



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FITOTECNIA**

***Trichoderma* spp. NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS E  
BIOLOGIA DA INFECÇÃO POR *Teratosphaeria epicoccoides* EM PLANTAS DE  
EUCALIPTO**

**NAASOOM LUIZ SANTOS MESQUITA**

**VITÓRIA DA CONQUISTA**

**BAHIA – BRASIL**

**2024**

**NAASOOM LUIZ SANTOS MESQUITA**

***Trichoderma* spp. NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS E  
BIOLOGIA DA INFECÇÃO POR *Teratosphaeria epicoccoides* EM PLANTAS DE  
EUCALIPTO**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção de título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Quelmo Silva de Novaes

Coorientador: Prof. Dr. Carlos André Espolador  
Leitão

VITÓRIA DA CONQUISTA

BAHIA – BRASIL

2024

M545t

Mesquita, Naasoom Luiz Santos.

*Trichoderma* spp. na promoção do crescimento de plantas e biologia de infecção por *Teratosphaeria epicoccoides* em plantas de eucalipto. /

Naasoom Luiz Santos Mesquita, 2024.

65f. : il.

Orientador (a): Dr. Quelmo Silva de Novaes.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Fitotecnia. Vitória da Conquista, 2024.

Inclui referências.

1. Estresse biótico e abiótico. 2. Estresse hídrico. 3. *Trichoderma asperellum*. *Trichoderma harzianum*. 5. *Phaeophleospora epicoccoides*. 6. Patogenicidade. 7. Sintomatologia. I. Novaes, Quelmo Silva de. II. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós- Graduação em Agronomia. III. T.

CDD. 634.973766

**Catálogo na fonte: Karolyne Alcântara Profeta – CRB 5/2134**

UESB - Campus Vitória da Conquista – BA



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**  
**Área de Concentração em Fitotecnia**

**Campus de Vitória da Conquista, BA**

**DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO: “*Trichoderma* spp. NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS E BIOLOGIA DA INFECÇÃO POR *Teratosphaeria epicoccoides* EM PLANTAS DE EUCALIPTO”.**

**AUTOR (A): Naasoom Luiz Santos Mesquita**

**Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOTECNIA, pela seguinte Banca Examinadora:**

Quelmo Silva de Novaes, D.Sc. (UESB)

Alcebiades Rebouças São José, D.Sc. (UESB)

Armínio Santos, D.Sc. (UESB)

Rafael José Vilela de Oliveira, D.Sc. (CETENE/PE)

Danila Souza de Oliveira Coqueiro, D.Sc. (UFBA)

Data de realização: 23 de Agosto de 2024.

## DEDICATÓRIA

Dedico, com amor e gratidão à minha avó Alaíde (*in memorian*) e aos meus pais, Rita e Pedro (*in memorian*).

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que sempre cuida de todas as coisas e nos concede força e sabedoria;

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade de realizar o curso;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa de estudo;

Ao meu orientador, professor Dr. Quelmo Silva de Novaes, pela paciência, apoio, incentivo e confiança ao longo destes anos de orientação. Agradeço também pela convivência harmoniosa, amizade e pelos ensinamentos compartilhados;

Ao meu coorientador, professor Dr. Carlos André Espolador Leitão, pela orientação, ensinamentos compartilhados e auxílio na condução deste estudo;

À coordenação e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pelas contribuições e ensinamentos compartilhados;

Ao professor Dr. Armínio Santos, pelos ensinamentos compartilhados e incentivo na realização de pesquisas;

A Dr. José Luiz Bezerra e Dr. Rafael José Vilela de Oliveira, pelos ensinamentos compartilhados e apoio na condução de pesquisas durante o curso;

Aos professores Dr. Alcebiádes Rebouças São José e Dra. Danila Souza de Oliveira Coqueiro pelas contantes contribuições desde a concepção deste estudo até o momento da defesa;

Às empresas Montezuma Florestal e BioFungi, pela colaboração e apoio na condução da pesquisa;

Aos colegas Raul Antonio Araújo do Bonfim e Willian Viana Campos, pela colaboração em algumas avaliações;

Aos colegas de laboratório Eveline e Natália, pela colaboração na realização deste trabalho e pelos momentos compartilhados;

À minha esposa Poliana, por estar sempre ao meu lado;

À minha filha Luiza, pela alegria que traz à minha vida;

Aos meus irmãos Branco, Marla, Naty e Daiane, pelos momentos compartilhados;

Aos meus amigos Bismarc, Ítalo, Luiz, Marlovich e Tom pelos momentos de descontração;

A todos os colegas de Pós-graduação, pela amizade e ensinamentos compartilhados.

## RESUMO GERAL

MESQUITA, N.L.S. *Trichoderma* spp. na promoção do crescimento de plantas e biologia da infecção por *Teratosphaeria epicoccoides* em plantas de eucalipto, Vitória da Conquista - BA, UESB, 2024. 65p. (Tese: Doutorado em Agronomia; Área de Concentração: Fitotecnia)\*

A deficiência hídrica e as doenças foliares são os principais fatores que afetam o crescimento e produtividade do eucalipto. A ampla expansão do seu cultivo em regiões com baixo índice pluviométrico tem ocasionado a necessidade de utilização de estratégias para mitigar os efeitos da deficiência hídrica. Quanto à ocorrência de doenças, a identificação do agente causal e o entendimento do patossistema são fundamentais para determinação de métodos adequados de manejo. Nessa perspectiva, o estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar efeitos de inoculações com *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma harzianum* na mitigação dos efeitos da deficiência hídrica em plantas de *Eucalyptus urophylla* cultivadas em vasos e sobre seu crescimento em campo (1) e identificar a espécie de *Teratosphaeria* associada à mancha foliar encontrada em plantações de eucalipto no município de Montezuma-MG e caracterizar o processo de infecção (2). No primeiro estudo (1), as plantas foram avaliadas quanto aos parâmetros morfofisiológicos, indicadores do estado hídrico, trocas gasosas e aspectos bioquímicos e metabólicos. Em plantas cultivadas em vaso, inoculações com *T. asperellum* e *T. harzianum* não mitigaram os efeitos da deficiência hídrica sobre o crescimento das plantas, no entanto, independente do regime hídrico, esses microrganismos proporcionaram maior atividade fotossintética, eficiência do uso da água e aumento dos teores de açúcares solúveis e aminoácidos. Em condições de campo o número de folhas, altura de plantas e diâmetro do caule foram maiores e os teores de açúcares redutores e solúveis e de amido menores sob inoculação com *T. asperellum* e *T. harzianum*, evidenciando uma maior demanda energética direcionada para o crescimento das plantas. No segundo estudo (2) um patógeno foi isolado a partir de amostras foliares obtidas em plantios de eucalipto com sintomas típicos da mancha foliar de *Teratosphaeria*. Os conídios eram similares aos de *Teratosphaeria epicoccoides*, sendo hialinos a marrom-claros, levemente curvados, com dimensões de  $54 \times 5 \mu\text{m}$  e com 4 septos em sua maioria. Sintomas típicos da infecção por *T. epicoccoides* foram observados 30 dias após inoculação em mudas de eucalipto, caracterizados pela ocorrência de lesões angulares restritas às folhas basais das plantas. Os conídios infectam as plantas através do poro estomático. As hifas colonizam os espaços intercelulares, ocasionando desestruturação do mesofilo e reatividade de células do parênquima paliçádico. Em meio de cultura, as colônias possuem crescimento lento. A esporulação ocorre, tanto em meio suco de tomate temperado como em batata dextrose ágar. O patógeno sobrevive por até nove meses em folhas armazenadas.

**Palavras-chave:** Estresse hídrico; *Trichoderma asperellum*; *Trichoderma harzianum*; *Phaeophleospora epicoccoides*; patogenicidade; sintomatologia

---

\***Orientador:** Dr. Quelmo Silva de Novaes, UESB e **Coorientador:** Dr. Carlos André Espolador Leitão, UESB.

## GENERAL ABSTRACT

MESQUITA, N.L.S. *Trichoderma* spp. in plant growth promotion and biology of *Teratosphaeria epicoccoides* infection in eucalyptus plants, Vitória da Conquista - BA, UESB, 2024. 65p. Thesis: Doctor Science in Agronomy; Area of Concentration: Crop Science)\*

Water deficit and leaf diseases are the main factors affecting eucalyptus growth and productivity. The widespread expansion of eucalyptus cultivation in regions with low rainfall has led to the need for strategies to mitigate the effects of water deficit. Regarding the occurrence of diseases, identifying the causal agent and understanding the pathosystem are essential to determine appropriate management methods. In this perspective, the study was developed with the objective of evaluating the effects of inoculations with *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma harzianum* in mitigating the effects of water deficit in Eucalyptus urophylla plants grown in pots and on their growth in the field (1) and identifying the *Teratosphaeria* species associated with leaf spot found in eucalyptus plantations in the municipality of Montezuma-MG and characterizing the infection process (2). In the first study (1), plants were evaluated for morphophysiological parameters, indicators of water status, gas exchange, and biochemical and metabolic aspects. In potted plants, inoculations with *T. asperellum* and *T. harzianum* did not mitigate the effects of water deficiency on plant growth. However, regardless of the water regime, these microorganisms provided greater photosynthetic activity, water use efficiency, and increased levels of soluble sugars and amino acids. Under field conditions, the number of leaves, plant height, and stem diameter were higher, and the levels of reducing and soluble sugars and starch were lower under inoculation with *T. asperellum* and *T. harzianum*, evidencing a greater energy demand directed toward plant growth. In the second study (2), a pathogen was isolated from leaf samples obtained from eucalyptus plantations with typical symptoms of *Teratosphaeria* leaf spot. The conidia were similar to those of *Teratosphaeria epicoccoides*, being hyaline to light brown, slightly curved, measuring  $54 \times 5 \mu\text{m}$ , and both with 4 septa in most cases. Typical symptoms of infection were observed 30 days after inoculation in eucalyptus seedlings, characterized by the occurrence of angular lesions restricted to the basal leaves of the plants. The conidia infect the plants through the stomatal pore. Hyphae colonize the intercellular spaces, causing mesophyll disruption and reactivity of palisade parenchyma cells. In culture medium, colonies grow slowly. Sporulation occurs both in seasoned tomato juice medium and in potato dextrose agar. The pathogen survives for up to nine months in stored leaves.

**Keywords:** Water stress; *Trichoderma asperellum*; *Trichoderma harzianum*; *Phaeophleospora epicoccoides*; pathogenicity; symptomatology

---

\***Advisor:** Dr. Quelmo Silva de Novaes, UESB e **Coadvisor:** Dr. Carlos André Espolador Leitão, UESB.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 – Potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ) [A] e teor relativo de água (TRA) [B] de folhas de *Eucalyptus urophylla* submetidas à inoculação com *T. asperellum* (TA), *T. harzianum* (TH) e não inoculado (C) e regimes hídricos com e sem deficiência hídrica (CD e SD). Letras maiúsculas diferentes entre tratamentos de inoculação e letras minúsculas entre regimes hídricos indicam diferenças significativas (Teste Tukey,  $p < 0,05$ )..... 29
- Figura 1.2 – Teor de açúcares redutores (A) e amido (B) em plantas de *Eucalyptus urophylla* submetidas à inoculação com *T. asperellum* (TA), *T. harzianum* (TH) e não inoculado (C) e regimes hídricos com e sem deficiência hídrica (CD e SD). Letras maiúsculas diferentes entre tratamentos de inoculação e letras minúsculas entre regimes hídricos indicam diferenças significativas (Teste Tukey,  $p < 0,05$ )..... 31
- Figura 1.3 – Teor de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em plantas de *Eucalyptus urophylla* submetidas à inoculação com *T. asperellum* (TA), *T. harzianum* (TH) e não inoculado (C) e regimes hídricos com e sem deficiência hídrica (CD e SD). Letras maiúsculas diferentes entre tratamentos de inoculação e letras minúsculas entre regimes hídricos indicam diferenças significativas (Teste Tukey,  $p < 0,01$ )..... 32
- Figura 1.4 – Atividade da peroxidase do guaiacol (GPX) [A] e superóxido dismutase (SOD) [B] em folhas de *Eucalyptus urophylla* submetidas à inoculação com *T. asperellum* (TA), *T. harzianum* (TH) e não inoculado (C) e regimes hídricos com e sem deficiência hídrica (CD e SD). Letras maiúsculas diferentes entre tratamentos de inoculação e letras minúsculas entre regimes hídricos indicam diferenças significativas (Teste Tukey,  $p < 0,05$ )..... 33
- Figura 1.5 – Número de folhas 90 dias após transplântio (A), altura de plantas (B) e diâmetro do caule (C) de plantas de eucalipto em função dos tratamentos controle (C), e aplicação de *T. asperellum* (TA) e *T. harzianum* (TH)..... 34
- Figura 1.6 – Teores de clorofila total (A) e carotenoides (B) de folhas de eucalipto aos 270 dias após transplântio em função dos tratamentos controle (C), e aplicação de *T. asperellum* (TA) e *T. harzianum* (TH)..... 34
- Figura 1.7 – Teores de açúcares solúveis totais (A), açúcares redutores (B), amido (C) e prolina (D) de folhas de eucalipto aos 270 dias após transplântio em função dos tratamentos controle (C) e aplicação de *T. asperellum* (TA) e *T. harzianum* (TH)..... 35
- Figura 2.1 – Sintomas e sinais de *Teratosphaeria epicoccoides* em plantas de eucalipto clone AEC 144 (*E. urophylla*) com 90 (A, B) e 270 dias de idade (C, D). Sintomas na superfície adaxial (A) das folhas, sintomas na superfície abaxial (B, C e D) e sinais do fungo indicado por setas (B)..... 50
- Figura 2.2 – Sintomas e sinais de *Teratosphaeria epicoccoides* em árvores de eucalipto clone AEC-2034 (*E. camaldulensis*  $\times$  *E. grandis*)  $\times$  *E. urophylla*) com dois anos (A e B). Sinais do fungo na superfície abaxial (C) e sintomas na su- 51

