmica nas plantas (QIAN et al., 2013; HEWEDY et al., 2020; YU e LUO, 2020). *Trichoderma koningiopsis* também pode induzir resistência em plantas através da produção de compostos antifúngicos, como as koningininas R-S que apresentam atividade antifúngica específica contra algumas espécies de *Fusarium* (HU et al., 2016; YU e LUO 2020).

Trichoderma koningiopsis é reconhecida como um excelente agente de controle biológico natural por apresentar atividades antagônicas contra vários fitopatógenos (CORTÉS-ROJAS et al., 2021; 2023). Dentre as habilidades antagônicas de *T. konigniopsis* destacam-se a competição por espaço e nutrientes, o parasitismo direto contra patógenos fúngicos, com degradação da parede celular usando enzimas como a quitinase, e a produção de metabólitos secundários com atividade antifúngica (CAI et al., 2022). Essas habilidades permitem que este fungo seja aplicado na agricultura como tratamentos de sementes, pulverizações foliares e corretivos do solo (TANDON et al., 2018; 2020; CAI et al., 2022). *Trichoderma koningiopsis* também apresenta grande capacidade de solubilizar fósforo no solo, inclusive em condições de estresse (TANDON et al. 2020), mostrando potencial promissor para aplicação na recuperação de solos degradados e pastagens com deficiência em nutrientes (ZHANG et al., 2018).

A eficácia de *T. koningiopsis* contra patógenos de plantas foi verificada em diversos estudos (RUANGWONG et al., 2021; CAI et al., 2022; OSORIO-GUERRERO et al., 2024). Por exemplo, no estudo realizado por Luo et al. (2023), *T. koningiopsis* reduziu significativamente a incidência e gravidade da murcha da banana causada por *F. oxysporum* f. sp. *cubense* tropical raça 4. *Trichoderma koningiopsis* também mostrou ser capaz de induzir respostas de defesa em plantas de pinheiro contra *F. oxysporum*, além de ter promovido melhora da fertilidade do solo (YU e LUO, 2020). O potencial biocontrolador de *T. koningiopsis* indica que o seu uso na agricultura pode oferecer vantagens significativas em comparação com o uso de produtos químicos, por não oferecer riscos de desenvolver resistência aos patógenos, não atingir organismos não alvo e não agredir o meio ambiente (TYŚKIEWICZ et al., 2022).

9. Referências

- ABREU, LM de; PFENNING, L. H. O gênero *Trichoderma*. *Trichordema* uso na agricultura, 2019.
- ADEDIRE, Oluwafemi Michael; ODUWAYE, Olubusola Fehintola; FASHOLA, Olutoye Olushola. Biocontrol of cassava root-rot mycopathogens with antimicrobial extracts of wood shavings. *Journal of Crop Improvement*, v. 35, n. 5, p. 745-761, 2021.

- AGRIOS, George N. *Plant pathology*. Elsevier, 2005.
- AJENG, Aaron Avit et al. Bioformulation of biochar as a potential inoculant carrier for sustainable agriculture. *Environmental Technology & Innovation*, v. 20, p. 101168, 2020.
- ALEXOPOULOS, Constantine John. *Introductory mycology*. 1962.
- ALFIKY, Alsayed. Effects of ultraviolet irradiation on the in vitro antagonistic potential of *Trichoderma* spp. against soil-borne fungal pathogens. *Heliyon*, v. 5, n. 7, 2019.
- ALMEIDA, Jorge; FERREIRA FILHO, José Raimundo. Mandioca: uma boa alternativa para alimentação animal. 2005.
- ALVES, Alfredo Augusto Cunha. Cassava botany and physiology. In: *Cassava: biology, production and utilization*. Wallingford UK: Cabi, 2001. p. 67-89.
- ALVES, RNB et al. Podridões em raízes de mandioca: problemas e soluções para o seu controle. 2020
- ASLAM, Sidra et al. Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi—a mini review. *Journal of Plant Interactions*, v. 12, n. 1, p. 493-504, 2017.
- BANDYOPADHYAY, Ranajit et al. *Fusarium* species from the cassava root rot complex in West África. *Phytopathology*, v. 96, n. 6, p. 673-676, 2006.
- BARROS, Rodrigo Luiz Neves et al. Crescimento e produtividade de grãos do feijoeiro comum sob inoculação com *Rhizobium* e adubação nitrogenada. 2016.
- BASHAN, Yoav et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and soil*, v. 378, p. 1-33, 2014.
- BASHAN, Yoav; DE-BASHAN, Luz E.; PRABHU, S. R. Superior polymeric formulations and emerging innovative products of bacterial inoculants for sustainable agriculture and the environment. In: *Agriculturally important microorganisms: Commercialization and regulatory requirements in Asia*. Singapore: Springer Singapore, 2016. p. 15-46.
- BASU, Anirban et al. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability*, v. 13, n. 3, p. 1140, 2021.
- BELLÉ, Rafael; FONTANA, Daniele Cristina. Patógenos de solo: principais doenças vasculares e radiculares e formas de controle. *Enciclopédia biosfera*, v. 15, n. 28, 2018.
- BETTIOL, Wagner et al. Produtos comerciais à base de *Trichoderma*. *Trichoderma*, p. 45, 2019.
- BEZERRA, Cidney Barbosa et al. Cama de aviário e solo não autoclavados são eficientes no controle do crescimento de *Scytilidium lignicola*, causador da podridão negra da mandioca. *Summa Phytopathologica*, v. 45, n. 2, p. 191-196, 2019.
- BHANDARI, Sagar et al. An overview of multifaceted role of *Trichoderma* spp. for sustainable agriculture. *Archives of Agriculture and Environmental Science*, v. 6, n. 1, p. 72-79, 2021.

- BISSETT, John. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Canadian journal of botany*, v. 62, n. 5, p. 924-931, 1984.
- BOARI, A. de J. et al. First report of *Phytophthium* sp. causing storage root rot and foliage blight of cassava in Brazil. *Plant Disease*, v. 102, n. 5, p. 1042-1042, 2018.
- BOAS, Sandielle Araújo Vilas et al. Sources of resistance to cassava root rot caused by *Fusarium* spp.: a genotypic approach. *Euphytica*, v. 209, n. 1, p. 237-251, 2016.
- BOAS, Sandielle Araújo Vilas et al. Survey of fungi associated with cassava root rot from different producing regions in Brazil. *Scientia Agricola*, v. 74, n. 1, p. 60-67, 2017.
- BORDIN, Eduarda Roberta et al. Non-toxic bioherbicides obtained from *Trichoderma koningiopsis* can be applied to the control of weeds in agriculture crops. *Industrial Biotechnology*, v. 14, n. 3, p. 157-163, 2018.
- BRITO, A. C. Q. et al. Diversity and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species associated with black root rot and stem cutting dry rot in *Manihot esculenta* in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, v. 157, p. 583-598, 2020.
- BUENSANTEAI, Natthiya; ATHINUWAT, Dusit. The antagonistic activity of *Trichoderma virens* strain TvSUT10 against cassava stem rot in Thailand. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 84, p. 14996-15001, 2012.
- BURRELL, Leigh D. et al. Long-term effects of biochar on soil physical properties. *Geoderma*, v. 282, p. 96-102, 2016.
- CAI, Feng et al. Colonization of *Trichoderma harzianum* strain SQR-T037 on tomato roots and its relationship to plant growth, nutrient availability and soil microflora. *Plant and Soil*, v. 388, p. 337-350, 2015.
- CAI, Feng; DRUZHININA, Irina S. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. *Fungal Diversity*, v. 107, n. 1, p. 1-69, 2021.
- CAI, Feng et al. The current state of *Trichoderma* taxonomy and species identification. In: *Advances in Trichoderma biology for agricultural applications*. Cham: Springer International Publishing, p. 3-35, 2022.
- CARDOSO, C. E. L.; SOUZA, J. da S.; GAMEIRO, A. H. Aspectos econômicos e mercado. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA. Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca (Cap. 2, p. 41-70). Cruz das Almas, BA: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006.
- COELHO, Luísa et al. Use of organic composts to suppress bentgrass diseases in *Agrostis stolonifera*. *Biological control*, v. 141, p. 104154, 2020.
- CONTRERAS-CORNEJO, Hexon Angel et al. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS microbiology ecology*, v. 92, n. 4, p. fiw036, 2016.
- CONTRERAS-CORNEJO, Hexon Angel; ORTIZ-CASTRO, Randy; LÓPEZ-BUCIO, José. Promotion of plant growth and the induction of systemic defence by *Trichoderma*: physiology, genetics and gene expression. In: *Trichoderma: biology and applications*. Wallingford UK: CABI, 2013. p. 173-194.

CORTÉS-ROJAS, Diego et al. Seed coating as a delivery system for the endophyte *Trichoderma koningiopsis* Th003 in rice (*Oryza sativa*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 105, p. 1889-1904, 2021.

CORTÉS-ROJAS, Diego et al. *Trichoderma koningiopsis* survival on coated seeds and effect on plant growth promotion in rice (*Oryza sativa*). *Current Microbiology*, v. 80, n. 1, p. 22, 2023.

CROUS, Pieter Willem et al. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies in mycology*, v. 98, p. 100116, 2021.

CRUZ, José Manoel Ferreira de Lima et al. Microbiolization of cowpea seeds with commercial strains of *Trichoderma asperellum* and *T. harzianum* 1. *Revista Ceres*, v. 69, n. 5, p. 613-618, 2022.

DARYANTO, Stefani; WANG, Lixin; JACINTHE, Pierre-André. Drought effects on root and tuber production: A meta-analysis. *Agricultural water management*, v. 176, p. 122-131, 2016.

DASHTI, Amir et al. Biochar performance evaluation for heavy metals removal from industrial wastewater based on machine learning: application for environmental protection. *Separation and Purification Technology*, v. 312, p. 123399, 2023.

EGAMBERDIEVA, Dilfuza et al. Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. *Frontiers in microbiology*, v. 8, p. 2104, 2017.

EKE, Pierre et al. Improved nutrient status and *Fusarium* root rot mitigation with an inoculant of two biocontrol fungi in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Rhizosphere*, v. 12, p. 100172, 2019.

ELZOBAIR, Khalid A. et al. Contrasting effects of biochar versus manure on soil microbial communities and enzyme activities in an Aridisol. *Chemosphere*, v. 142, p. 145-152, 2016.

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>

FAOSTAT (2020) FAO Statistical Database. Available at: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> [Accessed 11 January 2023].

FARIAS, Alba Rejane Nunes et al. Aspectos Socioeconômicos e agrônômicos da Mandioca. 1 ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006.

FIALHO, J. De F. et al. Mandioca no cerrado: orientações técnicas. Brasília, DF: Embrapa, 2013., 2013.

FIGUEREDO, Natália Aragão et al. A economia verde como referência para análise das unidades de conservação de uso sustentável no estado do Pará, Brasil. *Revista de Extensão e Estudos Rurais*, v. 6, n. 1, p. 40-62, 2017.

FIPKE, Glauber Monçon; DE BASTOS PAZINI, Juliano; ETHUR, Luciana Zago. Antagonismo de isolados de *Trichoderma* spp. ao *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes temperaturas. *Magistra*, v. 27, n. 1, p. 23-32, 2015.

- FLORENCIO, Camila et al. Avanços na produção e formulação de inoculantes microbianos visando uma agricultura mais sustentável. *Química Nova*, v. 45, p. 1133-1145, 2022.
- FORMISANO, Luigi et al. *Trichoderma* and phosphite elicited distinctive secondary metabolite signatures in zucchini squash plants. *Agronomy*, v. 11, n. 6, p. 1205, 2021.
- FOSTER, Erika J. et al. Biochar and manure amendments impact soil nutrients and microbial enzymatic activities in a semi-arid irrigated maize cropping system. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 233, p. 404-414, 2016.
- GHAZANFAR, Muhammad Usman et al. *Trichoderma* as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture: a review. *Plant Protection*, v. 2, n. 3, 2018.
- GHORBANPOUR, Mansour et al. Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biological Control*, v. 117, p. 147-157, 2018.
- GOULET, Frédéric. Characterizing alignments in socio-technical transitions. Lessons from agricultural bio-inputs in Brazil. *Technology in society*, v. 65, p. 101580, 2021.
- HARIHARAN, Ganeshamoorthy; PRASANNATH, Kandeeparoopan. Recent advances in molecular diagnostics of fungal plant pathogens: a mini review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, p. 600234, 2021.
- HILLOCKS, Rory J.; WYDRA, Kerstin. Bacterial, fungal and nematode diseases. In: Cassava: biology, production and utilization. Wallingford UK: CABI, 2001. p. 261-280.
- HOHENFELD, Camila Santiago et al. Comparative analysis of infected cassava root transcriptomics reveals candidate genes for root rot disease resistance. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, p. 10587, 2024.
- HOHENFELD, Camila Santiago et al. Genome-wide association study and selection for field resistance to cassava root rot disease and productive traits. *Plos one*, v. 17, n. 6, p. e0270020, 2022.
- HOHENFELD, Camila Santiago et al. Modelling growth characteristics and aggressiveness of *Neoscytalidium hyalinum* and *Fusarium solani* associated with black and dry root rot diseases on cassava. *Tropical Plant Pathology*, v. 43, p. 422-432, 2018.
- HONG, Shan et al. Significant decline in banana *Fusarium* wilt disease is associated with soil microbiome reconstruction under chilli pepper-banana rotation. *European Journal of Soil Biology*, v. 97, p. 103154, 2020.
- HU, Xiaojia et al. Use of formulated *Trichoderma* sp. Tri-1 in combination with reduced rates of chemical pesticide for control of *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape. *Crop Protection*, v. 79, p. 124-127, 2016.
- HYDE, Kevin D. et al. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*, v. 97, p. 1-136, 2019.
- JAISWAL, Amit K. et al. Activating biochar by manipulating the bacterial and fungal microbiome through pre-conditioning. *New Phytologist*, v. 219, n. 1, p. 363-377, 2018.
- JAKLITSCH, W. M.; VOGLMAYR, H. Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in southern Europe and macaronesia. *Studies in mycology*, v. 80, p. 1-87, 2015.

JUNIOR, MODESTO et al. Cultura da mandioca: Aspectos socioeconômicos, melhoramento genético, sistemas de cultivo, manejo de pragas e doenças e agroindústria. 2016.

KENDRICK, B. (2017). The fifth kingdom. Hackett Publishing.

KHALILI, Elham et al. Evaluation of *Trichoderma* isolates as potential biological control agent against soybean charcoal rot disease caused by *Macrophomina phaseolina*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 30, n. 3, p. 479-488, 2016.

KUMAR, Gagan et al. *Trichoderma*: a potential fungal antagonist to control plant diseases. *SATSA Mukhapatra-Annual Technical Issue*, v. 21, p. 206-218, 2017.

LA SPADA, Federico et al. *Trichoderma* counteracts the challenge of *Phytophthora nicotianae* infections on tomato by modulating plant defense mechanisms and the expression of crinkler, necrosis-inducing *Phytophthora* protein 1, and cellulose-binding elicitor lectin pathogenic effectors. *Frontiers in plant science*, v. 11, p. 583539, 2020.

LARKIN, Robert P.; BREWER, Marin T. Effects of crop rotation and biocontrol amendments on *rhizoctonia* disease of potato and soil microbial communities. *Agriculture*, v. 10, n. 4, p. 128, 2020.

LEAL, Itallo Michael Soares et al. Tecnologia de aplicação de *Trichoderma asperellum* e interferência na fitossociologia de plantas daninhas na cultura da *Manihot esculenta* Crantz. 2019.

LEHMANN, Johannes et al. Biochar effects on soil biota—a review. *Soil biology and biochemistry*, v. 43, n. 9, p. 1812-1836, 2011.

LI, G. Q[†]; HUANG, H. C[‡]; ACHARYA, S. N. Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control*, v. 28, n. 1, p. 11-18, 2003.

LIMA, Jose Romualdo de Sousa et al. Biochar enhances Acrisol attributes and yield of bean in Brazilian tropical dry region. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science*, v. 71, n. 8, p. 674-682, 2021.

LIMA, José Romualdo de Sousa et al. Effect of biochar on physicochemical properties of a sandy soil and maize growth in a greenhouse experiment. *Geoderma*, v. 319, p. 14-23, 2018.

LUCHI, Nicola; IOOS, Renaud; SANTINI, Alberto. Fast and reliable molecular methods to detect fungal pathogens in woody plants. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 104, n. 6, p. 2453-2468, 2020.

LÜCKING, Robert et al. Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding?. *IMA fungus*, v. 11, n. 1, p. 14, 2020.

MACHADO, Alexandre Reis; DE QUEIROZ BRITO, Amanda Cupertino; DE MELO, Juliana Ferreira. Podridões fúngicas de raízes tuberosas no Nordeste brasileiro: etiologia e manejo. *Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos*, p. 95-109, 2018.

- MANGANIELLO, Gelsomina et al. Modulation of tomato response to *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* and its secondary metabolite harzianic acid. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 1966, 2018.
- MANSFIELD, John et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, v. 13, n. 6, p. 614-629, 2012.
- MARTINAZZO-PORTZ, Tatiane et al. Utilização de medicamentos homeopáticos como alternativa para redução da taxa de progresso da murcha bacteriana na mandioca. 2017.
- MARTINEZ, Clara Liseth Mendoza et al. Production and characterization of coffee-pine wood residue briquettes as an alternative fuel for local firing systems in Brazil. *Biomass and Bioenergy*, v. 123, p. 70-77, 2019.
- MASSOLA JUNIOR, Nelson Sidnei; BEDENDO, Ivan Paulo. Doenças da mandioca. Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas, 1997.
- MAXMEN, Amy. How African scientists are improving cassava to help feed the world. *Nature*, v. 565, n. 7738, p. 144-147, 2019.
- MEDEIROS, Erika Valente et al. Biochar and *Trichoderma* as an eco-friendly and low-cost alternative to improve soil chemical and biological properties. *Waste and Biomass Valorization*, v. 15, n. 3, p. 1439-1450, 2024.
- MEDEIROS, Erika Valente et al. Biochar and *Trichoderma* spp. in management of plant diseases caused by soilborne fungal pathogens: a review and perspective. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 15, p. e296101522465-e296101522465, 2021a.
- MEDEIROS, Erika Valente et al. Biochar as a strategy to manage plant diseases caused by pathogens inhabiting the soil: a critical review. *Phytoparasitica*, v. 49, n. 4, p. 713-726, 2021b.
- MEDEIROS, Erika Valente et al. Effect of biochar and inoculation with *Trichoderma aureoviride* on melon growth and sandy Entisol quality. *Australian Journal of Crop Science*, v. 14, n. 6, p. 971-977, 2020.
- MEDEIROS, Hugo Agripino de et al. Tomato progeny inherit resistance to the nematode *Meloidogyne javanica* linked to plant growth induced by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 40216, 2017.
- MEDEIROS, Júlia Freire de. Conservação ex situ e acesso à informação: levantamento das amostras de *Manihot esculenta* coletadas na região do Rio Negro-AM, conservadas pela Embrapa. 2014.
- MENDOZA-MENDOZA, Artemio et al. Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: role of the fungal secretome. *Fungal Biology Reviews*, v. 32, n. 2, p. 62-85, 2018.
- MEYER, Maurício Conrado et al. *Trichoderma*: uso na agricultura. 2019.
- MONTIEL-ROZAS, María Del Mar et al. Sustainable alternatives to 1, 3-dichloropropene for controlling root-knot nematodes and fungal pathogens in melon crops in Mediterranean soils: Efficacy and effects on soil quality. *Environmental Pollution*, v. 247, p. 1046-1054, 2019.

MORAES, Rodrigo Lopes et al. Silagem de cana-de-açúcar tratada com inoculantes microbianos e suas misturas. *Rev Bras De Agrop Sust*, v. 7, p. 76-83, 2017.

MORAIS, Lizz Kezzy de; SANTIAGO, Antônio Dias; CAVALCANTE, Manoel Henrique Bonfim. Phenotypic stability in cassava estimated by the AMMI analysis with supplementary genotypes. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 17, n. 4, p. 366-372, 2017.

MORAIS, Martival Santos. Levantamento e avaliação da intensidade de doenças na mandioca e produção de celulases por fungos fitopatogênicos à cultura do estado da Paraíba. 2014.

MUNIZ, Maria de Fátima S. et al. Caracterização de isolados de *Phytophthora drechsleri*, agente causal da podridão mole de raízes de mandioca. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, p. 195-198, 2006.

MUNIZ, Paulo Henrique Pereira Costa et al. Produção de conídios em substrato sólido e colonização superficial por *Trichoderma harzianum*. *Revista de Agricultura Neotropical*, v. 5, n. 4, p. 40-44, 2018.

MUTER, Olga et al. Effect of biochar and *Trichoderma* application on fungal diversity and growth of *Zea mays* in a sandy loam soil. *Environmental & Experimental Biology*, v. 15, n. 4, 2017.

NASSAR, Nagib MA. Conservation of the genetic resources of cassava (*Manihot esculenta*) determination of wild species localities with emphasis on probable origin. *Economic Botany*, v. 32, n. 3, p. 311-320, 1978.

NASSAR, Nagib MA; HASHIMOTO, D. Y. C.; FERNANDES, S. D. C. Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. *Genetics and Molecular Research*, v. 7, n. 1, p. 16-28, 2008.

NAWROCKA, J.; MAŁOLEPSZA, U. Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological control*, v. 67, n. 2, p. 149-156, 2013.

NETO, Joacy Fonsêca et al. Efeito de adubo verde e *Trichoderma harzianum* na sobrevivência de *Fusarium solani* e no desenvolvimento do meloeiro. *Revista Agro@mbiente On-line*, v. 10, n. 1, p. 44-49, 2016.

NOTARO, Krystal Alcantara et al. Prospecção de fitopatógenos associados á podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brasil. *Biosci. j.* (Online), p. 1832-1839, 2013.

OLIVEIRA, Daniele Iensen et al. Biscoitos tipo cookie sem glúten formulados com farelo de feijão, farinha de arroz e amido de mandioca. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 11, n. 2, 2017.

OLIVEIRA, Saulo Alves Santos de et al. First report of *Phytophthora melonis* causing cassava wilt and root rot in Bahia State, Brazil. *Summa Phytopathologica*, v. 42, n. 1, p. 107-107, 2016.

OLIVEIRA, Saulo Alves Santos de et al. Resistance to *Fusarium* dry root rot disease in cassava accessions. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 48, p. 1414-1417, 2013.

OLIVEIRA, Saulo Alves Santos et al. Escala de notas inespecíficas para seleção de plantas de mandioca resistentes a doenças foliares. 2020.

- ONYEKA, T. J.; DIXON, A. G. O.; EKPO, E. J. A. Identification of levels of resistance to cassava root rot disease (*Botryodiplodia theobromae*) in African landraces and improved germplasm using in vitro inoculation method. *Euphytica*, v. 145, p. 281-288, 2005.
- OSORIO-GUERRERO, Karen Viviana et al. *Trichoderma koningiopsis* applied as seed coating protects sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) from fungal contaminants during storage. *European Journal of Plant Pathology*, p. 1-11, 2024.
- PANEQUE, Marina et al. Effect of biochar amendment on morphology, productivity and water relations of sunflower plants under non-irrigation conditions. *Catena*, v. 147, p. 280-287, 2016.
- PERALTA, Ariane L. et al. Crop rotational diversity increases disease suppressive capacity of soil microbiomes. *Ecosphere*, v. 9, n. 5, p. e02235, 2018.
- PERSOON, C. H. *Neurospora* genetic nomenclature. *Romers Neues Mag. Bot*, v. 1, p. 81-128, 1794.
- PERUCH, Luiz Augusto Martins et al. Sintomas e controle das principais doenças da mandioca em Santa Catarina. *Agropecuária Catarinense*, v. 26, n. 2, p. 52-54, 2013.
- PINTO, Florentino Carvalho. Aspectos da cadeia produtiva da mandioca em Feira de Santana no distrito de Maria Quitéria (Povoados de Lagoa Grande e Olhos D'água das Moças). *Sitientibus*, n. 43, 2010.
- PITERINA, Anna V. et al. Mutagenic activities of biochars from pyrolysis. *Science of The Total Environment*, v. 592, p. 674-679, 2017.
- PORTELLA, Ana Lúcia. Caracterização do processo produtivo, aspectos da qualidade da farinha de mandioca e percepção dos agentes da cadeia na região central do estado de Roraima. 2015.
- PUSHPALATHA, Raji; GANGADHARAN, Byju. Is cassava (*Manihot esculenta* Crantz) a climate “smart” crop? A review in the context of bridging future food demand gap. *Tropical Plant Biology*, v. 13, p. 201-211, 2020.
- QIAN, Y. S. et al. First report of leaf blight disease of *Curcuma wenyujin* caused by *Trichoderma koningiopsis* in China, 2013.
- RAMÍREZ-VALDESPINO, Claudia A.; CASAS-FLORES, Sergio; OLMEDO-MONFIL, Vianey. *Trichoderma* as a model to study effector-like molecules. *Frontiers in microbiology*, v. 10, p. 1030, 2019.
- RAMOS, Johnny Markos Guedes. Impactos do cooperativismo sobre o desenvolvimento sustentável: o caso da cooperativa COOMPRAB (Rio Preto da Eva/Amazonas). 2022.
- SALLAM, Nashwa MA; ERAKY, Amal MI; SALLAM, Ahmed. Effect of *Trichoderma* spp. on *Fusarium* wilt disease of tomato. *Molecular Biology Reports*, v. 46, p. 4463-4470, 2019.
- SAMUELS, Gary J. et al. The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in mycology*, v. 56, n. 1, p. 67-133, 2006.

- SÁNCHEZ, Antonio Santos et al. Waste bio-refineries for the cassava starch industry: New trends and review of alternatives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 73, p. 1265-1275, 2017.
- SANI, Md Nasir Hossain et al. Impact of application of *Trichoderma* and biochar on growth, productivity and nutritional quality of tomato under reduced NPK fertilization. *Annals of Agricultural Sciences*, v. 65, n. 1, p. 107-115, 2020.
- SANTOS, Mariana Sanches; NOGUEIRA, Marco Antonio; HUNGRIA, Mariangela. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *Amb Express*, v. 9, n. 1, p. 205, 2019.
- SAXENA, Amrita; RAGHUWANSHI, Richa; SINGH, Harikesh Bahadur. *Trichoderma* species mediated differential tolerance against biotic stress of phytopathogens in *Cicer arietinum* L. *Journal of basic microbiology*, v. 55, n. 2, p. 195-206, 2015.
- SAXENA, Jyoti; RANA, Geetika; PANDEY, Mrinal. Impact of addition of biochar along with *Bacillus* sp. on growth and yield of French beans. *Scientia Horticulturae*, v. 162, p. 351-356, 2013.
- SCHOCH, Conrad L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the national academy of Sciences*, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.
- SCHUSTER, André; SCHMOLL, Monika. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 87, p. 787-799, 2010.
- SERRA, Ilka Márcia Ribeiro de Souza et al. *Scytalidium lignicola* em mandioca: ocorrência no Estado do Maranhão e reação de cultivares ao patógeno. *Summa Phytopathologica*, v. 35, p. 327-328, 2009.
- SHARMA, Sushma et al. *Trichoderma*: biodiversity, ecological significances, and industrial applications. Recent advancement in white biotechnology through fungi: volume 1: diversity and enzymes perspectives, p. 85-120, 2019.
- SHARMA, Vivek; SALWAL, Richa. Molecular markers and their use in taxonomic characterization of *Trichoderma* spp. *Molecular Markers in Mycology: Diagnostics and Marker Developments*, p. 37-52, 2017.
- SILVA, C. A. D. et al. Interference of incorporation of soil organic matter in control of cassava black root, caused by *Scytalidium lignicola*. 2013.
- SILVA, Cintia Caroline Gouveia da et al. Coffee waste as an eco-friendly and low-cost alternative for biochar production impacts on sandy soil chemical attributes and microbial gene abundance. *Bragantia*, v. 80, p. e2121, 2021a.
- SILVA, Cíntia Caroline Gouveia et al. Biochar and cow manure on chemical and microbial community in regosol with bean. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 21, n. 2, p. 1552-1564, 2021b.
- SILVA, D. V. et al. Manejo de plantas daninhas na cultura da mandioca. *Planta daninha*, v. 30, p. 901-910, 2012.

- SILVA, Izael Oliveira et al. The first report about *Fusarium falciforme* that causes root rot in cassava cv Rosinha, in Alagoas state, Brazil. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 12, p. e221111234369-e221111234369, 2022a.
- SILVA, J. da et al. Relato de elaboração do sistema de produção de mandioca para o Extremo Sul da Bahia. 2009.
- SILVA, Jenifer Sthephanie Araújo et al. Biochar and *Trichoderma aureoviride* URM 5158 as alternatives for the management of cassava root rot. *Applied Soil Ecology*, v. 172, p. 104353, 2022b.
- SILVA, Jéssica Morais da et al. FAMEs e atividades microbianas envolvidas na supressão da podridão radicular da mandioca por matéria orgânica. *Revista Caatinga*, v. 30, p. 708-717, 2017a.
- SILVA, José Aldo Teixeira et al. Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against *Scytalidium lignicola* CMM 1098 and antioxidant enzymatic activity in cassava. *Phytoparasitica*, v. 45, p. 219-225, 2017b.
- SILVA, José Aldo Teixeira et al. *Trichoderma aureoviride* URM 5158 and *Trichoderma hamatum* URM 6656 are biocontrol agents that act against cassava root rot through different mechanisms. *Journal of Phytopathology*, v. 164, n. 11-12, p. 1003-1011, 2016.
- SILVA, Luiz Eduardo Bezerra et al. Aspectos gerais e peculiaridades sobre mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). *Diversitas Journal*, v. 3, n. 1, p. 13-23, 2018.
- SILVA, Ricardo Barros et al. Crescimento e produtividade da mandioca sob níveis de irrigação. 2020.
- SOUSA, Maria Cristiane Pereira. Efeito de diferentes coberturas vegetais. EMBRAPA Mandioca e fruticultura. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. Curso de Mestrado. 2020.
- SOUZA, Bianca Cristina Matos de et al. Adubação organomineral na cultura da mandioca (*Manihot esculenta* crantz). 2019.
- SOUZA, Emanuel; KALID, Ricardo. Transferência de tecnologia no cultivo de mandioca—o caso do Projeto Reniva. *Interações (Campo Grande)*, v. 23, n. 2, p. 423-439, 2022.
- SOUZA, Joana Maria Leite et al. Caracterização físico-química de farinhas de mandioca oriundas do município de Cruzeiro do Sul-Acre. 2008.
- STEFANELLO, Luciano et al. Manejo da podridão radicular da mandioca pela combinação de manejo de solo, variedade resistente e controle biológico com *Trichoderma harzianum*. *Revista Raízes e Amidos Tropicais*, v. 13, p. 31-45, 2017
- TANDON, Ashmita et al. Effect of *Trichoderma koningiopsis* on chickpea rhizosphere activities under different fertilization regimes. *Open Journal of Soil Science*, v. 8, n. 10, p. 261, 2018.
- TANDON, Ashmita et al. Phosphate solubilization by *Trichoderma koningiopsis* (NBRI-PR5) under abiotic stress conditions. *Journal of King Saud University-Science*, v. 32, n. 1, p. 791-798, 2020.

- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszuk-Ściśeł, J. (2022). *Trichoderma*: The Current Status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>
- VASSILEV, N. et al. Unexploited potential of some biotechnological techniques for biofertilizer production and formulation. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 99, p. 4983-4996, 2015.
- VEIGA, João Paulo Soto et al. Characterization and productivity of cassava waste and its use as an energy source. *Renewable energy*, v. 93, p. 691-699, 2016.
- VENBRUX, Marc; CRAUWELS, Sam; REDIERS, Hans. Current and emerging trends in techniques for plant pathogen detection. *Frontiers in Plant Science*, v. 14, p. 1120968, 2023.
- VERMA, Jay Prakash et al. Evaluation of plant growth promoting activities of microbial strains and their effect on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in India. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 70, p. 33-37, 2014.
- VIEIRA, B.; NECHET, K. de L. Índice ilustrado de doenças de plantas no Estado de Roraima. 2010.
- VIEIRA, Eduardo Alano et al. Caracterização molecular de acessos de mandioca biofortificados com potencial de uso no melhoramento genético. *Revista Ciência Agronômica*, v. 42, p. 457-463, 2011.
- Wang, L., Ko, E.E., Tran, J. & Qiao, H. (2020) TREE1-EIN3-mediated transcriptional repression inhibits shoot growth in response to ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117, 29178–29189.
- WANG, Qihang et al. Converting industrial waste cork to biochar as Cu (II) adsorbent via slow pyrolysis. *Waste Management*, v. 105, p. 102-109, 2020.
- WIJAYAWARDENE, Nalin N. et al. Current insight into culture-dependent and culture-independent methods in discovering Ascomycetous Taxa. *Journal of Fungi*, v. 7, n. 9, p. 703, 2021.
- XIE, Xiaomin et al. Regional water footprints of potential biofuel production in China. *Biotechnology for biofuels*, v. 10, p. 1-15, 2017.
- YANG, D. I. N. G. et al. Potential benefits of biochar in agricultural soils: a review. *Pedosphere*, v. 27, n. 4, p. 645-661, 2017.
- YANG, Xu et al. Effects of maize stover and its derived biochar on greenhouse gases emissions and C-budget of brown earth in Northeast China. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, p. 8200-8209, 2017.
- ZENG, Zhao Qing; ZHUANG, Wen Ying. Two new species and a new Chinese record of *Hypocreaceae* as evidenced by morphological and molecular data. *Mycobiology*, v. 47, n. 3, p. 280-291, 2019
- ZHANG, Fengge et al. *Trichoderma* biofertilizer links to altered soil chemistry, altered microbial communities, and improved grassland biomass. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 848, 2018.