perfcie adaxial (F), picnídios (D) e conídios (E). Escala: 10 mm (D) e 100 µm (E).....	
Figura 2.3 – Sintomas e sinais de <i>Teratosphaeria epicoccoides</i> na superfície abaxial de folha de eucalipto ( <i>E. urophylla</i> ) (A). Detalhe da exsudação de cirros no retângulo (A), picnídio (B) e conídios (B, C) e colônia após 30 dias em meio batata dextrose ágar (C). Escalas: 100 µm (B), 50 µm (C) e 20 mm (D).....	52
Figura 2.4 – Plantas jovens de eucalipto ( <i>E. urophylla</i> ) testemunha (A) e inoculada apresentando sintomas (B-C) aos 30 dias após inoculação.....	53
Figura 2.5 – Cortes transversais de plantas jovens de eucalipto ( <i>E. urophylla</i> ) sadia (A) e infectada por <i>Teratosphaeria epicoccoides</i> (B-D). Em C detalhe da formação inicial de estruturas reprodutivas na câmara subestomática. Escala: 100 µm.....	54
Figura 2.6 – Germinação de conídios (A) e comprimento do tubo germinativo (B) de <i>Teratosphaeria epicoccoides</i> após 36 e 60 horas em água destilada e soluções de extrato de malte (EM), suco de tomate temperado (STT) e dextrose (DEX). Médias seguidas de letras diferem entre tratamentos às 36 ou 60 horas, isoladamente, pelo teste de Tukey a 5%.....	55
Figura 2.7 – Colônias de <i>Teratosphaeria epicoccoides</i> em meio STT(A) e BDA (B). Setas indicam massa viscosa contendo conídios. Escala: 5 mm.....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Altura (ALT), diâmetro do caule (DC), área foliar (AF) e massa seca de parte aérea (MSPA) e raízes (MSR) de plantas jovens de <i>Eucalyptus urophylla</i> em função de regimes hídricos com (CD) e sem deficiência hídrica (SD) e inoculações com <i>T. asperellum</i> (TA), <i>T. harzianum</i> (TH) e controle (C).....	28
Tabela 1.2 – Teores de clorofila <i>a</i> e carotenoides de plantas de <i>E. urophylla</i> inoculadas com <i>T. asperellum</i> e <i>T. harzianum</i> e controle.....	30
Tabela 1.3 – Trocas gasosas de plantas de <i>E. urophylla</i> em função de regimes hídricos e inoculação com <i>T. asperellum</i> e <i>T. harzianum</i> .....	30
Tabela 1.4 – Parâmetros bioquímicos de plantas de <i>Eucalyptus urophylla</i> submetidas a regime hídrico com e sem deficiência hídrica e inoculação com <i>T. asperellum</i> , <i>T. harzianum</i> e não inoculado.....	31
Tabela 2.1 – Valores médios de comprimento, largura e número de septos de conídios e diâmetro da colônia em meio batata dextrose ágar de isolados de <i>Tetratosphaeria epicoccoides</i> .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	fotossíntese líquida
Al	alumínio
BDA	meio batata dextrose ágar
C	controle
Ca	cálcio
CD	com deficiência hídrica
DAT	dias após transplante
DEX	dextrose
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNS	ácido dinitrossalicílico
<i>E</i>	transpiração
EiUA	eficiência intrínseca no uso da água
EM	extrato de malte
EROs	espécies reativas de oxigênio
GPX	peroxidase do guaiacol
$g_s$	condutância estomática
H	hidrogênio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ácido sulfúrico
ITS	<i>internal transcribed spacer</i> (espaçador transcrito interno)
K	potássio
KCN	cianeto de potássio
LSU	<i>large subunit</i> (subunidade grande)
MF	massa fresca
Mg	magnésio
MS	massa seca
MT	massa túrgida
NBT	nitro azul de tetrazólio
O <sub>2</sub>	oxigênio
P	fósforo
pH	potencial hidrogeniônico
SD	sem deficiência hídrica
SOD	superóxido dismutase
STT	suco de tomate temperado
TA	<i>Trichoderma asperellum</i>
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloracético
TH	<i>Trichoderma harzianum</i>
TRA	teor relativo de água
UFC	unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
3 ARTIGO I – Efeito de <i>Trichoderma</i> spp. na mitigação da deficiência hídrica e crescimento de plantas de <i>Eucalyptus urophylla</i> .....	19
3.1 INTRODUÇÃO .....	21
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	22
3.2.1 Estudo em ambiente protegido: condições de cultivo e delineamento experimental.....	22
3.2.1.1 Parâmetros morfofisiológicos.....	23
3.2.1.2 Potencial hídrico foliar e teor relativo de água.....	23
3.2.1.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e peróxido de hidrogênio .....	24
3.2.1.4 Trocas gasosas da folha.....	24
3.2.1.5 Pigmentos fotossintéticos.....	24
3.2.1.6 Teor de açúcares redutores, açúcares solúveis e amido.....	25
3.2.1.7 Aminoácidos totais.....	25
3.2.1.8 Prolina.....	26
3.2.1.9 Quantificação de enzimas antioxidantes peroxidase do guaiacol (GPX) e superóxido dismutase (SOD) .....	26
3.2.2 Estudo de campo.....	27
3.2.2.1 Avaliações.....	27
3.2.3 Análise estatística.....	28
3.3 RESULTADOS.....	28
3.3.1 Estudo em ambiente protegido.....	28
3.3.2 Estudo de campo.....	33
3.4 DISCUSSÃO.....	35
3.5 CONCLUSÕES.....	39
3.6 REFERÊNCIAS.....	39
4 ARTIGO II – Biologia da infecção por <i>Teratosphaeria</i> sp. em eucalipto.....	45
4.1 INTRODUÇÃO.....	46
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.2.1 Ocorrência da doença e isolamento do patógeno.....	47
4.2.2 Esporulação in vitro e caracterização morfológica.....	48
4.2.3 Inoculação em mudas.....	48
4.2.4 Histoquímica.....	49
4.2.5 Germinação de conídios em meio líquido.....	49
4.2.6 Sobrevivência do fungo em folhas armazenadas.....	49
4.3 RESULTADOS.....	50
4.4 DISCUSSÃO.....	56
4.5 CONCLUSÕES.....	58
4.6 REFERÊNCIAS .....	58
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
APÊNDICES.....	62

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, as florestas plantadas ocupam uma área de cerca de 9,55 milhões de hectares, dos quais cerca de 78% correspondem a plantações de eucalipto, que estão localizadas principalmente nos estados de Minas Gerais (27,6%), São Paulo (18,1%), Mato Grosso do Sul (15,1%) e Bahia (7,8%) (IBÁ, 2021).

O cultivo de eucalipto tem se expandindo e alcançado regiões com alto estresse hídrico, onde se encontram as novas fronteiras florestais e, nessas condições, os híbridos como o de *E. urophylla* x *E. grandis* são os genótipos mais recomendados (Gonçalves et al., 2017). De acordo com Elli et al. (2019), o crescimento do eucalipto é influenciado por fatores bióticos e abióticos, dos quais a deficiência hídrica e o manejo florestal subótimo representam a principal causa de lacunas de crescimento dessas plantas no Brasil. Em plantas jovens de eucalipto a deficiência hídrica ocasiona redução de altura, diâmetro do caule, área foliar e massa seca total (Martins et al., 2008; Klippel et al., 2013; Soares et al., 2022), comprometendo o estabelecimento de povoamentos florestais.

Sob condições de deficiência hídrica plantas de eucalipto possuem mecanismos de controle estomático que reduzem a taxa de transpiração, minimizando a perda de água (Pita e Pardos, 2001; Fernandes et al., 2015). No entanto, a redução na condutância estomática pode limitar a difusão de CO<sub>2</sub>, afetando a fotossíntese (Mendes et al., 2013). A deficiência hídrica também pode afetar a síntese de pigmentos fotossintéticos resultando em menor conteúdo de clorofilas (Utkhao e Yingjajaval, 2015; Tariq et al., 2018) e redução da eficiência fotoquímica ocasionando o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e estresse oxidativo (Tariq et al., 2018). Em função da deficiência hídrica, plantas de eucalipto também podem realocar de recursos da parte aérea para a raiz, para aumentar a absorção de água (Nóia Júnior et al., 2020), e promover o ajuste osmótico por meio do acúmulo de solutos compatíveis, como açúcares e prolina, e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes (Shvaleva et al., 2006; Merchant et al., 2010).

Fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidos por seu efeito de promoção de crescimento em plantas e algumas espécies têm demonstrado eficiência na promoção de crescimento de mudas de eucalipto (Azevedo et al., 2017; Siregar et al., 2022). No entanto, estudos envolvendo a utilização de *Trichoderma* na tolerância à deficiência hídrica ainda não foram conduzidos.

Em geral, o efeito benéfico de *Trichoderma* na tolerância das plantas à deficiência hídrica tem sido relacionado à sua capacidade de promover o crescimento das raízes, aumentando a absorção de água (Bae et al., 2009; Shukla et al., 2012; Cornejo-Ríos et al., 2021) e maior expressão de enzimas antioxidantes que conferem maior capacidade de eliminar EROs (Mastouri et al., 2012; De Palma et al., 2021; Scudeletti et al., 2021). Os efeitos positivos de *Trichoderma* spp. no crescimento e desenvolvimento vegetal também podem ser relacionados à sua capacidade de induzir a síntese de fitohormônios (Illescas et al., 2021), produção de osmólitos (Alwhibi et al., 2017; Zhang et al., 2019) e acidificação da rizosfera produzindo ácidos orgânicos que podem solubilizar fosfatos, micronutrientes e cátions minerais (Gómez e Torre, 1994; Harman et al., 2006).

Além da deficiência hídrica, a ocorrência de doenças foliares é um fator que afeta o crescimento e produtividade do eucalipto, principalmente quando as condições de manejo florestal não são adequadas, o que torna as plantas mais suscetíveis a patógenos.

A mancha foliar de *Teratosphaeria* é uma doença foliar de importância econômica para plantações de eucalipto, pois ocasiona manchas foliares e desfolha prematura (Taole et al., 2012; Andjic et al., 2019). A doença é associada a várias espécies de *Teratosphaeria* (Andjic et al., 2019), sendo *T. epicoccoides*, *T. destructans* e *T. eucalypti* os patógenos mais importantes (Andjic et al., 2007). No Brasil, cerca de nove espécies foram relatadas associadas à doença, sendo *T. epicoccoides*, *T. nubilosa*, *T. suberosa*, *T. suttonii*, *T. ohnowa*, *T. perpendicularis*, *T. pseudafricana*, *T. flexuosa* e *T. pseudoecalypti* (Mafia e Alfenas, 2003; Alfenas et al., 2009; Crous et al., 2006; Pérez et al., 2009, Candido et al., 2014).

Dentre as espécies, *Teratosphaeria epicoccoides* (MycoBank, 437456) se destaca, devido à sua ampla ocorrência no mundo em diversas espécies de eucalipto (Andjic et al., 2019). A infecção de *T. epicoccoides* inicia-se com penetração através dos estômatos. As hifas do patógeno crescem nos espaços intercelulares e continuaram a se desenvolver até ocorrer a morte da célula hospedeira (Solís et al., 2022).

Os sintomas causados por *T. epicoccoides* se iniciam com lesões angulares, de cor verde-claro que evoluem para marrom arroxeadas, em ambas as faces da folha, de forma dispersa ou agrupadas no limbo foliar. Com o desenvolvimento da doença, pode ocorrer intensa desfolha, deixando a planta apenas com as folhas novas (Old et al., 2003; Mafia e Alfenas, 2009; Vieira Júnior et al., 2014). Embora *T. epicoccoides* seja

comumente encontrado em folhagens mais antigas, causando poucos danos, este fungo foi encontrado causando danos significativos em folhas jovens de alguns clones de *E. grandis* (Knipscheer et al., 1990) e aos clones de *E. grandis* e *E. grandis* × *E. camaldulensis* (Carnegie, 2007).

Nesse sentido, os objetivos do estudo foram avaliar o efeito de inoculações com *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma harzianum* na mitigação dos efeitos da deficiência hídrica em plantas de *Eucalyptus urophylla* cultivadas em vasos e sobre seu crescimento em campo (1) e identificar a espécie de *Teratosphaeria* associada à mancha foliar encontrada em plantações de eucalipto nos municípios de Montezuma-MG e Vitória da Conquista-BA e caracterizar o processo de infecção (2).

## 2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas, A.C.; Zauza, E.A.V.; Mafia, R.G.; Assis, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto. 2nd Ed. Viçosa, Brazil. Editora UFV, 2009.
- Alwhibi, M.S.; Hashem, A.; Abd, E.F. Allah, A.; Alqarawi, A.; Soliman, D.W.K.; Wirth, S.; Egamberdieva, D. Increased resistance of drought by *Trichoderma harzianum* fungal treatment correlates with increased secondary metabolites and proline content. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 16, p. 1751-1757, 2017. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61695-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61695-2)
- Andjic, V.; Carnegie, A.J.; Pegg, G.S.; Hardy, G.S.J.; Maxwell, A.; Crous, P.W.; C. Pérez, C.; Wingfield, M.J.; Burgess, T.I. 23 years of research on *Teratosphaeria* leaf blight of *Eucalyptus*. **Forest Ecology and Management**, v. 443, p. 19-27, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.04.013>
- Andjic, V.; Hardy, G.E.; Cortinas, M.N.; Wingfield, M.J.; Burgess, T.I. Multiple gene genealogies reveal important relationships between species of *Phaeophleospora* infecting *Eucalyptus* leaves. **FEMS Microbiology Letters**, v. 268, n. 1, p. 22-33, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00637.x>
- Azevedo, G.B.; Novaes Q.S.; Azevedo G.T.O.S.; Silva H.F.; Sobrinho G.G.R.; Novaes A.B. Efeito de *Trichoderma* spp. no crescimento de mudas clonais de *Eucalyptus camaldulensis*. **Scientia Forestalis**, v. 45, n. 114, p. 343-352, 2017.
- Bae, H.; Sicher, R.C.; Kim, M.S.; Kim, S-H.; Strem, M.D.; Melnick, R.L.; Bailey, B.A. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 11, p. 3279-3295, 2009. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp165>
- Cândido, T.S.; Silva, A.C.; Guimarães, L.M.S.; Ferraz, H.G.M.; Borges Júnior, N.; Alfenas, A.C. *Teratosphaeria pseudoecalypti* on eucalyptus in Brazil. **Tropical Plant**

**Pathology**, v. 39, n. 5, p. 407-412, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000500008>

Carnegie, A.J. Forest health condition in New South Wales, Australia, 1996–2005. II. Fungal damage recorded in eucalypt plantations during forest health surveys and their management. **Australasian Plant Pathology**, v. 36, p. 225-239, 2007.

Cornejo-Ríos, K.; Osorno-Suárez, M.d.P.; Hernández-León, S.; Reyes-Santamaría, M.I.; Juárez-Díaz, J.A.; Pérez-España, V.H.; Peláez-Acero, A.; Madariaga-Navarrete, A.; Saucedo-García, M. Impact of *Trichoderma asperellum* on chilling and drought stress in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Horticulturae**, v. 7, n. 385, p. 1-14, 2021. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100385n>

Crous, P.W.; Wingfield, M.J.; Mansilla, J.P.; Alfenas, A.C.; Groenewald, J.Z. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on Eucalyptus II. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 99-131, 2006.

Elli, E.F.; Sentelhas, P. C.; de Freitas, C.H.; Carneiro, R.L.; Alvares, C.A. Assessing the growth gaps of Eucalyptus plantations in Brazil–Magnitudes, causes and possible mitigation strategies. **Forest Ecology and Management**, v. 451, p. 117464, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.117464>

Fernandes, E.T.; Cairo, P.A.R.; Novaes, A.B. Respostas fisiológicas de clones de eucalipto cultivados em casa de vegetação sob deficiência hídrica. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 29-34, 2015. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622008000400006>

Gómez-Alarcón, G.; de la Torre, M.A. Mecanismos den corrosión microbiana sobre los materiales pétreos. **Microbiología**, v. 10, p. 111-120, 1994.

Gonçalves, J.L.M.; Alvares, C.A.; Rocha, J.H.T.; Brandani, C.B.; Hakamada, R. Eucalypt plantation management in regions with water stress, Southern Forests: a **Journal of Forest Science**, v. 79, n. 3, p. 169-183, 2017. <https://doi.org/10.2989/20702620.2016.1255415>

Harman, G.E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190–194, 2006. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0190>

IBÁ - Indústria Brasileira de Árvores. Relatório Anual IBÁ. 2021. Disponível em: <https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorioiba2021-compactado.pdf>. Acesso em 06 de maio de 2022.

Illescas, M.; Pedrero-Méndez, A.; Pitorini-Bovolini, M.; Hermosa, R.; Monte, E. Phytohormone production profiles in trichoderma species and their relationship to wheat plant responses to water stress. **Pathogens**, v. 10, n. 8, p. 991, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080991>

Klippel, V.H.; Pezzopane, J.E.M.; Pezzopane, J.R.M.; Toledo, J.V. Impacto da deficiência hídrica no crescimento inicial de eucalipto. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v. 22, n. 1, p. 18-29, 2013.

Knipscheer, N.S.; Wingfield, M.J.; Swart, W.J. Phaeoseptoria leaf spot of *Eucalyptus* in South Africa. **South African Forestry Journal**, v. 154, p. 56-59, 1990.

Martins, F.B.; Streck, N.A.; Silva, J.C.D.; Morais, W.W.; Susin, F.; Navroski, M.C.; Vivian, M.A. Deficiência hídrica no solo e seu efeito sobre transpiração, crescimento e desenvolvimento de mudas de duas espécies de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1297-1306, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832008000300037>

Mastouri, F.; Björkman, T.; Harman, G.E. *Trichoderma harzianum* enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 25, n. 9, p. 1264-1271, 2012. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-11-0240>

Mendes, H.S.J.; Paula, N.F. de; Scarpinatti, E.A.; Paula, R.C. Respostas fisiológicas de genótipos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* à disponibilidade hídrica e adubação potássica. **Cerne**, v. 19, n. 4, p. 603-611, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0104-77602013000400010>

Merchant, A.; Peuke, A.D.; Keitel, C.; Macfarlane, C.; Warren, C.R.; Adams, M.A. Phloem sap and leaf delta C-13, carbohydrates, and amino acid concentrations in *Eucalyptus globulus* change systematically according to flooding and water deficit treatment. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 1785-1793, 2010. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq045>

MYCOBANK Database. Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks. Disponível em:

<https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/field/Mycobank%20%23/437456>

Nóia Júnior, R.S.; Amaral, G.C.; Pezzopane, J.E.M.; Fonseca, M.D.S.; Câmara da Silva, A.P.; Xavier, T.M.T. Ecophysiological acclimatization to cyclic water stress in *Eucalyptus*. **Journal of Forestry Research**, v. 31, n. 3, p. 797-806, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11676-019-00926-9>

Old, K.M.; Wingfield, M.J.; Yuan, Z.Q. **A manual of diseases of Eucalyptus in South-East Asia: Phaeophleospora leaf diseases**. Cifor, p. 25-30, 2003.

Pérez, G.; Slippers, B.; Wingfield, B.D.; Finkenauer, E.; Wingfield, M.J. Mycosphaerella leaf disease (MLD) outbreak on *Eucalyptus globulus* in Brazil caused by *Teratosphaeria* (*Mycosphaerella*) *nubilosa*. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 48, p. 302-306, 2009.

Pita, P.; Pardos, J.A. Growth, leaf morphology, water use and tissue water relations of *Eucalyptus globulus* clones in response to water deficit. **Tree Physiology**, v. 21, p. 599-607, 2001.

Scudeletti, D.; Crusciol, C.A.C.; Bossolani, J.W.; Moretti, L.G.; Momesso, L.; Servaz Tubana, B.; Castro, S.G.Q.; Oliveira, E.F.; Hungria, M. *Trichoderma asperellum* inoculation as a tool for attenuating drought stress in sugarcane. **Frontiers in Plant Science**, 12, 570, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.645542>

Shukla, N.; Awasthi, R.P.; LaxmiRawat, L.; Kumar, J. Biochemical and physiological responses of rice (*Oryza sativa* L.) as influenced by *Trichoderma harzianum* under

drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, p. 78-88, 2012.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.02.001>

Shvaleyeva, A. L.; Silva, F C.E.; Breia, E.; Jouve, J.; Hausman, J.F.; Almeida, M.H., Maroco, J.P.; Rodrigues, M.L.; Pereira, J.S.; Chaves, M.M. Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. **Tree Physiology**, v. 26, n. 2, 239-248, 2006. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.2.239>

Siregar, B.A.; Liantiqomah, D.; Gafur, A.; Tjahjono, B. Screening of endophytic *Trichoderma* isolates to improve the growth and health of *Eucalyptus pellita* seedlings. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 974, n 1, p. 012084, 2022.

Soares, P.P.S.; Cairo, P.A.R.; da Silva, L.D.; Matsumoto, S.N., do Bonfim, R.A.A.; Barbosa, M.P.; Sá, M.C.; Almeida, M.F.; Mesquita, N.L.S. Mitigating water stress by increasing  $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$  ratio in young *Eucalyptus urophylla* plants. **Trees**, v. 36, 81-91, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02183-y>

Solís, M.; Wingfield, M.J.; Hammerbacher, A.; Naidoo, S. Comparison of the infection biology of *Teratosphaeria destructans* and *Teratosphaeria epicoccoides* on *Eucalyptus*. **Plant Disease**, v. 106, n. 7, p. 1944-1951, 2022. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-1877-RE>

Taole MM, Burgess TI, Gryzenhout M, Wingfield BD, Wingfield MJ. DNA sequence incongruence and inconsistent morphology obscure species boundaries in the *Teratosphaeria suttonii* species complex. **Mycoscience**, v. 53, p. 270-283, 2012.

Tariq, A., Pan, K., Olatunji, O. A., Graciano, C., Li, Z., Li, N., ... & Zhang, L. (2019). Impact of phosphorus application on drought resistant responses of *Eucalyptus grandis* seedlings. **Physiologia Plantarum**, v. 166, n. 4, p. 894-908.  
<https://doi.org/10.1111/ppl.12868>

Utkhao, W.; Yingjajaval, S. Changes in leaf gas exchange and biomass of *Eucalyptus camaldulensis* in response to increasing drought stress induced by polyethylene glycol. **Trees**, v. 29, n. 5, p. 1581-1592, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00468-015-1240-1>

Vieira Júnior, J.R.; Cipriani, H.; Fernandes, C.D.F.; De Santana, N.R.; Dos Passos, A. M.A.; Da Silva, D.S.G., Souza Filho, F.M.; Freire, T.C.; Matos, S. Escala diagramática de severidade da mancha-de-phaeophleospora em eucalipto. **Comunicado Técnico**, 391. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2014.

Zhang, S.; Xu, B.; Gan, Y. Seed treatment with *Trichoderma longibrachiatum* T6 promotes wheat seedling growth under NaCl stress through activating the enzymatic and nonenzymatic antioxidant defense systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 3729, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20153729>

**ARTIGO I**

*Trichoderma* spp. na mitigação dos efeitos da deficiência hídrica e crescimento de plantas de *Eucalyptus urophylla*\*

---

**Situação:** não submetido

### **3 *Trichoderma* spp. na mitigação da deficiência hídrica e crescimento de plantas de *Eucalyptus urophylla***

#### **RESUMO**

*Trichoderma* spp. promovem alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas que podem resultar em maior crescimento e mitigação dos efeitos da deficiência hídrica. Neste estudo, avaliou-se o efeito de inoculações com *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma harzianum* na mitigação dos efeitos da deficiência hídrica em plantas de *Eucalyptus urophylla* cultivadas em vasos e sobre seu crescimento em campo. Um estudo foi conduzido em ambiente protegido sob esquema fatorial 3 x 2, sendo o primeiro fator constituído por inoculação com *Trichoderma asperellum* (TA), *Trichoderma harzianum* (TH) e controle (C); e o segundo por dois regimes hídricos, com 30 e 90% da capacidade de vaso, caracterizados, respectivamente, com e sem deficiência hídrica (CD e SD). As plantas foram avaliadas quanto aos parâmetros morfofisiológicos, indicadores do estado hídrico, trocas gasosas e aspectos bioquímicos e metabólicos. Em campo, foram montados três experimentos individuais, constituídos pela inoculação das mudas com, *T. asperellum* (TA), *T. harzianum* (TH) e controle (C). Após 90 dias do transplântio, avaliou-se altura, número de folhas e diâmetro do caule das plantas. Aos 270 dias, discos foliares foram coletados para determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos e amostras foliares foram coletadas para determinação dos teores de açúcares totais e redutores, amido e prolina. Sob regime hídrico com deficiência hídrica o crescimento das plantas, potencial hídrico foliar, teor relativo de água na folha e trocas gasosas foram menores e os teores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e peróxido de hidrogênio maiores comparado a plantas sem deficiência hídrica. Inoculações com *T. asperellum* e *T. harzianum* não mitigaram os efeitos da deficiência hídrica sobre o crescimento de plantas de eucalipto, no entanto, independente do regime hídrico, esses microrganismos proporcionaram maior atividade fotossintética, eficiência do uso da água e aumento dos teores de açúcares solúveis e aminoácidos. Em condições de campo o número de folhas, altura de plantas e diâmetro do caule foram maiores e os teores de açúcares redutores e solúveis e de amido menores sob inoculação com *T. asperellum* e *T. harzianum*.

**Palavras-chave:** eucalipto, estresse hídrico, respostas fisiológicas, *Tricoderma*.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O cultivo de *Eucalyptus* spp. desempenha um papel fundamental no fornecimento de produtos florestais, tais como a madeira, carvão vegetal, resinas, compensados, celulose e papel, ao mesmo tempo em que alivia a pressão sobre as florestas nativas (Tupinambá-Simões, 2022). No entanto, a seca é um fator ambiental que limita o crescimento e a produtividade dessas plantas. Em *Eucalyptus urophylla*, a restrição hídrica ocasiona redução do potencial hídrico e do teor relativo de água nas folhas, das trocas gasosas e os teores de açúcares, amido e pigmentos fotossintéticos, e aumento nos teores peróxido de hidrogênio e malonaldeído e do extravasamento de eletrólitos (Barros Junior et al., 2021; Santos et al., 2021; Soares et al., 2022). Essas alterações interferem no crescimento e podem comprometer a sobrevivência das plantas, principalmente nas etapas iniciais da implementação da floresta.

O estabelecimento de relações simbióticas com *Trichoderma* spp. tem sido explorado como uma estratégia de promoção de crescimento e mitigação dos efeitos da deficiência hídrica em plantas de arroz, cacau, cana-de açúcar, milho, tomate e trigo (Bae et al., 2009; Mastouri et al., 2012; Shukla et al., 2012; Guler et al., 2016; Mona et al., 2017; Scudeletti et al., 2021). Sob condições de deficiência hídrica inoculações com cepas de *T. asperellum* e *T. harzianum* resultaram em aumento da expressão de enzimas antioxidantes reduzindo os danos causados pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), aumento do teor de pigmentos fotossintéticos, regulação de trocas gasosas e aumento da eficiência do uso da água e absorção de nutrientes que, em conjunto, resultam em maior crescimento das plantas (Mastouri et al., 2012; Estévez-Geffriaud et al., 2020; Khoshmanzar et al., 2020; Scudeletti et al., 2021; Singh et al., 2023).

Algumas espécies de *Trichoderma* promovem o crescimento de espécies florestais (Griebeler et al., 2021). Em plantas de eucalipto, seus efeitos na promoção de crescimento e no controle de fitopatógenos são amplamente relatados (Maciel et al., 2012; Azevedo et al., 2017; Bandeira et al., 2023; Gomes et al., 2023), mas possíveis mecanismos de tolerância à deficiência hídrica ainda não são conhecidos. Em plantas de *Pinus massoniana* submetidas a estresse hídrico a inoculação com *T. longibrachiatum* reduziu os danos às membranas celulares e aumentou significativamente as atividades das enzimas antioxidantes, o conteúdo de substâncias osmóticas e a fotossíntese (Yu et al., 2023). A mitigação dos efeitos da deficiência hídrica promovida por espécies de *Trichoderma*, geralmente, está relacionada a uma maior absorção de nutrientes (Gómez

e Torre, 1994; Harman et al., 2006), o que resulta em maior crescimento das raízes e melhor absorção de água (Bae et al., 2009; Shukla et al., 2012). Além disso, aumenta a expressão de enzimas antioxidantes (Mastouri et al., 2012) e pode induzir a síntese de fitohormônios (Illescas et al., 2021).

Considerando a hipótese de que a tolerância das plantas de eucalipto à deficiência hídrica e o crescimento são influenciados pela inoculação com espécies de *Trichoderma*, o objetivo do estudo foi avaliar respostas morfofisiológicas e bioquímicas de plantas de *Eucalyptus urophylla* em função de regimes hídricos e inoculações com *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma harzianum* e o efeito da inoculação sobre o crescimento inicial das plantas em condições de campo.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Estudo em ambiente protegido: condições de cultivo e delineamento experimental

O experimento foi conduzido em ambiente protegido com cobertura plástica e tela antiafídica, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, em Vitória da Conquista, Bahia, Brasil, no período de outubro a dezembro de 2021. A temperatura no ambiente protegido durante o crescimento das plantas variou entre 19°C (mínima) e 43°C (máxima), com média de 31°C. A umidade relativa média do ar foi de 61%.

Mudas sadias e uniformes de *E. urophylla* clone AEC 144 com 100 dias de idade, medindo cerca de 25 cm de altura e com cerca de 10 folhas, foram utilizadas para condução do experimento. As mudas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade para 15 dm<sup>3</sup>, preenchidos com substrato constituído de areia e solo de barranco na proporção 2:1, sendo adubadas de acordo com a análise prévia do substrato, que exibiu as seguintes características físico-químicas: pH = 4,9; matéria orgânica = 6 g dm<sup>-3</sup>; P = 1 mg dm<sup>-3</sup>; K = 0,08 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Ca = 0,6 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg = 0,3 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; H = 2 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Al = 0,5 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso (DIC), sob esquema fatorial 3 x 2, sendo o primeiro fator constituído por inoculação com *Trichoderma asperellum* (TA), *Trichoderma harzianum* (TH), e controle (C) (plantas não inoculadas); e o segundo por dois regimes hídricos, com 30 e 90% da capacidade de vaso caracterizados, respectivamente, com e sem deficiência hídrica (CD e SD). Foram utilizadas quatro repetições e cada parcela experimental foi constituída por uma planta.

Para inoculação, as mudas foram retiradas dos tubetes e suas raízes imersas em uma solução dos produtos comerciais à base de conídios de *T. harzianum* (Trichodermil<sup>®</sup>, CEPA ESALQ 1306,  $2 \times 10^9$  conídios viáveis mL<sup>-1</sup>) e *T. asperellum* (TrichobiolMax<sup>®</sup>,  $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>) na concentração de 10 mL L<sup>-1</sup>, por 30 minutos antes do transplântio. Posteriormente, foram adicionados 200 mL desta solução a cada vaso. A implementação dos regimes hídricos foi realizada aos 30 dias após transplântio (DAT) e, a partir desse período, os vasos foram pesados diariamente e regados com água até atingirem 30 e 90% da capacidade de vaso, respectivamente.

Aos 60 DAT, as plantas foram avaliadas. Amostras foliares foram coletadas no terço médio de cada planta, congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas e armazenadas em freezer para posterior determinação do teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e atividade das enzimas peroxidase do guaiacol (GPX) e superóxido dismutase (SOD).

### **3.2.1.1 Parâmetros morfofisiológicos**

Foram utilizados uma régua graduada e um paquímetro digital para medir o crescimento em altura e diâmetro do colo, respectivamente. Para a área foliar total, foi utilizado um medidor de área foliar (LICOR, LI-3100). A massa seca de parte aérea e raízes foi determinada secando-se as amostras em estufa de ventilação forçada a 65 °C, por 72 horas, e depois pesando-as.

### **3.2.1.2 Potencial hídrico foliar e teor relativo de água**

O potencial hídrico foliar foi determinado em horário pouco antes do amanhecer, tomando-se como referência folhas adultas e completamente expandidas, localizadas na parte mediana da planta, utilizando-se uma câmara de pressão (Modelo 1000, PMS) (Scholander et al., 1965).

O teor relativo de água (TRA) foi determinado em uma folha oposta, tomando-se como referência 10 discos (7 mm), extraídos do limbo foliar, com auxílio de um perfurador, nos quais verificou-se a massa fresca (MF) instantânea; a massa túrgida (MT), após submersão dos discos foliares em água deionizada por 24 h; e a massa seca (MS), após secagem em estufa com circulação forçada de ar, a 65 °C, até atingir massa constante. O TRA foi calculado com base na fórmula proposta por Weatherley (1950):

$$TRA(\%) = \left[ \frac{MF - MS}{MT - MS} \right] \times 100$$

### **3.2.1.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e peróxido de hidrogênio**

O nível de peroxidação lipídica foi determinado pela reação do ácido tiobarbitúrico (TBA), (Heath e Packer, 1968). O material foliar liofilizado (0,2 g) foi homogeneizado em 10 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1% e centrifugado a 10.000 rpm, por 5 min. A uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi adicionada a 4 mL de TBA a 0,5% diluído em TCA a 20%. A mistura foi aquecida a 95 °C, por 30 min, e então resfriada rapidamente em banho de gelo. Após centrifugação a 10.000 rpm, durante 10 min, a absorbância do sobrenadante foi mensurada a 532 nm em espectrofotômetro (Biochrom WPA Lightwave II) e o teor de TBARS calculado usando-se seu coeficiente de absorção de 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

O teor foliar de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi determinado de acordo com o método descrito por Junglee et al. (2014), com algumas modificações. Para obtenção do extrato, 0,05 g de folhas liofilizadas foram adicionadas a 1 mL de ácido tricloroacético (0,1%, p/v) e centrifugada a 10.000 rpm, por 10 min, a 4 °C. Posteriormente, 0,2 mL do sobrenadante foi adicionado a 0,2 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,5) e 0,8 mL de iodeto de potássio (1 mM). Para cada tratamento, um controle foi preparado com água deionizada em vez de iodeto de potássio para contabilizar a coloração do tecido. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente, no escuro, por 1 hora, e a absorbância medida a 390 nm. A quantidade de peróxido de hidrogênio foi calculada usando-se uma curva padrão conforme Junglee et al. (2014).

### **3.2.1.4 Trocas gasosas da folha**

As trocas gasosas foliares (fotossíntese líquida (*A*), transpiração (*E*) e condutância estomática (*g<sub>s</sub>*) foram determinadas entre 8 e 11 h da manhã utilizando-se um analisador de gases por infravermelho (LI-COR, LI-6400XT). As avaliações foram realizadas em folhas completamente expandidas, localizadas na porção mediana das plantas. A eficiência intrínseca no uso da água (EiUA) foi calculada pela razão entre a taxa de fotossíntese líquida e a condutância estomática (EiUA =  $A g_s^{-1}$ ).

### **3.2.1.5 Pigmentos fotossintéticos**

Os pigmentos fotossintéticos foram extraídos de acordo com a metodologia de Hiscox e Israelstam (1979), utilizando-se quatro discos foliares (7 mm de diâmetro) e 4 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com carbonato de cálcio. Os teores de

clorofila *a* e carotenoides foram determinados de acordo com o método de Wellburn (1994), tendo como referência os comprimentos de onda de 664 e 480 nm.

#### **3.2.1.6 Teor de açúcares redutores, açúcares solúveis e amido**

Os teores de açúcares redutores e solúveis foram quantificados em extratos obtidos de 0,2 g de folhas secas trituradas, que foram submetidas a duas centrifugações de 45 minutos, a 4000 rpm, utilizando-se 10 mL da solução tampão fosfato de potássio (0,1 M) como extrator, a cada centrifugação (2x). O sobrenadante foi recolhido como extrato.

A quantificação de açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), conforme descrição de Miller (1959). Uma alíquota de 0,8 mL do extrato foi adicionada a 0,5 mL de uma solução de DNS (NaOH 0,4 M, DNS 0,04 M e tartarato de sódio e potássio 1M) e 0,45 mL de água deionizada, totalizando um volume reacional de 1,25 mL, que foi submetido ao banho-maria, a 100 °C, por cinco minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados 3,75 mL de água deionizada, e leituras realizadas em espectrofotômetro a 540 nm.