ZIN, Nur A.; BADALUDDIN, Noor A. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, v. 65, n. 2, p. 168-178, 2020.

CAPÍTULO I

Identificação de espécies fusarióides associadas a podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brazil

Resumo

A podridão da raiz da mandioca ocorre em plantações em todo o mundo, causando perdas econômicas significativas. Os fungos fusarióides estão amplamente distribuídos no mundo e são comumente associados à podridão radicular da mandioca. Espécies fusarióides foram isoladas de raízes de plantas de mandioca com sintomas de podridão radicular em uma área de cultivo no estado de Pernambuco, Brasil. Os fungos foram identificados pelas análises filogenéticas das regiões gênicas *TEF1- α* , *RPB1* e *RPB2*. Foram identificadas as seguintes espécies: *Fusarium agrestense*, *F. gossypinum*, *F. grosnichelii*, *F. triseptatum* e *Neocosmospora falciformis*. Todos os isolados testados quanto à patogenicidade foram capazes de induzir doenças em tubérculos e mudas de mandioca. Este estudo representa a primeira utilização de análise filogenética multilocus (MLPA) para identificar espécies de fungos fusarióides associadas à podridão radicular da mandioca. Além disso, relata, pela primeira vez no mundo, a presença de *F. agrestense*, *F. gossypinum*, *F. grosnichelii* e *F. triseptatum* causando podridão radicular da mandioca.

Palavras-chave: *Manihot esculenta*, análise filogenética, patogenicidade, *Fusarium*

1. Introdução

Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta da família *Euphorbiaceae* e constitui uma das culturas de maior importância socioeconômica no mundo (TREMACOLDI, 2016). Essa cultura desempenha um papel crucial na segurança alimentar devido ao seu alto valor nutricional e utilização massiva na alimentação humana por ser rica em carboidratos, vitamina C e aminoácidos essenciais (BRITO et al., 2020). Os tubérculos da mandioca também são utilizados na produção de ração animal, produtos farmacêuticos, bebidas alcoólicas, adesivos e produtos têxteis (ADEDIRE et al., 2021).

O Brasil é o sexto maior produtor mundial de mandioca, com uma produção de cerca de 18 milhões de toneladas de raízes. A região Nordeste do Brasil é o segundo maior produtor de mandioca do país, com uma produção de cerca de 21,9% da produção anual (IBGE, 2022). A mandioca é cultivada principalmente em pequenas propriedades com recursos limitados, pouco aporte tecnológico, solos ácidos e materiais de propagação de baixa qualidade fisiológica e fitossanitária, favorecendo a ocorrência de doenças, que por sua vez reduzem o rendimento das culturas (BOAS et al., 2017; BRITO e outros 2020).

O cultivo de mandioca é afetado por diversas doenças, dentre as principais estão a podridão radicular, mosaico, crestamento bacteriano e antracnose (BANDYOPADHYAY et al., 2006). A podridão radicular da mandioca é altamente

destrutiva e de difícil controle, causa perdas significativas na produtividade e consequentemente impactos socioeconômicos (TREMACOLDI, 2016). Diversas espécies de fungos estão associadas à podridão radicular da mandioca (BRITO et al., 2020; MADRASSI, et al., 2023; PHAM; TRAN, 2021; SILVA et al., 2024) sendo as mais importantes pertencentes aos gêneros *Fusarium* Link, *Neoscytalidium* Crous; *Slippers* e *Lasiodiplodia* Ellis; Everh (BRITO et al., 2020).

As espécies de *Fusarium* e outros gêneros fusarioides podem ocorrer como endófitos ou fitopatógenos transmitidos pelo solo numa ampla gama de hospedeiros e habitats (CROUS et al., 2021). Esses fungos são comumente isolados de raízes podres de mandioca e têm um papel predominante no complexo fúngico que causa o apodrecimento das raízes da mandioca (BANDYOPADHYAY et al., 2006). Esses microrganismos colonizam o xilema e obstruem os vasos das plantas através da produção micelial e das estruturas reprodutivas (BELLÉ; FONTANA, 2018). Além disso, produzem clamidósporos, que são estruturas resistentes que permitem que os microrganismos persistam no solo por longos períodos, dificultando ainda mais o controle de doenças (BAHADUR, 2021).

Com base em evidências filogenéticas, moleculares, morfológicas, ecológicas e bioquímicas, espécies anteriormente consideradas como *Fusarium* (conceito Wollenweber) foram segregadas em 20 gêneros fusarióides. Assim, *Fusarium* sensu stricto é circunscrito a um grupo mais restritivo, enquanto as espécies que eram classificadas no complexo de espécies *Fusarium solani* passam a ser tratadas no gênero *Neocosmospora* (CROUS et al., 2021). As espécies fusarióides mais relatadas associadas a *M. esculenta* são *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *F. oxysporum* Schldtl. e *F. moniliforme* J. Sheld. (*sin. F. verticillioides*), sendo predominante *F. solani* (Boas et al., 2017). No entanto, estudos de filogenia molecular mostraram que algumas destas espécies são atualmente tratadas em grupos taxonômicos mais amplos (AOKI et al., 2014). Por exemplo, *F. oxysporum* (*sensu lato*) é um complexo com mais de 20 espécies (LOMBARD et al., 2019). Assim, são necessários estudos que avaliem a diversidade de espécies de fusarióides associadas à mandioca utilizando abordagens moleculares, para obter uma discriminação mais precisa de espécies de fungos que não podem ser distinguidas de outra forma pela morfologia. Isto tem implicações para a gestão da doença, uma vez que as espécies podem diferir em termos de virulência e resposta às medidas de controle.

As características morfológicas dos fungos são influenciadas pelas condições ambientais e isso pode levar a interpretações errôneas no processo de identificação (AOKI et al., 2014). Assim, o uso de técnicas moleculares torna-se crucial na identificação taxonômica de importantes patógenos, como os gêneros fusarióides, que apresentam grande diversidade de espécies patogênicas. Compreender as interações e o desempenho individual das espécies associadas à podridão radicular da mandioca requer um estudo aprofundado das espécies encontradas nas culturas. Portanto, este estudo teve como objetivo (I) isolar e identificar espécies de fusarióides associadas às raízes da mandioca e (II) determinar a patogenicidade desses fungos em plantas de mandioca.

2. Materiais e métodos

2.1. Coleta e isolamento de fungos

Raízes de plantas de mandioca com sintomas de amarelecimento e murchamento das folhas, lesões necróticas nas raízes com aspecto seco e descoloração dos tecidos vasculares e parenquimatosos variando de marrom a marrom escuro nas raízes e podridão dos caules foram coletadas de um cultivo de mandioca no município de Garanhuns, Agreste de Pernambuco, Brasil, em fevereiro de 2021, coordenadas 09° 29' 08,2" S, 036° 59' 49,9" W. Todas as amostras foram enviadas ao Laboratório de Taxonomia e Biotecnologia Utilizando Fungos do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brasil).

Fragmentos de raízes finas de aproximadamente 2 cm foram cortados na região entre o tecido sadio e necrótico das raízes para isolamento dos patógenos. Os fragmentos foram lavados em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 1 min, seguida de álcool etílico a 70% por 1 min, e água destilada estéril também por 1 min, e secos em papel filtro na superfície de placa de Petri aberta em câmara de fluxo laminar. Posteriormente, os fragmentos foram adicionados a placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) acrescido de antibióticos (cloranfenicol, 50 mg/L) e incubados a 25°C em demanda bioquímica de oxigênio (BOD) por 7 dias. Em seguida, foram obtidas culturas puras pela técnica de isolamento monospórico (Machado et al., 2019). As culturas puras foram depositadas na Micoteca URM – Coleção de Culturas do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (BARBOSA et al., 2020) – sob códigos descritos na Tabela 1.

2.2. Extração de DNA, PCR e sequenciamento

O DNA genômico foi extraído de culturas puras após 7 dias de crescimento em BDA usando o Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) seguindo as recomendações do fabricante. Para identificar os espécimes isolados, sequências de DNA foram obtidas das regiões de fator de alongamento de tradução 1- α (*TEF1- α*), utilizando os primers EF1 e EF2 (O'DONNELL et al., 1998), RNA polimerase II, gene da subunidade principal (*RPB1*), usando os primers Fa e R8 (O'DONNELL et al., 2010) e a subunidade principal do gene da RNA polimerase (*RPB2*), usando os primers 5F2 e 7cR (SUNG et al., 2007), respectivamente.

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas utilizando 6,25 μ l de GoTaq Master Mix (Promega), 0,5 μ l de cada primer, 4,25 μ l de água livre de nuclease e 1 μ l de cada amostra de DNA genômico para cada reação. As condições de ciclagem foram 5 min a 95°C, seguidas por 35 ciclos de 45 s a 95°C, 45 s a 52°C e 90 s a 72°C, e uma etapa final de 8 min a 72°C para *TEF1- α* . Para *RPB1*, o ciclo inicial foi de 90 s a 94°C, seguido por 5 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 54°C, 2 min a 72°C, seguidos por 5 ciclos de 45 s a 94°C, 45 segundos a 53°C e 2 minutos a 72°C, seguidos de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 52°C, 2 minutos a 72°C e uma extensão de 10 minutos a 72°C. °C. Para *RPB2*, o ciclo inicial foi de 5 minutos a 95°C, seguido por

40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 90 segundos a 51°C, 2 minutos a 68°C e uma extensão de 5 minutos a 68°C. Os produtos de PCR foram purificados a partir das enzimas EXO + SAP (Fosfatase Alcalina/Exonuclease I) (Cellco, São Carlos, Rondônia, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante e enviados para sequenciamento com os primers utilizando BigDye® Terminator v. (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) na Plataforma Multiusuário de Sequenciamento e Expressão Gênica do Centro de Ciências Biológicas da UFPE. Os eletroferogramas foram editados usando o Sequencher 4.7 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, Michigan) e exportados como arquivos FASTA. As sequências geradas foram depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI) sob os números de acesso mostrados na Tabela 1.

2.3. Alinhamento de sequencias de DNA e Análises filogenéticas

As comparações iniciais foram feitas usando uma pesquisa local BLASTn no banco de dados GenBank (NCBI) das sequências *TEF1-α*. Para as análises filogenéticas, as sequências de referência dos grupos aos quais os isolados pertencem foram recuperadas do GenBank, alinhadas na interface online MAFFT v.7([//mafft.cbrc.jp/alignment/server/](http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/)) e ajustadas usando MEGA v. 7. Os modelos de substituição de nucleotídeos foram estimados separadamente para cada região genética usando MrModeltest 2.3. As análises de Inferência Bayesiana (BI) foram construídas no portal CIPRES Science Gateway (MILLER et al., 2010) utilizando o MrBayes 3.2.6 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). As análises bayesianas foram baseadas em 10 × 10⁶ gerações, uma cadeia fria e três aquecidas e uma fração de burn-in de 25%.

2.4. Testes de patogenicidade

Dos isolados coletados de raízes de plantas de mandioca, oito foram selecionados para o teste de patogenicidade, sendo selecionados ao menos um isolado representativo de cada espécie encontrada.. Para a preparação do inóculo, um tampão micelial de 6 mm de diâmetro retirado da margem de uma colônia com 7 dias de idade cultivada em BDA foi transferido para um frasco Erlenmeyer contendo 50 g de arroz parboilizado e 10 mL de água destilada previamente autoclavada a 120 °C por 30 min (CLAUDINO; SOARES 2014). Para o tratamento controle, os frascos Erlenmeyer foram preparados conforme descrito acima, mas sem o tampão de micélio. A patogenicidade dos isolados foi testada em tubérculos e plantas saudias de mandioca da variedade Santo Estevão. As raízes tuberosas foram lavadas em água corrente para retirada do excesso de solo e em seguida desinfetadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio (0,5% de cloro ativo) por 5 min, lavadas em SDW por 5 min e colocadas para secar em papel toalha. Após a secagem, foi feita uma pequena abertura circular na superfície das raízes com auxílio de um bisturi esterilizado. Para inserir o grão de arroz colonizado pelo patógeno, o centro das aberturas foi perfurado com uma ponteira esterilizada. O mesmo procedimento foi realizado para o tratamento controle, utilizando grão de arroz não colonizado e autoclavado (BRITO et al., 2020). Cada

tratamento foi composto por cinco raízes de mandioca, incluindo a testemunha, que foram incubadas em caixas plásticas dentro de câmara úmida em temperatura ambiente ($26^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$). Após 7 dias, as raízes foram avaliadas quanto à presença ou ausência de sintomas. Os isolados foram considerados patogênicos quando a área da lesão ultrapassou o ponto de inoculação. As raízes foram cortadas longitudinalmente e foram observadas lesões internas.

Para o teste de patogenicidade em mudas, o solo foi inoculado com 10g de grãos de arroz colonizados pelo patógeno. Grãos de arroz não colonizados foram utilizados como tratamento controle. Foram utilizadas quatro repetições (4 mudas) para cada tratamento. A presença ou ausência de sintomas foi avaliada após 78 dias. Os experimentos foram repetidos duas vezes. Fragmentos de tecido com sintomas foram utilizados para reisolamento de patógenos e os isolados recuperados comparados com aqueles originalmente inoculados para completar o postulado de Koch.

3. Resultados

Todas as plantas amostradas apresentaram sintomas de amarelecimento e murchamento das folhas, lesões necróticas com aspecto seco e coloração variando do marrom ao marrom escuro nas raízes e caules, sintomas característicos de podridão radicular. Foram coletadas raízes sintomáticas de 15 plantas e obtidos 56 isolados fúngicos, sendo 39 isolados pertencentes ao gênero fusarióide, os quais foram posteriormente confirmados pela análise molecular.

As análises filogenéticas identificaram 39 isolados pertencentes a *Fusarium* e *Neocosmospora*. Considerando lacunas de alinhamento, o conjunto de dados *TEF1- α* consistiu em 620 caracteres com 97 locais variáveis para o complexo de espécies de *Fusarium oxysporum* (FOSC) e 678 caracteres com 312 locais variáveis para *Neocosmospora*. O conjunto de dados *RPB1* incluiu 772 caracteres com 27 locais variáveis, enquanto o conjunto de dados *RPB2* incluiu 876 caracteres com 82 locais variáveis para FOSC. Os modelos ótimos de substituição de nucleotídeos para as análises bayesianas foram HKY+G para *TEF1- α* , GTR+I para *RPB2* e SYM+G para *RPB1* de FOSC e SYM+I+G para *TEF1- α* de *Neocosmospora*.

Os três genes combinados (Figura 1) apresentaram 31 isolados pertencentes ao FOSC. Os isolados pertencentes ao FOSC formaram clados com *F. triseptatum* (5 isolados), *F. agrestense* (6), *F. gossypinum* (1) e *F. grosnichelii* (3). Os outros isolados (16) foram resolvidos em um ramo de suporte fraco com *F. callistephi*, *F. fabacearum* e *F. inflexum*. Assim, o uso da análise filogenética multilocus (MLPA) utilizando sequências *TEF1- α* , *RPB1* e *RPB2* não permitiu resolver todos os isolados ao nível de espécie (Figura 1). A análise filogenética da região *TEF1- α* revelou oito isolados do gênero *Neocosmospora*, onde todos os isolados se agruparam com *N. falciformis* syn. *Fusarium falciforme* (Figura 2).

Tabela 1. Números de acesso do Genbank das sequências de DNA usadas na análise filogenética. Os exemplares obtidos neste estudo estão destacados em negrito.

| Espécies | Isolados | Host/substrato | GenBank acesso no. | | |
|----------------------------|----------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| | | | <i>tef1-a</i> | <i>rpb1</i> | <i>rpb2</i> |
| <i>Fusarium agrestense</i> | ARM802T | <i>Ipomoea batatas</i> | ON981008 | ON981038 | ON981066 |
| <i>F. agrestense</i> | ARM808 | <i>I. batatas</i> | ON981010 | ON981039 | ON981067 |
| <i>F. agrestense</i> | ARM814 | <i>I. batatas</i> | ON981012 | ON981041 | ON981069 |
| <i>F. agrestense</i> | URM8725 | <i>Manihot esculenta</i> | - | - | OQ850348 |
| <i>F. agrestense</i> | URM8727 | <i>M. esculenta</i> | OR257062 | OQ863606 | OQ850344 |
| <i>F. agrestense</i> | URM8728 | <i>M. esculenta</i> | OR257063 | OQ863607 | OQ850345 |
| <i>F. agrestense</i> | URM8729 | <i>M. esculenta</i> | OR257064 | OQ863608 | OQ850346 |
| <i>F. agrestense</i> | URM8734 | <i>M. esculenta</i> | OR257065 | OQ863609 | OQ850347 |
| <i>F. agrestense</i> | URM8696 | <i>M. esculenta</i> | OQ973325 | - | OQ850343 |
| <i>F. callistephi</i> | CBS 115423 | <i>Agathosma betulina</i> | MH484996 | - | MH484905 |
| <i>F. callistephi</i> | CBS 187 53T | <i>Callistephus chinensis</i> | MH484966 | - | MH484875 |
| <i>F. carminascens</i> | CBS 144738T | <i>Zea mays</i> | MH485028 | MW928801 | MH484937 |
| <i>F. carminascens</i> | CBS 144740 | <i>Z. mays</i> | MH485026 | - | MH484935 |
| <i>F. contaminatum</i> | CBS 111552 | Pasteurized fruit juice | MH484991 | - | MH484900 |
| <i>F. contaminatum</i> | CBS 114899T | Pasteurized chocolate milk | MH484992 | - | MH484901 |
| <i>F. cugenangense</i> | CBS 131393 | Faba bean root | MH485019 | - | MH484928 |
| <i>F. cugenangense</i> | InaCC F984T | <i>Musa sp.</i> | LS479757 | LS479560 | LS479308 |
| <i>F. curvatum</i> | CBS 238 94T | <i>Beaucarnia sp.</i> | MH484984 | - | MH484893 |
| <i>F. duoseptatum</i> | CBS 102026 | <i>Musa sapientum</i> | MH484987 | - | MH484896 |
| <i>F. duoseptatum</i> | NRRL 36115 | <i>Musa acuminata</i> | LS479666 | LS479475 | LS479218 |
| <i>F. elaeidis</i> | CBS 217 49T | <i>Elais sp.</i> | MH484961 | MW928805 | MH484870 |
| <i>F. elaeidis</i> | CBS 218 49 | <i>Elais sp.</i> | MH484962 | - | MH484871 |
| <i>F. fabacearum</i> | CPC 25801 | <i>Z. mays</i> | MH485029 | MZ921691 | MH484938 |
| <i>F. fabacearum</i> | CPC 25802T | <i>Glycine max</i> | MH485030 | MW024605 | MH484939 |
| <i>F. fabacearum</i> | CPC 25803 | <i>G. max</i> | MH485031 | - | MH484940 |
| <i>F. fabacearum</i> | NRRL 54005 | <i>Arabidopsis sp.</i> | LS479674 | - | LS479482 |
| <i>F. glycines</i> | CBS 200 89 | <i>Ocimum basilicum</i> | MH484979 | - | MH484888 |
| <i>F. glycines</i> | CPC 25808T | <i>G. max</i> | MH485033 | MW928809 | MH484942 |
| <i>F. gossypinum</i> | URM8695 | <i>M. esculenta</i> | - | OQ850373 | OQ850342 |
| <i>F. gossypinum</i> | CBS 116611 | <i>Gossypinum hirsutum</i> | MH484998 | MH484998 | MH484907 |
| <i>F. gossypinum</i> | CBS 116612 | <i>G. hirsutum</i> | MH484999 | MH484999 | MH484908 |
| <i>F. gossypinum</i> | CBS 116613T | <i>G. hirsutum</i> | MH485000 | OP486425 | MH484909 |
| <i>F. grosnichelii</i> | URM8692 | <i>M. esculenta</i> | OQ973322 | OQ850370 | OQ850339 |
| <i>F. grosnichelii</i> | URM8693 | <i>M. esculenta</i> | OQ973323 | OQ850371 | OQ850340 |
| <i>F. grosnichelii</i> | URM8694 | <i>M. esculenta</i> | OQ973324 | OQ850372 | OQ850341 |
| <i>F. grosnichelii</i> | InaCC F833T | <i>Musa sp.</i> | LS479744 | LS479548 | LS479295 |
| <i>F. grosnichelii</i> | Indo18 | Unknown | LS479738 | LS479542 | LS479289 |
| <i>F. grosnichelii</i> | Indo19 | <i>Vigna unquiculata</i> | ON032394 | - | ON398186 |
| <i>F. hexaseptatum</i> | InaCC F866T | <i>M. acuminata</i> | LS479805 | - | LS479359 |

| | | | | | |
|-------------------------------|----------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>F. hoodiae</i> | CBS 132474T | <i>Hoodia gordonii</i> | MH485020 | - | MH484929 |
| <i>F. inflexum</i> | NRRL 20433T | Unknown | AF008479 | JX171469. | JX171583 |
| <i>F. kalimantanense</i> | Indo110 | Unknown | LS479690 | LS479497 | LS479241 |
| <i>F. kalimantanense</i> | Indo111 | Unknown | LS479691 | - | LS479242 |
| <i>F. languescens</i> | CBS 413 90 | <i>Solanum lycopersicum</i> | MH484981 | - | MH484890 |
| <i>F. languescens</i> | CBS 645 78T | <i>S. lycopersicum</i> | MH484971 | - | MH484880 |
| <i>F. libertatis</i> | CPC 25788 | <i>Aspalathus sp.</i> | MH485024 | - | MH484944 |
| <i>F. libertatis</i> | CPC 28465T | Rock surface | MH485035 | - | MH484864 |
| <i>F. nirenbergiae</i> | CBS 196 87 | <i>Bouvardia longiflora</i> | MH484977 | - | MH484886 |
| <i>F. nirenbergiae</i> | CBS 840 88T | <i>Dianthus caryophyllus</i> | MH484978 | - | MH484887 |
| <i>F. odoratissimum</i> | InaCC F822T | <i>Musa sp.</i> | LS479828 | LS479618 | LS479386 |
| <i>F. odoratissimum</i> | InaCC F824 | <i>Musa sp.</i> | LS479678 | LS479486 | LS479229 |
| <i>F. oxysporum</i> | CBS 144134T | <i>S. tuberosum</i> | MH484944 | - | MH484853 |
| <i>F. oxysporum</i> | CBS 144135 | <i>S. tuberosum</i> | MH484945 | - | MH484854 |
| <i>F. pharetrum</i> | CPC 30824T | <i>Aliodendron dichotomum</i> | MH485043 | - | MH484952 |
| <i>F. phialophorum</i> | InaCC F971T | <i>Musa sp.</i> | LS479292 | LS479545 | LS479741 |
| <i>F. phialophorum</i> | NRRL 36101 | <i>Musa sp.</i> | LS479654 | LS479467 | LS479208 |
| <i>F. sangayamense</i> | InaCC F960T | <i>Musa sp.</i> | LS479732 | LS479537 | LS479283 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8696 | <i>M. esculenta</i> | OQ973325 | - | OQ850343 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8727 | <i>M. esculenta</i> | OR257062 | OQ863606 | OQ850344 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8728 | <i>M. esculenta</i> | OR257063 | OQ863607 | OQ850345 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8729 | <i>M. esculenta</i> | OR257064 | OQ863608 | OQ850346 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8734 | <i>M. esculenta</i> | OR257065 | OQ863609 | OQ850347 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8725 | <i>M. esculenta</i> | - | - | OQ850348 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8702 | <i>M. esculenta</i> | OR257066 | OQ863610 | OQ850349 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8703 | <i>M. esculenta</i> | OR257067 | - | OQ850350 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8726 | <i>M. esculenta</i> | OR257068 | OQ863611 | OQ850351 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8730 | <i>M. esculenta</i> | OR257069 | OQ863612 | OQ850352 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8731 | <i>M. esculenta</i> | OR257070 | OQ863613 | OQ850353 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8732 | <i>M. esculenta</i> | OR333783 | OQ973310 | OQ850354 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8746 | <i>M. esculenta</i> | OR333784 | - | OQ850355 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8733 | <i>M. esculenta</i> | OR333785 | OQ973311 | OQ850356 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8747 | <i>M. esculenta</i> | OR333786 | OQ973312 | OQ850357 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8704 | <i>M. esculenta</i> | OR333787 | - | OQ850358 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8705 | <i>M. esculenta</i> | OR333788 | - | OQ850359 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8706 | <i>M. esculenta</i> | OR333789 | OQ973313 | OQ850360 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8707 | <i>M. esculenta</i> | OR333790 | OQ973314 | OQ850361 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8708 | <i>M. esculenta</i> | OR333791 | OQ973315 | OQ850362 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8709 | <i>M. esculenta</i> | OR333792 | OQ973316 | OQ850363 |
| <i>Fusarium sp.</i> | URM8710 | <i>M. esculenta</i> | OR333793 | OQ973317 | OQ850364 |
| <i>F. tardichlamydosporum</i> | Indo158 | Unknown | LS479729 | LS479534 | LS479280 |
| <i>F. tardicrescens</i> | CBS 102024T | dead bark | ON032440 | - | - |
| <i>F. triseptatum</i> | URM8687 | <i>M. esculenta</i> | OQ973318 | OQ850365 | OQ850334 |
| <i>F. triseptatum</i> | URM8688 | <i>M. esculenta</i> | OQ973319 | OQ850366 | OQ850335 |
| <i>F. triseptatum</i> | URM8689 | <i>M. esculenta</i> | OQ973320 | OQ850367 | OQ850336 |
| <i>F. triseptatum</i> | URM8690 | <i>M. esculenta</i> | - | OQ850368 | OQ850337 |
| <i>F. triseptatum</i> | URM8691 | <i>M. esculenta</i> | OQ973321 | OQ850369 | OQ850338 |
| <i>F. triseptatum</i> | CBS 119665 | Sago starch | MH485007 | - | MH484916 |
| <i>F. triseptatum</i> | CBS 130302 | Human eye | MH485015 | - | MH484924 |
| <i>F. triseptatum</i> | CBS 116619 | <i>G. hirsutum</i> | MH485001 | - | MH484910 |

| | | | | | |
|---------------------------------|----------------|---|-----------------|----------|----------|
| <i>F. triseptatum</i> | CBS 258 50T | <i>I. batatas</i> | MH484964 | MW928820 | MH484873 |
| <i>F. udum</i> | CBS 177 31 | <i>Digitaria eriantha</i> | MH484957 | MH484957 | MH484866 |
| <i>F. vanleeuwenii</i> | CBS 148372T | Soil | MZ921896 | MZ921669 | MZ921765 |
| <i>F. vanleeuwenii</i> | CBS 148374 | Soil | MZ921897 | MZ921670 | MZ921766 |
| <i>F. veterinarium</i> | CBS 109898T | Shark | MH484990 | - | MH484899 |
| <i>F. veterinarium</i> | CBS 117787 | peritoneum Swab sample near filling apparatus | MH485003 | - | MH484912 |
| <i>Geejayessia celtidicola</i> | CBS 125502T | <i>Geejayessia celtidicola</i> | KM232232 | MW834197 | HM626685 |
| <i>Neocosmospora acutispora</i> | CBS 145461T | <i>Coffea arabica</i> | LR583593 | - | - |
| <i>N. ampla</i> | CBS 202 32T | <i>Coffea sp.</i> | LR583594 | - | - |
| <i>N. bataticola</i> | NRRL 22400 | <i>I. batatas</i> | AF178343 | - | - |
| <i>N. bataticola</i> | NRRL 22402T | <i>I. batatas</i> | AF178344 | - | - |
| <i>N. brevicona</i> | CBS 204 31T | <i>Gladiolus sp.</i> | LR583600 | - | - |
| <i>N. citricola</i> | CBS 146512 | <i>Citrus sinensis</i> | MW248746 | - | - |
| <i>N. citricola</i> | CBS 146513T | <i>C. sinensis</i> | MW248747 | - | - |
| <i>N. crassa</i> | CBS 144386T | Unknown | LR583604 | - | - |
| <i>N. cryptoseptata</i> | NRRL 22412T | Bark | AF178351 | - | - |
| <i>N. cucurbitae</i> | NRRL 22399T | <i>Cucurbita viciifolia</i> | DQ247592 | - | - |
| <i>N. cucurbitae</i> | NRRL 22658 | <i>C. viciifolia</i> | DQ247640 | - | - |
| <i>N. elegans</i> | NRRL 22163 | Unknown | AF178328 | - | - |
| <i>N. elegans</i> | NRRL 22277T | Unknown | AF178336 | - | - |
| <i>N. falciformis</i> | URM8740 | <i>M. esculenta</i> | OR333775 | - | - |
| <i>N. falciformis</i> | URM8741 | <i>M. esculenta</i> | OR333776 | - | - |
| <i>N. falciformis</i> | URM8742 | <i>M. esculenta</i> | OR333777 | - | - |
| <i>N. falciformis</i> | URM8743 | <i>M. esculenta</i> | OR333778 | - | - |
| <i>N. falciformis</i> | URM8744 | <i>M. esculenta</i> | OR333779 | - | - |
| <i>N. falciformis</i> | URM8745 | <i>M. esculenta</i> | OR333780 | - | - |
| <i>N. falciformis</i> | URM8748 | <i>M. esculenta</i> | OR333781 | - | - |
| <i>N. falciformis</i> | URM8749 | <i>M. esculenta</i> | OR333782 | - | - |
| <i>N. falciformis</i> | CBS 121450 | Unknown | JX435161 | - | - |
| <i>N. falciformis</i> | CBS 475 67T | <i>Paspalum vaginatum</i> | MW620171 | - | - |
| <i>N. falciformis</i> | NRRL 32718 | Human eye | DQ247038 | - | - |
| <i>N. gamtoosensis</i> | CBS 146502T | <i>C. sinensis</i> | MW248762 | - | - |
| <i>N. haematococca</i> | CBS 119600T | Tree | KM231926 | - | - |
| <i>N. illudens</i> | NRRL 22090 | Unknown | AF178326 | - | - |
| <i>N. ipomoeae</i> | CBS 353 87 | <i>Gerbera sp.</i> | DQ247639 | - | - |
| <i>N. ipomoeae</i> | NRRL 22657 | <i>Capiscum annuum</i> | DQ247639 | - | - |
| <i>N. keleraja</i> | CBS 125720 | Unidentified tree | LR583612 | - | - |
| <i>N. keleraja</i> | CBS 125722T | Unidentified tree | DQ247515 | - | - |
| <i>N. keratoplasticum</i> | CBS 144389 | Greenhouse humic soil | LR583613 | - | - |
| <i>N. keratoplasticum</i> | CBS 490 63T | Unknown | JX435168 | - | - |
| <i>N. kurunegalense</i> | FRC S1833T | Recently cut tree | DQ247511 | - | - |
| <i>N. lichenicola</i> | CBS 509 63 | Air | LR583618 | - | - |

| | | | | | |
|---------------------------|-------------|---------------------------|----------|---|---|
| <i>N. lichenicola</i> | CBS 623 92T | Human necrotic wound | LR583620 | - | - |
| <i>N. mahasenii</i> | CBS 119594T | Rotting wood | DQ247519 | - | - |
| <i>N. martii</i> | CBS 115659T | <i>S. tuberosum</i> | JX435156 | - | - |
| <i>N. merxiana</i> | CBS 146525T | <i>Chrysanthemum</i> sp. | MW834288 | - | - |
| <i>N. merxiana</i> | CBS 146526 | <i>Chrysanthemum</i> sp. | MW834289 | - | - |
| <i>N. nirenbergiana</i> | NRRL 22387T | Unknown | AF178339 | - | - |
| <i>N. noneumartii</i> | CBS 115658T | <i>S. tuberosum</i> | JX435163 | - | - |
| <i>N. paraeumartii</i> | NRRL 13997T | <i>S. tuberosum</i> | DQ247549 | - | - |
| <i>N. phaseoli</i> | NRRL 22276 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | EF408415 | - | - |
| <i>N. phaseoli</i> | NRRL 22411 | <i>Phaseolus</i> sp. | FJ919464 | - | - |
| <i>N. piperis</i> | NRRL 22570T | <i>Piper nigrum</i> | AF178360 | - | - |
| <i>N. plagianthi</i> | NRRL 22632 | <i>Hoheria glabrata</i> | AF178354 | - | - |
| <i>N. protoensiformis</i> | NRRL 22178T | Dicot tree | AF178334 | - | - |
| <i>N. rectiphora</i> | CBS 125726 | Dead tree | JF433026 | - | - |
| <i>N. rectiphora</i> | CBS 125727T | Dead tree perithecial | JF433027 | - | - |
| <i>N. robusta</i> | NRRL 22395T | Bark | AF178341 | - | - |
| <i>N. samuelsii</i> | CBS 114067T | Bark | LR583644 | - | - |
| <i>N. solani</i> | CBS 140079T | <i>S. tuberosum</i> | KT313611 | - | - |
| <i>N. stercicola</i> | CBS 142481T | Subterranean clover | KY556524 | - | - |
| <i>N. stercicola</i> | CBS 42481 | Soil | UMB36324 | - | - |
| <i>N. suttoniana</i> | NRRL 32858T | Human wound | AYV96276 | - | - |
| <i>N. suttoniana</i> | NRRL 54972 | Equine eye | AGR92159 | - | - |
| <i>N. tonkinensis</i> | CBS 118931 | <i>S. lycopersicum</i> | JX435154 | - | - |
| <i>N. tonkinensis</i> | CBS 115 40T | <i>M. sapientum</i> | LT906672 | - | - |
| <i>N. vasinfecta</i> | CBS 446 93T | Soil | LR583670 | - | - |
| <i>N. vasinfecta</i> | NRRL 22436 | Soil | AF178348 | - | - |
| <i>N. vasinfecta</i> | CBS 533 65 | Unknown | LR583671 | - | - |

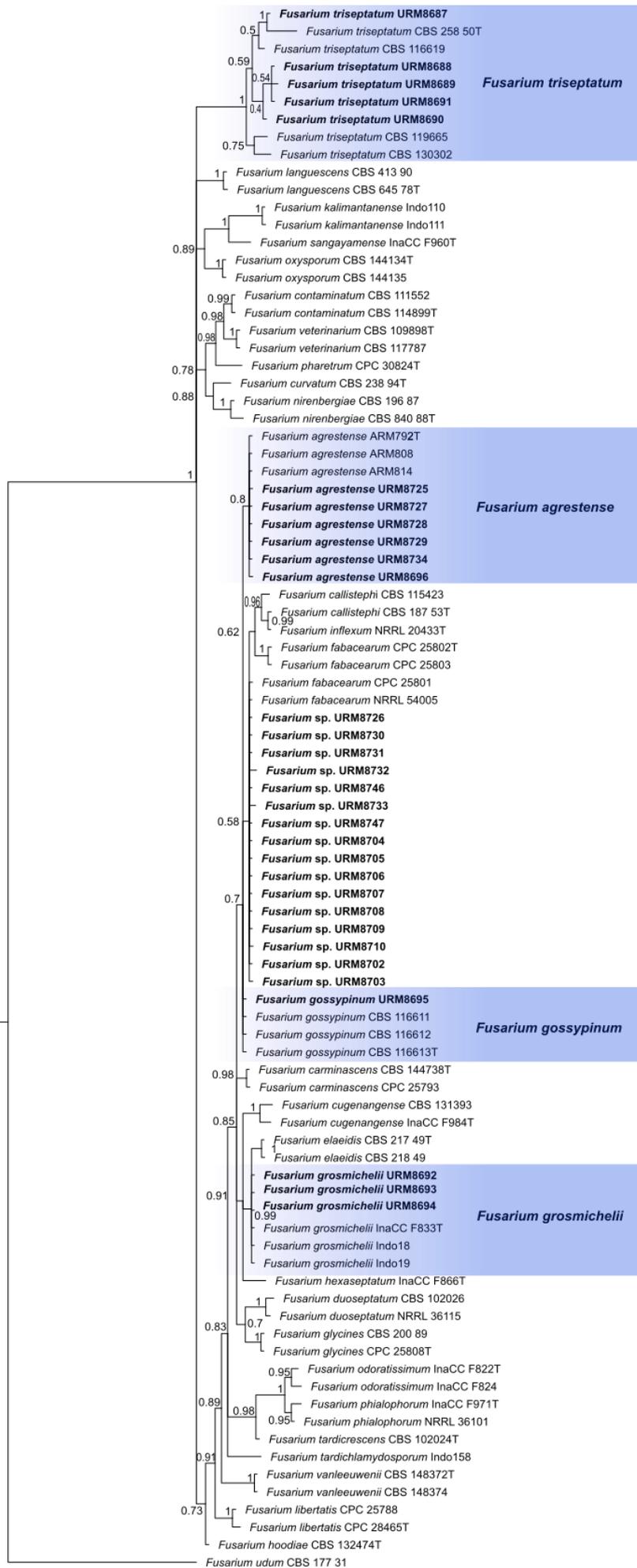


Figura 1: Árvore de inferência bayesiana baseada em um conjunto de dados combinado *TEFI- α* , *RPB1* e *RPB2* de membros do complexo de espécies *Fusarium oxysporum* (FOSC). As probabilidades posteriores bayesianas são mostradas nos entrenós. As cepas identificadas neste estudo estão em negrito. Sequências de *Fusarium udum* (CBS 177 31) foram utilizadas como grupo externo.

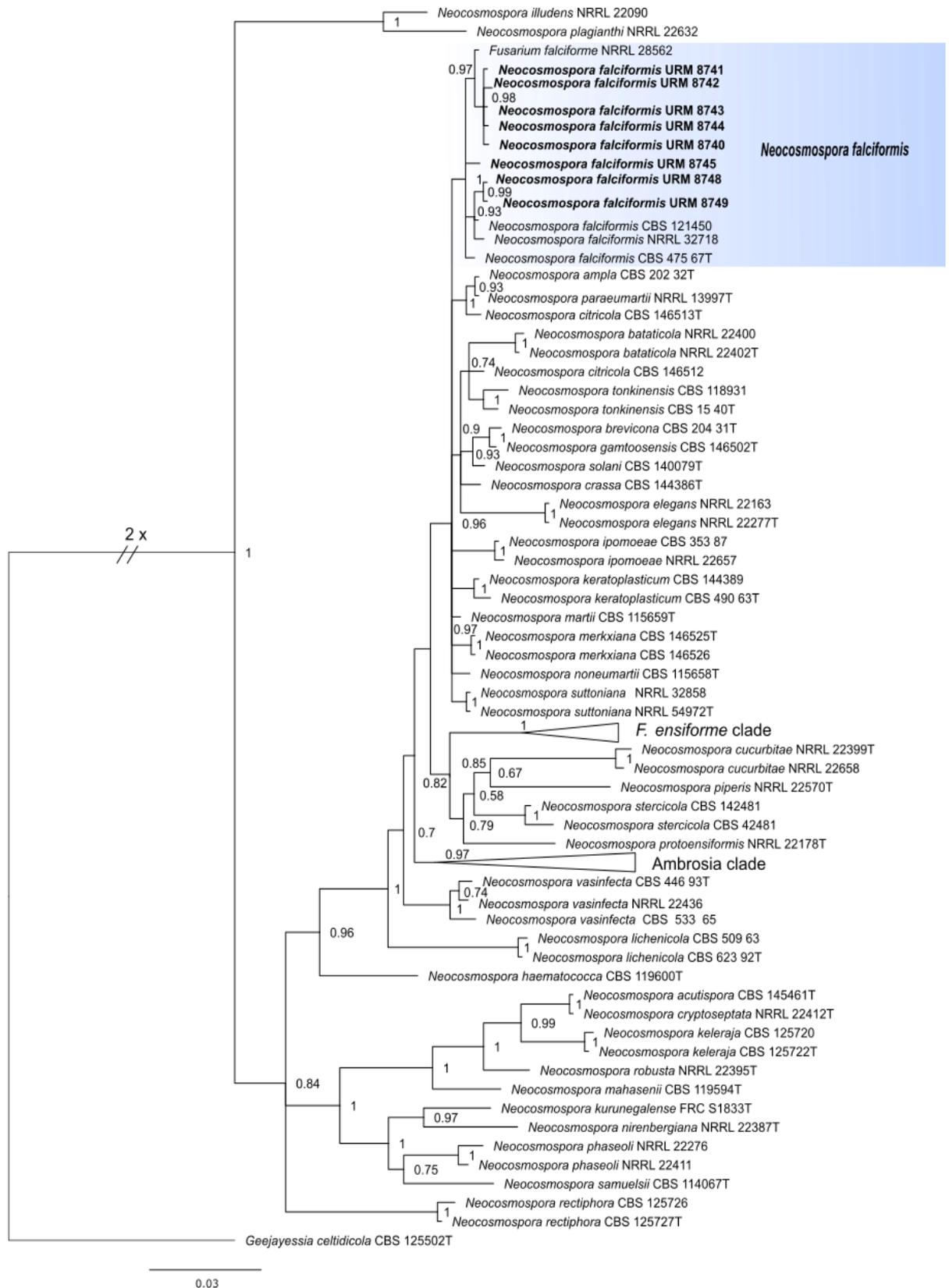


Figura 2. Árvore de inferência bayesiana baseada em sequências *TEF1- α* de membros do gênero *Neocosmospora*. As probabilidades posteriores bayesianas são mostradas nos entrenós. As cepas identificadas neste estudo estão em negrito. A sequência de *Geejayessia celtidicola* (CBS 125502) foi utilizada como grupo externo.

A patogenicidade de *F. triseptatum* URM 8690, *F. agrestense* URM 8727, *F. gossypinum* URM 8695, *F. grosnichelii* URM 8694, *Fusarium* sp. URM 8733; *Fusarium* sp. URM 8705, *Fusarium* sp. URM 8703 e *N. falciformis* URM 8749 foi confirmada em testes realizados em raízes tuberosas de mandioca (Figura 3) e plântulas (Figura 4). Sete dias após a inoculação, todos os tubérculos de mandioca apresentavam lesões com aspecto seco e coloração amarelada no centro e escuras nas bordas, originadas no ponto onde foi inserido o arroz colonizado, migrando para as laterais do ponto de inoculação (Figura 3). Setenta e oito dias após a inoculação no solo, as mudas apresentaram sintomas de murchamento, amarelecimento e folhas secas, com áreas necróticas, amareladas a acastanhadas no material de propagação vegetal que se estende pelo sistema vascular das plantas (Figura 4). Em ambos os testes de patogenicidade, o controle negativo-positivo apresentou-se saudável, sem sintomas de podridão radicular.



Figura 3. Resultados do teste de patogenicidade mostrando espécies fusarioides causando necrose em tubérculos de mandioca sete dias após a inoculação. (A) *Fusarium grosnichelii* URM 8694; (B) *F. gossypinum* URM 8695; (C) *F. agrestense* URM 8727; (D) *F. triseptatum* URM 8690; (E) *Fusarium* sp. URM 8733; (F) *Fusarium* sp. URM 8705; (G); *Fusarium* sp. URM 8703; (H) *N. falciformis* URM 8749; (I) tratamento controle sem sintomas de podridão radicular.



Figura 4. Espécies fusarioides causando podridão em plantas de mandioca setenta e oito dias após a inoculação. (A) *Fusarium grosmichelii* URM 8694; (B) *F. gossypinum* URM 8695; (C) *F. agrestense* URM 8727; (D) *F. triseptatum* URM 8690; (E) *Fusarium* sp. URM 8733; (F) *Fusarium* sp. URM 8705; (G); *Fusarium* sp. URM 8703; (H) *N. falciformis* URM 8749; (I) tratamento controle sem sintomas de podridão radicular.

4. Discussão

Este é o primeiro estudo a utilizar a análise filogenética multilocus (MLPA) para identificar espécies de fusarióides associadas à podridão radicular da mandioca. Aqui, identificamos quatro espécies do complexo *Fusarium oxysporum* (*F. triseptatum*, *F. agrestense*, *F. gossypinum*, *F. grosnichelii*) e uma espécie do gênero *Neocosmospora* (*N. falciformis*). A podridão radicular é uma das doenças mais limitantes para as culturas de mandioca, ocorrendo em todo o mundo, causando perdas de rendimento de até 100% em algumas plantações (ADEDIRE et al., 2023). Os fungos fusarióides são comumente associados à podridão radicular seca (DRR) na mandioca, destacando a grande diversidade de espécies que causam doenças nas culturas de mandioca nos países africanos (HOHENFELD et al., 2024). Nosso estudo confirma que diversas espécies fusarióides estão envolvidas na etiologia da podridão seca das raízes da mandioca.

Os fungos do gênero fusarióide têm distribuição mundial, afetam muitos hospedeiros e estão entre os patógenos mais importantes de plantas, animais e humanos (O'DONNELL et al., 2010). Os fungos fusarióides são de grande importância econômica e fitopatológica, pois causam doenças em culturas importantes, como banana e cucurbitáceas, bem como em plantas ornamentais (GUARNACCIA et al., 2019; MARYANI et al., 2019). As espécies fusarióides apresentam grande variabilidade morfológica e as características morfológicas de várias espécies, muitas vezes, se sobrepõem, conseqüentemente, a identificação baseada apenas nas características morfológicas resultou na identificação incorreta de muitas espécies (AOKI et al., 2014). A identificação incorreta de espécies favorece a ambiguidade na nomenclatura, resultando em extensas revisões taxonômicas (RANA et al., 2022).

Neste estudo, as regiões genéticas utilizadas para identificar os isolados foram *TEF1- α* , *RPB1* e *RPB2*. Utilizamos os loci que apresentam boa capacidade discriminatória em nível de espécie (O'DONNELL et al., 2015), considerados os melhores marcadores para identificação molecular de espécies de fusarióides (SANTOS et al., 2019). Apesar de utilizar as regiões genéticas mais informativas para discriminar espécies de fusarióides, essas regiões mostraram poder discriminatório limitado para alguns clados que foram colapsados em uma politomia no FOSC. Isolados não identificados também foram submetidos ao teste de patogenicidade e merecem ser melhor caracterizados futuramente. Os problemas topológicos e as dificuldades de congruência dos limites filogenéticos das espécies dentro do FOSC podem estar relacionados à transferência horizontal de genes entre isolados e processos de recombinação, e à classificação incompleta de linhagens, que pode mascarar relações evolutivas entre táxons intimamente relacionados (ACHARI et al., 2020).

Todas as espécies testadas foram patogênicas e causaram necrose nas raízes da mandioca. Este estudo foi realizado em apenas um local de cultivo, indicando uma grande diversidade de fungos fusarióides associados ao complexo de patógenos causadores da podridão radicular da mandioca, necessitando de uma investigação mais abrangente da possível ocorrência de uma maior diversidade de espécies de fusarióides. As plantas na natureza podem interagir com uma grande variedade de espécies

patogênicas, o que pode interferir no curso e na gravidade das doenças (ABDULLAH et al., 2017). A ocorrência de diferentes espécies patogênicas de fusarióides no mesmo hospedeiro em uma única área de cultivo indica que a podridão radicular da mandioca é uma doença complexa. As espécies fusarióides poderiam ter uma ação sinérgica na quebra das defesas do hospedeiro (DOBBS et al., 2021). Por exemplo, a coinfeção por *F. verticillioides* e *F. oxysporum* suprime a expressão de metabólitos secundários envolvidos nos mecanismos de defesa das plantas, favorecendo a infecção por vários outros fungos relacionados (Abdullah et al., 2017). Além disso, alguns fungos fusarióides, como *F. oxysporum* e *N. solani*, podem transferir cromossomos específicos dispensáveis para cepas receptoras, conferindo maior competitividade e capacidade de causar doenças em plantas hospedeiras (DOBBS et al., 2021).

Neste estudo, o complexo de espécies de *F. oxysporum* (FOSC) apresentou a maior diversidade de espécies associadas à podridão radicular da mandioca. Este grupo de fungos foi recentemente dividido e reclassificado em diversas espécies diferentes com base na variabilidade genética dos isolados (LOMBARD et al., 2019). *Fusarium oxysporum* é a mais importante economicamente entre as espécies patogênicas de fusarióides, contendo patógenos responsáveis pela murcha vascular, apodrecimento e tombamento de uma ampla gama de culturas agrônômicas importantes (EDEL-HERMANN; LECOMTE, 2019). As espécies deste complexo são as espécies fusarióides mais associadas à podridão das raízes da mandioca nos países africanos, resultando em grandes perdas econômicas (BANDYOPADHYAY et al., 2006, ZINSOU et al., 2017). Patógenos do complexo de espécies *F. oxysporum* (FOSC) também são encontrados causando doenças em muitas culturas, como banana, algodão, soja, feijão, tomate, cebola e melão (EDEL-HERMANN; LECOMTE, 2019). A ocorrência de FOSC em uma ampla variedade de hospedeiros é um obstáculo para o controle da doença em campo. Embora sejam conhecidos mundialmente por causarem doenças em culturas de grande importância econômica, nenhuma das espécies FOSC identificadas neste estudo tinha sido previamente reportada infectando a mandioca. Portanto, este é o primeiro relato de associação de *F. triseptatum*, *F. agrestense*, *F. gossypinum* e *F. grosnichelii* com podridão radicular em mandioca.

A identificação dos agentes etiológicos é crucial para que as medidas de manejo e controle sejam implementadas adequadamente, uma vez que diferentes patógenos podem responder de maneira diferente a eles. Também permite conectar o que se sabe sobre a distribuição, distribuição geográfica e potencial de produção de toxinas das espécies identificadas (O'DONNELL et al., 2022). Além disso, como muitas espécies do FOSC, *F. triseptatum* e *F. grosnichelii* formam clamidósporos (LOMBARD et al., 2019; MARYANI et al., 2019), esporos de sobrevivência de paredes espessas, resistentes à dessecação e resilientes em condições ambientais desfavoráveis. A produção desses esporos pode contribuir para aumentar a persistência desses fungos no solo e a sobrevivência na ausência do hospedeiro primário (DITA et al., 2018).

Fusarium triseptatum é uma espécie recém-descoberta alocada no FOSC, conhecida por causar infecção em plantas e humanos (CROUS et al., 2021), e foi

relatada pela primeira vez nos Estados Unidos, isolada da batata-doce (LOMBARD et al., 2019). Esta espécie tem sido associada ao apodrecimento das raízes nas plantações de banana na Costa Rica (JIMÉNEZ, 2022). Isolados desta espécie foram encontrados em solos de jardins na Holanda, que também relatou a ocorrência de várias outras espécies FOSS (CROUS et al., 2021). Ainda existem poucos relatos de *F. triseptatum* em todo o mundo e, até onde sabemos, este é o primeiro relato de *F. triseptatum* em plantas no Brasil.

Fusarium agrestense foi relatado pela primeira vez no estado de Pernambuco, Brasil, isolado de plantas de batata-doce com sintomas de podridão de caule e raiz (MELLO et al., 2024). Desde sua descrição, não houve outros relatos da espécie e, até onde sabemos, este é o primeiro relato de *F. agrestense* em mandioca no mundo. Outra espécie identificada neste estudo foi *Fusarium gossypinum*, foi alocada no FOSS por Lombard et al., (2019) e foi relatada pela primeira vez em Bouaké, Costa do Marfim, isolada de algodoeiro com sintomas de murcha. Este fungo tem sido associado a doenças em culturas de importância econômica e foi recentemente isolado do sorgo e do solo da rizosfera na Etiópia (LOMBARD et al., 2022). Além disso, foi apontado como causa da murcha do inhame na China (DONGZHEN et al., 2020). No Brasil, foi relatado que *F. gossypinum* causa murcha vascular em grão de bico em lavouras nos estados de Goiás e Distrito Federal (SOUZA, 2020).

Fusarium grosnichelii foi relatado pela primeira vez em Java, Indonésia, como patógeno de bananeiras da cultivar Gros Michel (MARYANI et al., 2019). No entanto, sua patogenicidade não foi encontrada em plantas da variedade Cavendish, que é uma variedade resistente a doenças e comercializada mundialmente. Esta espécie foi isolada de plantas de feijão-caupi na Índia (RANA et al., 2022) e foi relatada como causadora de podridão da bainha em plantas de arroz na Indonésia (PRAMUNADIPTA et al., 2022). Porém, até onde sabemos, este é o primeiro relato de *F. grosnichelii* associado a doenças em plantas no Brasil.

A segregação de *Neocosmospora* como gênero distinto de *Fusarium* sensu stricto para reter espécies anteriormente classificadas no complexo de espécies de *F. solani* dentro do gênero *Fusarium* ainda é questionada. Alguns pesquisadores preferem conservar o nome genérico *Fusarium* para incluir também o gênero *Neocosmospora* (CROUS et al., 2021), porém, os autores deste artigo optam por uma classificação não apenas baseada em evidências filogenéticas moleculares, mas também morfológicas, ecológicas e bioquímicas. Embora haja controvérsia por parte dos pesquisadores, o uso do nome genérico *Neocosmospora* é incentivado e tem se tornado frequente (SABAHI et al., 2023).

Neocosmospora falciformis (sin. *F. falciforme*) foi responsável pelo maior número de isolados entre as espécies isoladas de fusarióides obtidas neste estudo. Este patógeno foi relatado causando podridão radicular em mandioca, variedade Rosinha, no estado de Alagoas, Brasil (SILVA et al., 2022). Entretanto, esta é a primeira ocorrência de *N. falciformis* associada à podridão radicular em mandioca no estado de Pernambuco. *Neocosmospora falciformis* é uma espécie comum e amplamente

distribuída no mundo e está associada a doenças em muitos hospedeiros, configurando-se como um dos mais importantes grupos de fungos fitopatogênicos (SANDOVAL-DENIS et al., 2019). Já foi relatado que este patógeno causa doenças em culturas de importância econômica, como o feijão comum em Cuba (DUARTE et al., 2019) e o mamão no México (VEGA-GUTIÉRREZ et al., 2019). No Brasil, foi relatado que causa podridão radicular em plantas de soja (COSTA et al., 2016).

Embora muitas infecções tenham sido atribuídas a *N. solani*, estudos filogenéticos demonstraram que infecções por *Neocosmospora* spp. não são causados apenas por uma espécie (CROUS et al., 2021). Muitos estudos apontam *F. solani* como patógeno baseado apenas na identificação morfológica ou na análise do espaçador interno de transcrição (ITS). Contudo, o marcador ITS não fornece informação suficiente para a identificação de todas as espécies de *Fusarium* (O'DONNELL et al., 2015). Isto indica a necessidade de utilizar a análise filogenética multigênica para identificar com precisão espécies patogênicas de fusarióides.

As informações obtidas neste estudo são essenciais para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle e manejo de doenças causadas por fungos fusarióides na mandioca. Além disso, nossos dados contribuem para o conhecimento da distribuição geográfica e dos hospedeiros desses patógenos, permitindo identificar quais culturas podem ser uma possível fonte de inóculo para esses patógenos nas culturas de mandioca. Os resultados obtidos neste estudo sugerem a existência de uma comunidade diversificada de espécies de fusarióides associadas à podridão radicular da mandioca, fornecendo uma visão sobre as espécies associadas a esta doença e levantando a hipótese de que um estudo mais abrangente em áreas de cultivo de mandioca poderá encontrar ainda maior diversidade de espécies.

5. Referências

- ABDULLAH, Araz S. et al. Host–multi-pathogen warfare: pathogen interactions in co-infected plants. *Frontiers in plant science*, v. 8, p. 1806, 2017.
- ACHARI, Saidi R. et al. Phylogenetic relationship between Australian *Fusarium oxysporum* isolates and resolving the species complex using the multispecies coalescent model. *BMC genomics*, v. 21, p. 1-20, 2020.
- ADEDIRE, Oluwafemi Michael; ODUWAYE, Olubusola Fehintola; FASHOLA, Olutoye Olushola. Biocontrol of cassava root-rot mycopathogens with antimicrobial extracts of wood shavings. *Journal of Crop Improvement*, v. 35, n. 5, p. 745-761, 2021.
- AOKI, Takayuki; O'DONNELL, Kerry; GEISER, David M. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, v. 80, p. 189-201, 2014.
- BAHADUR, Amar. Current status of *Fusarium* and their management strategies. In: *Fusarium-An Overview of the Genus. IntechOpen*, 2021.
- BANDYOPADHYAY, Ranajit et al. *Fusarium* species from the cassava root rot complex in West Africa. *Phytopathology*, v. 96, n. 6, p. 673-676, 2006.

BARBOSA, Renan do Nascimento et al. Brazilian tropical dry forest (Caatinga) in the spotlight: an overview of species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* (Eurotiales) and the description of *P. vascosobrinhou* sp. nov. *Acta Botanica Brasilica*, v. 34, p. 409-429, 2020.

BELLÉ, Rafael; FONTANA, Daniele Cristina. Patógenos de solo: principais doenças vasculares e radiculares e formas de controle. *Enciclopédia biosfera*, v. 15, n. 28, 2018.

BRITO, A. C. Q. et al. Diversity and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species associated with black root rot and stem cutting dry rot in *Manihot esculenta* in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, v. 157, p. 583-598, 2020.

CLAUDINO, Monaliza R.; SOARES, Dartanha J. Pathogenicity and aggressiveness of *Macrophomina phaseolina* isolates to castor (*Ricinus communis*). *Tropical Plant Pathology*, v. 39, p. 453-456, 2014.

COSTA, Sarah S. et al. *Fusarium paranaense* sp. nov., a member of the *Fusarium solani* species complex causes root rot on soybean in Brazil. *Fungal Biology*, v. 120, n. 1, p. 51-60, 2016.

CROUS, Pieter Willem et al. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies in mycology*, v. 98, p. 100116, 2021.

DITA, Miguel et al. *Fusarium* wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Frontiers in plant science*, v. 9, p. 1468, 2018.

DOBBS, John T. et al. *Fusarium* spp. diversity associated with symptomatic *Acacia koa* in hawai'i. *Forest Pathology*, v. 51, n. 5, p. e12713, 2021.

DONGZHEN, Fang et al. *Fusarium* species and *Fusarium oxysporum* species complex genotypes associated with yam wilt in South-Central China. *Frontiers in microbiology*, v. 11, p. 1964, 2020.

DUARTE, Y. et al. First report of *Fusarium falciforme* affecting common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Cuba. *New Disease Reports*, v. 40, n. 9, p. 2044-0588.2019, 2019.

EDEL-HERMANN, Véronique; LECOMTE, Charline. Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology*, v. 109, n. 4, p. 512-530, 2019.

GUARNACCIA, Vladimiro et al. Soilborne diseases caused by *Fusarium* and *Neocosmospora* spp. on ornamental plants in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, v. 58, n. 1, p. 127-138, 2019.

HOHENFELD, Camila Santiago et al. Comparative analysis of infected cassava root transcriptomics reveals candidate genes for root rot disease resistance. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, p. 10587, 2024.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>

VEGA JIMÉNEZ, Jafet. Eficacia in vitro de formulaciones comerciales de *Trichoderma* Pers., en el combate de *Fusarium oxysporum* Schltdl. sensu lato y su efecto, sobre el desarrollo de plantas de banano (*Musa* sp., grupo AAA, subgrupo Cavendish) inoculadas con el patógeno a nivel de vivero en Río Frío, Sarapiquí, Costa Rica. 2022.

- LOMBARD, L. et al. *Fusarium* diversity associated with the Sorghum-Striga interaction in Ethiopia. *Fungal Systematics and Evolution*, v. 10, n. 1, p. 177-215, 2022.
- LOMBARD, L. et al. Epitypification of *Fusarium oxysporum*—clearing the taxonomic chaos. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v. 43, n. 1, p. 1-47, 2019.
- MACHADO, Alexandre Reis et al. *Botryosphaeriaceae* species causing dieback on *Annonaceae* in Brazil. *Plant Pathology*, v. 68, n. 7, p. 1394-1406, 2019.
- MADRASSI, Lucas Martín et al. *Clonostachys chloroleuca*: A novel pathogen causing cassava root rot disease in Misiones Province, Argentina. 2023.
- MARYANI, N. et al. Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. *Studies in mycology*, v. 92, n. 1, p. 155-194, 2019.
- MELLO, Juliana Ferreira et al. Species diversity of fusarioid genera associated with sweet potato in Brazil, including the description of a new species. *Plant Pathology*, v. 73, n. 4, p. 975-990, 2024.
- MILLER, Mark A.; PFEIFFER, Wayne; SCHWARTZ, Terri. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: 2010 gateway computing environments workshop (GCE). Ieee, 2010. p. 1-8.
- O'DONNELL, Kerry et al. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: A work in progress. *Plant disease*, v. 106, n. 6, p. 1597-1609, 2022.
- O'DONNELL, Kerry et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 5, p. 2044-2049, 1998.
- O'DONNELL, Kerry et al. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions. *Phytoparasitica*, v. 43, p. 583-595, 2015.
- O'DONNELL, Kerry et al. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 10, p. 3708-3718, 2010.
- PHAM, Cuong Viet; TRAN, Hong Thi. *Cunninghamella elegans* causing cassava root rot in Vietnam. *Australasian Plant Disease Notes*, v. 16, n. 1, p. 14, 2021.
- PRAMUNADIPTA, Syafiq et al. Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with the sheath rot disease of rice (*Oryza sativa*) in Indonesia. *Journal of Plant Pathology*, v. 104, n. 1, p. 251-267, 2022.
- RANA, Shiwali; SINGH, Sanjay Kumar; DUFOSSÉ, Laurent. Multigene phylogeny, beauvericin production and bioactive potential of *Fusarium* strains isolated in India. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 7, p. 662, 2022.
- RONQUIST, Fredrik; HUELSENBECK, John P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.
- SABAHI, Fatemeh et al. Molecular variability of the *Fusarium solani* species complex associated with *Fusarium* wilt of melon in Iran. *Journal of Fungi*, v. 9, n. 4, p. 486, 2023.

- SANDOVAL-DENIS, M.; LOMBARD, L.; CROUS, Pedro Willem. Back to the roots: a reappraisal of *Neocosmospora*. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v. 43, n. 1, p. 90-185, 2019.
- SANTOS, Ana Carla da Silva et al. Morphology, phylogeny, and sexual stage of *Fusarium caatingaense* and *Fusarium pernambucanum*, new species of the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex associated with insects in Brazil. *Mycologia*, v. 111, n. 2, p. 244-259, 2019.
- SILVA, Izael Oliveira et al. The first report about *Fusarium falciforme* that causes root rot in cassava cv Rosinha, in Alagoas state, Brazil. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 12, p. e221111234369-e221111234369, 2022.
- SILVA, Jenifer Stephanie Araujo da et al. *Diaporthe ueckeri* causing cassava root rot in Pernambuco, Brazil. *Crop Protection*, p. 106811, 2024.
- SUNG, Gi-Ho et al. A multi-gene phylogeny of *Clavicipitaceae* (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 44, n. 3, p. 1204-1223, 2007.
- TREMACOLDI, Célia Regina. Manejo das principais doenças da cultura da mandioca no estado do Pará. 2016.
- VEGA-GUTIÉRREZ, T. A. et al. *Fusarium falciforme* (FSSC 3+ 4) causing root and stem rot in papaya (*Carica papaya*) in Mexico. *Plant Disease*, v. 103, n. 10, p. 2681-2681, 2019.
- BOAS, Sandielle Araújo Vilas et al. Survey of fungi associated with cassava root rot from different producing regions in Brazil. *Scientia Agricola*, v. 74, n. 1, p. 60-67, 2017.
- ZINSOU, V. A. et al. Importance of fungal root rot pathogens of cassava in Benin. *Pak. J. Bot.*, v. 49, n. 5, p. 2023-2028, 2017.

CAPÍTULO II

***Diaporthe ueckeri* causando podridão radicular em mandioca no estado de Pernambuco, Brazil**

Resumo

A podridão da raiz da mandioca é uma doença altamente destrutiva e que causa grandes prejuízos no Brasil. A identificação dos agentes causais é essencial para o manejo desta doença. Raízes de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com sintomas de podridão radicular foram coletadas em uma lavoura de mandioca no município de Garanhuns, Estado de Pernambuco, Brasil. Este estudo teve como objetivo identificar uma espécie de *Diaporthe* isolada da podridão radicular da mandioca e avaliar a patogenicidade em plantas e raízes de mandioca. Aos 7 dias após a inoculação (DAI), as raízes tuberosas apresentavam lesões necróticas, aspecto mole, coloração rosada no centro e marrom a esverdeada nas bordas, enquanto as plântulas apresentavam podridão radicular, murcha, amarelecimento, ressecamento e queda de folhas aos 66 DAI no solo. Todas as plantas do grupo controle estavam assintomáticas 66 DAI. Após reisolamentos e confirmação dos postulados de Koch, o agente causal foi identificado conclusivamente como *Diaporthe ueckeri* através das análises filogenéticas multilocus envolvendo os genes ITS, *TEF1- α* , *TUB*, *CAL* e *HIS*. Os resultados mostraram que as características morfológicas, como colônias com abundante micélio aéreo, formação de picnídios e alfa conídios, foram consistentes com aquelas descritas para espécies do gênero *Diaporthe*. Este é o primeiro relato de *D. ueckeri* causando podridão de raízes de mandioca no Brasil e no mundo.

Palavras-chave: *Diaporthe ueckeri*, *Manihot esculenta*, Análise filogenética multigênica, Patogenicidade

1. Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta perene pertencente à família *Euphorbiaceae*, amplamente cultivada em regiões tropicais e considerada um dos tubérculos mais importantes do mundo (MOHIDIN et al., 2023). As raízes da mandioca são ricas em amido, o que faz da mandioca a principal fonte de carboidratos na dieta de milhões de pessoas (LEAL, 2019). Devido ao seu alto valor nutricional, a mandioca é uma excelente fonte de alimento para a dieta humana, para a alimentação animal e para a produção de produtos industriais, como etanol, glicose, álcoois, papel e gomas (ADEDIRE et al., 2021). Embora seja considerada uma cultura muito resistente, a produção de mandioca é afetada por vários fatores, nomeadamente sistemas de cultivo de baixa tecnologia, escassez de água, solos inférteis e materiais de propagação de baixa qualidade fisiológica e fitossanitária, que favorecem a ocorrência de doenças (NYIRAKANANI et al., 2021).

Várias doenças afetam as culturas de mandioca, incluindo podridão das raízes, mosaico, crestamento bacteriano e antracnose (AYU et al., 2021). A podridão da raiz da mandioca é altamente destrutiva e causa grandes perdas econômicas, sendo de difícil

diagnóstico por ser transmitida por patógenos do solo (SANGPUEAK et al., 2023). Os patógenos da podridão radicular afetam o sistema radicular da planta, bloqueando a absorção de água e nutrientes e resultando no amarelecimento e queda das folhas (WILLIAMSON-BENAVIDES; DHINGRA et al., 2021). A podridão radicular da mandioca pode ser classificada como podridão seca, preta ou mole dependendo dos sintomas e do agente causal (HOHENFELD et al., 2022).