A quantificação dos teores de açúcares solúveis foi baseada no método proposto por Yemm e Willis (1954). Uma alíquota de 0,02 mL de extrato foi adicionada a 2 mL de antrona a 0,2% (p/v) e 0,98 mL de água deionizada, em recipiente mantido sob resfriamento, totalizando o volume reacional de 3 mL. O volume reacional foi colocado em banho-maria, a 100 °C, por três minutos, com posterior resfriamento, para a realização das leituras espectrofotométricas a 620 nm.

O teor de amido foi determinado conforme Instrução Normativa nº 20 (Brasil, 1999), com algumas modificações. Uma amostra de 0,25 g de folhas secas previamente desengorduradas em hexano, foi adicionada a 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M e aquecida a 100 °C, por 1 hora. Após esse período, adicionou-se água, completando o volume para 250 mL. Em seguida, coletou-se 1 mL dessa solução, para resfriamento, a 0 °C, juntamente com 5 mL de solução de antrona 0,005 M. Após esse procedimento, a mistura foi aquecida a 100 °C, por 11 min, seguida de resfriamento sob temperatura ambiente e leituras espectrofotométricas realizadas a 620 nm.

#### **3.2.1.7 Aminoácidos totais**

Os teores de aminoácidos totais foram quantificados pelo método proposto por Yemm e Coccking (1955), com base nos mesmos extratos utilizados na quantificação de

açúcares. Alíquotas de 0,1 mL dos extratos foram adicionadas em meio reacional contendo 0,5 mL de citrato de sódio (0,2 M, pH 5), 0,2 mL de ninhidrina (5% em metil celosolve), 1,0 mL de KCN 0,01 M (2 % em metil celosolve) e 0,9 mL de água deionizada, e submetido ao banho-maria, a 100 °C, por 20 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados 1,3 mL de etanol 60% (v/v), completando-se o volume para 4 mL. Leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 570 nm e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de aminoácidos  $\text{g}^{-1}$  matéria fresca.

### **3.2.1.8 Prolina**

O teor de prolina foi determinado de acordo com o método proposto por Bates et al. (1973). A extração foi realizada utilizando-se 10 mL de água deionizada que foram adicionados a 0,02 g de folhas secas e trituradas, sendo submetidos ao banho maria a 100 °C, por 1 hora. Uma alíquota de 0,2 mL do extrato foi adicionada ao meio reacional, contendo 0,8 mL de água deionizada, 1 mL de solução ácida de ninhidrina (1,25 g de ninhidrina, 30 mL de ácido acético glacial, 20 mL de ácido fosfórico (6 M) e 1 mL de ácido acético glacial, sendo aquecido a 100 °C, por 1 hora, seguido de resfriamento com gelo. Em seguida, foram adicionados 2 mL de tolueno ao meio reacional, com posterior agitação em vortex e coleta do sobrenadante para a leitura em espectrofotômetro a 520 nm.

### **3.2.1.9 Quantificação de enzimas antioxidantes peroxidase do guaiacol (GPX) e superóxido dismutase (SOD)**

Para extração 0,05 g de material liofilizado foi adicionado a 1,5 mL de tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (50 mM, pH 6,0) e centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm. Posteriormente o sobrenadante foi coletado como extrato. A atividade da enzima peroxidase do guaiacol (GPX) foi determinada conforme metodologia descrita por Burguières et al. (2007), com algumas modificações. O meio reacional foi constituído por 160  $\mu\text{L}$  de tampão de reação peroxidase [40 M de guaiacol,  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 0,06% e  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (20 mM, pH 6,0)], 80  $\mu\text{L}$  de tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (50 mM, pH 6,0) e 40  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático diluído (1:10). A variação da absorbância, a 470 nm foi monitorada durante 1 minuto de reação, a 25 °C, em espectrofotômetro leitor de microplacas (Asys Expert Plus).

A atividade da SOD foi determinada pelo cálculo da quantidade de extrato que inibi 50% da redução de nitro azul de tetrazólio (NBT) (Beauchamp e Fridovich, 1971).

Alíquotas de 100 µL do extrato enzimático foram transferidas para tubos de ensaios protegidos da luz, contendo tampão NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7,8, 0,1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético, 13 mM de L- metionina e 75 µM de NBT. A reação foi iniciada pela adição de 2 µM de riboflavina e a concomitante transferência dos tubos para uma câmara iluminada por uma lâmpada fluorescente circular de 30 watts, durante um período de 30 min. Em seguida, realizou-se leituras de absorvância a 560 nm em espectrofotômetro leitor de microplacas (Asys Expert Plus).

### **3.2.2 Estudo de campo**

Um estudo de campo foi conduzido no município de Montezuma-MG (15°13'36" S e 42°34'34" W), em parceria com a empresa Montezuma Florestal, no período de 11 de agosto a 23 de novembro de 2022. Foram montados três experimentos individuais, constituídos pela inoculação das mudas com *T. asperellum* (TA), *T. harzianum* (TH) e controle (C). As mudas foram plantadas em espaçamento de 2,5 x 3,5 m, em linhas de 800 metros de comprimento, sendo plantadas 250 mudas para cada tratamento. A área útil de cada tratamento foi constituída por 60 (sessenta) parcelas experimentais, localizadas na área central de cada linha, sendo cada parcela experimental composta por uma planta. A inoculação foi realizada pela imersão das raízes em solução dos produtos comerciais, na concentração de 1 mL L<sup>-1</sup>, por 30 minutos, e adição de 1 litro dessa solução na bacia, próximo ao colo da planta, de maneira a fornecer 1 mL do produto comercial por planta. Para o tratamento controle, os mesmos procedimentos foram realizados utilizando-se apenas água. Como a implantação foi realizada em um período de seca foi realizada irrigação a cada 7 dias.

#### **3.2.2.1 Avaliações**

O número de folhas foi avaliado aos 90 DAT. A altura foi avaliada aos 90 e 150 DAT, com auxílio de fita métrica e o diâmetro do caule aos, 90, 150 e 270 DAT, com auxílio de paquímetro digital. Essas avaliações foram realizadas nas 60 plantas da área útil de cada tratamento.

Aos 270 dias, discos foliares foram retirados de folhas completamente expandidas localizadas na porção mediana da copa de 10 plantas, de cada tratamento, para determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos, como descrito no item 2.1.6. Nesse mesmo período, em cada tratamento, foram coletadas 40 folhas de cada uma das 10 plantas, que foram secas em estufa, trituradas e utilizadas para determinação dos

teores de açúcares totais e redutores, amido e prolina (como descrito nos itens 2.1.7 e 2.1.9).

### 3.2.3 Análise estatística

Os dados coletados nos experimentos descritos em 4.1 e 4.2 foram submetidos a teste de normalidade dos resíduos de Shapiro-Wilk e homogeneidade das variâncias de Bartlett, no programa PAST 4.10 (Hammer et al., 2001). Posteriormente, realizou-se a análise de variância e teste de comparação de médias Tukey, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

## 3.3 RESULTADOS

### 3.3.1 Estudo em ambiente protegido

Os parâmetros de crescimento e massa seca das plantas de eucalipto foram influenciados apenas pelo fator regime hídrico (Tabela 1.1). Plantas submetidas à deficiência hídrica (CD) apresentaram menor altura, diâmetro do caule, área foliar e massa seca de parte aérea e raiz, quando comparado às plantas bem irrigadas (SD).

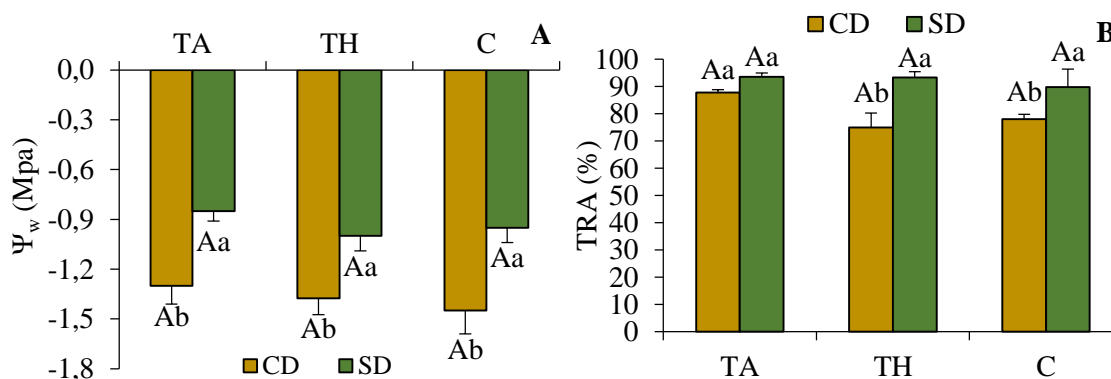
**Tabela 1.1.** Altura (ALT), diâmetro do caule (DC), área foliar (AF) e massa seca de parte aérea (MSPA) e raízes (MSR) de plantas jovens de *Eucalyptus urophylla* em função de regimes hídricos com (CD) e sem deficiência hídrica (SD) e inoculações com *T. asperellum* (TA), *T. harzianum* (TH) e controle (C)

Regime hídrico	ALT (cm)	DC (cm)	AF (cm <sup>2</sup> )	MSPA (g)	MSR (g)
CD	54,08 ± 1,80 b	7,17 ± 0,41 b	2188,12 ± 159,53 b	23,66 ± 1,63 b	7,17 ± 0,50 b
SD	59,83 ± 1,69 a	9,10 ± 0,33 a	3951,24 ± 256,05 a	41,24 ± 2,62 a	12,86 ± 0,96 a
Inoculação <sup>ns</sup>	ALT (cm)	DC (cm)	AF (cm <sup>2</sup> )	MSPA (g)	MSR (g)
TA	60,25 ± 1,36	9,19 ± 0,48	3399,45 ± 355,06	36,97 ± 4,34	11,11 ± 1,51
TH	55,37 ± 2,25	7,24 ± 0,50	2878,75 ± 438,86	28,2 ± 3,68	9,73 ± 1,2
C	55,25 ± 2,95	8,0 ± 0,56	2930,83 ± 453,24	32,22 ± 4,22	9,22 ± 1,50

Letras minúsculas diferentes entre regimes hídricos indicam diferenças significativas (Teste Tukey,  $p < 0,05$ ). ns: não houve diferenças significativas (Teste F,  $p < 0,05$ ).

Apesar das inoculações não terem influenciado os parâmetros de crescimento, plantas inoculadas com *T. asperellum* (TA) exibiram, respectivamente, valores de altura, diâmetro do caule e área foliar 9,05, 14,87 e 15,99% superiores às plantas controle (Tabela 1.1).

O potencial hídrico foliar foi influenciado em função do regime hídrico, exibindo valores inferiores nos tratamentos CD. Para o teor relativo de água, houve interação significativa entre regimes hídricos e inoculação. Independente do regime hídrico, os tratamentos com inoculação não diferiram entre si. No entanto sob inoculação com TA o TRA se manteve similar nas plantas CD e SD. Nos tratamentos com inoculação por TH e controle, o TRA foi menor sob plantas CD.



**Figura 1.1.** Potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ) [A] e teor relativo de água (TRA) [B] de folhas de *Eucalyptus urophylla* submetidas à inoculação com *T. asperellum* (TA), *T. harzianum* (TH) e não inoculado (C) e regimes hídricos com e sem deficiência hídrica (CD e SD). Letras maiúsculas diferentes entre tratamentos de inoculação e letras minúsculas entre regimes hídricos indicam diferenças significativas (Teste Tukey,  $p < 0,05$ ).

Os teores de clorofila *a* e carotenoides foram influenciados pelo fator inoculação, verificando-se menores teores sob inoculação com TH, quando comparado às plantas controle (Tabela 1.2). Para TA, verificou-se valores intermediários.

**Tabela 1.2.** Teores de clorofila *a* e carotenoides de plantas de *E. urophylla* inoculadas com *T. asperellum* e *T. harzianum* e controle

Inoculação	Clorofila <i>a</i> ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	Carotenoides ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )
<i>T. asperellum</i>	$0,00491 \pm 0,00079$ ab	$0,000313 \pm 0,00005$ ab

<i>T. harzianum</i>	0,00389 ± 0,00079 b	0,000251 ± 0,00004 b
Controle	0,00727 ± 0,00046 a	0,00046 ± 0,00006 a

Letras minúsculas diferentes entre tratamentos de inoculação indicam diferenças significativas (Teste Tukey,  $p < 0,05$ ).

A condutância estomática ( $g_s$ ) e a taxa de transpiração ( $E$ ) foram influenciadas pelo regime hídrico, apresentando menores valores sob regime CD. A taxa fotossintética ( $A$ ) foi influenciada pelos fatores individualmente, e a eficiência intrínseca do uso da água (EiUA) apenas pelo fator inoculação (Tabela 1.3). A imposição do regime CD também ocasionou redução da  $A$ . Em função das inoculações, verificou-se maior  $A$  e EiUA sob inoculação com TA e TH, em relação ao controle não inoculado (Tabela 1.3).

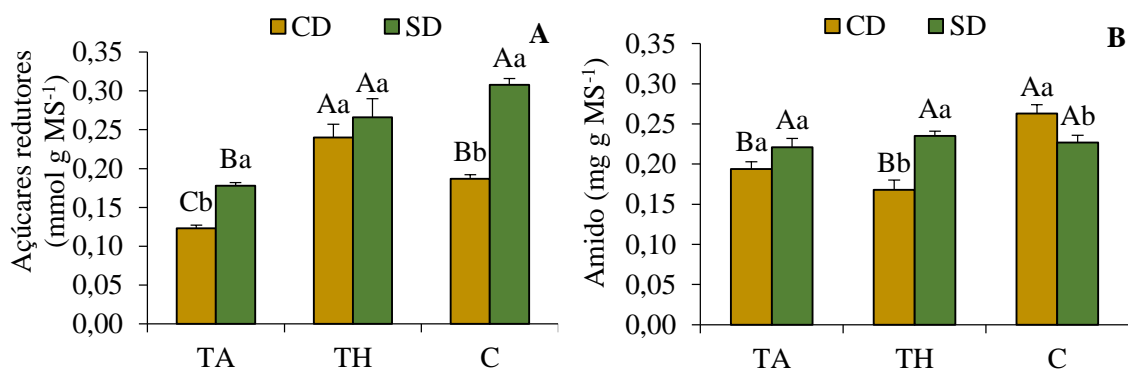
**Tabela 1.3.** Trocas gasosas de plantas de *E. urophylla* em função de regimes hídricos e inoculação com *T. asperellum* e *T. harzianum*

Regime hídrico	$g_s$ (mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	$E$ (mmol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	$A$ (μmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
Com déficit	0,22 ± 0,02 b	4,93 ± 0,19 b	14,490 ± 0,61 b
Sem déficit	0,33 ± 0,02 a	6,60 ± 0,14 a	19,070 ± 0,36 a
Inoculação	$A$ (μmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	EiUA (μmol mol <sup>-1</sup> )	
<i>T. asperellum</i>	17,45 ± 0,87 a	71,54 ± 6,76 a	
<i>T. harzianum</i>	17,40 ± 1,03 a	74,58 ± 6,69 a	
Controle	15,480 ± 0,96 b	52,69 ± 5,47 b	

Letras minúsculas diferentes entre tratamentos indicam diferenças significativas (Teste Tukey,  $p < 0,05$ ).

Plantas inoculadas com TA e controle exibiram menor teor de açúcares redutores sob regime hídrico CD. Para as inoculadas com TH não houve diferenças em função dos regimes hídricos. Independente do regime hídrico, plantas inoculadas com TA exibiram menores teores de açúcares redutores (Figura 1.2A).

Sob inoculação com TA, os teores de amido foram similares entre os regimes CD e SD. Para TH, verificou-se maior teor de amido sob SD e nas plantas controle maior teor sob CD. Plantas submetidas ao regime hídrico CD exibiram menor teor de amido sob inoculação com TA e TH em relação ao controle, não havendo diferenças sob regime SD (Figura 1.2B).



**Figura 1.2.** Teor de açúcares redutores (A) e amido (B) em plantas de *Eucalyptus urophylla* submetidas à inoculação com *T. asperellum* (TA), *T. harzianum* (TH) e não inoculado (C) e regimes hídricos com e sem deficiência hídrica (CD e SD). Letras maiúsculas diferentes entre tratamentos de inoculação e letras minúsculas entre regimes hídricos indicam diferenças significativas (Teste Tukey,  $p < 0,05$ ).

O teor de açúcares solúveis e prolina foi influenciado pelos dois fatores, quando analisados separadamente. O teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi influenciado apenas pelo regime hídrico e o teor de aminoácidos totais pela inoculação. Sob regime hídrico CD, as plantas exibiram maior teor de açúcares solúveis, TBARS e prolina (Tabela 1.4).

Inoculações com TA e TH resultaram em aumento do teor de açúcares solúveis e aminoácidos totais em comparação ao tratamento controle. Plantas inoculadas com TA exibiram maior teor de prolina do que as inoculadas com TH e valor similar às plantas controle, respectivamente.

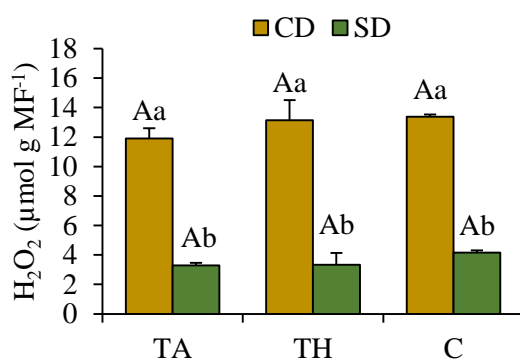
**Tabela 1.4.** Parâmetros bioquímicos de plantas de *Eucalyptus urophylla* submetidas ao regime hídrico com e sem deficiência hídrica e inoculação com *T. asperellum*, *T. harzianum* e não inoculado

	Açúcares solúveis	TBARS	Prolina
Regime hídrico	(mmol g MS <sup>-1</sup> )	(nmol g MF <sup>-1</sup> )	(mmol g MS <sup>-1</sup> )
Com déficit	1,15 ± 0,09 a	80,27 ± 5,59 a	0,0257 ± 0,003 a
Sem déficit	0,92 ± 0,1 b	63,65 ± 4,17 b	0,0192 ± 0,002 b
	Açúcares solúveis	Aminoácidos totais	Prolina
Inoculação	(mmol g MS <sup>-1</sup> )	(μmol g MS <sup>-1</sup> )	(mmol g MS <sup>-1</sup> )
<i>T. asperellum</i>	1,22 ± 0,077 a	7,11 ± 0,364 a	0,0259 ± 0,003 a

<i>T. harzianum</i>	1,12 ± 0,125 a	6,65 ± 0,532 a	0,0162 ± 0,003 b
Controle	0,73 ± 0,105 b	4,83 ± 0,207 b	0,0254 ± 0,003 ab

Letras minúsculas diferentes entre tratamentos indicam diferenças significativas (Teste Tukey,  $p < 0,05$ ).

O teor de  $H_2O_2$  foi influenciado apenas pelo regime hídrico, havendo maior teor de  $H_2O_2$  nas plantas sob o regime hídrico CD (Figura 1.3). Embora não haja diferenças significativas entre os tratamentos com inoculação, plantas submetidas à deficiência hídrica e inoculadas com TA exibiram teor de  $H_2O_2$  9,39 e 11,05 % inferior às plantas inoculadas com TH e controle.

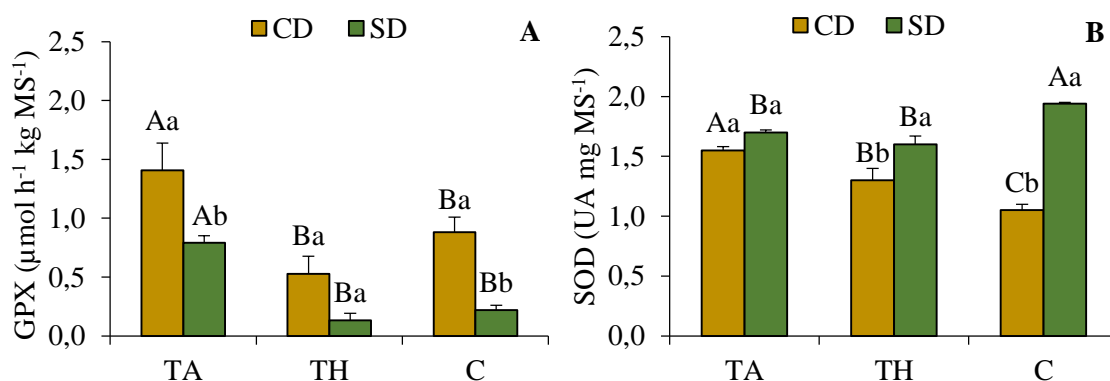


**Figura 1.3.** Teor de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em plantas de *Eucalyptus urophylla* submetidas à inoculação com *T. asperellum* (TA), *T. harzianum* (TH) e não inoculado (C) e regimes hídricos com e sem deficiência hídrica (CD e SD). Letras maiúsculas diferentes entre tratamentos de inoculação e letras minúsculas entre regimes hídricos indicam diferenças significativas (Teste Tukey,  $p < 0,01$ ).

A atividade das enzimas peroxidase do guaiacol (GPX) e superóxido dismutase (SOD) foi influenciada pela interação entre os fatores inoculação e regime hídrico. Plantas inoculadas com TA e controle exibiram maior atividade da GPX, quando submetidas ao regime hídrico CD; para as inoculadas com TH, não houve diferenças entre os regimes hídricos. Independente do regime hídrico, plantas inoculadas com TA exibiram maior atividade da GPX em relação às inoculadas com TH e controle (Figura 1.4A).

Plantas inoculadas com TH e controle exibiram maior atividade da SOD sob regime hídrico SD. Sob inoculação com TA, os valores foram similares entre os regimes CD e SD (Figura 1.4B). Sob regime hídrico SD, verificou-se maior atividade da SOD

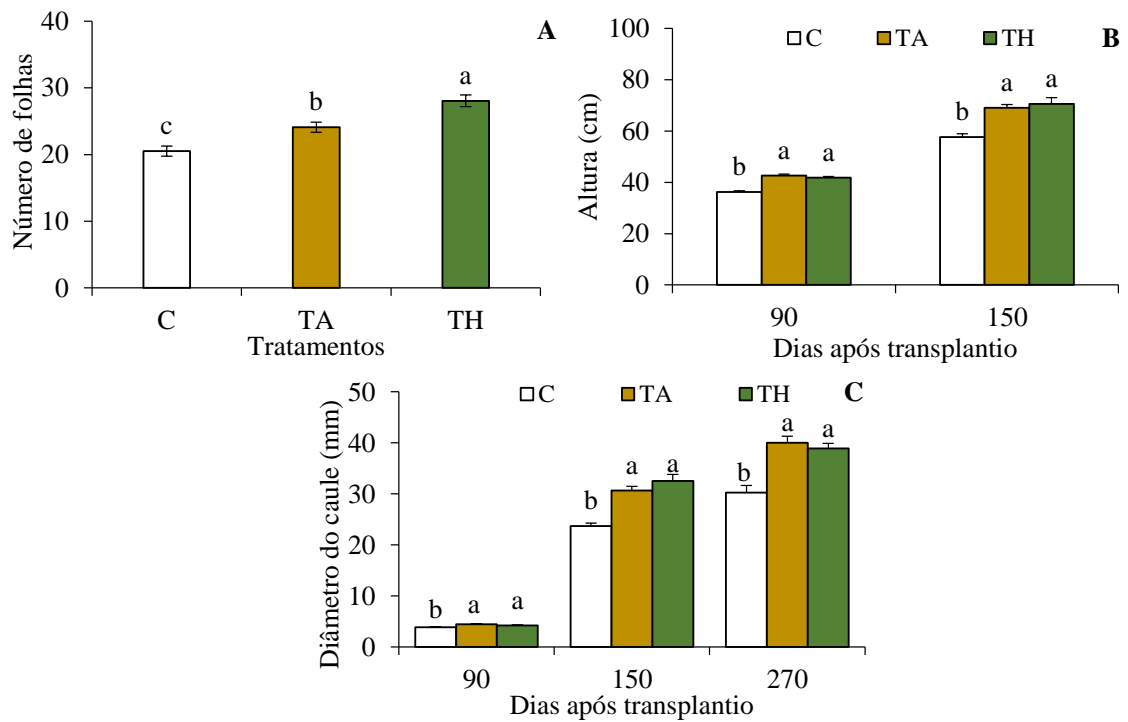
nas plantas controle, e sob CD nas plantas inoculadas com TA, seguido das inoculadas com TH.



**Figura 1.4.** Atividade da peroxidase do guaiacol (GPX) [A] e superóxido dismutase (SOD) [B] em folhas de *Eucalyptus urophylla* submetidas à inoculação com *T. asperellum* (TA), *T. harzianum* (TH) e não inoculado (C) e regimes hídricos com e sem deficiência hídrica (CD e SD). Letras maiúsculas diferentes entre tratamentos de inoculação e letras minúsculas entre regimes hídricos indicam diferenças significativas (Teste Tukey,  $p < 0,05$ ).

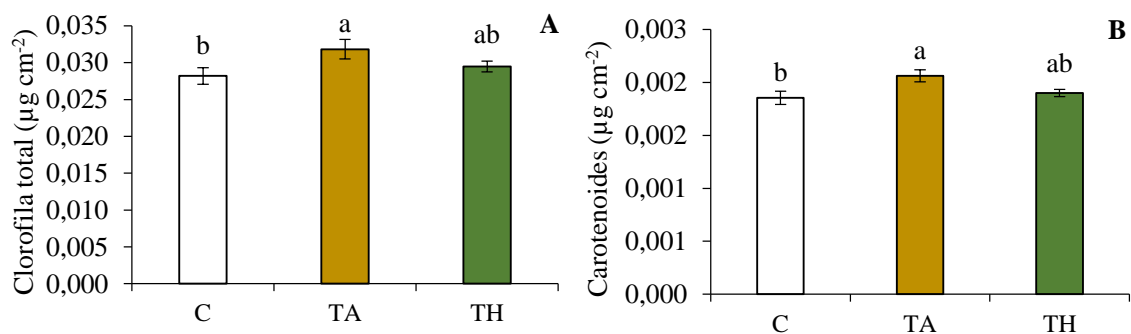
### 3.3.2 Estudo de campo

O número de folhas aos 90 DAT foi maior em plantas inoculadas com TH, seguido das inoculadas com TA, quando comparado ao controle (plantas não inoculadas) (Figura 1.5). A altura de plantas, avaliada aos 90 e 150 DAT, foi maior nas plantas inoculadas com TA e TH do que no controle, não diferindo entre si. O diâmetro do caule, avaliada aos 90, 150 e 270 DAT, também foi maior nas plantas inoculadas, que não diferiram entre si.



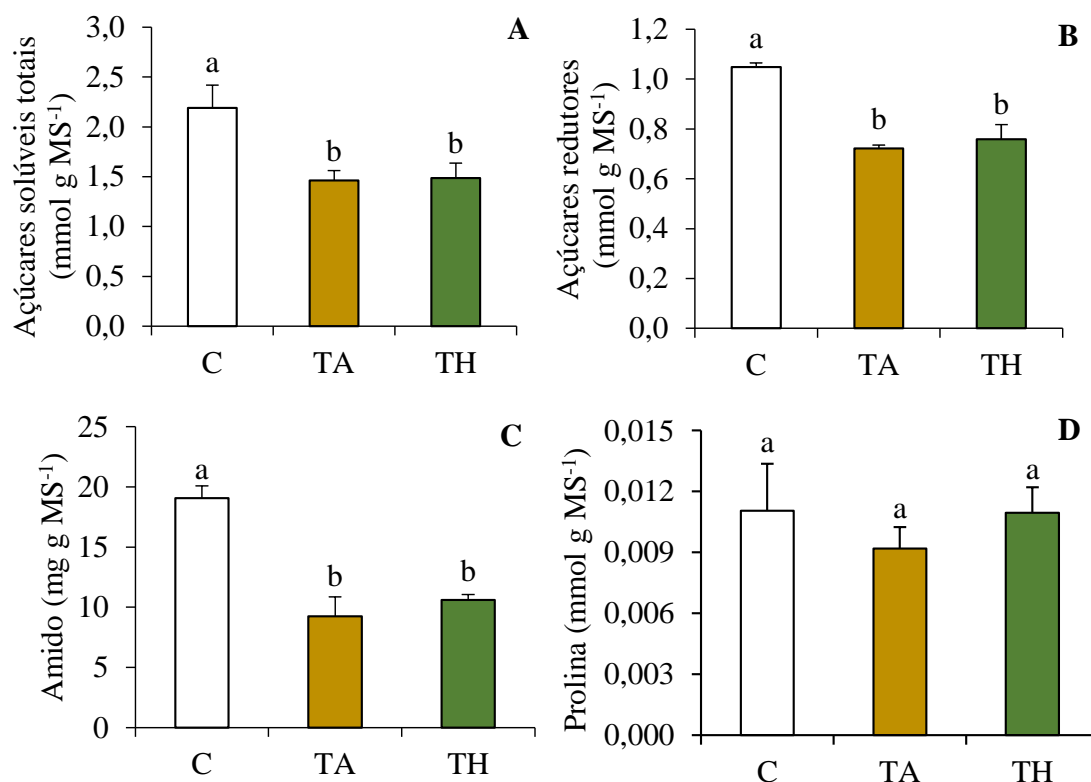
**Figura 1.5.** Número de folhas 90 dias após transplântio (A), altura de plantas (B) e diâmetro do caule (C) de plantas de eucalipto em função dos tratamentos controle (C), e aplicação de *T. asperellum* (TA) e *T. harzianum* (TH).

Os teores de clorofila total e carotenoides foram maiores em plantas inoculadas com TA do que no controle, não se diferenciando de plantas inoculadas com TH, que apresentou valores intermediários, similares tanto ao controle como a TA (Figura 1.6).



**Figura 1.6.** Teores de clorofila total (A) e carotenoides (B) de folhas de eucalipto aos 270 dias após transplântio em função dos tratamentos controle (C), e aplicação de *T. asperellum* (TA) e *T. harzianum* (TH).

Os teores foliares de açúcares solúveis totais, redutores e de amido, avaliados aos 270 DAT, foi menor em plantas inoculadas com TA e TH, em comparação ao controle (Figura 1.7A-C). O teor de prolina não diferiu entre os tratamentos (Figura 1.7D).



**Figura 1.7.** Teores de açúcares solúveis totais (A), açúcares redutores (B), amido (C) e prolina (D) de folhas de eucalipto aos 270 dias após transplântio em função dos tratamentos controle (C) e aplicação de *T. asperellum* (TA) e *T. harzianum* (TH).

### 3.4 DISCUSSÃO

A deficiência hídrica impacta negativamente no crescimento de plantas de *E. urophylla*. No presente estudo, verificou-se menores valores de altura, diâmetro de caule, área foliar e massa seca de parte aérea e raízes (Tabela 1.1), o que já foi relatado por diversos autores para esta cultura (Barros Júnior, 2021; Santos et al., 2021; Soares et al., 2022), e, nesta pesquisa, pode estar relacionado à redução do potencial hídrico (Figura 1.1A), teor relativo de água (Figura 1.1B) e trocas gasosas foliares (Tabela 1.3).

Inoculações com *Trichoderma asperellum* (TA) e *T. harzianum* (TH) não influenciaram significativamente os parâmetros de crescimento de *E. urophylla* cultivadas em vaso (Tabela 1.1), mas em campo, verificou-se maior número de folhas, altura e diâmetro do caule em plantas inoculadas (Figura 1.5), o que evidencia que os resultados benéficos da inoculação são mais evidentes quando avaliados por um maior período e, portanto, dependentes da duração da interação (Segarra et al., 2007). Em geral, o efeito da colonização de endófitos no crescimento das plantas é maior em plantas anuais do que em plantas perenes como o eucalipto (Dastogeer, 2018).

Apesar de não mitigar os efeitos da deficiência hídrica sob o crescimento das plantas, inoculações com TA favoreceram o crescimento, independente do regime hídrico, exibindo massa seca de parte aérea (14,74%) e raízes (20,50%) superiores às plantas controle (Tabela 1.1). Esse aumento da massa seca pode estar relacionado à manutenção do turgor celular, evidenciado pela similaridade dos valores do TRA foliar entre os regimes CD e SD (Figura 1.1B), enquanto nos demais tratamentos houve redução do TRA. Além disso, plantas CD inoculadas com TA exibiram potencial hídrico foliar 10,34 e 5,45% superior às plantas inoculadas com TH e controle (Figura 1.1A), respectivamente.

O aumento do TRA foliar em plantas inoculadas com *T. hamatum*, *T. atroviride* e *T. asperellum* também foi relatado em plantas de cacau e milho (Bae et al., 2009; Guler et al., 2016; Estévez-Geffriaud et al., 2020). Em alguns estudos, plantas inoculadas com *Trichoderma* exibiram maior capacidade de extrair água da rizosfera e maior eficiência do uso da água do que plantas não inoculadas (Guler et al., 2016; Khoshmanzar et al., 2020), o que neste estudo também foi evidenciado pela maior EiUA em plantas inoculadas com TA e TH. Em *Arabidopsis*, a inoculação com *Trichoderma virens* e *Trichoderma atroviride* resultou em menor abertura estomática e redução da perda de água (Contreras-Cornejo et al., 2015). Em plantas de arroz, a inoculação com *T. harzianum* promoveu a regulação de genes que controlam o influxo e saída de água (Pandey et al., 2016), o que contribui para a maior regulação das relações hídricas, resultando em maior eficiência do uso da água.