O gênero *Diaporthe* pertence à família *Diaporthaceae* (Diaporthales) e o estado assexuado era anteriormente conhecido como *Phomopsis* (WIJAYAWARDENE et al., 2022). Como apenas um nome pode ser usado para um gênero, foi dada prioridade ao nome *Diaporthe* Nitschke, que foi o primeiro publicado e abrange a maioria das espécies (SUN et al., 2021). *Diaporthe* está amplamente distribuído em todo o mundo e pode ocorrer como endófitos, sapróbios e patógenos de plantas (GOMES et al., 2013; GAO et al., 2021). Além disso, *Diaporthe* pode produzir metabólitos secundários, como as micotoxinas citoskyrinas e citocalasinas que são conhecidas por atividades antibióticas e citotóxicas, o que é de grande interesse neste grupo de fungos (CHEPKIRUI; STADLER, 2017; LAMBERT et al., 2023). Este gênero compreende muitas espécies fitopatogênicas associadas a doenças em diversas culturas economicamente importantes (GOMES et al., 2013), comumente relatadas como causadoras de sintomas de cancro, murcha, manchas foliares e podridões (GUARNACCIA et al., 2018; LIN et al., 2018; MILAGRES et al., 2018) Porém, são escassos os estudos sobre a associação de espécies de *Diaporthe* com doenças em mandioca. Nesse sentido, a identificação precisa de espécies patogênicas é essencial para o manejo da podridão radicular da mandioca. Portanto, este estudo teve como objetivo identificar espécies de *Diaporthe* isoladas de raízes de mandioca e avaliar sua patogenicidade.

2. Materiais e métodos

2.1. Isolamento de fungos

Amostras de raízes de plantas de mandioca com sintomas de amarelecimento e murchamento das folhas e necrose radicular da estria marrom foram coletadas em fevereiro de 2021 em uma área de plantio em Garanhuns no Estado de Pernambuco, Brasil, coordenadas 09° 29' 08,2" S, 036° 59' 49,9" W, e altitude de 812 m. A partir desses materiais, foram obtidas 5 amostras compostas de raízes de 25 plantas de mandioca. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Taxonomia e Biotecnologia Utilizando Fungos do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Estado de Pernambuco, Brasil). Fragmentos de raízes finas com aproximadamente 2 cm de comprimento foram cortados na região entre o tecido saudável e necrótico das raízes para isolar os patógenos. Os fragmentos foram lavados em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 1 min, seguido de álcool etílico 70% e água destilada estéril, também por 1 min, e secos em papel filtro na superfície de placa de Petri aberta em formato laminar em câmara de fluxo. Posteriormente, os fragmentos foram adicionados a placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar

(BDA) acrescido de antibiótico (cloranfenicol, 50 mg/L) e incubados a 25 °C por 7 dias. As culturas puras foram depositadas na Micoteca URM – Coleção de Culturas do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (BARBOSA et al., 2020) – sob códigos descritos na Tabela 2.

2.2. Análise morfológica

Um ponto central em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo ágar sintético pobre em nutrientes (SNA) e meio BDA, suplementado com agulhas de pinheiro estéreis, foi inoculado para induzir a formação de picnídios e caracterizar sua morfologia (SMITH et al., 1996). As culturas foram incubadas a 25 ° C no escuro. As morfologias das colônias foram registradas após 15 dias. As culturas foram examinadas periodicamente quanto ao desenvolvimento de conidioma. Os caracteres morfológicos de cor, textura e densidade de micélio aéreo foram examinados em colônias cultivadas em BDA e SNA. Foram feitas trinta medições de cada estrutura morfológica relevante para o gênero. Para os valores médios foi calculado o desvio padrão. O ácido láctico (60%) foi utilizado como fluido de montagem de estruturas fúngicas. A análise foi realizada em microscópio Leica DM2500, as imagens foram capturadas com Flexacam C3 e processadas no software Leica Application Suite X 3.8.1.2., sendo posteriormente editadas.

2.3. Extração de DNA, amplificação de PCR e sequenciamento

O DNA genômico foi extraído usando o Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Para identificar espécimes isolados, foram obtidas sequências de DNA da região espaçadora transcrita interna (ITS), utilizando os primers ITS4 e ITS5 (WHITE et al., 1990); calmodulina (*CAL*), utilizando iniciadores CAL-228F e CAL-737R (CARBONE; KOHN, 1999); histona H3 (*HIS*), utilizando os iniciadores CYCH3F e H3-1b (CROUS et al., 2004; GLASS; DONALDSON, 1995); fator de alongamento de tradução 1- α (*TEF1- α*), utilizando os iniciadores EF1-728F e EF1-986R (CARBONE; KOHN, 1999); e beta-tubulina (*TUB*), utilizando os iniciadores Bt2a e Bt2b (GLASS; DONALDSON, 1995). As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas utilizando 6,25 μ l de GoTaq Master Mix (Promega), 0,5 μ l de cada primer (10pm), 4,25 μ l de água livre de nuclease e 1 μ l de cada amostra de DNA genômico para cada reação. Os produtos de PCR foram purificados a partir das enzimas EXO + SAP (Fosfatase Alcalina/Exonuclease I) (Cellco, São Carlos, Rondônia, Brasil) e enviados para sequenciamento com os primers utilizando o Kit de Sequenciamento de Ciclo BigDye® Terminator v. Sequenciamento e Expressão Gênica no Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os eletrofarogramas foram editados usando o Sequencher 4.7 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, Michigan). As sequências geradas foram depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI) sob os números de acesso mostrados na Tabela 2.

2.4. Análise filogenética

As comparações iniciais foram feitas usando uma pesquisa local do BLASTn no banco de dados GenBank (NCBI) das sequências ITS. Para as análises filogenéticas, as sequências de referência dos grupos aos quais pertencem os isolados foram recuperadas do GenBank, alinhadas no MAFFT v.7 (KATOH; STANDLEY, 2013; KATOH et al., 2017) e ajustadas usando MEGA v.7 (Kumar et al., 2017). As análises de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) utilizando uma matriz concatenada de regiões gênicas ITS, *TEF1- α* , *TUB2*, *CAL* e *HIS* foram realizadas utilizando RAxML-HPC BlackBox 8.2.12 (STAMATAKIS, 2014) e MrBayes v.3.2.7a (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003), respectivamente, no CIPRES Science Gateway (<https://www.phylo.org/>) (Miller et al., 2010). O modelo de substituição de nucleotídeos para as análises de BI foi estimado separadamente para cada região genética usando MrMODELTEST 2.3 (POSADA; BUCKLEY, 2004) e o modelo GTRGAMMA+I foi utilizado para todas as análises de ML. As análises de ML foram realizadas com 1.000 replicações de bootstrap usando parâmetros padrão. As análises de BI foram realizadas por 10 milhões de gerações e os primeiros 25% das amostras foram descartadas. A árvore foi enraizada com *Diaporthella corylina* CBS 121124. As árvores foram visualizadas no FigTree v. 1.1.2 (RAMBAUT, 2009). Os valores de bootstrap (bs) dos valores de probabilidades posteriores (pp) de ML e BI são rotulados nos nós. Valores abaixo de 70% bs e 0,90 pp não são apresentados.

2.5. Testes de patogenicidade

O inóculo foi preparado utilizando discos de micélio de 6 mm de diâmetro retirados de uma colônia com 7 dias de idade cultivada em BDA. Os discos foram transferidos para um Erlenmeyer contendo 50 g de arroz parboilizado autoclavado (BRITO et al., 2020). Para o tratamento controle, foram preparados frascos Erlenmeyer sem o disco de micélio.

Inoculação das mudas: aos 43 dias após o plantio das mudas da variedade Santo Estevão, o solo foi inoculado com 10g de grãos de arroz colonizados pelo patógeno. Grãos de arroz não colonizados foram utilizados como tratamento controle. Foram utilizadas três repetições (3 mudas) para cada tratamento. A presença ou ausência de sintomas foi avaliada após 66 dias.

Inoculação de raízes: foram utilizadas raízes sadias de mandioca da variedade Santo Estevão. As raízes tuberosas foram lavadas em água corrente e depois desinfetadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio (0,5% de cloro ativo) por 5 min, lavadas em SDW, também por 5 min, e colocadas para secar em papel toalha. Após a secagem, apenas um grão de arroz colonizado por patógenos foi inserido em uma abertura perfurada na raiz com ponta esterilizada, com profundidade suficiente para colocar o arroz, aproximadamente 6 mm. Para o tratamento controle foi utilizado grão de arroz não colonizado e autoclavado. Cada tratamento foi composto por cinco raízes de mandioca, que foram incubadas em caixas plásticas dentro de câmara úmida em

temperatura ambiente (26 ± 2 °C) com luz ambiente. A presença de sintomas foi avaliada até o 7º DAI. Os experimentos foram repetidos duas vezes. O patógeno foi reisolado dos tecidos necróticos e comparado morfológicamente com os isolados utilizados na inoculação.

3. Resultados

Das raízes sintomáticas coletadas foram obtidos dois isolados (URM 8970 e URM 8971) e identificados pela morfologia como pertencentes ao gênero *Diaporthe*. A cultura URM 8970 em PDA apresentou cor variando de branco a sépia acinzentada (106) após 15 dias de crescimento, abundante micélio aéreo floculante com anel branco-acinzentado. A colônia apresentou abundante micélio aéreo, formando anéis brancos concêntricos no SNA (Fig. 1A). Quando cultivados em BDA e SNA, a formação de picnídios foi observada em agulhas de pinheiro aos 19 dias. Esses picnídios eram globosos, apresentavam-se solitários ou em grupos, variando de marrom a preto, na maturidade exalavam gotículas translúcidas a amareladas de conídios dos ostíolos (Fig. 1B, 1D). Conidióforos reduzidos a células conidiogênicas apresentaram tamanho médio de $7\text{--}33$ ($DP \pm 5,4$) \times $1\text{--}2$ ($DP \pm 0,5$) μm , eram fialídicos, ampuliformes, longos, cilíndricos, terminais, ligeiramente, afinando em direção ao ápice, muitas vezes ramificados (Figs. 1C). Conídios alfa com tamanho médio de $4\text{--}8$ ($DP \pm 0,8$) \times $2\text{--}3$ ($DP \pm 0,2$) μm , eram abundantes, unicelulares, lisos, asseptados, hialinos, bigutulados, elipsoidais, com uma extremidade pontiaguda (Figs. 1E).

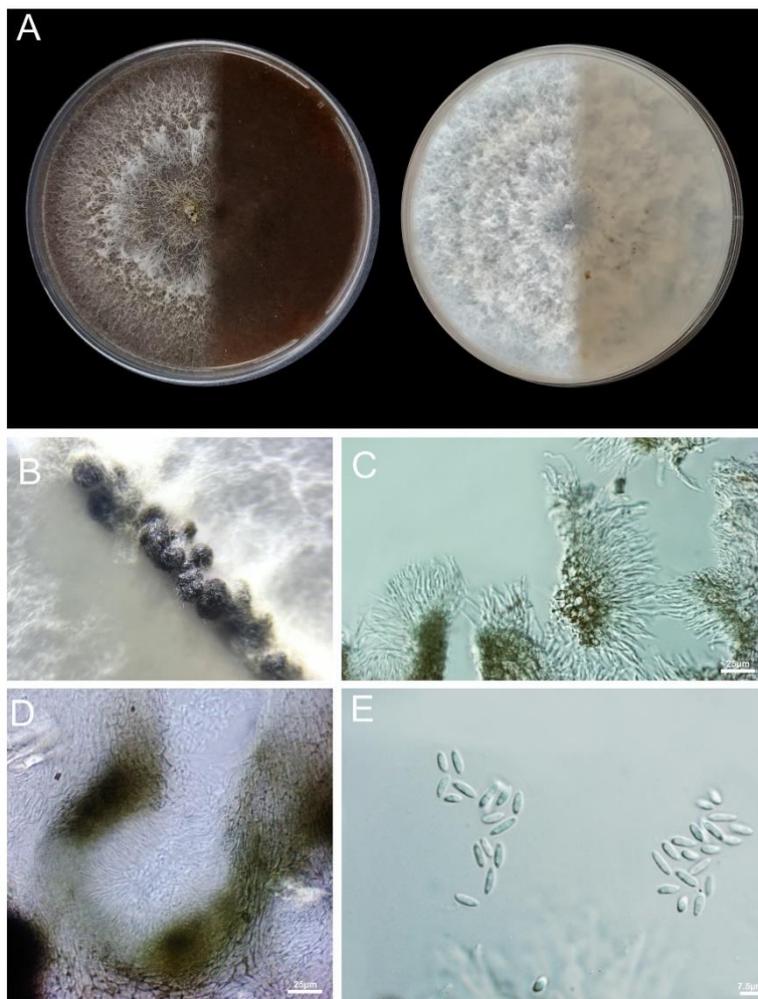


Figura 5. Morfológica de *Diaporthe ueckeri* (URM8970). A. Frente e reverso da colônia em PDA e SNA após 15 dias a 28 °C. B. Conidiomas picnidiais no SNA. C. Conidióforos. D. Conidiomas. E. conídios alfa. Barra de escala: C, D = 25 μ m, E = 7,5 μ m.

De acordo com pesquisas do BLAST, as sequências ITS, *TEF1- α* , *TUB* e *HIS* de isolados de mandioca compartilhavam 99% de similaridade com *Diaporthe ueckeri*, *CAL* 98% de identidade com *D. passiflorae* e 97% de identidade com *D. ueckeri*. O alinhamento concatenado continha 2.486 caracteres: 505 pb (ITS), 629 pb (*TEF1- α*), 476 pb (*TUB*), 471 pb (*CAL*) e 405 pb (*HIS*). Os códigos de todas as sequências utilizadas estão dispostos na Tabela 2. O valor final de probabilidade de otimização de ML da melhor árvore foi -35370,396224. As frequências básicas estimadas são as seguintes: A = 0,211363, C = 0,321048, G = 0,239099, T = 0,228490; taxas de substituição: AC = 1,149944, AG = 3,530891, AT = 1,152481, CG = 1,057750, CT = 4,555182, GT = 1,000000. Os modelos ideais de substituição de nucleotídeos para as análises Bayesianas foram GTR+I+G para ITS e HKY+I+G para *TEF1- α* , *TUB*, *CAL* e *HIS*. As análises filogenéticas identificaram dois isolados pertencentes ao gênero *Diaporthe*. A árvore foi enraizada com *Diaporthella corylina* CBS 121124. A análise filogenética multigênica combinada mostrou que os isolados foram colocados em um clado contendo o tipo ex e isolados representativos de *D. ueckeri*. O clado foi bem suportado com valores de probabilidades posteriores bayesianas (BPP) e bootstrap de

máxima verossimilhança (MS-BS) de 1 e 100, respectivamente (Fig. 2). Este resultado atribuiu os isolados URM8970 e URM8971 a esta espécie.

Tabela 2. Números de acesso ao Genbank das sequências de DNA utilizadas na análise filogenética. Os exemplares obtidos neste estudo estão destacados em negrito.

| Espécies | Isolados | ITS | TUB2 | HIS | TEF | CAL |
|----------------------------|---------------------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| <i>Diaporthe acericola</i> | MFLUCC17 0956T | KY964224 | KY964074 | – | KY964180 | KY964137 |
| <i>D. aitkeniae</i> | BRIP 58827aT | OR019750 | OR039647 | – | OR039640 | – |
| <i>D. alangii</i> | CFCC 52556T | MH121491 | MH121573 | MH121451 | MH121533 | MH121415 |
| <i>D. ambigua</i> | CBS 114015T | KC343010 | KC343978 | KC343494 | KC343736 | KC343252 |
| <i>D. angelicae</i> | CBS 111592T | KC343026 | KC343994 | KC343511 | KC343752 | KC343268 |
| <i>D. antonovae</i> | BRIP 58824bT | OR019751 | OR039648 | – | OR039641 | – |
| <i>D. arctii</i> | CBS 139280T | KJ590736 | KJ610891 | KJ659218 | KJ590776 | KJ612133 |
| <i>D. arezzoensis</i> | MFLU 19 2880T | MT185503 | MT454055 | – | – | – |
| <i>D. atlantica</i> | CECT 21217T | ON159893 | ON364040 | ON398810 | ON398831 | ON364019 |
| <i>D. australpacificae</i> | BRIP 60163dT | OM918688 | OM960615 | – | OM960597 | – |
| <i>D. batatas</i> | CBS 122 21T | KC343040 | KC344008 | KC343524 | KC343766 | KC343282 |
| <i>D. beilharziae</i> | BRIP 54792T | JX862529 | KF170921 | – | JX862535 | – |
| <i>D. berteroeae</i> | BRIP 57900aT | OR019752 | OR039649 | – | OR039642 | – |
| <i>D. biguttulata</i> | ZJUD47T | KJ490582 | KJ490403 | KJ490524 | KJ490461 | – |
| <i>D. brasiliensis</i> | CBS 133183T | KC343042 | KC344010 | KC343526 | KC343768 | KC343284 |
| <i>D. breyniae</i> | CBS 148910T | ON400846 | ON409186 | ON409187 | ON409188 | ON409189 |
| <i>D. brideliae</i> | CBS 148911T | OR348649 | OR468827 | OR468807 | OR468817 | OR468837 |
| <i>D. brumptoniae</i> | BRIP 59403aT | OM918702 | OM960629 | – | OM960611 | – |
| <i>D. butterfly</i> | BRIP 59194aT | OR019753 | OR039650 | – | OR039643 | – |
| <i>D. caatingaensis</i> | CBS 141542T | KY085927 | KY115600 | KY115605 | KY115603 | KY115597 |
| <i>D. cameroonensis</i> | CBS 148913T | OR348650 | OR468826 | OR468806 | OR468816 | OR468836 |
| <i>D. camporesii</i> | JZB 320143T | MN533805 | MN561316 | – | – | – |
| <i>D. caryae</i> | CFCC 52563T | MH121498 | MH121580 | MH121458 | MH121540 | MH121422 |
| <i>D. celtidis</i> | NCYU 19 0357T | MW114346 | MW148266 | – | MW192209 | – |
| <i>D. cerradensis</i> | CMRP4331T | MN173198 | MW751671 | MW751663 | MT311685 | MW751655 |
| <i>D. chiangmaiensis</i> | MFLUCC 18 0544T | OK393703 | – | – | OL439483 | – |
| <i>D. chimonanthi</i> | SCHM 3614T | AY622993 | – | – | – | – |
| <i>D. chinensis</i> | MFLUCC 19 0101T | MW187324 | MW245013 | – | MW205017 | MW294199 |
| <i>D. chromolaenae</i> | MFLUCC 17- 1422T | MH094275 | – | – | – | – |
| <i>D. cichorii</i> | MFLUCC 17- 1023T | KY964220 | KY964104 | – | KY964176 | KY964133 |
| <i>D. cinnamomi</i> | CFCC 52569T | MH121504 | MH121586 | MH121464 | MH121546 | – |
| <i>D. citriasiana</i> | CBS 134240T | JQ954645 | KC357459 | MF418282 | JQ954663 | KC357491 |

| | | | | | | |
|---------------------------|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <i>D. columnaris</i> | AR3612T | AF439625 | – | – | – | – |
| <i>D. compacta</i> | C3083T | KP267854 | KP293434 | KP293508 | KP267928 | – |
| <i>D. convolvuli</i> | CBS 124654T | KC343054 | KC344022 | KC343538 | KC343780 | KC343296 |
| <i>D. cucurbitae</i> | DAOM 42078T | KM453210 | KP118848 | KM453212 | KM453211 | – |
| <i>D. cuppatea</i> | CBS 117499T | AY339322 | JX275420 | KC343541 | AY339354 | JX197414 |
| <i>D. cyatheae</i> | YMJ 1364T | JX570889 | KC465403 | – | KC465406 | KC465410 |
| <i>D. discoidispora</i> | ZJUD89T | KJ490624 | KJ490445 | KJ490566 | KJ490503 | – |
| <i>D. endophytica</i> | CBS 133811T | KC343065 | KC344033 | KC343549 | KC343791 | KC343307 |
| <i>D. etinsideae</i> | BRIP 64096aT | OM918692 | OM960619 | – | OM960601 | – |
| <i>D. fici. septicae</i> | MFLU 18-2588T | MW114348 | MW148268 | – | MW192211 | – |
| <i>D. fructicola</i> | MAFF 246408T | LC342734 | LC342736 | LC342737 | LC342735 | LC342738 |
| <i>D. ganjae</i> | CBS 180.91T | KC343112 | KC344080 | KC343596 | KC343838 | KC343354 |
| <i>D. glabrae</i> | SCHM 3622T | AY601918 | – | – | – | – |
| <i>D. goulteri</i> | RIP 55657aT | KJ197290 | KJ197270 | – | KJ197252 | – |
| <i>D. griceae</i> | BRIP 67014aT | OM918694 | OM960621 | – | OM960603 | – |
| <i>D. guangdongensis</i> | ZHKUCC 20-0014T | MT355684 | MT409292 | – | MT409338 | MT409314 |
| <i>D. gulyae</i> | BRIP 54025T | JF431299 | KJ197271 | – | JN645803 | – |
| <i>D. guttulata</i> | CGMCC 3.20100T | MT385950 | MT424705 | MW022491 | MT424685 | MW022470 |
| <i>D. helianthi</i> | CBS 592.81T | KC343115 | KC344083 | KC343599 | KC343841 | JX197454 |
| <i>D. heterostemmatis</i> | SAUCC 194.85T | MT822613 | MT855810 | MT855581 | MT855925 | MT855692 |
| <i>D. hordei</i> | CBS 481.92T | KC343120 | KC344088 | KC343604 | KC343846 | KC343362 |
| <i>D. hubeiensis</i> | JZB 320123T | MK335809 | MK500148 | – | MK523570 | MK500235 |
| <i>D. iberica</i> | CECT 21218T | ON159902 | ON364049 | ON398819 | ON398841 | ON364028 |
| <i>D. infecunda</i> | CBS 133812T | KC343126 | KC344094 | KC343610 | KC343852 | KC343368 |
| <i>D. infertilis</i> | CBS 230.52T | KC343052 | KC344020 | KC343536 | KC343778 | KC343294 |
| <i>D. kochmanii</i> | BRIP 54033T | JF431295 | – | – | JN645809 | – |
| <i>D. kongii</i> | BRIP 54031T | JF431301 | KJ197272 | – | JN645797 | – |
| <i>D. leucospermi</i> | CBS 111980T | JN712460 | KY435673 | KY435653 | KY435632 | KY435663 |
| <i>D. longicolla</i> | FAU 599T | KJ590728 | KJ610883 | KJ659188 | KJ590767 | KJ612124 |
| <i>D. longispora</i> | CBS 194.36T | KC343135 | KC344103 | KC343619 | KC343861 | KC343377 |
| <i>D. lusitanicae</i> | CBS 123212T | KC343136 | KC344104 | KC343620 | KC343862 | KC343378 |
| <i>D. machili</i> | SAUCC 194.111T | MT822639 | MT855836 | MT855606 | MT855951 | MT855718 |
| <i>D. malorum</i> | CBS142383T | KY435638 | KY435668 | KY435648 | KY435627 | KY435658 |
| <i>D. masirevicii</i> | BRIP 57892aT | KJ197277 | KJ197257 | – | KJ197239 | – |
| <i>D. mayteni</i> | CBS 133185T | KC343139 | KC344107 | KC343623 | KC343865 | KC343381 |
| <i>D. megalospora</i> | CBS 143.27T | KC343140 | KC344108 | KC343624 | KC343866 | KC343382 |
| <i>D. melongenae</i> | MBELPIC61T | OQ123525 | OR099715 | – | OR099712 | – |
| <i>D. melonis</i> | CBS 507.78T | KC343142 | KC344110 | KC343626 | KC343868 | KC343384 |
| <i>D. middletonii</i> | BRIP 54884eT | KJ197286 | KJ197266 | – | KJ197248 | – |
| <i>D. minusculata</i> | CGMCC 3.20098T | MT385957 | MT424712 | MW022499 | MT424692 | MW022475 |
| <i>D. monetii</i> | MF-Ha18-049T | MW008494 | MW008505 | MZ671965 | MW008516 | MZ671939 |

| | | | | | | |
|-----------------------------|----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <i>D. moorei</i> | BRIP 61500bT | OR019755 | OR039652 | – | OR039645 | – |
| <i>D. moriniae</i> | BRIP 60190aT | OM918698 | OM960625 | – | OM960607 | – |
| <i>D. myracrodruonis</i> | URM 7972T | MK205289 | MK205291 | – | MK213408 | MK205290 |
| <i>D. neoarctii</i> | CBS 109490T | KC343145 | KC344113 | KC343629 | KC343871 | KC343387 |
| <i>D. novem</i> | CBS 127271T | KC343157 | KC344125 | KC343641 | KC343883 | KC343399 |
| <i>D. orixae</i> | HKAS 121465T | OK283041 | OK432278 | OK484486 | OK432279 | OK484485 |
| <i>D. ovalispora</i> | ZJUD93T | KJ490628 | KJ490449 | KJ490570 | KJ490507 | – |
| <i>D. oxe</i> | CBS 133186T | KC343164 | KC344132 | KC343648 | KC343890 | KC343406 |
| <i>D. pachirae</i> | COAD 2074T | MG559537 | MG559541 | – | MG559539 | MG559535 |
| <i>D. paranensis</i> | CBS 133184T | KC343171 | KC344139 | KC343655 | KC343897 | KC343413 |
| <i>D. passiflorae</i> | CBS 132527T | JX069860 | KY435674 | KY435654 | KY435633 | KY435664 |
| <i>D. phaseolorum</i> | AR4203T | KJ590738 | KJ610893 | KJ659220 | KJ590739 | KJ612135 |
| <i>D. pseudobauhiniae</i> | MFLUCC 17 1669T | MF190119 | – | – | MF377598 | – |
| <i>D. pyracanthae</i> | CBS142384T | KY435635 | KY435666 | KY435646 | KY435625 | KY435656 |
| <i>D. quercicola</i> | CSUFTCC 104T | ON076567 | – | ON081667 | ON081659 | ON081670 |
| <i>D. racemosae</i> | CBS 143770T | MG600223 | MG600227 | MG600221 | MG600225 | MG600219 |
| <i>D. raonikayaporum</i> | CBS 133182T | KC343188 | KC344156 | KC343672 | KC343914 | KC343430 |
| <i>D. rizhaoensis</i> | CFCC 57562T | OP955930 | OP959773 | OP959785 | OP959767 | OP959782 |
| <i>D. rosiphthora</i> | COAD 2914T | MT311197 | – | – | MT313693 | MT313691 |
| <i>D. rossmaniae</i> | CAA 762T | MK792290 | MK837914 | MK871432 | MK828063 | MK883822 |
| <i>D. sackstonii</i> | BRIP 54669bT | KJ197287 | KJ197267 | – | KJ197249 | – |
| <i>D. sambucusii</i> | CFCC 51986T | KY852495 | KY852511 | KY852503 | KY852507 | KY852499 |
| <i>D. sapindicola</i> | CFCC 55344T | MW881507 | MW898937 | MW898940 | MW898934 | MW898943 |
| <i>D. schini</i> | CBS 133181T | KC343191 | KC344159 | KC343675 | KC343917 | KC343433 |
| <i>D. schoeni</i> | MFLU 15-1279T | KY964226 | KY964109 | – | KY964182 | KY964139 |
| <i>D. sclerotioides</i> | CBS 296.67T | KC343193 | KC344161 | KC343677 | KC343919 | KC343435 |
| <i>D. serafiniae</i> | BRIP 55665aT | KJ197274 | KJ197254 | – | KJ197236 | – |
| <i>D. shawiae</i> | BRIP 64534aT | OM918701 | OM960628 | – | OM960610 | – |
| <i>D. siamensis</i> | MFLUCC 10- 0573aT | JQ619879 | JX275429 | – | JX275393 | – |
| <i>D. sinensis</i> | CGMCC 3.19521T | MK637451 | MK660447 | – | MK660449 | – |
| <i>D. sojae</i> | CBS 139282T | KJ590719 | KJ610875 | KJ659208 | KJ590762 | KJ612116 |
| <i>D. stewartii</i> | CBS 193.36T | FJ889448 | – | – | GQ250324 | – |
| <i>D. subellipicola</i> | KUMCC 17- 0153T | MG746632 | MG746634 | – | MG746633 | – |
| <i>D. subordinaria</i> | CBS 464. 90T | KC343214 | KC344182 | KC343698 | KC343940 | KC343456 |
| <i>D. tarchonantheri</i> | CBS 146073T | MT223794 | MT223733 | MT223759 | – | – |
| <i>D. tecomae</i> | CBS 100547T | KC343215 | KC344183 | KC343699 | KC343941 | KC343457 |
| <i>D. tectonae</i> | MFLUCC 12- 0777T | KU712430 | KU743977 | – | KU749359 | KU749345 |
| <i>D. tectonendophytica</i> | MFLUCC 13- 0471T | KU712439 | KU743986 | – | KU749367 | KU749354 |
| <i>D. terebinthifolii</i> | CBS 133180T | KC343216 | KC344184 | KC343700 | KC343942 | KC343458 |

| | | | | | | |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>D. trevorrowii</i> | BRIP 70737aT | OM918703 | OM960630 | – | OM960612 | – |
| <i>D. tulliensis</i> | BRIP 62248aT | KR936130 | KR936132 | – | KR936133 | – |
| <i>D. ueckeri</i> | FAU 656T | KJ590726 | KJ610881 | KJ659215 | KJ590747 | KJ612122 |
| <i>D. ueckeri</i> | URM8970 | PP667388 | PP729356 | PP729359 | PP747225 | PP729358 |
| <i>D. ueckeri</i> | URM8971 | PP667389 | PP729357 | PP729360 | PP747226 | – |
| <i>D. ueckeri</i> (= <i>D. absenteum</i>) | LC3429 | KP267897 | KP293477 | KP293547 | KP267971 | – |
| <i>D. ueckeri</i> (= <i>D. miriciae</i>) | BRIP 54736jT | KJ197283 | KJ197263 | – | KJ197245 | – |
| <i>D. ueckeri</i> (= <i>D. passifloricola</i>) | CPC 27480 | KX228343 | KX228387 | KX228367 | – | – |
| <i>D. ueckeri</i> (= <i>D. rosae</i>) | MFLUCC 17-2658T | MG828894 | MG843878 | – | – | MG829273 |
| <i>D. ueckeri</i> (= <i>D. vochysiae</i>) | LGMF 1583T | MG976391 | MK007527 | MK033323 | MK007526 | MK007528 |
| <i>D. unshiuensis</i> | CFCC 52595 | MH121530 | MH121607 | MH121488 | MH121572 | MH121448 |
| <i>D. vangoghii</i> | MF-Ha18-046T | MW008492 | MW008503 | MZ671963 | MW008514 | MZ671937 |
| <i>D. yunnanensis</i> | CGMCC 3.18289T | KX986796 | KX999228 | KX999267 | KX999188 | KX999290 |
| <i>Diaporthella corylina</i> | CBS 121124 | KC343004 | KC343972 | KC343488 | KC343730 | KC343246 |

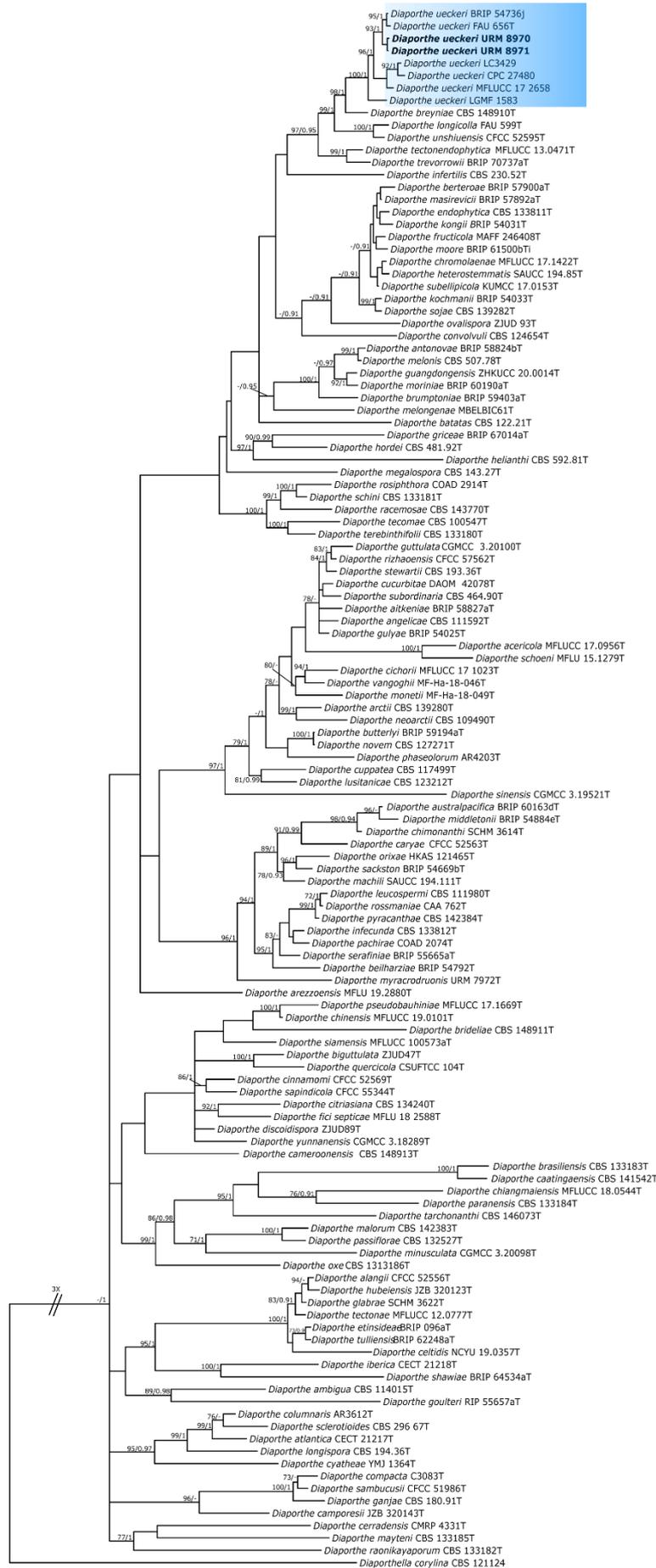


Figura 6. Árvore filogenética por Inferência Bayesiana (BI) e Máxima Verossimilhança (ML) de sequências concatenadas dos genes ITS, *TEF1- α* , *TUB2*, *CAL* e *HIS* para o complexo de espécies *Diaporthe sojae*. *Diaporthella corylina* (CBS 121124) foi utilizada como grupo externo. Suporte de bootstrap (70%) e probabilidade posterior $\geq 0,90$ estão indicados acima dos nós. As sequências geradas neste estudo estão destacadas em negrito e T indica a espécie-tipo.