Sob condição de restrição hídrica, as plantas tendem a fechar parcialmente os estômatos, ocasionando redução na condutância estomática, transpiração e taxa fotossintética (Sharma et al., 2020). Em plantas de eucalipto, a deficiência hídrica reduz a  $g_s$ ,  $E$  e  $A$  (Fernandes et al., 2015; Chen et al., 2020). Neste estudo, inoculações com TA e TH não mitigaram os efeitos da deficiência sobre as trocas gasosas, verificando-se

redução da  $g_s$ , e, conseqüentemente da  $E$  e  $A$ . No entanto, independente do regime hídrico, inoculações com TA e TH promoveram aumento da  $A$  e  $EiUA$ . Plantas de trigo e cana-de-açúcar, inoculadas com diferentes espécies de *Trichoderma* também apresentaram aumento da taxa fotossintética em relação às plantas não inoculadas (Oljira et al., 2020, Scudeletti et al., 2021). A regulação positiva da fotossíntese em função da inoculação com *Trichoderma* está relacionada ao aumento do teor de pigmentos fotossintéticos e da atividade antioxidante que contribui para a manutenção de condições fisiológicas favoráveis para a fotossíntese. Além disso, vários genes e componentes fotossintéticos relacionados à fotossíntese são regulados positivamente por cepas de *Trichoderma* (Harman et al., 2021).

Embora alguns estudos tenham relatado aumento dos teores de pigmentos fotossintéticos em plantas estressadas inoculadas com *Trichoderma* (Mona et al., 2017; Zhang et al., 2019), no presente estudo, em ambiente protegido, as plantas inoculadas com TA e TH não exibiram maior teor de pigmentos fotossintéticos, quando comparado ao controle. Por outro lado, em campo, o teor de clorofila total e carotenoides foi maior em plantas inoculadas com *T. asperellum* (Figura 1.16). O aumento no teor de pigmentos pode ser explicado por alterações moleculares. Genes, proteínas e pigmentos, envolvidos na fotossíntese em uma variedade de culturas, são regulados positivamente, quando colonizadas por cepas de *Trichoderma* (Harman et al., 2021).

Em geral, o acúmulo de osmólitos nas células vegetais resulta em uma diminuição no potencial osmótico celular e, portanto, melhora a absorção de água e a pressão de turgor celular, o que pode ajudar a sustentar processos fisiológicos sob condições de deficiência hídrica (Jogawat, 2019). Neste estudo, plantas submetidas ao regime hídrico CD exibiram aumento dos teores de açúcares solúveis totais e prolina em resposta à deficiência hídrica. Esses osmólitos podem proteger as membranas celulares e proteínas e aumentar a tolerância à desidratação (Shvaleva et al., 2005). A inoculação radicular com *Trichoderma* também resultou em maiores teores de açúcares, proteínas solúveis e prolina em plantas de tomate e pepino (Ghorbanpour et al., 2018; Mona et al., 2017; Zhang et al., 2019).

Sob regime hídrico CD, a redução no teor de amido (Figura 2B), acompanhada pelo aumento no teor de açúcares solúveis (Tabela 1.12), em plantas inoculadas com TA e TH, pode contribuir para o ajustamento osmótico e fornecimento de energia e carbono em momentos em que a fotossíntese é potencialmente limitada (Thalman e Santelia, 2017). Inoculações com TA e TH também promoveram aumento nos teores de

aminoácidos totais. Resultados similares foram observados em plantas de cacau inoculadas com *T. asperellum* (Tchameni et al., 2011) e em plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* cepa T02 (Meneses et al., 2022). O acúmulo de aminoácidos pode contribuir para o ajustamento osmótico, regulação do transporte de íons, além de afetar a síntese proteica, a expressão gênica e a homeostase redox (Rai et al., 2002).

Em condições de campo, os menores teores de açúcares solúveis totais, redutores e de amido em plantas inoculadas podem ser atribuídos à maior demanda por carboidratos para sustentar o crescimento das plantas, que também foi maior nessas plantas.

A deficiência hídrica limita o crescimento das plantas, principalmente por prejudicar a fisiologia/bioquímica celular por meio da promoção do estresse oxidativo (Gillet al., 2015). Nessa condição, o equilíbrio entre a produção de EROs e a atividade de extinção do sistema antioxidante é determinante para a tolerância à deficiência hídrica e manutenção do crescimento. Neste estudo, plantas submetidas ao regime hídrico CD apresentaram maior peroxidação lipídica (expressa em teor de TBARS) (Tabela 1.4) e teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em comparação com as plantas SD (Figura 1.3). No entanto, sob condições de deficiência hídrica, a inoculação com TA e TH favoreceu o aumento da atividade antioxidante mediada pela SOD e pela GPX sob inoculação com TA. A SOD protege as células contra possíveis danos causados pelo oxigênio singlete ao catalisar sua conversão em O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gill et al., 2015), já a GPX atua na remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> convertendo em H<sub>2</sub>O (Das e Roychoudhury, 2014).

No geral, a atividade das enzimas SOD e GPX, nas plantas submetidas ao regime hídrico CD, foi maior sob inoculação com TA. A ativação do sistema antioxidante tem sido relatada como um mecanismo geral, ativado por diferentes cepas de *T. asperelloides* e *T. harzianum*, para aumentar a tolerância à salinidade e à deficiência hídrica em plantas de *Arabidopsis*, pepino e tomate (Mastouri et al, 2012, Brotman et al., 2013).

As respostas diferenciais promovidas por TA e TH em plantas de eucalipto cultivadas em vaso e a campo podem ser atribuídas aos mecanismos de ação desses microrganismos, por serem específicos e variáveis, conforme as condições ambientais e a duração entre o período de inoculação e a avaliação (Hoyos-Carvajal et al., 2009; Stewart e Hill, 2014). Além disso, as condições ambientais influenciam a capacidade desses microrganismos de se desenvolverem na rizosfera e colonizarem a planta.

### 3.5 CONCLUSÕES

O crescimento de plantas de *Eucalyptus urophylla* em ambiente protegido foi menor sob restrição hídrica, associado ao menor potencial hídrico foliar, teor relativo de água na folha e trocas gasosas. Independente do regime hídrico, inoculações com *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma harzianum* proporcionaram maior atividade fotossintética, eficiência do uso da água e teores de açúcares solúveis e aminoácidos, no entanto, essas alterações não foram suficientes para mitigar os efeitos da deficiência hídrica sobre o crescimento de plantas de eucalipto. Em condições de campo, o número de folhas, altura de plantas e diâmetro do caule foram maiores e os teores de açúcares redutores e solúveis e de amido menores, sob inoculação com *T. asperellum* e *T. harzianum*.

Este estudo fornece evidências da contribuição de *T. asperellum* e *T. harzianum* para promoção do crescimento de plantas de eucalipto em condições de campo e tolerância das plantas de eucalipto à deficiência hídrica em ambiente protegido. Para melhor avaliação das contribuições da inoculação com *Trichoderma* sp. na mitigação da deficiência hídrica estudos futuros devem envolver o uso de ambientes controlados e determinação da taxa de colonização radicular.

### 3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, G.B., NOVAES, Q.S., AZEVEDO, G.D.O., SILVA, H.F., ROCHA SOBRINHO, G.G., NOVAES, A.B., 2017. Effect of *Trichoderma* spp. on *Eucalyptus camaldulensis* clonal seedlings growth. *Scientia Forestalis*, vol. 45, no. 114, pp. 343-352, 2017. <https://doi.org/10.18671/scifor.v45n114.10>

BAE, H., SICHER, R.C., KIM, M.S., KIM, S-H., STREM, M.D., MELNICK, R.L., BAILEY, B.A. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, vol. 60, no. 11, pp. 3279-3295, 2009. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp165>

BANDEIRA, J.B., RODRIGUES, J.N., DE OLIVEIRA, R.S., PINTO, I.O., CHAGAS-JÚNIOR, A F., NASCIMENTO, V.L., MORAES, C.B., SARMENTO, R.A. Endophytic colonization of five *Trichoderma* species and their effects on growth of a eucalyptus hybrid. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 54, pp. 3113-3125, 2023. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01112-0>

BARROS JÚNIOR, U.O., LIMA, M.D., ALSAHLI, A.A., LOBATO, A.K. Unraveling the roles of brassinosteroids in alleviating drought stress in young *Eucalyptus urophylla* plants: Implications on redox homeostasis and photosynthetic apparatus. *Physiologia Plantarum*, vol. 172, n. 2, pp. 748-761, 2021. <https://doi.org/10.1111/ppl.13291>

BATES, L.S., WALDREN, R.P., TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, vol. 39, pp. 205-207, 1973. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>

BEAUCHAMP, C., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, vol. 44, pp. 276-287, 1971. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 20, de 21 de julho de 1999. Oficializa os métodos analíticos físicoquímicos, para controle de produtos cárneos e seus ingredientes – sal e salmoura. Diário oficial da União. Brasília, DF, 27 jul. 1999.

BROTMAN, Y., LANDAU, U., CUADROS-INOSTROZA, Á., TAKAYUKI, T., FERNIE, A.R., CHET, I., VITERBO, A., WILLMITZER, L. Trichoderma-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathogens*, vol. 9, no. 3, e1003221, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003221>

BURGUIERES, E.; PATRICK MCCUE, P.; KWON, Y-I.; SHETTY, K. Effect of vitamin C and folic acid on seed vigour response and phenolic-linked antioxidant activity. *Bioresource Technology*, vol. 98, no. 7, pp. 1393-1404, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.046>

CHEN, X., ZHAO, P., OUYANG, L., ZHU, L., NI, G., SCHÄFER, K.V.R. Whole-plant water hydraulic integrity to predict drought-induced *Eucalyptus urophylla* mortality under drought stress. *Forest Ecology and Management*, vol. 46, no. 118179, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118179>

CONTRERAS-CORNEJO, H.A., MACÍAS-RODRÍGUEZ, L., VERGARA, A.G., LÓPEZ-BUCIO, J. Trichoderma modulates stomatal aperture and leaf transpiration through an abscisic acid-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Growth Regulation*, vol. 34, pp. 425-432, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00344-014-9471-8>

DAS, K., ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, vol. 2, no. 53, 2014. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>

DASTOGEER, K.M. Influence of fungal endophytes on plant physiology is more pronounced under stress than well-watered conditions: a meta-analysis. *Planta*, vol. 248, pp. 1403-1416, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2982-y>

ESTÉVEZ-GEFFRIAUD, V., VICENTE, R., VERGARA-DÍAZ, O., NARVÁEZ REINALDO, J.J.N., TRILLAS, M.I. Application of *Trichoderma asperellum* T34 on maize (*Zea mays*) seeds against drought stress. *Planta*, vol. 252, no. 8, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03404-3>

FERNANDES, E.T., CAIRO, P.A.R., NOVAES, A.B. Respostas fisiológicas de clones de eucalipto cultivados em casa de vegetação sob deficiência hídrica. *Ciência Rural*, vol. 45, no. 1, pp. 29-34, 2015. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622008000400006>

FERREIRA, D.F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. *Ciência e Agrotecnologia*, vol. 35, no. 6, pp. 1039-1042, 2011. <https://doi.org/10.1590/s1413-70542011000600001>

GHORBANPOUR, A., SALIMI, A., GHANBARY, M.A.T., PIRDASHTI, H., DEHESTANI, A. The effect of *Trichoderma harzianum* in mitigating low temperature stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Science Horticulture*, vol. 230, pp. 134-141, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.11.028>

GILL, S.S., ANJUM, N.A., GILL, R., YADAV, S., HASANUZZAMAN, M., FUJITA, M., MISHRA, P., SABAT, S.C., TUTEJA, N. Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 22, pp. 10375-10394, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4532-5>

GOMES, M.E., SOUZA, L.S., ANJOS, L.V.S., ANTONIO, G.L., FURTADO, P.O., SOUZA, V.H.M., BERGAMINI-LOPES, M.P., PASCHOLATI, S.F., FIRMINO, A.C. Management of *Ralstonia solanacearum* in eucalyptus seedlings: initial studies with *Trichoderma harzianum* and *Purpureocillium lilacinum*. *Scientia Forestalis*, vol. 51, e3916, 2023. <https://doi.org/10.18671/scifor.v50.48>

GULER, N.S., PEHLIVAN, N., KARAOGLU, S.A., GUZEL, S., BOZDEVECİ, A. *Trichoderma atroviride* ID20G inoculation ameliorates drought stress-induced damages by improving antioxidant defence in maize seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 38, no. 132, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2153-3>

HAMMER, Ø., HARPER, D.A., RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, vol. 4, no. 1, 9, 2001. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm).

HARMAN, G.E., DONI, F., KHADKA, R.B., UPHOFF, N. Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants' photosynthetic capability. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 130, no. 2, pp. 529-546, 2021. <https://doi.org/10.1111/jam.14368>

HEATH, R.L., PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 125, pp. 189-198, 1968. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)

HISCOX, J.D., ISRAELSTAM, G.F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, vol. 57, no. 12, pp. 1332-1334, 1979. <https://doi.org/10.1139/b79-163>

HOYOS-CARVAJAL, L., ORDUZ, S., BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control*, vol. 51, no. 3, pp. 409-416, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.07.018>

ILLESCAS, M., PEDRERO-MÉNDEZ, A., PITORINI-BOVOLINI, M., HERMOSA, R., MONTE, E. Phytohormone production profiles in trichoderma species and their relationship to wheat plant responses to water stress. *Pathogens*, vol. 8, 991, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080991>

JOGAWAT, A. Osmolytes and their role in abiotic stress tolerance in plants. In: Tripathi, D.K., Roychoudhury, A. (Eds). *Molecular plant abiotic stress: biology and biotechnology*. John Wiley & Sons, New Jersey, pp. 91-104, 2019.

JUNGLEE, S., URBAN, L., SALLANON, H., LOPEZ-LAURI, F. Optimized assay for hydrogen peroxide determination in plant tissue using potassium iodide. *American Journal of Analytical Chemistry*, vol. 5, pp. 730-736, 2014. <https://doi.org/10.4236/ajac.2014.511081>

KHOSHMANZAR, E., ALIASGHARZAD, N., NEYSHABOURI, M.R., KHOSHROU, B., ARZANLOU, M., LAJAYER, B.A. Effects of *Trichoderma* isolates on tomato growth and inducing its tolerance to water-deficit stress. *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 17, pp. 869-878, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02405-4>

MACIEL, C.G., LAZAROTTO, M., MEZZOMO, R., POLETO, I., MUNIZ, M.F.B., LIPPERT, D.B. *Trichoderma* spp. no biocontrole de *Cylindrocladium candelabrum* em mudas de Eucalyptus saligna. *Revista Árvore*, vol. 36, no. 5, pp. 825-832, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622012000500004>

MASTOURI, F., BJORKMAN, T., HARMAN, G.E. *Trichoderma harzianum* enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 25, pp. 1264-1271, 2012. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-11-0240>

MENESES, F.J.R., LOPES, Á.L.O., SETUBAL, I.S., COSTA NETO, V.P., BONIFÁCIO, A. Inoculation of *Trichoderma asperelloides* ameliorates aluminum stress-induced damages by improving growth, photosynthetic pigments and organic solutes in maize. *3 Biotech*, vol. 12, no. 246, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03310-3>

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, vol. 31, no. 426, 1959. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

MONA, S.A., HASHEM, A., ABD\_ALLAH, E.F., ALQARAWI, A.A., SOLIMAN, D.W.K., STEPHAN WIRTH, S., EGAMBERDIEVA, D. Increased resistance of drought by *Trichoderma harzianum* fungal treatment correlates with increased secondary metabolites and proline content. *Journal of Integrative Agriculture*, vol. 16, no. 8, pp. 1751-1757, 2017. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61695-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61695-2)

OLJIRA, A.M., HUSSAIN, T., WAGHMODE, T.R., ZHAO, H., SUN, H., LIU, X., WANG, X., LIU, B. *Trichoderma* enhances net photosynthesis, water use efficiency, and growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt stress. *Microorganisms*, vol. 8, no. 10, 1565, 2020. <https://10.3390/microorganisms8101565>

PANDEY, V., ANSARI, M.W., TULA, S., YADAV, S., SAHOO, R.K., SHUKLA, N., BAINS, G., BADAL, S., CHANDRA, S., GAUR, A.K., KUMAR, A., SHUKLA, A., KUMAR, J., TUTEJA, N. Dose-dependent response of *Trichoderma harzianum* in improving drought tolerance in rice genotypes. *Planta*, vol. 243, pp. 1251-1264, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2482-x>

RAI, V. Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biologia Plantarum*, vol. 45, pp. 481-487, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1022308229759>

SANTOS, E.F., MATEUS, N.S., ROSÁRIO, M.O., GARCEZ, T.B., MAZZAFERA, P., LAVRES, J. Enhancing potassium content in leaves and stems improves drought tolerance of eucalyptus clones. *Physiologia Plantarum*, vol. 172, no. 2, pp. 552-563, 2021. <https://doi.org/10.1111/ppl.13228>

SCHOLANDER, P.F.; BRADSTERRET, E.D.; HEMMINGSEN, E.A.; HAMMEL, H.T. Sap pressure in vascular plants. *Science*, vol. 148, no. 3668, pp. 339-346, 1965.

SCUDELETTI, D., CRUSCIOL, C.A.C., BOSSOLANI, J.W., MORETTI, L.G., MOMESSO, L., SERVAZ TUBANA, B., CASTRO, S.G.Q., OLIVEIRA, E.F., HUNGRIA, M. *Trichoderma asperellum* inoculation as a tool for attenuating drought stress in sugarcane. *Frontiers in Plant Science*, vol. 12, 570, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.645542>

SEGARRA, G., CASANOVA, E., BELLIDO, D., ODENA, M.A., OLIVEIRA, E., TRILLAS, I. Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics*, vol. 7, no. 21, pp. 3943-3952, 2007.

SHARMA, A., KUMAR, V., SHAHZAD, B., RAMAKRISHNAN, M., SIDHU, G.P.S., BALI, A.S., HANDA, N., KAPOOR, D., YADAV, P., KHANNA, K., BAKSHI, B., REHMAN, A., KOHLI, S.K., KHAN, E.A., PARIHAR, R.D., YUAN, H., THUKRAL, A.K., BHARDWAJ, R., ZHENG, B. Photosynthetic response of plants under different abiotic stresses: a review. *Journal of Plant Growth Regulation*, vol. 39, no. 2, pp. 509-531, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-10018-x>

SHUKLA, N., AWASTHI, R.P., RAWAT, L., KUMAR, J. Biochemical and physiological responses of rice (*Oryza sativa* L.) as influenced by *Trichoderma harzianum* under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 54, pp. 78-88, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.02.001>

SHVALEVA, A.L., SILVA, F.C.E., BREIA, E., JOUVE, J., HAUSMAN, J.F., ALMEIDA, M.H., MARROCOS, J.P., RODRIGUES, M.L., PEREIRA, J.S., CHAVES, M.M. Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. *Tree Physiology*, vol. 26, no. 2, pp. 239-248, 2006. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.2.239>

SINGH, P., SINGH, R., MADHU, G.S., SINGH, V.P. Seed Biopriming with *Trichoderma harzianum* for growth promotion and drought tolerance in rice (*Oryza sativa*). *Agricultural Research*, vol. 12, pp. 154-162, 2023. <https://doi.org/10.1007/s40003-022-00641-8>

SOARES, P.P.S., CAIRO, P.A.R., DA SILVA, L.D., MATSUMOTO, S.N., DO BONFIM, R.A.A., BARBOSA, M.P., SÁ, M.C., ALMEIDA, M.F., MESQUITA, N.L.S. Mitigating water stress by increasing NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ratio in young *Eucalyptus urophylla* plants. *Trees*, vol. 36, pp. 81-91, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02183-y>

STEWART, A., HILL, R. Applications of trichoderma in plant growth promotion. In: GUPTA, V.G., SCHMOLL, M., HERRERA-ESTRELLA, A., UPADHYAY, R.S., DRUZHININA, I., TUOHY, M. (Eds.). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier, pp. 415-428, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00031-X>

THALMANN, M., SANTELIA, D. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytologist*, vol. 214, pp. 943-951, 2017. <https://doi.org/10.1111/nph.1449>

TUPINAMBÁ-SIMÕES, F., BRAVO, F., GUERRA-HERNÁNDEZ, J., PASCUAL, A. Assessment of drought effects on survival and growth dynamics in eucalypt commercial forestry using remote sensing photogrammetry. A showcase in Mato Grosso, Brazil. *Forest Ecology and Management*, vol. 505, no. 1, 119930, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119930>

WEATHERLEY, P.E. Studies in the water relations of the cotton plant: the field measurements of water deficits in leaves. *New Phytologist*, vol. 49, pp. 81-97, 1950. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1950.tb05146.x>

WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, vol. 144, pp. 307-314, 1994.

YEMM, E.W., WILLIS, A. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*, vol. 57, no. 3, pp. 508-514, 1954. <https://doi.org/10.1042/bj0570508>

YEMM, E.W., COCCKING, E.C. The determination of amino acid with ninhydrin. *Analyst*, vol. 80, pp. 209-213, 1955. <https://doi.org/10.1039/AN9558000209>

YU, C.; JIANG, X.; XU, H.; DING, G. *Trichoderma longibrachiatum* inoculation improves drought resistance and growth of *Pinus massoniana* seedlings through regulating physiological responses and soil microbial community. *Journal of Fungi*, vol. 9, no. 7, 694, 2023.

ZHANG, F., WANG, Y., LIU, C., CHEN, F., GE, H., TIAN, F., YANG, T., MA, K., ZHANG, Y. *Trichoderma harzianum* mitigates salt stress in cucumber via multiple responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 170, pp. 436-445, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.084>

**ARTIGO II**

Biologia da infecção por *Teratosphaeria epicoccoides* em eucalipto\*

---

**Situação:** não submetido

## 4 Biologia da infecção por *Teratosphaeria epicoccoides* em eucalipto

### RESUMO

Dentre as doenças foliares do eucalipto no Brasil, aquelas causadas por espécies de *Teratosphaeria* são de particular interesse devido à desfolha que ocasionam. Apesar das espécies que ocorrem no Brasil serem patógenos levemente agressivos, quando os níveis de inóculo são elevados e os povoamentos florestais são mal geridos, a doença pode afetar o crescimento das árvores. Sintomas típicos da mancha foliar de *Teratosphaeria* foram observados em novembro de 2022 em plantios jovens de eucalipto e posteriormente em árvores adultas de eucalipto no município de Montezuma – MG. Dessa forma, o estudo foi conduzido com o objetivo de identificar o patógeno associado à doença e caracterizar o processo de infecção. Amostras foliares obtidas de plantios de eucalipto com sintomas típicos da mancha foliar de *Teratosphaeria* foram coletadas. O patógeno foi isolado em meio de cultura, caracterizado morfológicamente, e a porcentagem de germinação e comprimento do tubo germinativo foram determinados em água destilada e soluções de extrato de malte, suco de tomate temperado e dextrose. O patógeno foi inoculado em plantas de eucalipto e amostras foliares foram coletadas para avaliações histoquímicas. Folhas sintomáticas, coletadas em campo, foram armazenadas e utilizadas para avaliação da sobrevivência do patógeno em diferentes períodos. Sintomas típicos da infecção por *Teratosphaeria epicoccoides* foram observados 30 dias após inoculação em mudas de eucalipto, caracterizados pela ocorrência de lesões angulares restritas às folhas basais das plantas. Os conídios infectam as plantas através do poro estomático. As hifas colonizam os espaços intercelulares, ocasionando desestruturação do mesofilo e reatividade de células do parênquima paliádico. As colônias possuem crescimento lento com diâmetro médio de 15 mm após 30 dias de crescimento. A germinação de conídios é maior em solução de dextrose e a esporulação ocorre tanto em meio suco de tomate temperado como em batata dextrose ágar. Em folhas armazenadas, o patógeno sobrevive por até nove meses após armazenamento.

**Palavras-chave:** histoquímica, mancha foliar, *Phaeophleospora epicoccoides*, patogenicidade, sintomatologia.

### 4.1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Eucalyptus* destacam-se entre as espécies florestais utilizadas para reflorestamento, devido à sua alta produtividade, crescimento rápido e capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais. No Brasil, o eucalipto responde por grande parte do sucesso da atividade florestal, sobretudo nos setores ligados à produção de papel, celulose e madeira. No entanto, a maioria das plantações é estabelecida em regiões com condições edafoclimáticas limitantes (Gonçalves et al. 2013), o que torna as plantas mais suscetíveis à infecção por patógenos.

Dentre as doenças foliares do eucalipto, aquelas causadas por espécies de *Teratosphaeria* são de particular interesse, devido à intensa desfolha que pode afetar o crescimento das árvores (Alfenas et al. 2009). Várias espécies, que atualmente estão acomodadas em *Teratosphaeria* (= *Kirramyces*), pertenciam anteriormente, ao gênero anamorfo *Phaeophleospora* (Andjic et al. 2007; Crous et al. 2007).

No Brasil, cerca de nove espécies foram relatadas, associadas à mancha foliar de *Teratosphaeria* (Mafia e Alfenas 2003; Alfenas et al. 2009; Crous et al. 2006; Pérez et al. 2009; Candido et al. 2014). Dessas espécies, *T. epicoccoides* (= *Phaeophleospora epicoccoides*) é amplamente distribuída nas regiões onde o eucalipto é cultivado. Apesar de ser considerado um patógeno levemente agressivo, quando os níveis de inóculo são elevados e os povoamentos florestais são mal geridos, o patógeno pode causar danos graves, resultando na desfolha e morte de árvores (Carnegie 2007; Knipscheer et al. 1990).

Sintomas típicos da mancha foliar de *T. epicoccoides*, caracterizados por lesões angulares com bordas marrons arroxeadas e visualização de cirros conidiais exsudados, a partir de picnídios na face inferior das folhas (Mafia e Alfenas 2003), foram observados em povoamentos jovens de eucalipto na cidade de Montezuma – MG e, posteriormente, em árvores adultas, acompanhado de intensa desfolha de folhas basais. Em geral, os cultivos de eucalipto nessa região são mal manejados e sujeitos ao estresse hídrico e nutricional, o que torna as plantas suscetíveis à infecção e pode resultar em atraso no desenvolvimento das plantas. Dessa forma, o estudo foi conduzido com o objetivo de identificar o patógeno associado à doença e caracterizar o processo de infecção.

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1 Ocorrência da doença e isolamento do patógeno**

Inicialmente a doença foi observada em plantio de eucalipto em fase inicial de implementação (90 dias após plantio), no município de Montezuma – MG. Posteriormente, realizou-se coleta de mudas com sintomas similares em viveiro na cidade de Vitória da Conquista – BA. Em ambos os casos os sintomas e sinais da doença foram similares. As folhas foram levadas ao Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), acondicionadas sob câmara úmida por 24h. Após esse período, o fungo foi isolado diretamente a partir da massa de conídio exsudada dos picnídios, que foi adicionada com auxílio de agulha estéril em

placa contendo meio BDA 50% e, posteriormente, repicada para obtenção de cultura pura. Foram obtidos dois isolados, denominados de isolados MTZ e VCA.

Áreas de cultivo de eucalipto localizadas na cidade de Montezuma-MG foram inspecionadas para verificação da ocorrência da doença em campo, sendo coletadas folhas sintomáticas para confirmação da identidade do agente causal em laboratório.

#### **4.2.2 Esporulação *in vitro* e caracterização morfológica**

Para obtenção de esporulação, os isolados foram repicados do meio BDA para BDA e STT, mantidos em escuro por 20 dias e, posteriormente, expostos à luz branca por 72 horas. Lâminas foram preparadas, retirando-se a massa cinza formada nas colônias, para observação dos conídios em microscópio.

Para cada isolado, foram realizadas medições de comprimento e largura de 30 conídios. O diâmetro das colônias foi determinado nos meios BDA e STT, após 30 dias de crescimento; e as medições foram realizadas em dois eixos perpendiculares entre si. Picnídios foram coletados diretamente das lesões na superfície abaxial das folhas e o diâmetro de 15 estruturas foi determinado.

#### **4.2.3 Inoculação em mudas**

Uma solução de conídios foi obtida a partir de quatro colônias cultivadas em meio STT por 30 dias e água estéril. A concentração foi ajustada para  $6 \times 10^5$  conídios/mL com um hemacitômetro do tipo Neubauer e adicionado tween 20 (0,01%). Plantas jovens de eucalipto (*E. urophylla*, clone AEC-144), com cerca de 100 dias de idade, foram utilizadas para realização do teste de patogenicidade. Aplicou-se apenas água em três plantas mantidas como controle e em outras seis foi aplicada a solução de conídios. As plantas foram mantidas por 48 horas, cobertas com sacos plásticos para manutenção de elevada umidade e avaliadas semanalmente quanto ao aparecimento dos sintomas.

Com o objetivo de caracterizar o processo de infecção em diferentes clones e espécies de eucalipto, foram inoculadas 27 mudas dos clones AEC 144 (*E. urophylla*), AEC 2034 ((*E. camaldulensis*  $\times$  *E. grandis*)  $\times$  *E. urophylla*), AEC 2111 (*E. urophylla*  $\times$  (*E. camaldulensis*  $\times$  *E. grandis*)), 12 de *Corymbia citriodora* e 6 de *E. cloeziana* (Fig 3A – a, b) e mantidas sob cobertura plástica por 48 horas (Fig 3A- c). No entanto, devido a altas temperaturas (superiores a 30 °C) observadas no período, não houve infecção.

#### **4.2.4 Histoquímica**

Após o aparecimento dos sintomas, amostras foliares foram coletadas de plantas controle e infectadas. Segmentos foliares foram coletados e fixados em solução Karnovsky (Karnovsky 1965) por 24 h, a 6 °C. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água destilada, parcialmente desidratadas em série etílica progressiva até etanol 95% e incluídas em resina glicol-metacrilato (Historesin® Leica). Cortes transversais foram obtidos com auxílio de micrótomo rotativo (Leitz, 1212), regulado para 3 µm. Os cortes foram corados com azul de toluidina (0,025% em tampão McIlvaine, pH 4,0) (O'Brien et al. 1964; Ribeiro e Leitão 2020) e analisados em um microscópio de luz (DM750) equipado com sistema de captura de imagens digitais (Leica Microsystems, ICC50HD).

#### **4.2.5 Germinação de conídios em meio líquido**

Uma solução de conídios foi obtida a partir da adição de conídios obtidos em meio de cultura STT a 5 mL de água estéril. A germinação e o comprimento do tubo germinativo de conídios foram avaliados em meio líquido, constituído por: água destilada, soluções de extrato de malte 20 mg mL<sup>-1</sup> (EM), suco de tomate temperado a 2% (STT) e dextrose a 20 mg mL<sup>-1</sup> (DEX). A solução de suco de tomate temperado foi preparada pela diluição do suco integral em água destilada. Após preparo, todos os meios foram levados à autoclave a 121 °C, por 30 minutos. Para cada solução, foram utilizados 10 microtubos, preenchidos com 500 µL da solução meio + 50 µL da solução de conídios. Após 36 e 60 horas, foram retirados com auxílio de pipeta 20 µL de cada solução e adicionados em lâminas transparentes para determinação da germinação e comprimento dos tubos germinativos em microscópio. Dados de germinação de conídios e comprimento do tubo germinativo foram submetidos a análise de variância e teste de comparação de médias Tukey, utilizando o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

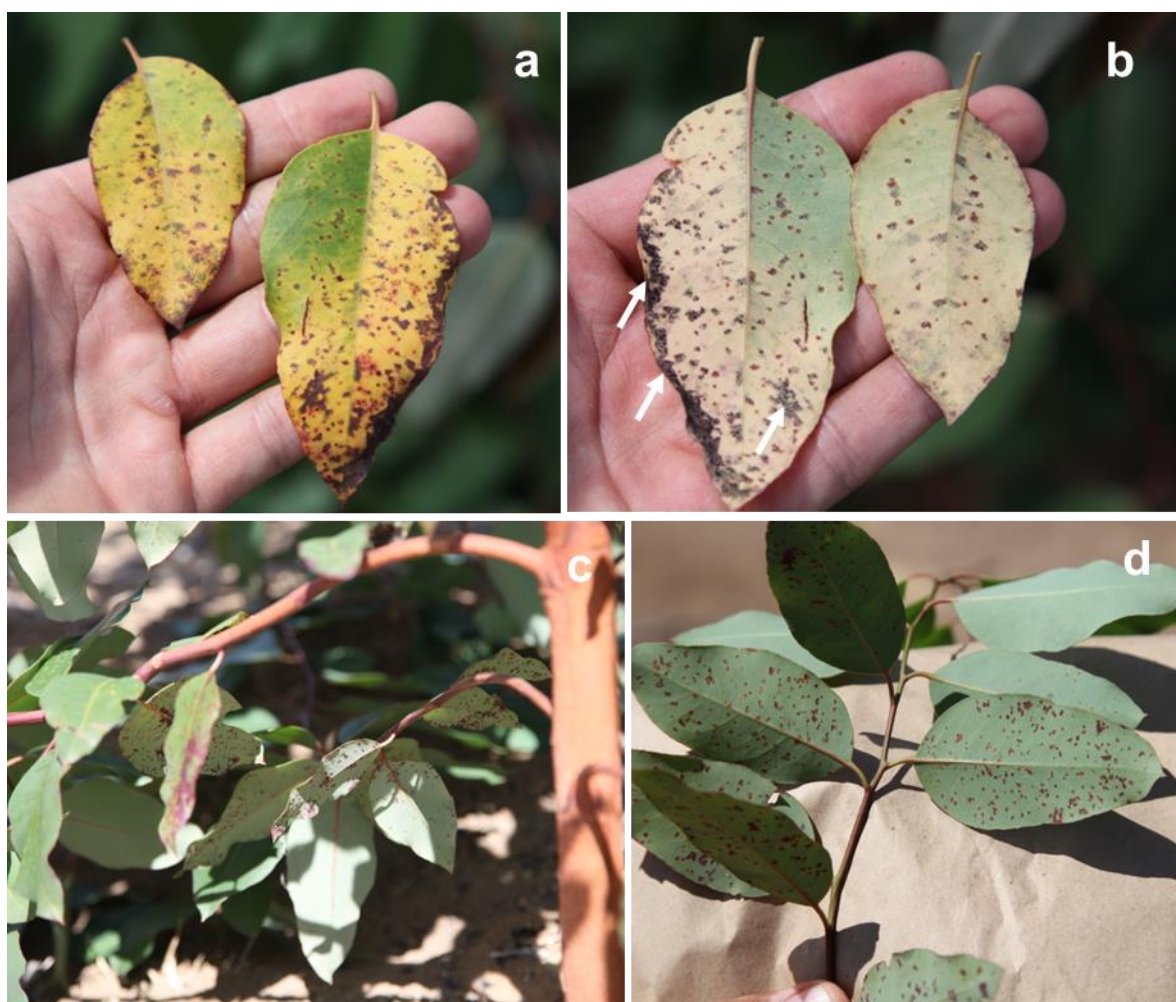
#### **4.2.6 Sobrevivência do fungo em folhas armazenadas**

Folhas infectadas, coletadas a campo em abril de 2023, foram armazenadas em sacos de papel e, após 3, 6 e 9 meses, condicionadas em câmara úmida para avaliação quanto à sobrevivência do patógeno (Fig 4A). Em cada período, 5 folhas foram raspadas com espátula estéril e limpas com algodão umedecido com álcool 70% para retirada de contaminantes ou esporos presentes nas folhas, sendo posteriormente acondicionadas

em placas de petri estéril, contendo algodão umedecido em água destilada e, após 72-96 horas, avaliadas quanto à presença de estruturas viáveis do fungo.