A patogenicidade de *Diaporthe ueckeri* URM 8970 foi confirmada em testes realizados em mudas de mandioca e raízes tuberosas (Fig. 3). No teste com mudas de mandioca foram observados sintomas de murchamento, amarelecimento, ressecamento e queda de folhas aos 66 dias após a inoculação no solo (Figs. 3A-3C). Sintomas de podridão também foram observados no colo, sistema radicular e material propagativo da planta, que apresentava lesões marrons e aspecto macio. Aos 7 DAI, todas as raízes tuberosas apresentavam lesões necróticas originadas no ponto de inserção do arroz colonizado, migrando para as laterais do ponto de inoculação. Essas lesões tinham aparência lisa, eram rosadas no centro e marrons a esverdeadas nas bordas (Figs. 3D-3E). Em ambos os testes de patogenicidade, o controle negativo-positivo apresentou-se saudável, sem sintomas de podridão radicular.

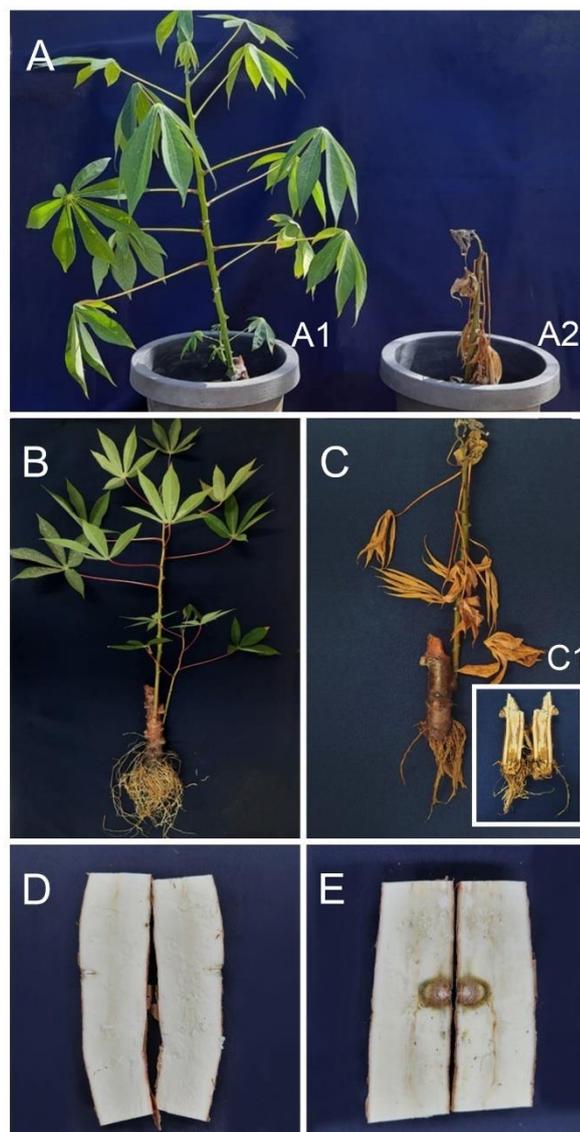


Figura 7. Resultado de testes de patogenicidade mostrando *Diaporthe ueckeri* causando podridão radicular em plantas tuberosas e raízes de mandioca. (A1, B) Plantas de controle. (A2, C) Plantas com sintomas de murcha, ressecamento e necrose. (C1) Material propagativo e sistema radicular com sintomas de necrose. (D) Tubérculo de controle. (E) Tubérculo com sintomas de necrose.

4. Discussão

A mandioca é uma cultura de grande importância socioeconômica, pois é a principal fonte de alimento para milhões de pessoas em todo o mundo e é amplamente utilizada na produção de produtos industriais, gerando assim muitos empregos (ADEDIRE et al., 2021). No entanto, a podridão da raiz da mandioca é uma doença altamente destrutiva que compromete a qualidade do produto, ao mesmo tempo que reduz drasticamente o rendimento das culturas de mandioca (BRITO et al., 2020). O presente estudo foi realizado para relatar um novo agente causal da podridão radicular da mandioca no Brasil. O fungo foi identificado por características morfológicas e análise filogenética de múltiplos locus como *Diaporthe ueckeri* e confirmado como patógeno de acordo com os Postulados de Koch.

Diaporthe ueckeri foi originalmente descrita a partir de isolados de *Cucumis melo* em Oklahoma, Estados Unidos (UDAYANGA et al., 2014). *Diaporthe miriciae* foi sinonimizado como *D. ueckeri* por Gao et al., (2016) e recentemente as espécies *D. passifloricola*, *D. rosae* e *D. vochysiae* também foram sinonimizadas como *D. ueckeri* por Ferro et al., (No prelo). Registros anteriores relataram *D. ueckeri* causando morte do caule em *Arachis hypogaea* (THOMPSON et al., 2018), cancro do caule em *Glycine max* (López-Cardona et al., 2021), podridão da extremidade do caule em *Citrus reticulata* e *Mangifera indica* (LIM et al., 2019; CHAISIRI et al., 2021) e mancha marrom em *Hyophorbe lagenicaulis* (GUO et al., 2024). *Diaporthe ueckeri* também foi relatado como endofítico em *Miconia* sp., *Anacardium occidentale*, *Brosimum gaudichaudii* (FERRO et al., 2023) e em outras plantas, mostrando que o patógeno possui uma ampla gama de hospedeiros.

O manejo da podridão causada por *D. ueckeri* pode ser muito complexo, pois é um fungo transmitido pelo solo e com ampla gama de hospedeiros. Isso requer o estudo de diferentes abordagens para seu manejo, como o desenvolvimento de cultivares resistentes, a utilização de matéria orgânica no solo e o controle biológico de microrganismos (MEDEIROS et al., 2021). As informações obtidas neste estudo auxiliarão na identificação prévia deste patógeno e no desenvolvimento de estratégias de controle em campo.

Até onde sabemos, este é o primeiro relato de *D. ueckeri* causando podridão radicular em mandioca no Brasil e no mundo. Além disso, o presente estudo contribui para o conhecimento da identificação, patogenicidade e etiologia da podridão radicular da mandioca no país, possibilitando o desenvolvimento de medidas mais eficazes para o

manejo da doença, uma vez que a podridão radicular da mandioca é uma doença grave e com incidência crescente nas culturas no Brasil.

5. Referências

- ADEDIRE, Oluwafemi Michael; ODUWAYE, Olubusola Fehintola; FASHOLA, Olutoye Olushola. Biocontrol of cassava root-rot mycopathogens with antimicrobial extracts of wood shavings. *Journal of Crop Improvement*, v. 35, n. 5, p. 745-761, 2021.
- AYU, H. R.; SURTONO, A.; APRIYANTO, D. K. Deep learning for detection cassava leaf disease. In: *Journal of Physics: Conference Series*. IOP Publishing, 2021. p. 012072.
- BARBOSA, Renan do Nascimento et al. Brazilian tropical dry forest (Caatinga) in the spotlight: an overview of species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* (Eurotiales) and the description of *P. vascosobrinhou* sp. nov. *Acta Botanica Brasilica*, v. 34, p. 409-429, 2020.
- BEZERRA, Cidney Barbosa et al. Non-autoclaved poultry litter and soil are efficient in controlling *Scytalidium lignicola* growth, the causal agent of cassava black root. *Summa Phytopathologica*, v. 45, p. 191-196, 2019.
- BRITO, Amanda Cupertino de Queiroz et al. First report of *Macrophomina pseudophaseolina* causing stem dry rot in cassava in Brazil. *Journal of Plant Pathology*, v. 101, p. 1245-1245, 2019.
- CARBONE, Ignazio; KOHN, Linda M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, v. 91, n. 3, p. 553-556, 1999.
- CHAISIRI, Chingchai et al. Morphology characterization, molecular phylogeny, and pathogenicity of *Diaporthe passifloricola* on *Citrus reticulata* cv. nanfengmiju in Jiangxi province, China. *Plants*, v. 10, n. 2, p. 218, 2021.
- CHEPKIRUI, Clara; STADLER, Marc. The genus *Diaporthe*: a rich source of diverse and bioactive metabolites. *Mycological Progress*, v. 16, n. 5, p. 477-494, 2017.
- CROUS, Pedro W. et al. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with clavate vesicles. *Studies in Mycology*, v. 55, n. 1, p. 213-226, 2006.
- FERRO, Layanne O. et al. Filling a gap: endophytic fungal diversity in the leaves of *Miconia mirabilis* in the Atlantic Forest (Brazil) and the description of a new *Muyocopron* species. *Acta Botanica Brasilica*, v. 37, p. e20230101, 2023.
- GAO, Hong et al. *Cytospora* and *Diaporthe* species associated with hazelnut canker and dieback in Beijing, China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, 2021.
- GAO, Yahui; LIU, Fang; CAI, Lei. Unravelling *Diaporthe* species associated with *Camellia*. *Systematics and Biodiversity*, v. 14, n. 1, p. 102-117, 2016.
- GLASS, N. Louise; DONALDSON, Gary C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995.

- GOMES, R. R. et al. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v. 31, n. 1, p. 1-41, 2013.
- GUARNACCIA, Vladimiro et al. *Diaporthe* diversity and pathogenicity revealed from a broad survey of grapevine diseases in Europe. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v. 40, n. 1, p. 135-153, 2018.
- GUO, Jia Ming et al. First report of Brown blotch disease caused by *Diaporthe ueckeri* on *Hyophorbe lagenicaulis* in China. *Plant Disease*, v. 108, n. 1, p. 224, 2024.
- GUO, Y. S. et al. High diversity of *Diaporthe* species associated with pear shoot canker in China. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v. 45, n. 1, p. 132-162, 2020.
- HOHENFELD, Camila Santiago et al. Modelling growth characteristics and aggressiveness of *Neoscytalidium hyalinum* and *Fusarium solani* associated with black and dry root rot diseases on cassava. *Tropical Plant Pathology*, v. 43, p. 422-432, 2018.
- HOHENFELD, Camila Santiago et al. Genome-wide association study and selection for field resistance to cassava root rot disease and productive traits. *Plos one*, v. 17, n. 6, p. e0270020, 2022.
- KATOH, Kazutaka; ROZEWICKI, John; YAMADA, Kazunori D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in bioinformatics*, v. 20, n. 4, p. 1160-1166, 2019.
- KATOH, Kazutaka; STANDLEY, Daron M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.
- KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.
- LAMBERT, Christopher et al. Four new endophytic species of *Diaporthe* (*Diaporthaceae*, *Diaporthales*) isolated from Cameroon. *MycKeys*, v. 99, p. 319, 2023.
- LEAL, Naiane Caetano da Silva et al. Mandioca minimamente processada: estudo da qualidade das raízes produzidas na Palmares Sul, zona rural de Parauapebas. 2019.
- LIM, Li; MOHD, Masratul Hawa; ZAKARIA, Latiffah. Identification and pathogenicity of *Diaporthe* species associated with stem-end rot of mango (*Mangifera indica* L.). *European Journal of Plant Pathology*, v. 155, p. 687-696, 2019.
- LIN, Shan; TAYLOR, Nancy J.; PEDUTO HAND, Francesca. Identification and characterization of fungal pathogens causing fruit rot of deciduous holly. *Plant disease*, v. 102, n. 12, p. 2430-2445, 2018.
- MEDEIROS, Erika Valente et al. Biochar and *Trichoderma* spp. in management of plant diseases caused by soilborne fungal pathogens: a review and perspective. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 15, p. e296101522465-e296101522465, 2021.
- MILAGRES, Cristiane A. et al. A novel species of *Diaporthe* causing leaf spot in *Pachira glabra*. *Tropical Plant Pathology*, v. 43, p. 460-467, 2018.

- MILLER, Mark A.; PFEIFFER, Wayne; SCHWARTZ, Terri. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: 2010 gateway computing environments workshop (GCE). Ieee, 2010. p. 1-8.
- MOHIDIN, Siti Raudhah Noor Shifa Putri et al. Cassava (*Manihot esculenta* Crantz): A systematic review for the pharmacological activities, traditional uses, nutritional values, and phytochemistry. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, v. 28, p. 2515690X231206227, 2023.
- NOTARO, Krystal Alcantara et al. Prospecção de fitopatógenos associados á podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brasil. *Biosci. j.* (Online), p. 1832-1839, 2013.
- NYIRAKANANI, Chantal et al. Farmer and field survey in cassava-growing districts of rwanda reveals key factors associated with cassava brown streak disease incidence and cassava productivity. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 5, p. 699655, 2021.
- POSADA, David; BUCKLEY, Thomas R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic biology*, v. 53, n. 5, p. 793-808, 2004.
- Rambaut, A., 2009. FigTree 1.2.2. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- RONQUIST, Fredrik; HUELSENBECK, John P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.
- SANGPUEAK, Rungthip et al. Identification of cassava black stem and root rot agents in Thailand. *Chilean journal of agricultural research*, v. 83, n. 1, p. 70-82, 2023.
- SMITH, H. et al. *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus* spp. and *Eucalyptus* spp. in South Africa. *South African Journal of Botany*, v. 62, n. 2, p. 86-88, 1996.
- SOUZA, Bianca Cristina Matos de et al. Adubação organomineral na cultura da mandioca (*Manihot esculenta* crantz). 2019.
- STAMATAKIS, Alexandros. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014.
- SUN, Wenxiu et al. Morphological and molecular identification of *Diaporthe* species in south-western China, with description of eight new species. *MycKeys*, v. 77, p. 65, 2021.
- THOMPSON, S. M. et al. First reports of *Diaporthe kongii*, *D. masirevicii*, and *D. ueckerae* associated with stem and peg dieback on peanut in Australia. *Plant disease*, v. 102, n. 7, p. 1459-1459, 2018.
- UDAYANGA, Dhanushka et al. The *Diaporthe sojae* species complex: Phylogenetic re-assessment of pathogens associated with soybean, cucurbits and other field crops. *Fungal Biology*, v. 119, n. 5, p. 383-407, 2015.
- WHITE, Thomas J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.
- WIJAYAWARDENE, Nalin N. et al. Forecasting the number of species of asexually reproducing fungi (Ascomycota and Basidiomycota). *Fungal Diversity*, v. 114, n. 1, p. 463-490, 2022.

WILLIAMSON-BENAVIDES, Bruce A.; DHINGRA, Amit. Understanding root rot disease in agricultural crops. *Horticulturae*, v. 7, n. 2, p. 33, 2021.

CAPÍTULO III

Biochar e *Trichoderma koningiopsis* URM 8972 no manejo de *Fusarium agrestense* e *Curvularia* sp., agentes causais da podridão radicular da mandioca

Resumo

A produção da mandioca é bastante limitada pela incidência de doenças como as podridões radiculares que causam grandes prejuízos em todo o país. A identificação dos patógenos é essencial para manejo eficaz da doença. Este estudo teve como objetivos identificar agentes causais isolados de raízes de mandioca com sintomas de podridão e confirmar sua patogenicidade; identificar espécies de *Trichoderma* isoladas de solo cultivado com plantas de mandioca assintomáticas; testar a produção de quitinase e o antagonismo de *Trichoderma* contra os referidos patógenos; produzir um bioinoculante a base de biochar e *Trichoderma* e testar seus efeitos sobre a severidade de patógenos e a qualidade do solo. Raízes de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com sintomas de podridão radicular foram coletadas em uma lavoura de mandioca no município de Garanhuns, Agreste de Pernambuco, Brasil. Os agentes causais identificados neste estudo foram *Curvularia* sp. e *Macrophomina phaseolina*, os quais tiveram a patogenicidade confirmada em tubérculos e plantas de mandioca. Os isolados do solo foram identificados como *Trichoderma* sp., *T. koningiopsis* e *T. longibrachiatum*. *Trichoderma koningiopsis* URM 8972 e *T. longibrachiatum* URM 6068 apresentaram as maiores produções de quitinase, além de grande potencial antagônico contra os patógenos. Biochar de resíduos da uva combinado com *T. koningiopsis* URM 8972 reduziu significativamente a severidade da podridão radicular da mandioca causada por *Curvularia* sp. e *Fusarium agrestense* (identificado anteriormente). O bioinoculante também proporcionou aumento nos teores de P e K no solo, sendo esta combinação uma ferramenta promissora para o manejo da podridão radicular da mandioca

Palavras-chave: Patogenicidade, Biocontrole, Antagonismo, Atividade enzimática

1. Introdução

Os cultivos de mandioca são de importância socioeconômica global (UCHÔA et al., 2020). Os tubérculos dessa planta são fonte de nutrientes para mais de 500 milhões de pessoas (SOUZA; KALID, 2022). Bastante versátil, a mandioca é amplamente utilizada na fabricação de produtos como farinhas, gomas, álcool, etanol, glicose e pastas (ADEDIRE et al., 2021). Embora seja uma cultura de relevância econômica significativa, os cultivos de mandioca são afetados pelo surgimento de doenças que provocam quedas na produtividade (SOUZA et al., 2019), como as podridões radiculares.

A podridão radicular da mandioca é uma doença que causa grandes prejuízos em áreas produtoras (HOHENFELD et al., 2022). Essa doença é causada por uma ampla gama de patógenos presentes no solo, o que torna mais complexo o seu diagnóstico e

controle (WILLIAMSON-BENAVIDES; DHINGRA, 2021). Dentre os agentes causais mais relevantes estão os fungos dos gêneros *Fusarium*, *Neocosmospora*, *Neoscytalidium* e *Lasiodiplodia*, e os oomicetos dos gêneros *Phytophthora* e *Pythium* (BOAS et al., 2017; BRITO et al., 2020; ADEDIRE et al., 2021).

Devido à complexidade da podridão radicular da mandioca, estratégias de controle estão sendo estudadas como alternativas ao controle químico, que na maioria dos casos, é inviável por causar acúmulo de produtos químicos nocivos no solo (ADEDIRE et al., 2021). O desenvolvimento de variedades resistentes, uso de matéria orgânica para aumentar a supressividade do solo e microrganismos antagonistas apresentam grande potencial no manejo de podridões em mandioca (SILVA et al., 2017; ADEDIRE et al., 2021; HOHENFELD et al., 2022).

A incorporação de materiais orgânicos ao solo promove aumento de microrganismos benéficos e a competição entre microrganismos, podendo reduzir a severidade de doenças (MEHTA et al., 2014). Resíduos orgânicos inexplorados como os da agroindústria podem ser utilizados para produzir um composto com valor agregado, como o biochar (MEDEIROS et al., 2024). Biochar é um composto sólido, com alta porosidade e rico em carbono que é obtido através do processo de pirólise de resíduos orgânicos (BOLAN et al., 2023). O biochar apresenta diversos benefícios para a agricultura, que incluem a promoção do crescimento vegetal (SONG et al., 2022), melhora de atributos físico-químicos do solo (GARBUZ et al., 2021), alteração da microbiota da rizosfera (ZHENG et al., 2017) e supressão de fitopatógenos transmitidos pelo solo (MEDEIROS et al., 2021).

Fungos do gênero *Trichoderma* são amplamente estudados e utilizados na indústria e agricultura (MEDEIROS et al., 2021). *Trichoderma* é conhecido pelo alto potencial em promover o desenvolvimento de plantas (MEDEIROS et al., 2020), e suprimir a ação de patógenos transmitidos pelo solo (NIETO-JACOBO et al., 2017; LU et al., 2020). Espécies de *Trichoderma* são as mais estudadas no biocontrole de doenças de plantas (ZIN; BADALUDDIN, 2020), devido a diversidade de mecanismos que possuem, sendo os principais a competição por espaço e nutrientes (WANG et al., 2020), o micoparasitismo (ALFIKY, 2019) e a produção de metabolitos secundários, como a quitinase que degrada a parede celular de fungos fitopatogênicos (SILVA et al., 2016).

Os benefícios do *Trichoderma* podem ser potencializados pela combinação com fontes orgânicas como o biochar (MEDEIROS et al., 2021). O efeito positivo da combinação de biochar e *T. aureoviride* foi verificado na redução da severidade da podridão radicular da mandioca cultivada em solo infestado com *Neocosmospora solani* (*Sin. F. solani*) (SILVA et al., 2022).

No entanto, estudos acerca da ação combinada de biochar e *Trichoderma* no controle de podridões radiculares em mandioca ainda são escassos. Além disso, as podridões são causadas por um amplo espectro de patógenos com os quais essa combinação deve ser testada. Isso ressalta a necessidade de estudos que avaliem a

combinação de biochar e *Trichoderma* no manejo da podridão radicular da mandioca, assim como os efeitos dessa combinação na qualidade do solo. Por isso, neste estudo, tivemos como objetivos testar a hipótese de que a combinação de biochar e *T. koningiopsis* URM 8972 auxilia no manejo da podridão radicular da mandioca, causada por *Curvularia* sp. e *Fusarium agrestense*, e melhora os atributos do solo.

2. Materiais e métodos

2.1. Isolamento e identificação de fungos

2.1.1. Coleta e isolamento de fungos

Amostras de raízes de mandioca foram coletadas em fevereiro de 2021, em uma área de plantio em Garanhuns, região Agreste de Pernambuco, Brasil (09° 29' 08,2"S, 036° 59' 49,9" W e altitude de 812 m). As plantas de mandioca selecionadas para a coleta apresentavam sintomas de amarelecimento e murcha das folhas, e lesões necróticas nas raízes adventícias e material de propagação. Amostras compostas de 25 raízes de plantas foram coletadas, acondicionadas em caixas de isopor com gelo e transportadas para o Laboratório de Taxonomia e Biotecnologia Utilizando Fungos do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil. Fragmentos de raízes adventícias com aproximadamente 2 cm de comprimento foram cortados na região entre o tecido saudável e necrótico das raízes para isolar os patógenos. Os fragmentos foram lavados em solução de hipoclorito de sódio 1% por 1 min, seguido de álcool etílico 70% e água destilada esterilizada, também por 1 min. Em seguida, os fragmentos foram secos em papel filtro na superfície de uma placa de Petri. Posteriormente, os fragmentos foram transferidos para o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) acrescido de antibiótico (cloranfenicol, 50 mg/L) contido em placas de Petri e incubados a 25 °C por 7 dias.

Nesta mesma área de cultivo foram coletadas amostras compostas de solo rizosférico de plantas de mandioca saudáveis. Para cada amostra composta foram realizadas amostragens de solo de três plantas saudáveis diferentes. As amostras foram homogeneizadas, acondicionadas em sacos plásticos e, posteriormente, armazenadas em refrigerador na temperatura de 5 °C até a realização do isolamento dos fungos. De cada amostra composta foram retirados 10 g de solo e colocados em frascos de Erlenmeyer com 90 ml de água destilada esterilizada, constituindo a suspensão na concentração de 10^{-1} 1 ml. Cada solução foi devidamente agitada para homogeneizar a suspensão e, posteriormente, foram realizadas diluições seriadas retirando-se 1 ml da suspensão 10^{-1} 1 ml e transferido para tubo de ensaio com 9 ml de água destilada esterilizada, repetindo o procedimento até obter a suspensão 10^{-3} . Das diluições 10^{-3} foi transferido 1 ml para placas de Petri contendo meio Martini semisseletivo, sendo as placas incubadas a 25°C durante 5 dias. Todos isolados obtidos em ambas as coletas foram repicados até a obtenção de culturas puras. As culturas puras foram depositadas na Micoteca URM – Coleção de Culturas do Departamento de Micologia da UFPE, sob os códigos de acesso indicados na Tabela 4.

2.1.2. Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento

O DNA genômico foi extraído usando o Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). As regiões gênicas amplificadas, os respectivos primers e programações utilizados para identificar espécimes isolados estão descritos na Tabela 3. As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas utilizando 6,25 µl de GoTaq Master Mix (Promega), 0,5 µl de cada primer (10 pM), 4,25 µl de água livre de nuclease e 1 µl de cada amostra de DNA genômico para cada reação. Os produtos de PCR foram purificados usando as enzimas EXO + SAP (Fosfatase Alcalina/Exonuclease I) (Cellco, São Carlos, Rondônia, Brasil) e enviados para sequenciamento com os mesmos primers utilizando o Kit de Sequenciamento de Ciclo BigDye® Terminator v. na Plataforma de Sequenciamento e Expressão Gênica no Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os eletroferogramas foram editados usando o Sequencher 4.7 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, Michigan). As sequências geradas foram depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Tabela 4).

2.1.3. Filogenia

As comparações iniciais foram feitas usando as sequências ITS na ferramenta BLASTn no banco de dados GenBank (NCBI). Para as análises filogenéticas, sequências de referência dos grupos aos quais pertencem os isolados foram recuperadas do GenBank, alinhadas no MAFFT v.7 (KATOHI; STANDLEY, 2013; KATOHI et al., 2019) e ajustadas usando MEGA v.7 (KUMAR et al., 2016). Para cada gênero dos isolados obtidos foram realizadas Análises de Máxima Verossimilhança (ML) e/ou Inferência Bayesiana (BI) utilizando uma matriz concatenada de regiões gênicas específicas para cada gênero, utilizando RAxML-HPC BlackBox 8.2.12 (STAMATAKIS, 2014) e MrBayes v.3.2.7a (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003), respectivamente, no CIPRES Science Gateway (<https://www.phylo.org/>) (MILLER et al., 2010). O modelo de substituição de nucleotídeos para as análises de BI foi estimado separadamente para cada região genética usando MrMODELTEST 2.3 (POSADA; BUCKLEY, 2004). As análises de ML foram realizadas com 1.000 replicações de bootstrap usando parâmetros padrão. As análises de BI foram realizadas por 10 milhões de gerações e os primeiros 25% das amostras foram descartadas. As árvores foram visualizadas no FigTree v. 1.1.2 (RAMBAUT, 2009). Os valores de bootstrap (bs) e valores de probabilidade posterior (pp) de ML e BI, respectivamente, estão localizados nos nós. Valores acima de 70% bs e 0,90 pp são apresentados.

2.2. Testes de patogenicidade

Preparo do inóculo: o inóculo foi preparado utilizando discos de micélio de 6 mm de diâmetro retirados de uma cultura de cada fungo fitopatogênico com 7 dias de crescimento em BDA. Os discos foram transferidos para um Erlenmeyer contendo 50 g

de arroz parboilizado autoclavado (BRITO et al., 2020). Para o tratamento controle, foram preparados frascos Erlenmeyer sem o disco de micélio.

Inoculação das mudas: manivas da variedade Santo Estevão foram cedidas de uma área agrícola do município de Garanhuns. Para o plantio, as manivas foram lavadas em água corrente e depois desinfetadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio (0,5% de cloro ativo) por 5 min, lavadas em água destilada, também por 5 min, e colocadas para secar durante 48 horas. Aos 20 dias após o plantio das mudas, 10g de grãos de arroz colonizados pelo patógeno foram incorporados ao solo. Grãos de arroz não colonizados foram utilizados como tratamento controle. Foram utilizadas três repetições (três mudas) para cada tratamento. As plantas foram observadas com frequência semanal e a presença ou ausência de sintomas foi avaliada após 66 dias após o plantio.

Inoculação de raízes: foram utilizadas raízes sadias de mandioca da variedade Santo Estevão. As raízes tuberosas foram lavadas em água corrente e depois desinfetadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio (0,5% de cloro ativo) por 5 min, lavadas em água destilada autoclavada, também por 5 min, e colocadas para secar em papel toalha. Após a secagem, apenas um grão de arroz colonizado por patógenos foi inserido em uma abertura perfurada na raiz com ponta esterilizada, com profundidade suficiente para colocar o arroz (aproximadamente 6 mm). Para o tratamento controle foi utilizado grão de arroz não colonizado e autoclavado. Cada tratamento foi composto por cinco raízes de mandioca, que foram incubadas em caixas plásticas dentro de câmara úmida em temperatura ambiente (26 ± 2 °C) com luz ambiente. A presença de sintomas foi avaliada até o 7º dia após a inoculação. Os experimentos foram repetidos duas vezes. Os patógenos foram reisolados dos tecidos necróticos e comparados morfológicamente com os isolados utilizados na inoculação.

2.3. Atividade da enzima quitinase

A avaliação de produção de quitinase foi testada utilizando sete isolados de *Trichoderma*, sendo três delas isoladas da rizosfera da mandioca (*T. koningiopsis* URM 8972, *T. longibrachiatum* URM 8974, *Trichoderma* sp. URM 8973), e quatro procedentes da Micoteca URM (*T. aureoviride* URM 5158, *T. longibrachiatum* URM 6068, *T. harzianum* URM 6508, *T. aureoviride* GUS 5158). Esporos dessas culturas com 7 dias de crescimento em BDA a 25 °C foram suspensos em 10 ml de solução de Tween 80 (0,02%), a partir dessa suspensão foi realizada a contagem de esporos em câmara Neubauer, sendo a concentração ajustada para 10^7 esporos mL⁻¹.

Para fermentação submersa, 2 ml de cada suspensão de esporos foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 50 ml de meio seletivo (sacarose, NaNO₃, KH₂PO₄, KCl, MgSO₄, FeSO₄7H₂O, 10 ml de quitina coloidal), com pH 6,5. Os frascos de Erlenmeyer foram mantidos sob agitação constante (150 rpm) a 37 °C durante 24, 48, 72 e 96 horas. Concluído o tempo de fermentação, o conteúdo do frasco foi filtrado a vácuo, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a $12.300 \times g$, a 4°C por 30 minutos, obtendo-se assim o extrato bruto enzimático (BONFIM et al., 2021).

Para a avaliação da atividade enzimática, a mistura reacional foi composta de 0,5 ml de extrato bruto enzimático, 0,5 ml de tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,0) e 1 ml de quitina coloidal (20%) foi incubada a 37 °C por 30 minutos (WAGHMARE; GHOSH, 2010). Posteriormente, 100 µl dessa mistura foram transferidos para novo tubo de ensaio e adicionado a 1 ml de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNSA), em seguida incubado em banho fervente por 10 min. Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e avaliadas em espectrofotômetro em absorvância de 570 nm. Uma unidade de quitinase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de N-acetilglucosamina por minuto. A mediana geral, mensurada entre zero e 96 horas após incubação, foi calculada e o desempenho dos isolados foi estatisticamente comparado pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e Dunn.

2.4. Teste de antagonismo

O antagonismo de duas espécies de *Trichoderma* foi testado contra 11 isolados patogênicos obtidos neste estudo, utilizando o método de cultura dupla desenvolvido por Li et al. (2003), que avaliou o crescimento micelial. Todos os isolados de *Trichoderma* e patógenos foram cultivados em BDA a 25° C por 7 dias no escuro. Discos de 6 mm de diâmetro contendo *Trichoderma* e patógenos foram distribuídos em placas de Petri com meio BDA. As placas continham um disco com *Trichoderma* de um lado e outro disco com o patógeno do lado oposto e foram incubadas a 25 °C, sendo observadas durante quatro períodos de incubação (24, 48, 72 e 96 horas). A medição do crescimento micelial foi realizada em milímetros de cada patógeno desde a borda mais próxima até seu alcance máximo em direção ao *Trichoderma* em placa de Petri, com o auxílio de uma régua. Os dados foram submetidos à análise de regressão logística para determinar a inibição dos patógenos pelos antagonistas ao longo do tempo.

2.5. Produção e inoculação de biochar

O biochar foi produzido a partir de resíduos da fermentação de uva, cedidos pela Vinícola Vale das Colinas, localizada no município de Garanhuns, Agreste de Pernambuco, Brasil. O material foi submetido ao processo de combustão incompleta em um pequeno forno térmico caseiro (LIMA et al., 2018), e após a pirólise foi peneirado em malha de 2 mm, obtendo-se o biochar.

Amostras do referido biochar foram enviados para o laboratório Plant Soil localizado no município de Petrolina, Pernambuco, onde foi realizada a caracterização: nitrogênio (21,7 g/Kg), sódio (4,5 g/Kg), potássio (5,9 g/Kg), cálcio (6,8 g/Kg), magnésio (2,0 g/Kg), fósforo (7,6 g/Kg), enxofre (2374.7 mg/Kg), silício (0,1 g/Kg), ferro (796.0 mg/Kg), cobre (29,9 mg/Kg), manganês (57,0 mg/Kg), zinco (263,2 mg/Kg), boro (20,1 mg/Kg), carbono orgânico (142,8 g/Kg), relação carbono/nitrogênio (6,6), capacidade de troca catiônica (107,9 mmol/dm³) e pH (10,28).

Os inóculos foram preparados de acordo com o método descrito por Silva et al. (2016) e ajustado para manter na concentração de 10^6 esporos ml^{-1} . Para inoculação foram usados 12g de biochar e 4 ml de suspensão de esporos de *T. koningiopsis* URM 8972, incubado a 25 °C por 15 dias para posterior aplicação no solo.

2.6. Experimento de controle biológico de *Curvularia* sp. e *Fusarium* *agrestense* com biochar e *Trichoderma koningiopsis* URM 8972

O experimento foi conduzido em casa de vegetação localizada na Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE), município de Garanhuns, Pernambuco. O bioinoculante foi incorporado no solo, dos vasos correspondentes aos tratamentos, 15 dias antes do plantio. Foram utilizadas manivas de mandioca da variedade Santo Estevão, medindo de 8-10 cm, que foram previamente lavadas em água corrente e em seguida desinfetadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio por 5 min, lavadas em água destilada, também por 5 min e posteriormente colocadas para secar até o momento do plantio. Duas manivas foram plantadas em cada vaso, e foram desbastadas após 15 dias, permanecendo a planta mais vigorosa. Os inóculos dos patógenos foram feitos de acordo com a metodologia descrita no tópico 2.2.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram: controle absoluto, apenas com solo (zero); solo infestado com o patógeno *F. agrestense* (F); solo infestado com o patógeno *Curvularia* sp. (C); biochar inoculado com *T. koningiopsis* URM 8972 aplicado em solo infestado com *F. agrestense* (FT); e biochar inoculado com *T. koningiopsis* URM 8972 aplicado em solo infestado com *Curvularia* sp. (CT). A presença de sintomas foi avaliada 70 dias após o plantio. Os patógenos foram reisolados dos tecidos necróticos e comparados morfológicamente com os isolados utilizados na inoculação, completando assim os Postulados de Koch. As lesões internas nas manivas causadas pelos patógenos foram medidas e as médias foram analisadas pelo teste LSD.

2.7. Análises de solo

Amostras de solo seco de cada tratamento foram coletadas após 66 de plantio, para as determinações dos valores de pH em água (1:2.5) e o conteúdo de P, Na⁺, K⁺, de acordo com a metodologia de Silva (2009). O P inorgânico lábil, Na⁺ e K⁺ foram extraídos pela solução de Mehlich 1 (H₂SO₄ 0.0125 mol L⁻¹ + HCl 0.05 mol L⁻¹). O P foi quantificado por colorimetria espectrofotométrica e Na⁺ e K⁺ foram determinados por fotometria de chama.

A quantificação da biomassa microbiana (CBM) foi determinada pela metodologia de irradiação, sendo a extração realizada pela adição de 80 ml de K₂SO₄ 0,5 M para cada 20 g de solo (TATE et al., 1988). O teor de C foi determinado por colorimetria (BARTLETT; ROSS, 1988).

As amostras de solo foram refrigeradas a 4°C até análise das atividades enzimáticas: β -glucosidase (BETAGLU) (3.2.1.21), Urease (URE) (EC 3.5.1.5), Fosfatase ácida e alcalina (Pac e Palk) (EC 3.1.3), e arylsulfatase (EC 3.1.6.1). As determinações das atividades enzimáticas foram baseadas em análise colorimétrica dos produtos de libertação por cada enzima quando a amostra de solo foi submetida a condições normais de incubação com substrato adequado (Sigma Aldrich). A atividade β -glucosidase, Fosfatase, Urease e Aril foram determinadas segundo a metodologia proposta por Eivazi; Tabatabai (1988), Eivazi; Tabatabai (1977), Kandeler; Gerber (1988) e Tabatabai; Bremmer (1972) respectivamente. As atividades enzimáticas são expressas em microgramas de produto produzido por grama de solo e por tempo específico.

2.8. Análise estatística

Todos as análises foram realizadas no ambiente R v.4.3.1 (R Core Team, 2023) através da interface RStudio (RStudio Team, 2023). Os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias foram analisados pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Estatísticas adotadas para os dados paramétricos foram a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc LSD de Fisher ou Tukey ($\alpha = 0.05$). Os dados não paramétricos (enzimáticos) foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste post-hoc de Dunn ($p = 0.05$). A análise de componentes principais (PCA) foi feita para estudar a variabilidade dos atributos do solo em função dos tratamentos aplicados, sendo modelada através de ferramentas do pacote R ‘factoextra’. A análise de regressões polinomiais e logística para os dados de antagonismo foram feitas com base nas bibliotecas R “ggplot” (função ‘geom_smooth’) e “stats” (função ‘glm’), respectivamente. Todos os gráficos foram gerados com a biblioteca R “ggplot2”.

3. Resultados

3.1. Sintomatologia e isolamento de fungos

Raízes de plantas de mandioca foram coletadas de uma área de plantio que apresentava sintomas de podridão radicular (Figura 8). Das raízes coletadas foram obtidos 56 isolados pertencentes ao complexo fusarióide *Fusarium oxysporum*, aos gêneros *Neocosmospora*, *Diaporthe*, *identificado em estudo*, *Curvularia* e *Macrophomina*, os isolados pertencentes aos dois últimos gêneros foram confirmados pela análise de sequências de DNA neste capítulo. A maior parte desses isolados foram identificados e tiveram a patogenicidade comprovada em outros estudos (SILVA et al., 2024a; 2024b). Portanto, para este estudo, foram selecionados os patógenos *Curvularia* e *Macrophomina* para os Postulados de Koch e identificação molecular, e *Curvularia* e *F. agrestense* para os testes de controle biológico com aplicação de inoculante em solo cultivado com plantas de mandioca.

O isolamento a partir de amostras de solo resultou na obtenção de um total de 38 isolados, dos quais apenas quatro isolados foram confirmados pela análise de sequências de DNA como pertencentes ao gênero *Trichoderma*.



Figura 8. Sintomatologia das plantas na área de coleta. A. e C. Plantas com sintomas de murcha e amarelecimento. B. Maniva com sintoma de podridão.

3.2. Análise filogenética

De acordo com a pesquisa via BLASTn, a sequência ITS do isolado URM 8968 compartilhou 100% de similaridade com *Curvularia senegalenses*. Uma árvore de Máxima Verossimilhança foi contruída com sequências de referência do gênero *Curvularia*, no entanto, a região ITS não foi específica o suficiente para resolver a identificação específica deste isolado, e devido à dificuldade de amplificar sequências deste gênero outras regiões com maior especificidade não foram obtidas, sendo necessário estudos futuros para a identificação ser finalizada. Sequências de ITS e *TEF1- α* do isolado URM 8969 compartilharam 100% de similaridade com *Macrophomina phaseolina*. A análise combinada de ITS, *TEF1- α* para os isolados agrupados em *Macrophomina* consistiu em 12 táxons, incluindo o grupo externo *Botryosphaeria dothidea* CBS 115476 (Figura 9).

Buscas via BLASTn também foram realizadas para os isolados do gênero *Trichoderma* e sequências das regiões *TEF1- α* e *RPB2* mostraram 100%/99% de similaridade do isolado URM 8972 com *T. koningiopsis*, 99%/99% de similaridade de URM 8974 com *T. longibrachiatum*, e 97% de similaridade de URM 8973 e S2C2 com *T. harzianum*. A análise combinada das regiões *TEF1- α* e *RPB2* para os isolados agrupados em *Trichoderma* consistiu em 74 táxons, incluído o grupo externo *Nectria eustromatica* CBS 121896 e *Thyronectria berolinensis* CBS 127382 (Figura 10). Esta análise mostrou que o isolado URM 8972 se agrupou em um clado com ex-tipo representativo de *T. koningiopsis*, o isolado URM 8974 se agrupou com *T. longibrachiatum*, e os isolados URM 8973 e S2C2 não se agruparam com nenhuma espécie conhecida, sendo provavelmente uma nova espécie, a ser comprovada em outros estudos.

Tabela 3. Regiões gênicas utilizadas neste estudo com primers e processo de PCR.

| Gênero | Região | Primers | Programação da PCR | Referência |
|---------------------|---------------------------------|---------------------|---|--|
| <i>Curvularia</i> | ITS | ITS1/ ITS4 | 94 °C: 5 min; (95 °C: 30 s, 48 °C: 30 s, 72 °C: 1 min) × 35 ciclos; 72 °C: 5 min | White et al., 1990 |
| <i>Macrophomina</i> | ITS | ITS1/ ITS4 | 94 °C: 5 min; (95 °C: 30 s, 48 °C: 30 s, 72 °C: 1 min) × 35 ciclos; 72 °C: 5 min | White et al., 1990 |
| <i>Macrophomina</i> | <i>TEF1-α</i> | EF1F/EF2R | 95 °C: 5 min; (94 °C: 50s, 56 °C: 50 s, 72 °C: 50s) × 40 ciclos; 72 °C: 5 min | JACOBS et al., 2004 |
| <i>Trichoderma</i> | <i>RPB2</i> | 5F/7CR | 95 °C: 5 min; (95 °C: 1 min, 55 °C: 1 min, 72 °C: 1 min) x 30 ciclos; 72 °C: 10 min | Liu et al., 1999 |
| <i>Trichoderma</i> | <i>TEF1-α</i> | EF1-728F/TEF1LLERev | (95 °C: 5 min; (95 °C: 1 min, 55 °C: 1 min, 72 °C: 1 min) x 30 ciclos; 72 °C: 10 min) | Carbone; Kohn, 1999/Jaklitsch et al., 2005 |

Tabela 4. Números de acesso do Genbank das sequências de DNA usadas nas análises filogenéticas. Os espécimes obtidos neste estudo estão destacados em negrito.

| Espécies | Códigos | ITS | <i>RPB2</i> | <i>TEF1-α</i> |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|-------------|---------------------------------|
| <i>Botryosphaeria dothidea</i> | CBS 115476T | NG062738 | - | DQ767637 |
| <i>Curvularia sp.</i> | URM 8968 | PQ425589 | - | - |
| <i>Macrophomina euphorbiicola</i> | CMM4145T | KU058937 | - | KU058907 |
| <i>M. euphorbiicola</i> | CMM4134 | KU058936 | - | KU058906 |
| <i>M. phaseolina</i> | URM 8969 | PQ425590 | - | PQ450143 |
| <i>M. phaseolina</i> | CBS20547T | KF951622 | - | KF951997 |
| <i>M. phaseolina</i> | CPC21513 | KF951903 | - | KF952138 |
| <i>M. pseudophaseolina</i> | CBS 137165T | KF951791 | - | KF952153 |
| <i>M. pseudophaseolina</i> | CBS 137166 | KF951786 | - | KF952148 |
| <i>M. tecta</i> | BRIP 70781T | MW591684 | - | MW592271 |
| <i>M. tecta</i> | BRIP 71603 | MW591631 | - | MW592218 |

| | | | | |
|----------------------------------|-----------------|----------|-----------------|-----------------|
| <i>M. vaccinii</i> | CGMCC319503T | MK687450 | - | OP672298 |
| <i>M. vaccinii</i> | CGMCC319504 | MK687451 | - | MK687427 |
| <i>Nectria eustomatica</i> | CBS 121896T | - | HM534886 | HM534875 |
| <i>Trichoderma afarasin</i> | GJS 99 227T | - | - | AF348093 |
| <i>T. afroharzianum</i> | GJS 04 186T | - | FJ442691 | FJ463301 |
| <i>T. afroharzianum</i> | LESF229 | - | KT278945 | KT279013 |
| <i>T. asperellum</i> | CBS 433 97T | - | EU248617 | AF456907 |
| <i>T. asperellum</i> | CGMCC 6422 | - | KF425755 | KF425756 |
| <i>T. atroviride</i> | DAOM 222144 | - | FJ442754 | AF456889 |
| <i>T. atroviride</i> | Th002 | - | AB558915 | AB558906 |
| <i>T. azevedoi</i> | CEN1403 | - | MK696800 | MK696638 |
| <i>T. azevedoi</i> | CEN1422T | - | MK696821 | MK696660 |
| <i>T. bannaense</i> | HMAS 248840T | - | KY687979 | KY688037 |
| <i>T. bannaense</i> | HMAS 248865 | - | KY688003 | KY688038 |
| <i>T. breve</i> | HMAS 248845 | - | KY687984 | KY688046 |
| <i>T. breve</i> | HMAS 248844T | - | KY687983 | KY688045 |
| <i>T. brunneoviride</i> | CBS 121130T | - | EU498357 | EU498316 |
| <i>T. camerunense</i> | GJS 99 230T | - | - | AF348107 |
| <i>T. camerunense</i> | GJS 99 231 | - | - | AF348108 |
| <i>T. capillare</i> | CPK 2883T | - | JN182312 | JN182283 |
| <i>T. citrinoviride</i> | TAMA 188T | - | AB807656 | AB807644 |
| <i>T. endophyticum</i> | Dis 221ET | - | FJ442775 | FJ463316 |
| <i>T. guizhouense</i> | S278T | - | KF134791 | KF134799 |
| <i>T. guizhouense</i> | S628 | - | KJ665273 | KJ665511 |
| <i>T. hamatum</i> | CBS 132565 | - | KJ665275 | KJ665514 |
| <i>T. hamatum</i> | DAOM 167057T | - | AF545548 | EU279965 |
| <i>T. harzianum</i> | CBS 226 95 | - | AF545549 | AF348101 |
| <i>T. harzianum</i> | Thaum12 | - | MT118248 | MT081433 |
| <i>T. inhamatum</i> | CBS 273 78T | - | FJ442725 | AF348099 |
| <i>T. koningii</i> | 7723 | - | KJ634720 | KJ634753 |
| <i>T. koningii</i> | CBS 979 70 | - | EU248601 | AY665703 |
| <i>T. koningiopsis</i> | URM 8972 | - | PQ450145 | PQ450141 |
| <i>T. koningiopsis</i> | DIS 374A | - | FJ442730 | FJ463288 |
| <i>T. koningiopsis</i> | GJS 93 20T | - | - | AY376044 |
| <i>T. kunigamense</i> | TAMA 193T | - | AB807657 | AB807645 |
| <i>T. leguminosarum</i> | CBS 130014T | - | KJ665288 | KJ665551 |
| <i>T. leguminosarum</i> | S391 WU 33368 | - | KJ665287 | KJ665548 |
| <i>T. leguminosarum</i> | S503 WU 33398 | - | KJ665289 | KJ665552 |
| <i>T. lentiforme</i> | Dis 167C | - | FJ463309 | FJ463309 |
| <i>T. lentiforme</i> | GJS 98 6T | - | - | AF469195 |
| <i>T. lentinulae</i> | CGMCC 39847T | - | MN605867 | MN605878 |
| <i>T. lentinulae</i> | CGMCC 39848 | - | MN605868 | MN605879 |
| <i>T. lieckfeldtia</i> | GJS 00 14T | - | EU883562 | EU856326 |
| <i>T. lixii</i> | CBS 110080T | - | KJ665290 | FJ716622 |
| <i>T. longibrachiatum</i> | URM 8974 | - | - | PQ450140 |
| <i>T. longibrachiatum</i> | CBS 816 68T | - | DQ087242 | EU401591 |

| | | | | |
|-------------------------------|-----------------|---|-----------------|-----------------|
| <i>T. longibrachiatum</i> | TC714 | - | MF371211 | MF371226 |
| <i>T. longibrachiatum</i> | UTHSC 07 2530 | - | - | HG931246 |
| <i>T. notatum</i> | JZBQT1Z11T | - | OP832382 | OP832397 |
| <i>T. notatum</i> | JZBQT1Z5 | - | OP832381 | OP832396 |
| <i>T. parareesei</i> | TUB F 1066T | - | OR687153 | GQ354353 |
| <i>T. phayaoense</i> | SDBR CMU349 | - | MW002074 | MW002073 |
| <i>T. pingquanense</i> | JZBQT7Z10 | - | ON649961 | ON649908 |
| <i>T. pingquanense</i> | JZBQT7Z11 | - | ON649962 | ON649909 |
| <i>T. polysporum</i> | 8147 | - | KJ634738 | KJ634771 |
| <i>T. polysporum</i> | 8232 | - | KJ634746 | KJ634779 |
| <i>T. pseudokoningii</i> | DAOM 167678T | - | KJ842214 | AY865641 |
| <i>T. pseudokoningii</i> | GJS NS 19 | - | JN175535 | JN175588 |
| <i>T. pyramidale</i> | CBS 135574T | - | KJ665334 | KJ665699 |
| <i>T. pyramidale</i> | S573 | - | - | KJ665698 |
| <i>T. reesei</i> | GJS 00 89 | - | JN175548 | JN175599 |
| <i>T. rifaii</i> | Dis 337F | - | FJ442720 | FJ463321 |
| <i>T. simmonsii</i> | GJS 91 138T | - | FJ442757 | AF443935 |
| <i>T. simmonsii</i> | GJS 92 100 | - | FJ442710 | AF443937 |
| <i>T. songyi</i> | TC480 | - | KX266249 | KX266243 |
| <i>T. songyi</i> | TC556 | - | KX266244 | KX266250 |
| <i>Trichoderma sp.</i> | URM 8973 | - | PQ450144 | PQ450142 |
| <i>T. stilbohypoxyli</i> | CPK 1977 | - | FJ860592 | FJ860702 |
| <i>T. tsugarensae</i> | TAMA 203T | - | AB807659 | AB807647 |
| <i>T. vermifimicola</i> | CGMCC 39694T | - | MN605871 | MN605882 |
| <i>T. vermifimicola</i> | CGMCC 39850 | - | MN605870 | MN605881 |
| <i>T. xixiacum</i> | CGMCC 39697T | - | MN605874 | MN605885 |
| <i>T. xixiacum</i> | CGMCC 39698 | - | MN605875 | MN605886 |

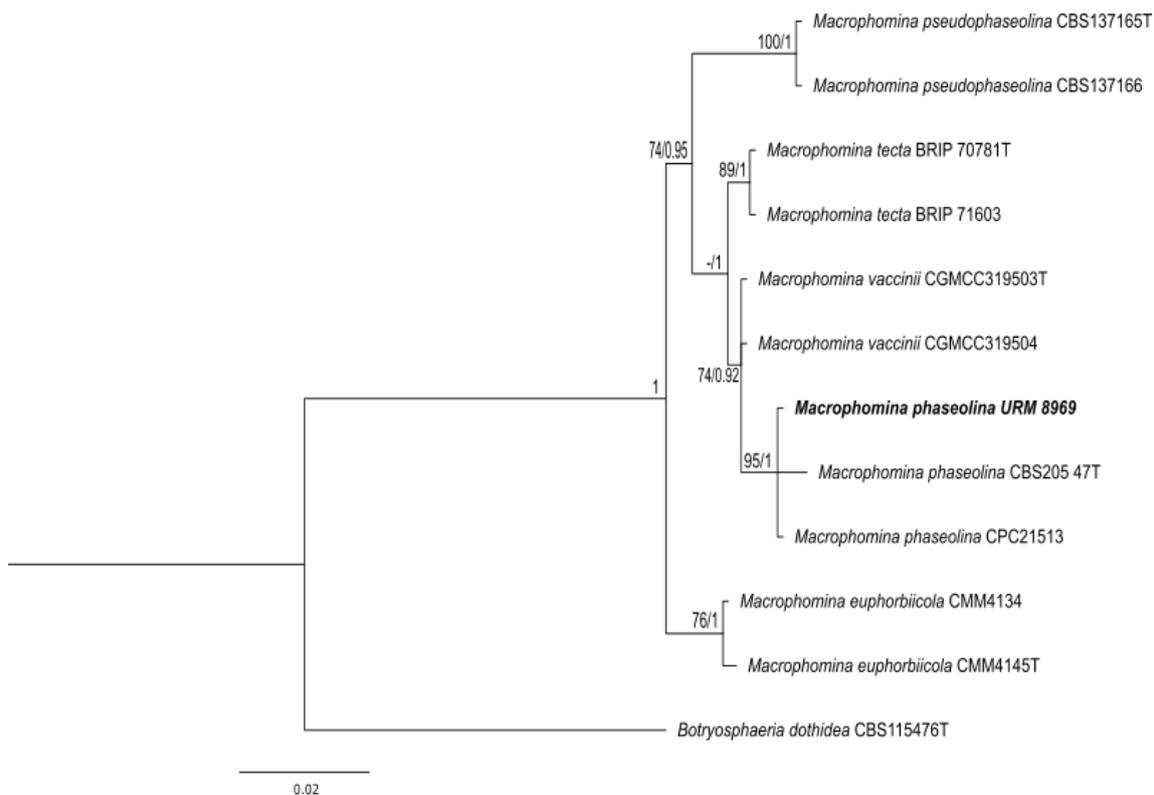


Figura 9. Árvore filogenética gerada a partir da análise de Inferência Bayesiana (BI) e Máxima Verossimilhança (ML) de seqüências concatenadas de ITS e *TEFI- α* do gênero *Macrophomina*. Probabilidades posteriores bayesianas estão indicadas acima dos nós. A árvore foi enraizada com a *Botryosphaeria dothidea* CBS 115476. O espécime obtido neste estudo está destacado em negrito.

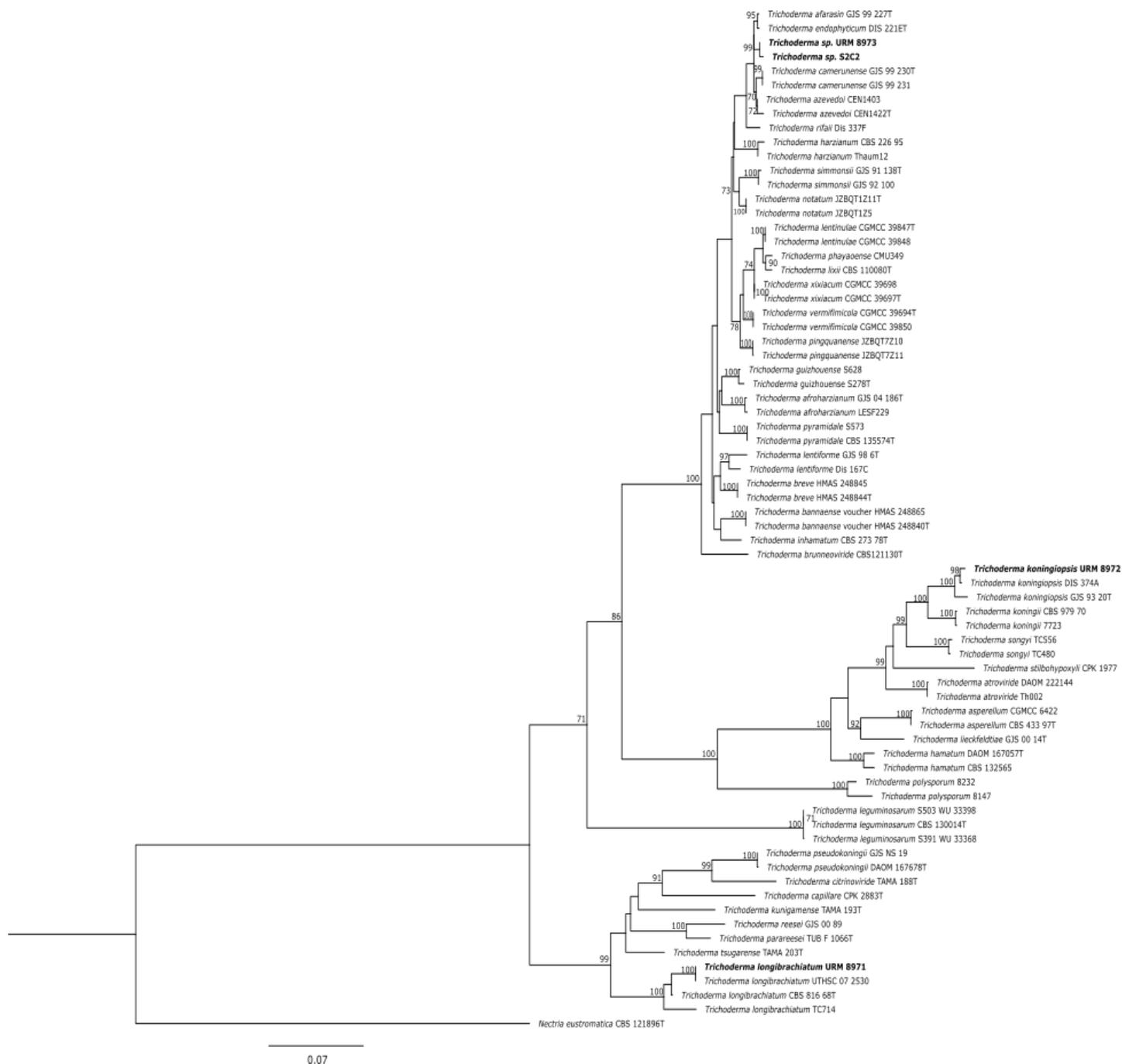


Figura 10. Árvore filogenética gerada a partir da análise de Máxima Verossimilhança (ML) de seqüências concatenadas de *TEF1-α* e *RPB2* do gênero *Trichoderma*. A árvore foi enraizada com *Nectria eustromatica* CBS 121896. As espécies obtidas neste estudo estão destacadas em negrito.

Teste de patogenicidade

O teste de patogenicidade realizado em raízes tuberosas de mandioca confirmou a patogenicidade de *Curvularia* sp. URM 8968 e *Macrophomina phaseolina* URM 8969, isolados obtidos neste estudo (Figura 11). Sete dias após a inoculação, as raízes foram cortadas e mostraram sinais de podridão partindo do ponto onde o arroz

colonizado foi inserido como inóculo. No caso de *Curvularia*, as raízes apresentaram lesões necróticas com aspecto seco e coloração acastanhada (Fig. 11, A1) e micélio no ponto de inoculação sobre a casca. As raízes inoculadas com *M. phaseolina* também apresentaram lesões necróticas com aspecto seco e coloração cinza escuro no centro e acastanhada nas bordas (Fig. 11, B1), apresentando massa de micélio sobre a casca também. As raízes do controle permaneceram assintomáticas (Fig. 11, C1).

No teste de patogenicidade em plantas, os isolados *Curvularia* sp. URM 8968 e *M. phaseolina* URM 8969 também se mostraram capazes de causar doença, sendo observados sintomas de doença em toda a planta (Figura 11). Todas as plantas cultivadas em solo com inóculo de *Curvularia* (Fig. 11, A2-A3) e *M. phaseolina* (Fig. 11, B2-B3) apresentaram sintomas de amarelecimento, murcha e seca, seguido de queda das folhas. As plantas do controle cultivadas em solo livre de patógenos permaneceram saudáveis (Fig. 11, C2-C3). Em ambos os testes, as lesões apresentaram uma grande variação nos tamanhos, desta forma, não foi aplicado o teste de médias.



Figura 11. Teste de patogenicidade em tubérculos e mudas de mandioca. **A1- A3.** Plantas com sintomas de podridão e tubérculo com lesão necrótica causadas por *Curvularia* sp. URM 8968. **B1-B3.** Plantas com sintomas de podridão e tubérculo com lesão necrótica causadas por e *Macrophomina phaseolina* URM 8969. **C1-C3.** Plantas e tubérculos saudáveis da testemunha.

Potencial de produção de quitinase por *Trichoderma*

A atividade enzimática da quitinase apresentou diferença significativa entre os espécimes testados (Gráfico 1). Dentre os sete isolados de *Trichoderma* testados, *Trichoderma koningiopsis* URM 8972 e *T. longibrachiatum* URM 6068 foram os que apresentaram as maiores atividades de quitinase médias de todo o período de fermentação. A atividade quitinolítica de todos os isolados permaneceu constante durante os tempos observados, com exceção de *T. longibrachiatum* URM 6068, que apresentou um pico da atividade enzimática em 48 horas de fermentação (Gráfico 1).

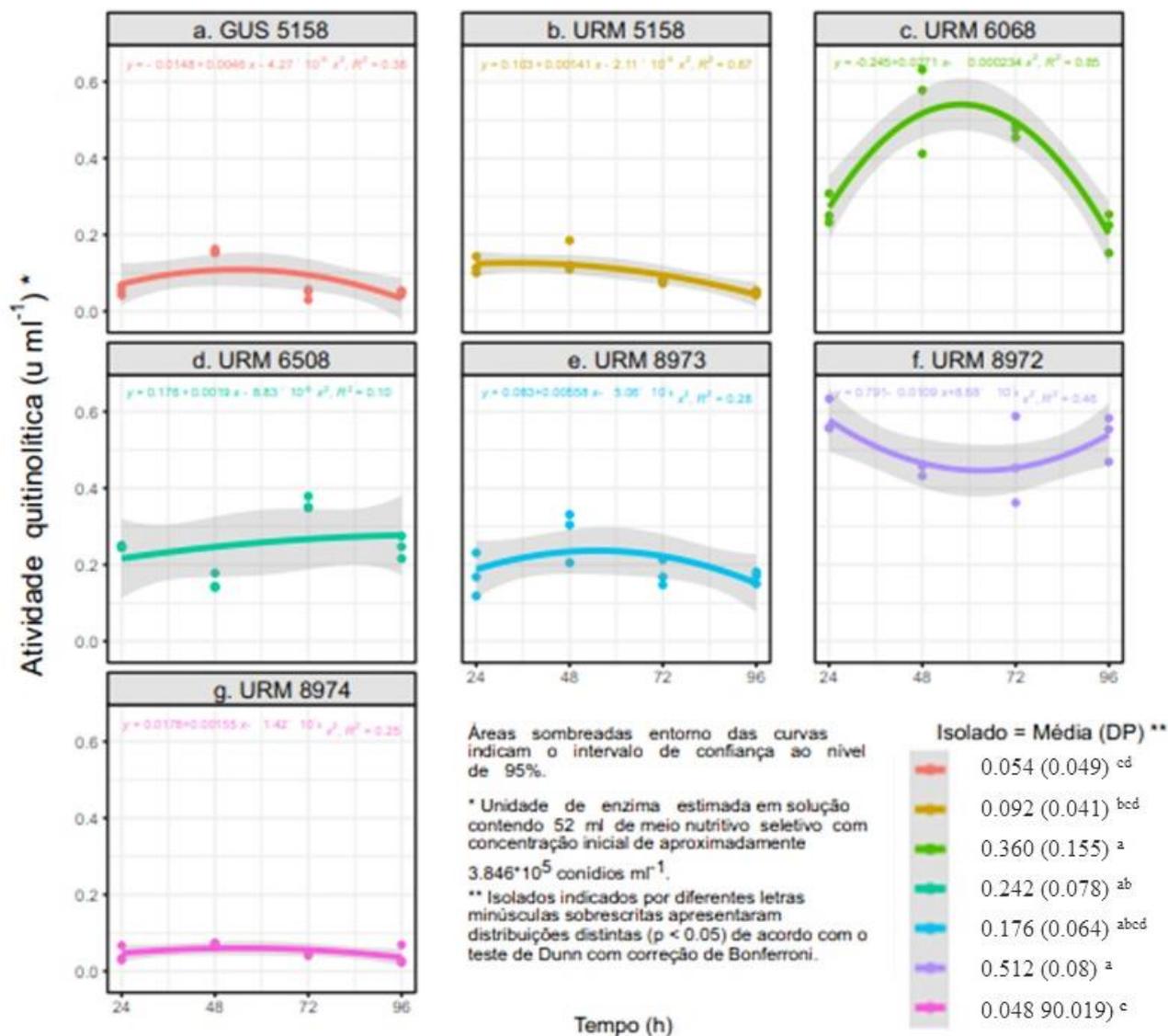


Gráfico 1. Análises de regressão da atividade quitinolítica de isolados fúngicos in vitro. A mediana geral, mensurada entre zero e 96 horas após incubação, foi calculada e o desempenho dos isolados foi estatisticamente comparado pelos testes não paramétrico de Kruskal-Wallis e Dunn, pelos quais valores seguidos por diferentes letras minúsculas sobrescritas indicaram distinções entre tratamentos. Legenda: **GUS 5158** – *Trichoderma aureoviride* URM 5158 (usado por mais de 10 anos); **URM 5158** – *T. aureoviride*; **URM 6068** – *T. longibrachiatum*; **URM 6508** – *T. harzianum*; **URM 8973** – *Trichoderma* sp.; **URM 8972** – *T. koningiopsis*; **URM 8974** – *T. longibrachiatum*.

Atividade antagonista de *Trichoderma* no controle de fungos fitopatogênicos

Os onze patógenos isolados de raízes de mandioca, que tiveram a patogenicidade confirmada neste capítulo e nos capítulos anteriores, foram submetidos ao teste de antagonismo com os isolados *T. koningiopsis* URM 8972 e *T. longibrachiatum* URM 6068. De acordo com a análise de regressão logística do crescimento micelial ao longo das 96 horas, os antagonistas testados apresentaram comportamento semelhante no controle e ambos mantiveram controlado o crescimento micelial de todos os patógenos (Gráfico 2), sendo possível observar a sobreposição dos antagonistas sobre a colônia da maioria dos patógenos (Figura 12). Com exceção de *Neocosmospora falciformis*, todos os patógenos apresentaram algum nível de inibição a partir das 48 horas na presença de antagonistas, isso é evidenciado pela curva de crescimento dos patógenos (linha preta) estarem sempre acima das curvas de crescimento dos patógenos com os antagonistas (linhas azul e amarela) a partir das 48 horas de crescimento (Gráfico 2).

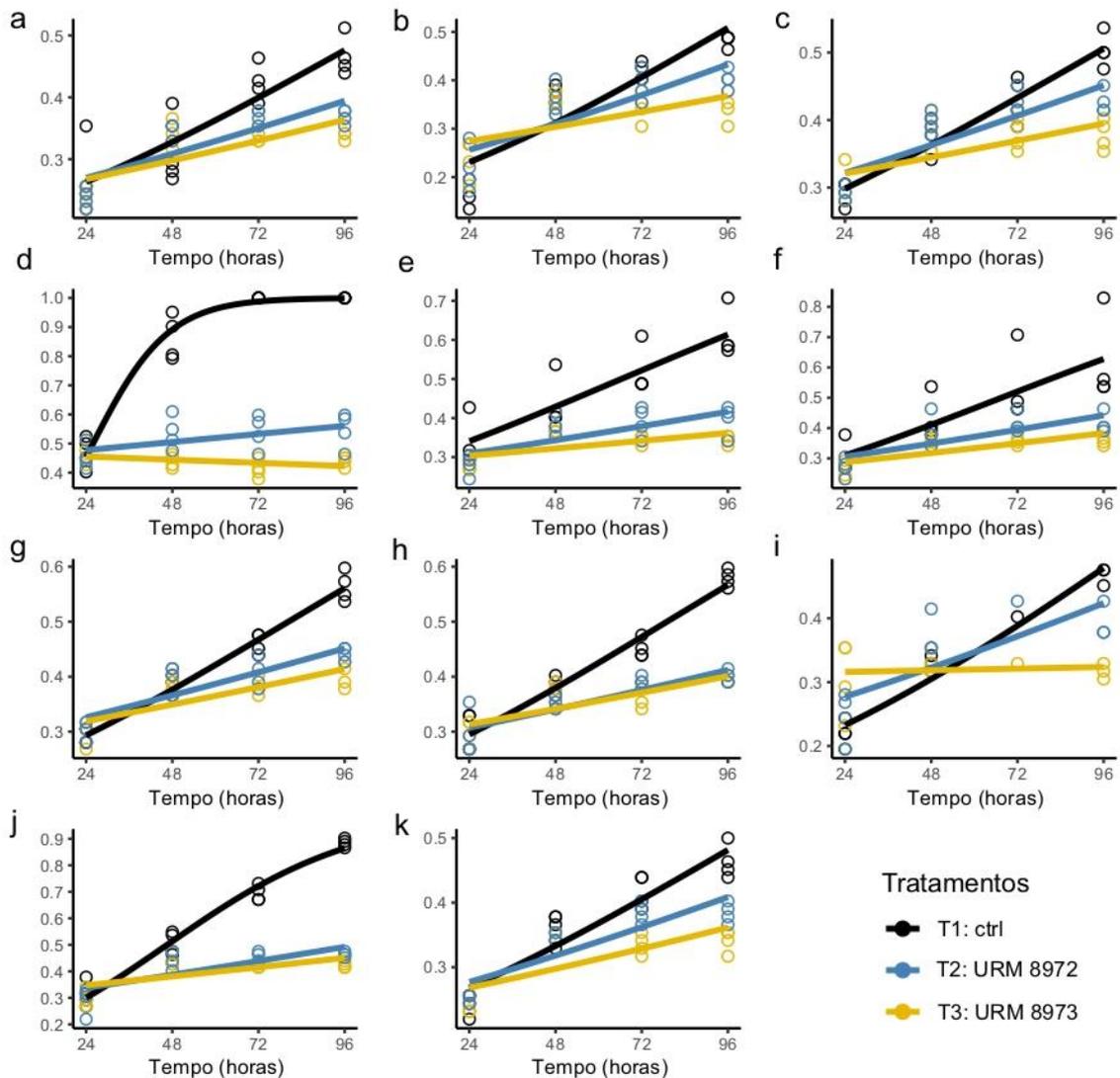


Gráfico 2. Curvas de crescimento dos tratamentos avaliados no teste de antagonismo in vitro. Os valores foram convertidos em escala entre 0 e 1 para regressão logística considerando os quatro tempos de avaliação. **T1.** Curva de crescimento dos patógenos. **T2.** Curva de crescimento do patógenos x *T. koningiopsis* URM 8972. **T3.** Curva de crescimento do patógenos x *T. longibrachiatum* URM 6068. **a.** *Curvularia* sp. URM 8968; **b.** *Fusarium gossypinum* URM 8695; **c.** *Fusarium* sp. URM 8705; **d.** *Macrophomina phaseolina* URM 8969; **e.** *F. agrestense* URM 8727; **f.** *F. triseptatum* URM 8690; **g.** *Fusarium* sp. URM 8703; **h.** *F. grosnichelii* URM 8694; **i.** *Neocosmospora falciformis* URM 8749; **j.** *Diaporthe ueckeri* URM8 8970. **k.** *Fusarium* sp. URM 8733.

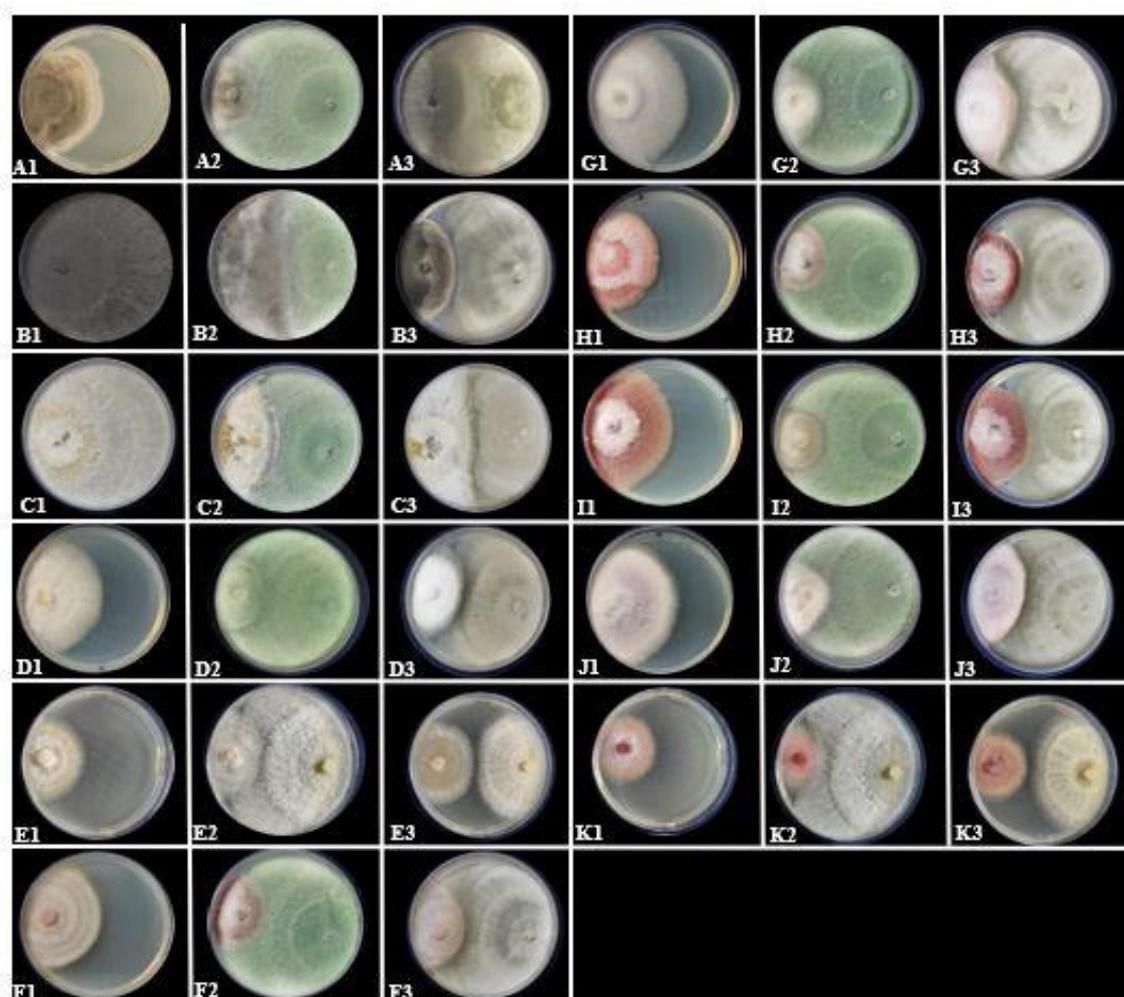


Figura 12. Antagonismo de *Trichoderma* frente a patógenos da podridão radicular da mandioca após 96 horas de crescimento micelial. **1.** Patógenos. **2.** Patógenos x *T. koningiopsis* URM 8972. **3.** Patógenos x *T. longibrachiatum* URM 6068. **A1-A3.** *Curvularia* sp. URM 8968. **B1-B3.** *Macrophomina phaseolina* URM 8969. **C1-C3.** *Diaporthe ueckeri* URM 8970. **D1-D3.** *Fusarium gossypinum* URM 8695. **E1-E3.** *Fusarium* sp. URM 8703. **F1-F3.** *Neocosmospora falciformis* URM 8749. **G1-G3.** *F. agrestense* URM 8727. **H1-H3.** *Fusarium* sp. URM 8705. **I1-I3.** *Fusarium* sp. URM 8733. **J1-J3.** *F. triseptatum* URM 8690. **K1-K3.** *F. grosnichelii* URM 8694.

Efeito do biochar e *Trichoderma koningiopsis* URM 8972 no controle da podridão radicular da mandioca

O inoculante de biochar de fermentação de resíduos da uva e *T. koningiopsis* URM 8972 reduziu a severidade da podridão radicular em plantas de mandioca causada por *F. agrestense* URM 8690 após 70 dias de plantio (Figura 13, Gráfico 3). Todas as plantas cultivadas em solo inoculado com os patógenos apresentaram sintomas de murcha, amarelecimento, seca e queda das folhas na parte aérea, e lesões necróticas de aspecto seco e coloração variando de marrom a preto nas manivas (Fig. 13, A-D). No entanto, as plantas cultivadas com biochar e *T. koningiopsis* URM 8972 e infestadas com *F. agrestense* visivelmente apresentaram menos sintomas na parte aérea, maior quantidade de folhas e lesões menores nas manivas (Fig. 13, B). Enquanto as plantas e manivas do controle sem patógenos e sem bioinoculante permaneceram assintomáticas (Fig. 13, E). Os resultados mostraram diferenças significativas entre os tratamentos, sendo observada maior severidade das lesões nas manivas de plantas cultivadas em solo infestado com *F. agrestense*, e redução da severidade das lesões em manivas de plantas infectadas por *F. agrestense* em solo tratado com o bioinoculante (Gráfico 3).



Figura 13. Severidade da podridão radicular da mandioca cultivada em solos tratados com biochar e *T. koningiopsis* URM 8972 e inoculado com *F. agrestense* URM 8690 e *Curvularia* sp. URM 8968. **A1-A3.** Plantas e maniva infectadas com *F. agrestense*. **B1-B3.** Plantas e maniva infectadas com *F. agrestense* em solo com biochar e *T. koningiopsis*. **C1-C3.** Plantas e

maniva infectadas com *Curvularia* sp. **D1-D3**. Plantas e maniva infectadas com *Curvularia* sp. em solo com biochar e *T. koningiopsis*. **E1-E3**. Plantas e maniva do tratamento controle, sem patógenos e sem biochar e *Trichoderma*.

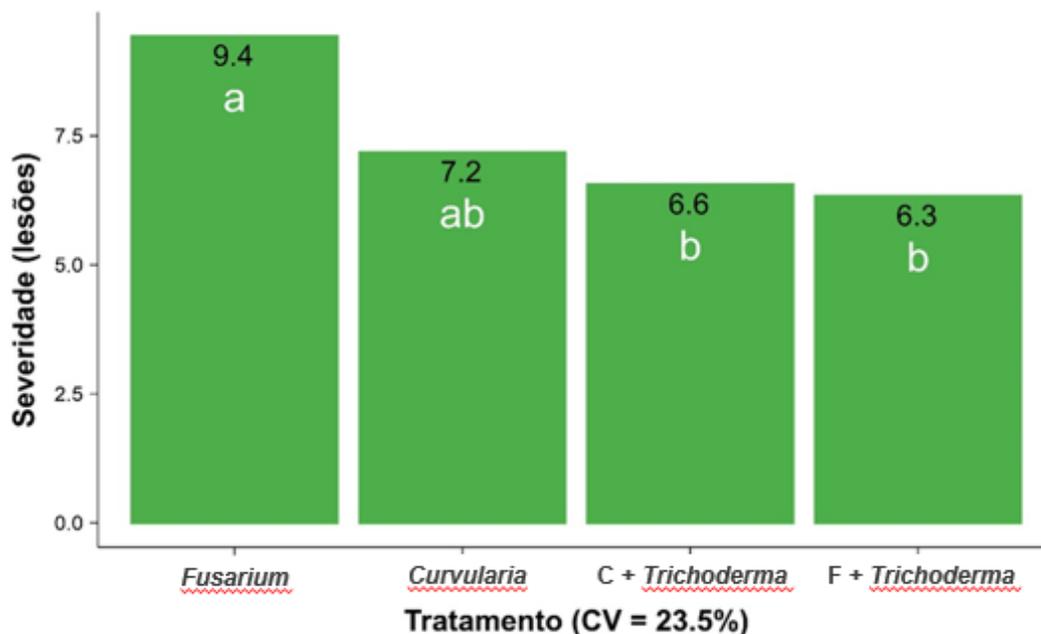


Gráfico 3. Análise de severidade de sintomas por meio da média do comprimento das lesões em centímetros. As médias que apresentaram diferentes letras foram significativamente diferentes entre si, de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. **Fusarium** - Solo com *F. agrestense* URM 8690. **Curvularia** - Solo com *Curvularia* sp. URM 8968. **C+Trichoderma** - Solo com *Curvularia* sp. URM 8968 e biochar com *T. koningiopsis* URM 8972. **F+Trichoderma** - *F. agrestense* URM 8690 e biochar com *T. koningiopsis* URM 8972.

Análises dos atributos do solo

Os tratamentos impactaram significativamente em alguns atributos químicos e microbiológicos do solo. Todos os tratamentos reduziram significativamente o pH dos solos comparados ao tratamento controle (Gráfico 4). A aplicação de biochar e *T. koningiopsis* provocou aumento dos teores de Fósforo (P) e Potássio (K). Enquanto os atributos sódio (Na) e carbono da biomassa microbiana (CBM) permaneceram constantes entre os tratamentos (Gráfico 4). Os tratamentos tiveram a tendência de reduzir a atividade da enzima arilsulfatase. A atividade da beta-glucosidase apresentou a tendência de diminuir na presença dos patógenos e se manter no solo com biochar e *T. koningiopsis*. Enquanto as atividades enzimáticas das enzimas urease, fosfatase ácida e alcalina permaneceram constantes (Gráfico 5).

De acordo com a análise dos componentes principais os tratamentos tiveram efeitos significativos sobre os atributos químicos e atividades enzimáticas do solo (Gráfico 6). Mudanças foram provocadas no solo pela aplicação dos patógenos e biochar com *T. koningiopsis*, o que é indicado pelo distanciamento entre os tratamentos

e o controle (triângulo vermelho). A aproximação dos tratamentos com biochar e *T. koningiopsis* (Triângulos amarelo e azul) dos nutrientes P e K mostram que esses tratamentos estão relacionados aos teores desses nutrientes no solo, indicando que a melhora da qualidade do solo pode estar relacionada com a redução da severidade das lesões causadas pelos patógenos. As enzimas arilsulfatase e betaglucosidase tiveram tendência a reduzir na presença dos tratamentos com patógenos (Gráfico 6).

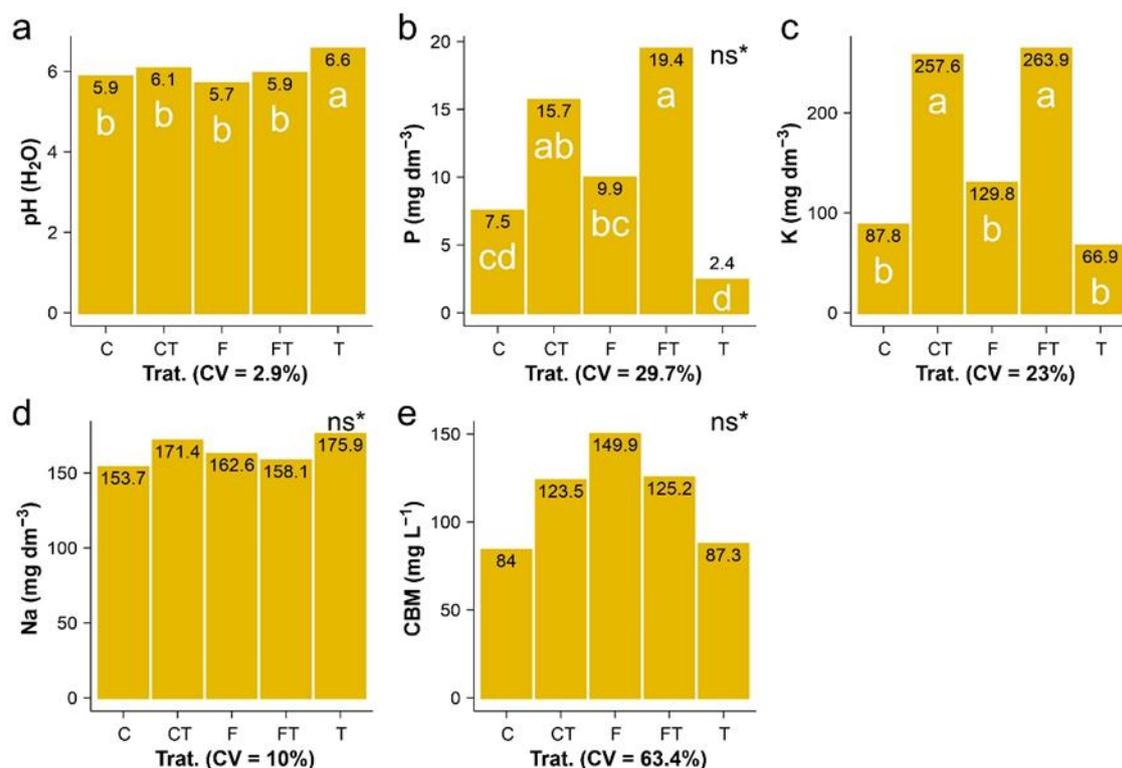


Gráfico 4. Médias dos atributos químicos do solo nos cinco tratamentos. Barras indicadas por diferentes letras minúsculas foram significativamente distintas entre si, de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Letras não foram adicionadas as variáveis sem diferenças significativas (ns) de acordo com o teste F ($\alpha = 0.05$). Legenda: **a.** pH determinado em água; **b.** fósforo disponível; **c.** potássio disponível; **d.** sódio; **e.** carbono da biomassa microbiana (CBM). **C** - Solo com *Curvularia* sp. URM 8968.; **CT** - Solo com *Curvularia* sp. URM 8968 e biochar com *T. koningiopsis* URM 8972; **F** - Solo com *F. agrestense* URM 8690; **FT** - *F. agrestense* URM 8690 e biochar com *T. koningiopsis* URM 8972; **T** - Solo sem patógenos e sem biochar e *T. koningiopsis* URM 8972.

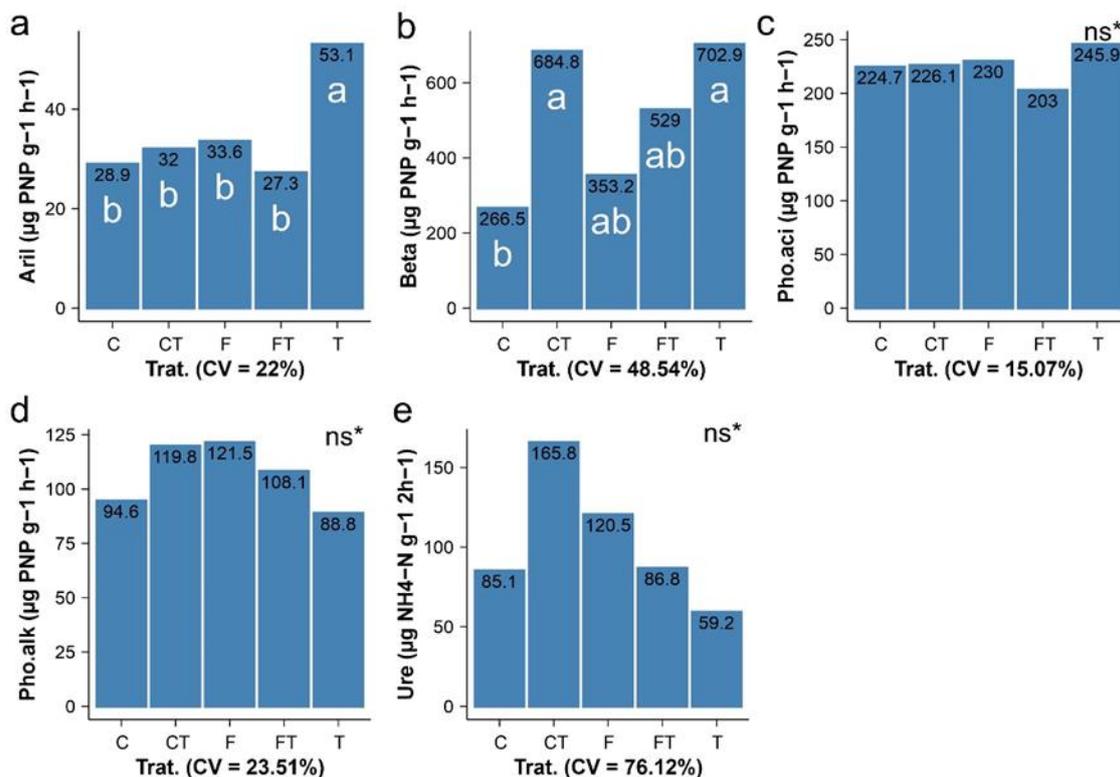


Gráfico 5. Médias das atividades enzimáticas do solo nos cinco tratamentos. Barras indicadas por diferentes letras minúsculas foram significativamente distintas entre si, de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Letras não foram adicionadas as variáveis sem diferenças significativas (ns) de acordo com o teste F ($\alpha = 0.05$). Legenda: **a.** arilsulfatase; **b.** β -glucosidase; **c.** fosfatase ácida; **d.** fosfatase alcalina; **e.** urease. **C** - Solo com *Curvularia* sp. URM 8968.; **CT** - Solo com *Curvularia* sp. URM 8968 e biochar com *T. koningiopsis* URM 8972; **F** - Solo com *F. agrestense* URM 8690; **FT** - *F. agrestense* URM 8690 e biochar com *T. koningiopsis* URM 8972; **T** - Solo sem patógenos e sem biochar e *T. koningiopsis* URM 8972.

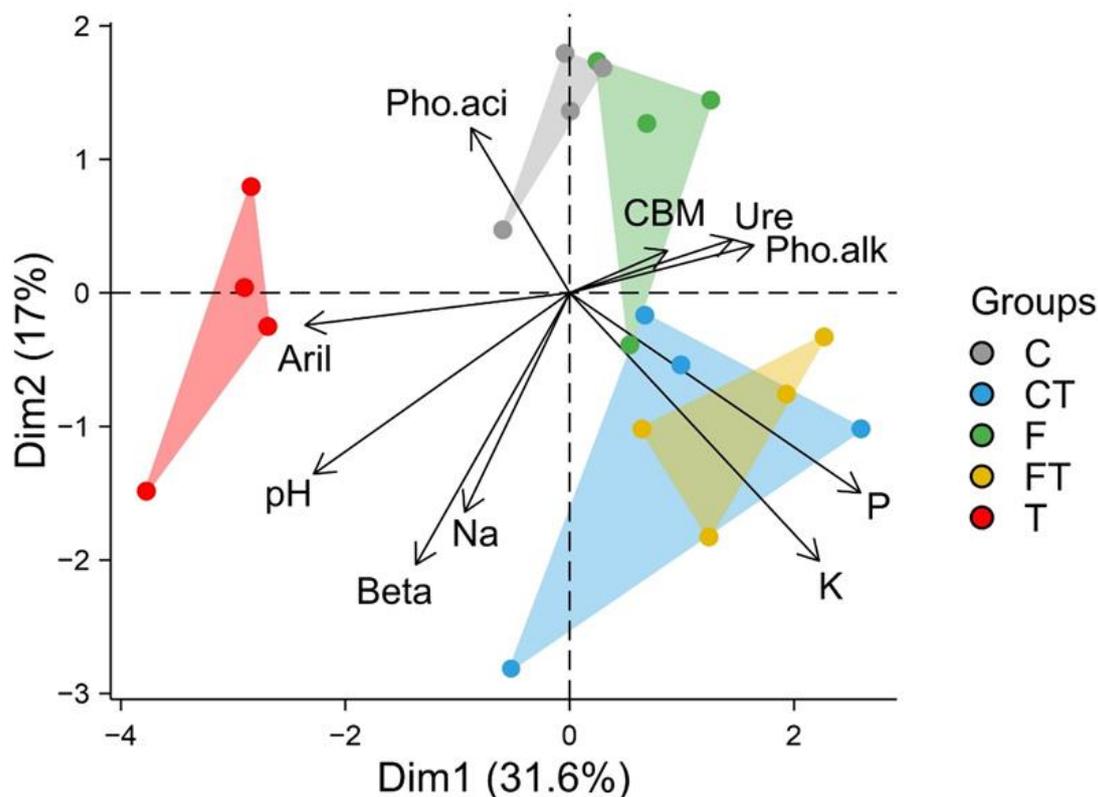


Gráfico 6. Análise de componentes principais relacionando as variáveis químicas e enzimáticas analisadas em solos tratados com isolados fúngicos. Legenda: pH – pH determinado em água; P – fósforo disponível; K – potássio disponível; Na – sódio; CBM – carbono da biomassa microbiana; **Aril** - arilsulfatase; **Beta** – β-glucosidase; **Pho.aci** – fosfatase ácida; **Pho.alk** – fosfatase alcalina; **Ure** – urease; **C** - Solo com *Curvularia* sp. URM 8968.; **CT** - Solo com *Curvularia* sp. URM 8968 e biochar com *T. koningiopsis* URM 8972; **F** - Solo com *F. agrestense* URM 8690; **FT** - *F. agrestense* URM 8690 e biochar com *T. koningiopsis* URM 8972; **T** – Solo sem patógenos e sem biochar e *T. koningiopsis* URM 8972.

4. Discussão

A podridão radicular é um dos fatores limitantes para a produção da mandioca. Esta doença afeta a qualidade do produto comercializado, causando grandes prejuízos econômicos (HOHENFELD et al., 2022). Uma ampla diversidade de fungos está associada à podridão radicular em mandioca (ADEDIRE et al., 2021). Das raízes de mandioca com sinais de podridão coletadas neste estudo, foram isolados fungos pertencentes aos gêneros *Curvularia* e *Macrophomina*, que foram confirmados pelo teste de patogenicidade em plantas e raízes tuberosas como agentes causais da podridão radicular da mandioca.

O gênero *Curvularia* Boedijn pertence à família *Pleosporaceae* (WIJAYAWARDENE et al., 2018). Espécies de *Curvularia* são frequentemente encontradas como saprófitos, endófitos ou patógenos de plantas (BEZERRA et al., 2020). Devido a presença de muitas espécies crípticas e a sobreposição de caracteres

morfológicos entre certas espécies do gênero, a identificação específica é complexa (ITURRIETA-GONZÁLEZ et al., 2020), esses fatores refletem a dificuldade encontrada em identificar o isolado URM 8968 neste estudo, pois a similaridade entre espécies diferentes dentro do gênero, dificultou a distinção em nível de espécie. Espécies de *Curvularia* causam doenças de pré e pós-colheita em diversas culturas de importância econômica (BENGYELLA et al., 2019), tais como murcha foliar do milho (BISHT et al., 2018), mancha marrom foliar e podridão em espigas de arroz (ZHOU et al., 2021; BAI et al., 2024), pinta preta do tomateiro (ABDELFAH et al., 2021), e mancha foliar em batata doce (LAI et al., 2022), e feijão (WEI et al., 2022). A espécie *C. lunata* foi relatada causando doença em caules de plantas de mandioca na África (MSIKITA et al., 1997; 2007). No entanto, até onde sabemos, este é o primeiro relato de *Curvularia* causando podridão em mandioca.

A espécie *Macrophomina phaseolina* (Tasi) Goid também identificada no presente estudo é um fungo generalista, presente no solo, com ampla distribuição mundial, que pertence à família *Botryosphaeriaceae* (MARQUEZ et al., 2021). *Macrophomina phaseolina* é uma espécie de grande importância fitopatogênica, conhecida por infectar mais de 500 plantas hospedeiras (GHOSH et al., 2018). Este fungo foi relatado causando podridões em diversas culturas de importância econômica, como a podridão de ramos e raízes da batata doce (MELLO, 2019), podridão da soja (ALMEIDA et al., 2014), podridão do carvão em feijão-fava (SOUSA et al., 2017), e podridão da coroa do morango (KOIKE, 2008). Em mandioca, *M. phaseolina* foi descrita causando queima das folhas na China (WANG et al., 2023), e podridão radicular no Benin e na Nigéria (MSIKITA et al., 1998). No entanto, até onde sabemos, este é o primeiro relato de *M. phaseolina* causando podridão radicular em mandioca no Brasil.

Os patógenos *M. phaseolina* e *Curvularia* sp. estão sendo relatados pela primeira vez como agentes causais da podridão radicular da mandioca no Brasil. De acordo com os resultados do presente estudo ficou clara a associação desses patógenos com a podridão radicular da mandioca. As informações obtidas neste estudo contribuem para o conhecimento acerca da diversidade e distribuição geográfica destes patógenos no Brasil e no mundo. Estes resultados também serão úteis para ressaltar a importância desses patógenos em culturas de importância econômica como a mandioca e na adoção de medidas de controle eficientes contra a podridão radicular da mandioca.

Na mesma área de cultivo onde foram encontrados os patógenos *Curvularia* sp. e *M. phaseolina*, foram isoladas, a partir do solo rizosférico de plantas de mandioca sadias, as espécies *Trichoderma* sp., *T. koningiopsis* e *T. longibrachiatum*, compreendidos em um grupo de fungos amplamente reconhecido por seu potencial antagonístico. As espécies *T. koningiopsis* e *T. longibrachiatum* são frequentemente isoladas de solos agrícolas (SILVA et al., 2011; FANTINEL et al., 2018; BEZERRA et al., 2021), e têm sido amplamente estudadas na promoção do crescimento vegetal e inibição de patógenos de plantas (HEWEDY et al., 2020; ANWAR et al., 2023). Uma rica diversidade de microrganismos benéficos colonizam as raízes de plantas saudáveis

e assintomáticas na natureza, e esse complexo microbiano impacta diretamente o crescimento das plantas (HACQUARD, 2016). *Trichoderma* spp., por exemplo, apresenta a capacidade de estabelecer relações endofíticas com as raízes de diversas espécies de plantas, podendo conferir proteção e induzir resistência sistêmica a fitopatógenos (KUMAR et al., 2017; MARRA et al., 2019), no entanto, práticas de manejo intensivo e distúrbios no solo podem inibir o crescimento desses microrganismos.

Diversos mecanismos conferem sucesso no biocontrole de espécies de *Trichoderma*, que apresentam como características alto oportunismo, rápido crescimento, colonização agressiva do solo e da rizosfera, e capacidade de estabelecer interações benéficas com plantas (MEYER et al., 2019). Neste estudo, *Trichoderma koningiopsis* URM 8972 e *T. longibrachiatum* URM 6068 apresentaram as maiores atividades de quitinase. A quitinase é a enzima que hidrolisa a quitina, um polissacarídeo composto por β -1,4 N-acetilglucosamina (SONIKA et al., 2014), abundante e de grande importância na natureza, responsável por conferir resistência a parede celular dos fungos (KAPPEL; GRUBER, 2020). *Trichoderma koningiopsis* e *T. longibrachiatum* apresentam potencial como produtoras de quitinase em diversos estudos que relacionam a produção enzimática com a capacidade de controlar fungos fitopatogênicos presentes no solo (RUANGWONG et al., 2021; BOMFIM et al., 2021), indicando que dentre os isolados avaliados são os fungos com maior potencial para inibir o crescimento de patógenos.

O elevado potencial de inibição apresentado por *T. koningiopsis* URM 8972 e *T. longibrachiatum* URM 6068 no teste *in vitro* provavelmente foi influenciado pela liberação de quitinases e outros metabólitos secundários, uma vez que a produção de enzimas é um dos principais mecanismos de controle empregados pelas espécies de *Trichoderma* (CHERKUPALLY et al., 2017). Estudos reconhecem o potencial antagonístico de *T. koningiopsis* e *T. longibrachiatum* e a eficácia destes no controle de fungos fitopatogênicos, ambos foram relatados no controle de espécies que tiveram a patogenicidade confirmada para podridão radicular da mandioca (BROETTO et al., 2014; HEWEDY et al., 2019; BRITO et al., 2022; MORAIS et al., 2022; BEDINE et al., 2022).

Os testes de antagonismo *in vitro* são uma etapa importante para a seleção de cepas que inibam diretamente o crescimento micelial de patógenos de plantas (KHALILI et al., 2012). O antagonismo *in vitro* exibido por *T. koningiopsis* URM 8972 e *T. longibrachiatum* URM 6068 durante a interação com os patógenos destacou a presença de mecanismo de controle eficiente e permitiu uma escolha adequada do antagonista a ser utilizado em testes *in vivo*, uma vez que *T. koningiopsis* URM 8972 combinado com biochar de resíduos da uva foi eficaz no controle da podridão radicular causada por *F. agrestense* em experimentos em casa de vegetação.

Plantas cultivadas em solos tratados com *T. koningiopsis* URM 8972 e biochar apresentaram lesões menores nas manivas, além de uma parte aérea mais desenvolvida e com menos sintomas, evidenciando o alto potencial desses tratamentos no controle da

doença. Esses resultados reforçam a hipótese de que as espécies de *Trichoderma* atuam na proteção das plantas sadias contra patógenos presentes no solo. Entretanto, as populações de *Trichoderma* no solo eram baixas, o que se mostrou insuficiente para proteger outras plantas, que apresentaram sintomas de podridão radicular na mesma área. Além disso, fatores como a presença do patógeno, pH, temperatura e nutrientes disponíveis no ambiente também podem interferir nos mecanismos de ação do biocontrolador (ZIN et al., 2020). Da mesma forma, solos com histórico de doenças, pH ácido e baixa fertilidade tendem a agravar a severidade das infecções (SARAVANAKUMAR; WANG, 2020).

Vários mecanismos de controle podem estar relacionados ao sucesso de biochar e *T. koningiopsis* URM 8972 no controle da podridão radicular da mandioca. Por exemplo a capacidade de espécies de *Trichoderma* de neutralizar os patógenos por meio de relações de micoparasitismo, que envolvem o reconhecimento do patógeno através das lectinas presentes na parede celular dos fungos e, em seguida, *Trichoderma* envolve as hifas do fitopatógeno causando estrangulamento e morte. Então, enzimas que degradam a parede celular do fungo são secretadas e a espécie de *Trichoderma* se nutre dos tecidos mortos (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2016; ALFIKY, 2019; CUNHA, 2023).

A eficiência de *T. koningiopsis* no controle de doenças causadas por fitopatógenos do solo é descrita em diversos estudos. Por exemplo, Luo et al. (2023), mostraram que *T. koningiopsis* reduziu significativamente a incidência e gravidade da murcha da banana causada por *F. oxysporum* f. sp. *cubense* tropical raça 4. De forma similar, Yu e Luo (2020) mostraram que *T. koningiopsis* induziu respostas de defesa de plantas de pinheiro contra *F. oxysporum* e melhorou a fertilidade do solo. Além disso, Osorio-Guerrero et al., (2024), relataram eficiência de *T. koningiopsis* em proteger sementes de sorgo dos patógenos *Diaporthe melonis*, *Curvularia lunata* e *Penicillium polinocum* sem afetar a germinação das sementes durante 12 meses de armazenamento.

Além do potencial antagônico que *T. koningiopsis* confere ao inoculante, o biochar oferece propriedades físico-químicas que o tornam uma ferramenta valiosa no manejo de fitopatógenos. Diversos estudos demonstram sua eficiência na redução da severidade de doenças transmitidas pelo solo (GRABER et al., 2014; ZHANG et al., 2016; POSTMA; NIJHUIS 2019; CHEN et al., 2020; MEDEIROS et al., 2021). Por exemplo, Akanmu et al., (2020) mostrou que o biochar de esterco de aves e serragem reduziu a podridão da espiga de milho causada por *F. verticillioides*. Resultados semelhantes foram encontrados por Medeiros et al., (2022) que ao aplicar biochar de casca de mandioca, palha de feijão e palha de milho observou redução da severidade de *Ralstonia solanacearum* em tomate.

A aplicação de biochar no solo tem se mostrado uma ferramenta promissora na agricultura, pois promove o crescimento saudável das plantas e aumenta sua resistência ao estresse e a doenças (KUMAR; BHATTACHARYA, 2021). Esse efeito ocorre porque o biochar suprime os patógenos por meio de mecanismos como a indução de resistência nas plantas, a sorção de compostos fungitóxicos, o aumento da microbiota

benéfica e a melhoria da qualidade do solo, favorecendo a disponibilidade de nutrientes (BONANOMI et al., 2015). Dessa forma, a capacidade de induzir resistência pode explicar tanto a redução na severidade da doença quanto o aumento da quantidade de folhas e raízes adventícias nas plantas tratadas com a combinação de *T. koningiopsis* e biochar.

Além de induzir resistência nas plantas, o biochar contribui para a colonização das raízes por espécies de *Trichoderma*, que utilizam os exsudados das plantas e superam suas defesas iniciais. Em resposta, as plantas ativam mecanismos de proteção, como a produção de compostos antimicrobianos e o engrossamento da parede celular (MEYER et al., 2019). Paralelamente, o biochar potencializa a ação antagonista de microrganismos como o *Trichoderma*, graças à sua alta porosidade e ao tamanho dos poros, que fornecem substrato e criam um habitat ideal para o desenvolvimento de microrganismos benéficos (MUTER et al., 2017; JAISWAL et al., 2018). Além disso, a estrutura porosa do biochar melhora o desenvolvimento das raízes das plantas, o que, por sua vez, facilita a absorção de água e nutrientes (JAISWAL et al., 2018). Portanto, a aplicação de biochar não apenas torna o ambiente do solo mais favorável ao desenvolvimento das plantas, mas também contribui para a indução de resistência vegetal, devido à maior disponibilidade de nutrientes no solo (GRABER et al., 2014)."

Em estudo anterior Silva et al. (2022) revelaram que o biochar de diferentes fontes, inoculado com *T. aureoviride* e aplicado ao solo, reduziu a podridão radicular da mandioca causada por *Neocosmospora solani* (sin. *F. solani*), como consequência de melhorias na qualidade do solo. Da mesma forma, Rehman et al. (2023) demonstraram efeitos sinérgicos na combinação de biochar de palha de arroz com *T. viride*, o que resultou em alta inibição da podridão do carvão do milho, causada por *M. phaseolina*. Ademais, foi observado maior crescimento das plantas de milho em tratamentos com biochar, independentemente da presença de *T. viride*. Por sua vez, Cao et al. (2022) mostraram que a aplicação de biochar e *Trichoderma* estimulou o crescimento do pepino e aumentou a vitalidade do sistema radicular. Esses estudos reforçam os nossos resultados, evidenciando a resposta positiva da associação entre biochar e *Trichoderma koningiopsis* URM 8972

Os efeitos da aplicação combinada de biochar e *T. koningiopsis* URM 8972 foram evidentes nos atributos do solo. Os tratamentos com o bioinoculante aumentaram os teores de P e K, sugerindo que essa combinação melhorou a disponibilidade de nutrientes e, conseqüentemente, pode ter induzido resistência a patógenos, além de promover o crescimento das plantas. Esse aumento nos teores de P e K pode ser explicado pela capacidade do biochar de adsorver nutrientes em sua superfície, deixando-os disponíveis para incorporação pelas plantas ou pela microbiota (ELZOB AIR et al., 2016; YANG et al., 2017). Além disso, a maior disponibilidade de P pode estar diretamente relacionada ao aumento de K no solo (AHMAD et al., 2024). Steiner et al. (2008) demonstraram que a aplicação de biochar e composto no solo resultou em maior absorção de K pelas plantas, além de maior resistência e produtividade. Da mesma forma, Nigussie et al. (2012) relataram melhor crescimento

vegetal associado ao aumento da disponibilidade de fósforo com o uso de biochar no solo.

Complementando esses resultados, Saeed et al. (2023) destacaram o efeito sinérgico da aplicação de biochar de palha de arroz juntamente com *T. viride*, que não apenas promoveu o biocontrole do patógeno *M. phaseolina*, mas também resultou em um aumento considerável no teor de P. Ademais, fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidos por promover a solubilização de minerais (Khan; Mohiddin, 2018). Joo e Hussein (2022) também demonstraram a eficiência de algumas cepas de *Trichoderma*, como *T. virens* e *T. koningii*, na mobilização de fosfatos insolúveis, destacando sua contribuição na solubilização de fosfato.

A melhora da qualidade do solo nos tratamentos com biochar e *T. koningiopsis* URM 8972 pode estar relacionada com a redução da severidade das lesões causadas pelos patógenos. A alteração da comunidade microbiana do solo, inativação de toxinas e enzimas patogênicas, e redução do crescimento e virulência de patógenos são alguns dos benefícios atribuídos ao biochar, que influenciam na progressão de doenças transmitidas pelo solo (JAISWAL et al., 2019).

Os tratamentos apresentaram a tendência de reduzir o pH do solo mesmo na presença do biochar, que é amplamente reconhecido pela capacidade de aumentar o pH do solo, provavelmente o tempo de experimento ou a quantidade de biochar não foi suficiente para aumentar o pH do solo. Além disso, a alta atividade patogênica dos fungos nos solos pode ter interferido negativamente reduzindo o pH do solo. A sobrevivência em ambientes levemente ácidos é comum para a maioria dos fungos, solos com pH ácido favorecem a colonização dos fungos, desta forma, muitos patógenos fúngicos secretam substâncias orgânicas para acidificar o ambiente e aumentar a sua patogenicidade (ALKAN et al., 2013), sendo esta também uma forma de escapar das respostas de defesa da planta (VYLKOVA, 2017).

Neste estudo os tratamentos apenas com patógenos se correlacionaram positivamente com a atividade da enzima fosfatase ácida, o que é indicado pela aproximação desses atributos na análise multivariada. A fosfatase ácida é uma enzima envolvida no ciclo do P, sintetizada por plantas e microrganismos, e faixa ideal de pH 6,5 (MEDEIROS et al., 2020). Segundo Acosta-Martínez e Tabatabai (2000) a atividade da fosfatase ácida é negativamente correlacionada com o pH do solo, sendo está uma possível explicação para a correlação da fosfatase ácida com os tratamentos com os patógenos neste estudo, que promoveram uma leve acidificação do solo.

Os resultados obtidos contribuem com a descoberta de novos antagonistas que apresentam potencial para o controle de doenças de plantas de importância agrícola. Além disso, o presente estudo propõe uma solução inovadora e sustentável para o controle de patógenos causadores da podridão radicular da mandioca, sem causar danos ao meio ambiente. Nossa análise revelou que o biochar de resíduos da uva aplicado com *T. koningiopsis* URM 8972 alterou consideravelmente as propriedades do solo, como P,

K e atividades enzimáticas, e proporcionou maior resistência a podridão radicular da mandioca causada por *F. agrestense*.

Esses resultados ampliaram a compreensão de como a combinação de biochar e *T. koningiopsis* URM 8972 são uma ferramenta promissora para o manejo de doenças de plantas. Essa combinação é econômica e sustentável para melhorar a produção da mandioca, além disso, proporciona benefícios a qualidade do solo e permite reaproveitar resíduos que seriam descartados no meio ambiente. Nossas descobertas permitem uma melhor compreensão de práticas alternativas de manejo para reduzir a gravidade de doenças da mandioca causadas por fungos transmitidos pelo solo. Considerando a importância e o impacto causado por patógenos do solo na saúde das plantas e do solo, o desenvolvimento e compreensão de práticas alternativas são essenciais para a adoção de estratégias de controle que reduzam as perdas na produção e se enquadram no conceito de global de sustentabilidade.

5. Referências

ABDELFATAH, Heba-Alla S. et al. *Curvularia lunata* as new causal pathogen of tomato early blight disease in Egypt. *Molecular Biology Reports*, v. 48, p. 3001-3006, 2021.

ACOSTA-MARTINEZ, V.; TABATABAI, M. A. Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and Fertility of soils*, v. 31, p. 85-91, 2000.

ADEDIRE, Oluwafemi Michael; ODUWAYE, Olubusola Fehintola; FASHOLA, Olutoye Olushola. Biocontrol of cassava root-rot mycopathogens with antimicrobial extracts of wood shavings. *Journal of Crop Improvement*, v. 35, n. 5, p. 745-761, 2021.

AHMAD, Ibrar et al. Synergistic enhancement of maize crop yield and nutrient assimilation via zinc oxide nanoparticles and phosphorus fertilization. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2024.

AKANMU, A. O. et al. Efficacy of biochar in the management of *Fusarium verticillioides* Sacc. causing ear rot in *Zea mays* L. *Biotechnology Reports*, v. 26, p. e00474, 2020.

ALFIKY, Alsayed. Effects of ultraviolet irradiation on the in vitro antagonistic potential of *Trichoderma* spp. against soil-borne fungal pathogens. *Heliyon*, v. 5, n. 7, 2019.

ALKAN, Noam; ESPESO, Eduardo A.; PRUSKY, Dov. Virulence regulation of phytopathogenic fungi by pH. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 19, n. 9, p. 1012-1025, 2013.

ALMEIDA, A. M. R. et al. *Macrophomina phaseolina* em soja. 2014.

ANWAR, Saeed et al. The Impact of *Trichoderma harzianum* Together with Copper and Boron on Wheat Yield. *ACS Agricultural Science & Technology*, v. 3, n. 6, p. 517-527, 2023.

- BAI, Zhenxu et al. First Report of *Curvularia plantarum* Causing Rice Spikelet Rot Disease in China. *Plant Disease*, v. 108, n. 4, p. 1102, 2024.
- BARTLETT, Richmond J.; ROSS, DONALD S. Colorimetric determination of oxidizable carbon in acid soil solutions. *Soil Science Society of America Journal*, v. 52, n. 4, p. 1191-1192, 1988.
- BEDINE, Marie Amperes Boat et al. Identification of native soil-derived *Trichoderma* spp. isolates and analysis of their antagonist traits against *Lasiodiplodia theobromae* causing stem-end rot in papaya. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, v. 55, n. 15, p. 1766-1794, 2022.
- BENGYELLA, Louis et al. Biotechnological application of endophytic filamentous *Bipolaris* and *Curvularia*: a review on bioeconomy impact. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 5, p. 69, 2019.
- BENWART, W. L.; TABATABAI, M. A.; BREMMER, J. M. Determination of ammonium in soil extracts and water samples by an ammonia electrode. *Comm. Soil Sciences and Plant Analysis*, v. 3, n. 6, p. 449-458, 1972.
- BEZERRA, G. de A., et al. "Filogenia molecular de *Trichoderma* spp. isolados da rizosfera de arroz." In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 52., 2021. Anais...[Brasília, DF]: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2021., 2021.
- BEZERRA, Gustavo de Andrade et al. Fungos endofíticos associados a bromélias de restingas, do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro–Brasil. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 7, p. e971974298-e971974298, 2020.
- BISHT, Sunaina et al. Determination of susceptible growth stage and efficacy of fungicidal management of *Curvularia* leaf spot of maize caused by *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn. *Maydica*, v. 61, n. 3, p. 5, 2018.
- BOAS, Sandielle Araújo Vilas et al. Survey of fungi associated with cassava root rot from different producing regions in Brazil. *Scientia Agricola*, v. 74, n. 1, p. 60-67, 2017.
- BOLAN, Shiv et al. The potential of biochar as a microbial carrier for agricultural and environmental applications. *Science of the Total Environment*, v. 886, p. 163968, 2023.
- BOMFIM, Aline Gleyce Julião et al. Antagonistic activity and chitinolytic potential of endophytic fungi recovered from cacti growing in the Brazilian tropical dry forest. 2021.
- BONANOMI, G.; IPPOLITO, F.; SCALA, F. A "black" future for plant pathology? Biochar as a new soil amendment for controlling plant diseases. *Journal of Plant Pathology*, v. 97, n. 2, 2015.
- BRITO, A. C. Q. et al. Diversity and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species associated with black root rot and stem cutting dry rot in *Manihot esculenta* in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, v. 157, p. 583-598, 2020.
- BRITO, Fabiano da Silva et al. Selection and control efficacy of *Trichoderma* spp. against *Fusarium solani* and *Lasiodiplodia theobromae* causing root rot in forage cactus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 122, p. 101900, 2022.

BROETTO, Laline et al. Crescimento micelial e produção de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* confrontado com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. *Scientia Agraria Paranaensis*, v. 13, n. 4, p. 310-317, 2014.

CAO, Xia et al. Effects of biochar and *Trichoderma* on bacterial community diversity in continuous cropping soil. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, v. 63, n. 1, p. 1-12, 2022.

CHEN, Shu et al. Biochar amendment controlled bacterial wilt through changing soil chemical properties and microbial community. *Microbiological research*, v. 231, p. 126373, 2020.

CHERKUPALLY, Ramaraju; AMBALLA, Hindumathi; REDDY, Bhumi Narasimha. In vitro screening for enzymatic activity of *Trichoderma* species for biocontrol potential. *Ann. Plant Sci*, v. 6, p. 1784-1789, 2017.

CLAUDINO, Monaliza R.; SOARES, Dartanha J. Pathogenicity and aggressiveness of *Macrophomina phaseolina* isolates to castor (*Ricinus communis*). *Tropical Plant Pathology*, v. 39, p. 453-456, 2014.

CONTRERAS-CORNEJO, Hexon Angel et al. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS microbiology ecology*, v. 92, n. 4, p. fiw036, 2016.

CUNHA, Arielton. Uso de *Trichoderma* spp. no controle da incidência da podridão-de-esclerócio (*Sclerotium Rolfsii* Sacc.) em tomateiro (*Solanum Lycopersicum* L.). 2023.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 20, n. 5, p. 601-606, 1988.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Phosphatases in soils. *Soil biology and biochemistry*, v. 9, n. 3, p. 167-172, 1977.

ELZOBAIR, Khalid A. et al. Contrasting effects of biochar versus manure on soil microbial communities and enzyme activities in an Aridisol. *Chemosphere*, v. 142, p. 145-152, 2016.

FANTINEL, Vinícius Spolaor et al. Biocontrole in vitro de *Colletotrichum siamense* utilizando *Trichoderma* spp. e *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki. *Revista Ciência Agrícola*, v. 16, n. 3, p. 43-50, 2018.

GARBUZ, Stanislav et al. Biochar amendment improves soil physico-chemical properties and alters root biomass and the soil food web in grazed pastures. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 319, p. 107517, 2021.

GHOSH, TANMAY et al. Mechanisms involve in jute resistance to *Macrophomina phaseolina*: strategies for developing resistant jute varieties. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, v. 19, n. 3-4, p. 91-106, 2018.

GRABER, E. R. et al. How may biochar influence severity of diseases caused by soilborne pathogens?. *Carbon Management*, v. 5, n. 2, p. 169-183, 2014.

HACQUARD, Stéphane et al. Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi. *Nature communications*, v. 7, n. 1, p. 11362, 2016.

- HEWEDY, Omar A. et al. Phylogenetic diversity of *Trichoderma* strains and their antagonistic potential against soil-borne pathogens under stress conditions. *Biology*, v. 9, n. 8, p. 189, 2020.
- HOHENFELD, Camila Santiago et al. Comparative analysis of infected cassava root transcriptomics reveals candidate genes for root rot disease resistance. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, p. 10587, 2024.
- HOHENFELD, Camila Santiago et al. Genome-wide association study and selection for field resistance to cassava root rot disease and productive traits. *Plos one*, v. 17, n. 6, p. e0270020, 2022.
- ITURRIETA-GONZÁLEZ, Isabel et al. Three new *Curvularia* species from clinical and environmental sources. *MycKeys*, v. 68, p. 1, 2020.
- JAISWAL, Amit K. et al. Activating biochar by manipulating the bacterial and fungal microbiome through pre-conditioning. *New Phytologist*, v. 219, n. 1, p. 363-377, 2018.
- JAISWAL, Amit K. et al. Biochar as a management tool for soilborne diseases affecting early stage nursery seedling production. *Crop Protection*, v. 120, p. 34-42, 2019.
- JOO, Jin Ho; HUSSEIN, Khalid Abdallah. Biological control and plant growth promotion properties of volatile organic compound-producing antagonistic *Trichoderma* spp. *Frontiers in Plant Science*, v. 13, p. 897668, 2022.
- KANDELER, Ellen; GERBER, H. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and fertility of Soils*, v. 6, p. 68-72, 1988.
- KAPPEL, Lisa; GRUBER, Sabine. Chitin and chitosa important structural components in *Trichoderma* cell wall remodeling. In: *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*. Elsevier, 2020. p. 243-280.
- KATOH, Kazutaka; ROZEWICKI, John; YAMADA, Kazunori D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in bioinformatics*, v. 20, n. 4, p. 1160-1166, 2019.
- KATOH, Kazutaka; STANDLEY, Daron M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.
- KHALILI, Elham et al. Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, p. 297-305, 2012.
- KHAN, Mujeebur R.; MOHIDDIN, Fayaz A. *Trichoderma*: its multifarious utility in crop improvement. In: *Crop improvement through microbial biotechnology*. Elsevier, 2018. p. 263-291.
- KOIKE, Steven T. Crown rot of strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in California. *Plant Disease*, v. 92, n. 8, p. 1253-1253, 2008.
- KUMAR, Abhishek; BHATTACHARYA, Tanushree. Biochar: a sustainable solution. *Environment, Development and Sustainability*, v. 23, p. 6642-6680, 2021.
- KUMAR, Gagan et al. *Trichoderma*: a potential fungal antagonist to control plant diseases. *SATSA Mukhapatra-Annual Technical Issue*, v. 21, p. 206-218, 2017a.

KUMAR, Nathan Vinod; RAJAM, K. Subha; RANI, Mary Esther. Plant growth promotion efficacy of indole acetic acid (IAA) produced by a mangrove associated fungi-*Trichoderma viride* VKF3. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 6, n. 11, p. 2692-2701, 2017b.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LAI, Jiahao et al. First report of *Curvularia plantarum* causing leaf spot on sweet potato (*Ipomoea batatas*) in China. *Plant Disease*, v. 106, n. 6, p. 1753, 2022.

LI, G. Q[Ⓜ]; HUANG, H. C[Ⓜ]; ACHARYA, S. N. Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control*, v. 28, n. 1, p. 11-18, 2003.

LIMA, José Romualdo de Sousa et al. Effect of biochar on physicochemical properties of a sandy soil and maize growth in a greenhouse experiment. *Geoderma*, v. 319, p. 14-23, 2018.

LÓPEZ-BUCIO, José; PELAGIO-FLORES, Ramón; HERRERA-ESTRELLA, Alfredo. *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia horticultrae*, v. 196, p. 109-123, 2015.

LU, Zhi-xiang et al. Screening of antagonistic *Trichoderma* strains and their application for controlling stalk rot in maize. *Journal of Integrative Agriculture*, v. 19, n. 1, p. 145-152, 2020.

LUO, Mei et al. *Trichoderma koningiopsis* Tk905: an efficient biocontrol, induced resistance agent against banana *Fusarium* wilt disease and a potential plant-growth-promoting fungus. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, p. 1301062, 2023.

MARQUEZ, Nathalie et al. *Macrophomina phaseolina*: General characteristics of pathogenicity and methods of control. *Frontiers in Plant Science*, v. 12, p. 634397, 2021.

MARRA, Roberta et al. Application of *Trichoderma* strains and metabolites enhances soybean productivity and nutrient content. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 67, n. 7, p. 1814-1822, 2019.

MEDEIROS, Erika V. et al. Biochar and *Trichoderma aureoviride* applied to the sandy soil: effect on soil quality and watermelon growth. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, v. 48, n. 2, p. 735-751, 2020.

MEDEIROS, Erika Valente et al. Biochar and *Trichoderma* as an eco-friendly and low-cost alternative to improve soil chemical and biological properties. *Waste and Biomass Valorization*, v. 15, n. 3, p. 1439-1450, 2024.

MEDEIROS, Erika Valente et al. Biochar and *Trichoderma* spp. in management of plant diseases caused by soilborne fungal pathogens: a review and perspective. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 15, p. e296101522465-e296101522465, 2021.

MEDEIROS, Erika Valente et al. Biochar from different sources against tomato bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 22, n. 1, p. 540-548, 2022.

- MEHTA, Chandra Mohan et al. Compost: its role, mechanism and impact on reducing soil-borne plant diseases. *Waste management*, v. 34, n. 3, p. 607-622, 2014.
- MELLO, Juliana Ferreira de. Taxonomia, filogenia e patogenicidade de espécies de *Botryosphaeriaceae* associadas com a podridão de raízes e ramos de batata-doce (*Ipomoea batatas*) no Brasil. 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- MEYER, Maurício Conrado et al. *Trichoderma*: uso na agricultura. 2019.
- MILLER, Mark A.; PFEIFFER, Wayne; SCHWARTZ, Terri. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: 2010 gateway computing environments workshop (GCE). Ieee, 2010. p. 1-8.
- MORAIS, Estefenson Marques et al. Endophytic *Trichoderma* strains isolated from forest species of the Cerrado-Caatinga ecotone are potential biocontrol agents against crop pathogenic fungi. *Plos one*, v. 17, n. 4, p. e0265824, 2022.
- MSIKITA, W. et al. First report of *Curvularia lunata* associated with stem disease of cassava. *Plant Disease*, v. 81, n. 1, p. 112-112, 1997.
- MSIKITA, W. et al. First report of *Macrophomina phaseolina* causing pre-harvest cassava root rot in Benin and Nigeria. *Plant disease*, v. 82, n. 12, p. 1402-1402, 1998.
- MSIKITA, W.; BAIMEY, H.; JAMES, B. D. Severity of *Curvularia* stem blight disease of cassava in West Africa. *Plant disease*, v. 91, n. 11, p. 1430-1435, 2007.
- MUTER, Olga et al. Effect of biochar and *Trichoderma* application on fungal diversity and growth of *Zea mays* in a sandy loam soil. *Environmental & Experimental Biology*, v. 15, n. 4, 2017.
- NIETO-JACOBO, Maria F. et al. Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in plant science*, v. 8, p. 102, 2017.
- NIGUSSIE, Abebe et al. Effect of biochar application on soil properties and nutrient uptake of lettuces (*Lactuca sativa*) grown in chromium polluted soils. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science*, v. 12, n. 3, p. 369-376, 2012.
- OSORIO-GUERRERO, Karen Viviana et al. *Trichoderma koningiopsis* applied as seed coating protects sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) from fungal contaminants during storage. *European Journal of Plant Pathology*, p. 1-11, 2024.
- POSADA, David; BUCKLEY, Thomas R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic biology*, v. 53, n. 5, p. 793-808, 2004.
- POSTMA, Joeke; NIJHUIS, Els H. controlling *Pythium* infection in tomato. 2019.
- Rambaut, A., 2009. FigTree 1.2.2. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- REHAMAN, A. Effect of *Trichoderma viride* and rice straw biochar on the development of charcoal rot in maize. *Pakistan Journal of Science*, v. 75, n. 03, p. 455-467, 2023.

- RONQUIST, Fredrik; HUELSENBECK, John P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.
- RUANGWONG, On-Uma et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma koningiopsis* PSU3-2 against postharvest anthracnose of chili pepper. *Journal of Fungi*, v. 7, n. 4, p. 276, 2021.
- SAEED, Maimona et al. Development of novel kinetic model based on microbiome and biochar for in-situ remediation of total petroleum hydrocarbons (TPHs) contaminated soil. *Chemosphere*, v. 324, p. 138311, 2023.
- SARAVANAKUMAR, Kandasamy; WANG, Myeong-Hyeon. Isolation and molecular identification of *Trichoderma* species from wetland soil and their antagonistic activity against phytopathogens. *Physiological and Molecular plant pathology*, v. 109, p. 101458, 2020.
- SILVA, Jenifer Stephanie Araújo et al. Biochar and *Trichoderma aureoviride* URM 5158 as alternatives for the management of cassava root rot. *Applied Soil Ecology*, v. 172, p. 104353, 2022.
- SILVA, Jenifer Stephanie Araujo da et al. *Diaporthe ueckeri* causing cassava root rot in Pernambuco, Brazil. *Crop Protection*, p. 106811, 2024a.
- SILVA, Jenifer Stephanie Araujo et al. First reports of *Fusarium agrestense*, *F. gossypinum*, *F. grosnichelii* and *F. triseptatum* causing cassava root rot in Pernambuco, Brazil. *Crop Protection*, p. 106947, 2024b.
- SILVA, Jéssica Moraes da et al. FAMES e atividades microbianas envolvidas na supressão da podridão radicular da mandioca por matéria orgânica. *Revista Caatinga*, v. 30, p. 708-717, 2017
- SILVA, José Aldo Teixeira et al. *Trichoderma aureoviride* URM 5158 and *Trichoderma hamatum* URM 6656 are biocontrol agents that act against cassava root rot through different mechanisms. *Journal of Phytopathology*, v. 164, n. 11-12, p. 1003-1011, 2016.
- SILVA, Veronica Nogueira da et al. Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 46, p. 1609-1618, 2011.
- SONG, Xiliang et al. Biochar/vermicompost promotes Hybrid *Pennisetum* plant growth and soil enzyme activity in saline soils. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 183, p. 96-110, 2022.
- SONIKA, Sonika Pandey et al. Chitinolytic assay for *Trichoderma* species isolated from different geographical locations of Uttar Pradesh. 2014.
- SOUSA, E. S. et al. First report of *Fusarium falciforme* (FSSC 3+ 4) causing root rot in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Brazil. *Plant Disease*, v. 101, n. 11, p. 1954-1954, 2017.
- SOUZA, Bianca Cristina Matos de et al. Adubação organomineral na cultura da mandioca (*Manihot esculenta* crantz). 2019.

- SOUZA, Emanuel; KALID, Ricardo. Transferência de tecnologia no cultivo de mandioca—o caso do Projeto Reniva. *Interações (Campo Grande)*, v. 23, n. 2, p. 423-439, 2022.
- STAMATAKIS, Alexandros. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014.
- STEINER, Christoph. Biochar carbon sequestration. University of Georgia, Biorefining and Carbon Cycling Program, Athens, GA, v. 30602, 2008.
- TATE, K. R.; ROSS, D. J.; FELTHAM, C. W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: effects of experimental variables and some different calibration procedures. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 20, n. 3, p. 329-335, 1988.
- UCHÔA, Sandra CP et al. Adubação fosfatada na produtividade e qualidade de raízes tuberosas de cultivares de mandioca na savana amazônica, Brasil. 2020.
- VYLKOVA, Slavena. Environmental pH modulation by pathogenic fungi as a strategy to conquer the host. *PLoS pathogens*, v. 13, n. 2, p. e1006149, 2017.
- WAGHMARE, Shailesh R.; GHOSH, Jai S. Chitobiose production by using a novel thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* strain JS isolated from a mushroom bed. *Carbohydrate research*, v. 345, n. 18, p. 2630-2635, 2010.
- WANG, Congcong et al. First Report of *Macrophomina phaseolina* Causing Leaf Blight of Cassava in China. *Plant Disease*, v. 107, n. 8, p. 2541, 2023.
- WANG, Ken-Der et al. Oxylipins other than jasmonic acid are xylem-resident signals regulating systemic resistance induced by *Trichoderma virens* in maize. *The Plant Cell*, v. 32, n. 1, p. 166-185, 2020.
- WEI, Tianpeng et al. *Curvularia verruculosa* as new causal pathogen of common bean leaf spot disease in China. *Crop Protection*, v. 162, p. 106091, 2022.
- WIJAYAWARDENE, Nalin N. et al. Outline of ascomycota: 2017. *Fungal diversity*, v. 88, p. 167-263, 2018.
- WILLIAMSON-BENAVIDES, Bruce A.; DHINGRA, Amit. Understanding root rot disease in agricultural crops. *Horticulturae*, v. 7, n. 2, p. 33, 2021.
- YANG, Xu et al. Effects of maize stover and its derived biochar on greenhouse gases emissions and C-budget of brown earth in Northeast China. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, p. 8200-8209, 2017.
- YU, Cun; LUO, Xin. *Trichoderma koningiopsis* controls *Fusarium oxysporum* causing damping-off in *Pinus massoniana* seedlings by regulating active oxygen metabolism, osmotic potential, and the rhizosphere microbiome. *Biological Control*, v. 150, p. 104352, 2020.
- ZHANG, Dengxiao et al. Is current biochar research addressing global soil constraints for sustainable agriculture?. *Agriculture, ecosystems & environment*, v. 226, p. 25-32, 2016.
- ZHENG, Jufeng et al. Biochar compound fertilizer increases nitrogen productivity and economic benefits but decreases carbon emission of maize production. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 241, p. 70-78, 2017.

ZHOU, Hong Kai et al. First report of leaf spot caused by *Curvularia lunata* on wild rice in China. *Plant Disease*, v. 105, n. 10, p. 3300, 2021.

ZIN, Khairunnisa'Mohd et al. Microbial decolorization of triazo dye, direct blue 71: an optimization approach using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN). *BioMed research international*, v. 2020, n. 1, p. 2734135, 2020.

ZIN, Nur A.; BADALUDDIN, Noor A. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, v. 65, n. 2, p. 168-178, 2020.

CONCLUSÕES

- A podridão radicular da mandioca em Pernambuco é causada por um complexo de espécies de diferentes gêneros fúngicos como *Curvularia* sp., *Diaporthe ueckeri*, *Fusarium agrestense*, *F. grosnichelii*, *F. gossypinum* e *F. triseptatum* que estão sendo relatadas pela primeira vez causando doença em mandioca.
- No solo de cultivo de plantas de mandioca assintomáticas são encontradas espécies de *Trichoderma*.
- *Trichoderma koningiopsis* URM 8972 e *T. longibrachiatum* URM 6068 possuem potencial para produção de quitinase e são eficientes na inibição do crescimento dos patógenos: *Curvularia* sp. URM 8968; *F. gossypinum* URM 8695; *Fusarium* sp. URM 8705; *Macrophomina phaseolina* URM 8969; *F. agrestense* URM 8727; *F. triseptatum* URM 8690; *Fusarium* sp. URM 8703; *F. grosnichelii* URM 8694; *Neocosmospora falciformis* URM 8749; *D. ueckeri* URM8 8970. *Fusarium* sp. URM 8733, avaliados no teste de antagonismo in vitro.
- Dentre os patógenos testados in vivo, *Fusarium agrestense* URM 8725 possui maior agressividade quando inoculados em raízes de mandioca.
- A combinação de biochar de resíduos da uva e *Trichoderma koningiopsis* URM 8972 é eficaz na redução da severidade da podridão radicular da mandioca causada por *F. agrestense* URM 8725, e melhorou as propriedades do solo
- Biochar e *T. kongiopsis* URM 8972 mostrou ser uma excelente alternativa sustentável para reduzir as doenças do campo. O uso combinado de biochar e *T. koningiopsis* URM 8972 pode ser uma ferramenta estratégica nos plantios de mandioca, podendo proporcionar maiores rendimentos da cultura, redução do uso de produtos químicos nocivos ao meio ambiente e melhora da qualidade do solo.