### 4.3 RESULTADOS

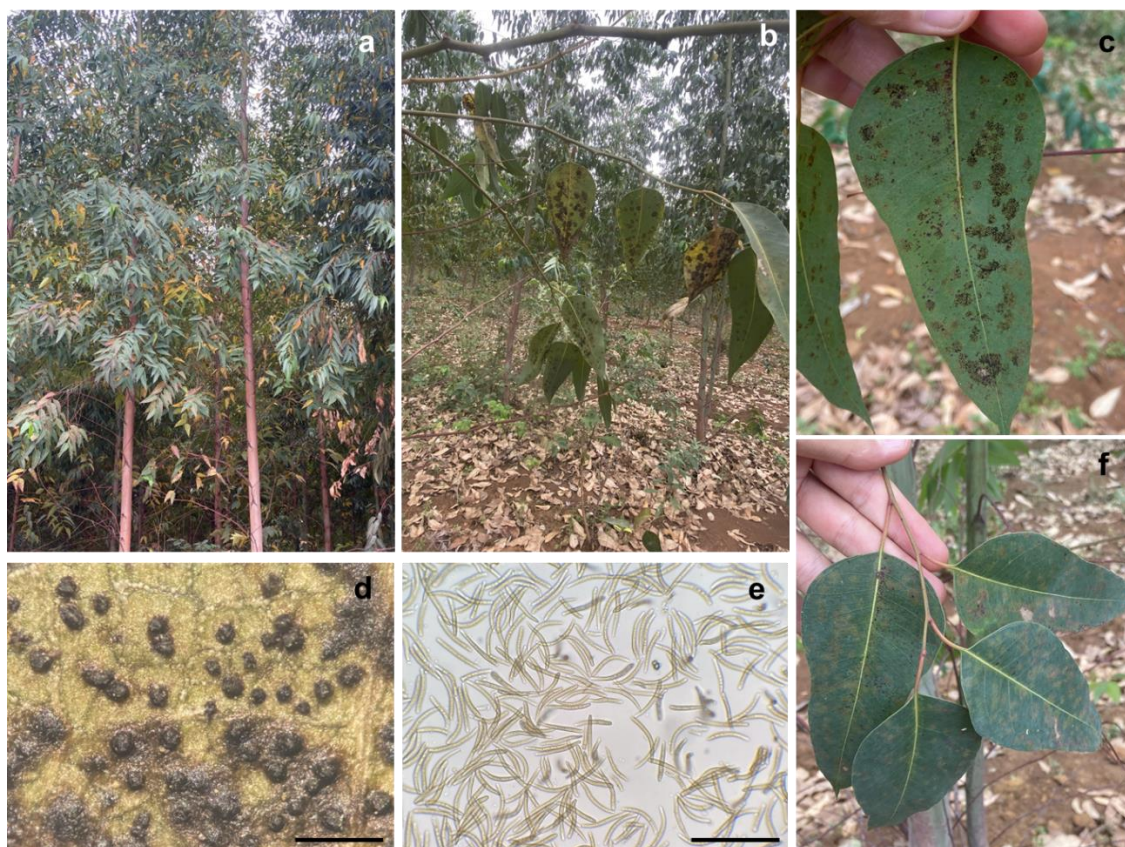
A doença foi observada inicialmente em áreas de cultivo, em fases iniciais de implementação (90 a 270 dias) (Fig 2.1). Os sintomas da doença são lesões angulares com alo arroxeadado nas folhas basais, sendo possível observar sinais do fungo na face abaxial das folhas (Fig 2.1a-b). Posteriormente, a doença foi observada e em árvores com dois anos de idade (Fig 2.2). Dois isolados foram obtidos por isolamento direto a partir de folhas infectadas, coletadas na cidade de Montezuma – MG (isolado MTZ), e em Vitória da Conquista - BA (isolado VCA).



**Fig 2.1** Sintomas e sinais de *Teratosphaeria epicoccoides* em plantas de eucalipto clone AEC 144 (*E. urophylla*) com 90 (a, b) e 270 dias de idade (c, d). Sintomas na superfície

adaxial (a) das folhas, sintomas na superfície abaxial (b, c e d) e sinais do fungo indicado por setas (b)

Em *E. urophylla*, as lesões causadas pelo patógeno são angulares. Na face abaxial das folhas, ocorre a extrusão de cirros conidiais (Fig 2.3a) a partir de picnídios. Em plantio de eucalipto clone AEC-2034 (*E. camaldulensis* × *E. grandis*) × *E. urophylla*, com cerca de 2 anos de idade, o patógeno foi encontrado em folhas, formando colônias na face inferior, amarelecimento e intensa desfolha (Fig 2.2a-c). Os sinais do fungo (colônias do fungo), observados na superfície abaxial, possuem aspecto circular e coloração enegrecida. Embora esses sinais apresentem uma certa diferença dos observados em mudas e plantas jovens de *E. urophylla*, as estruturas do patógeno apresentaram características similares.

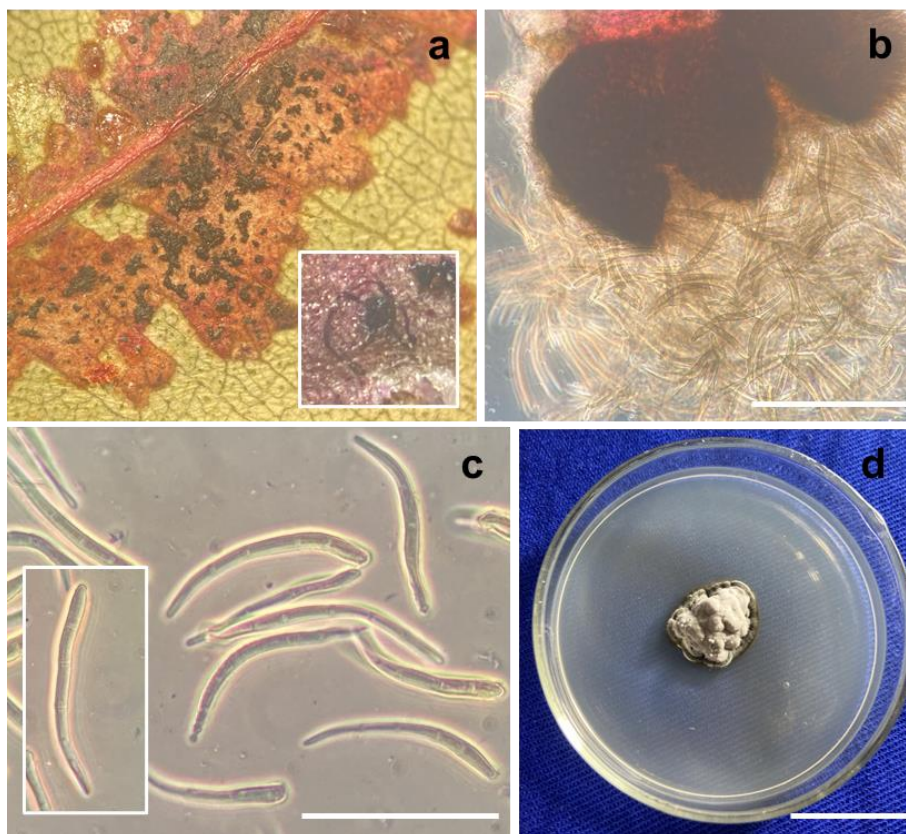


**Fig 2.2** Sintomas e sinais de *Teratosphaeria epicoccoides* em árvores de eucalipto clone AEC-2034 (*E. camaldulensis* × *E. grandis*) × *E. urophylla*) com dois anos (a e b). Sinais do fungo na superfície abaxial (c) e sintomas na superfície adaxial (f), picnídios (d) e conídios (e). Escala: 10 mm (d) e 100 µm (e)

Os isolados obtidos a partir de plantas infectadas na cidade de Montezuma (isolado MTZ) e Vitória da Conquista (isolado VCA) apresentaram características morfológicas similares, tanto *in vitro* como *in vivo*. Os conídios eram hialinos a marrom-claros, levemente curvados (Fig 2.3b-c). O isolado VCA possui dimensões de (36-61)  $50 \times 3,5$  (3,5-4)  $\mu\text{m}$  e o isolado MTZ (38-62)  $54 \times 5$  (4-5)  $\mu\text{m}$ , ambos com 4 (1-6) septos em sua maioria (Tabela 2.1). Os picnídios possuem dimensão média de  $163 \times 150 \mu\text{m}$ . As colônias apresentam crescimento lento e dimensões médias de 8 a 15 mm após 30 dias de crescimento em meio STT e BDA, respectivamente.

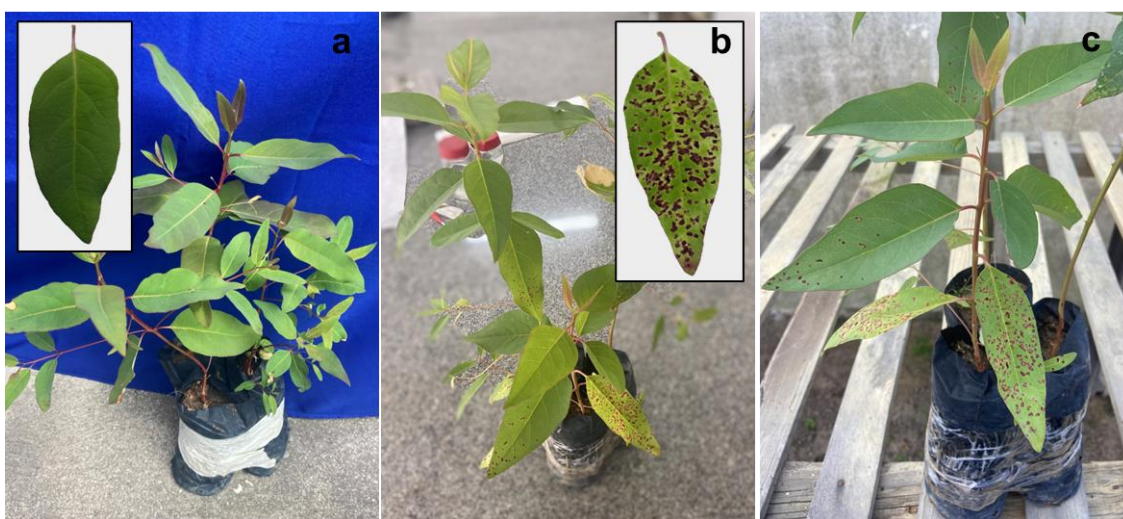
**Tabela 2.1.** Valores médios de comprimento, largura e número de septos de conídios e diâmetro da colônia em meio batata dextrose ágar de isolados de *Teratosphaeria epicoccoides*

Isolados	Conídios			Diâmetro médio da colônia (mm)
	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Largura ( $\mu\text{m}$ )	Número de septos	
MTZ	54	5	4 (1-6)	14
VCA	50	3,5	4 (4-5)	12



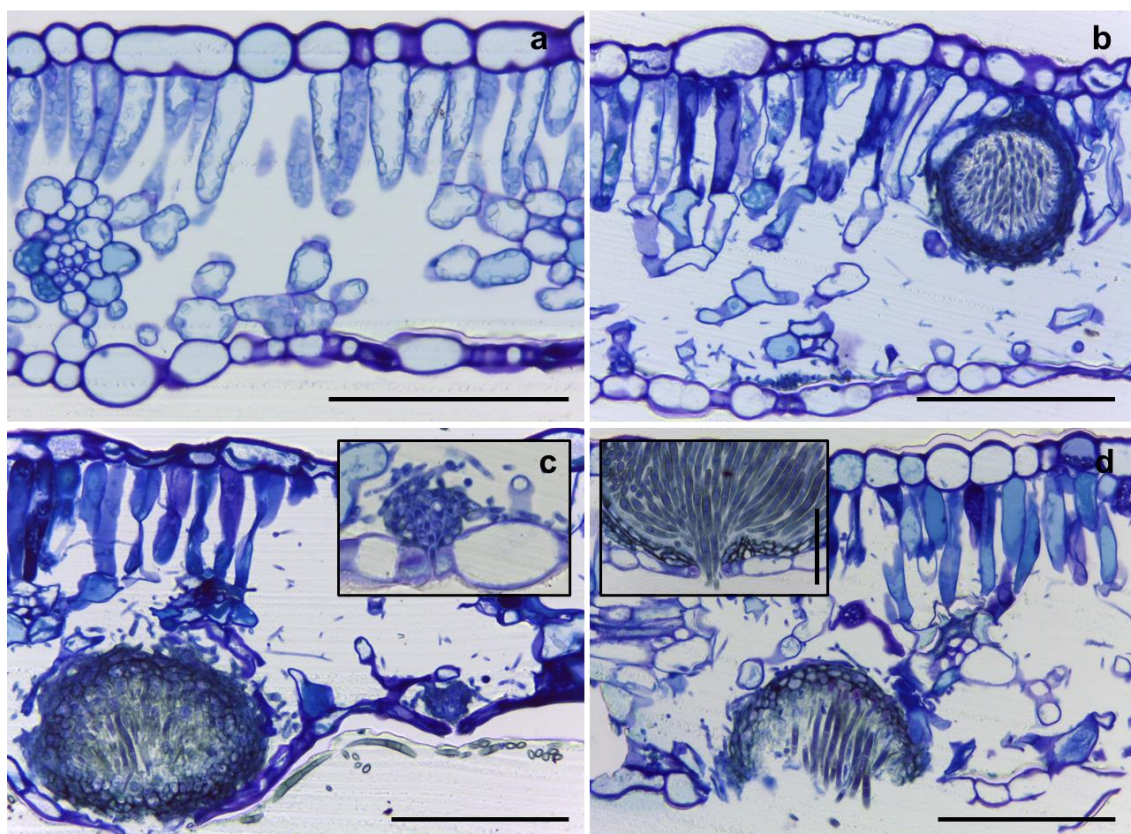
**Fig 2.3** Sintomas e sinais de *Teratosphaeria epicoccoides* na superfície abaxial de folha de eucalipto (*E. urophylla*) (a). Detalhe da exsudação de cirros no retângulo (a), picnídio (b) e conídios (b, c) e colônia após 30 dias em meio batata dextrose ágar (c). Escalas: 100  $\mu$ m (b), 50  $\mu$ m (c) e 20 mm (d)

Sintomas típicos da infecção por *T. epicoccoides* foram observados 30 dias após inoculação, caracterizados pela ocorrência de lesões angulares restritas às folhas basais das plantas, completamente expandidas (Fig 2.4b, c). Plantas controle, onde se aplicou apenas água, mantiveram-se assintomáticas (Fig 2.4a).



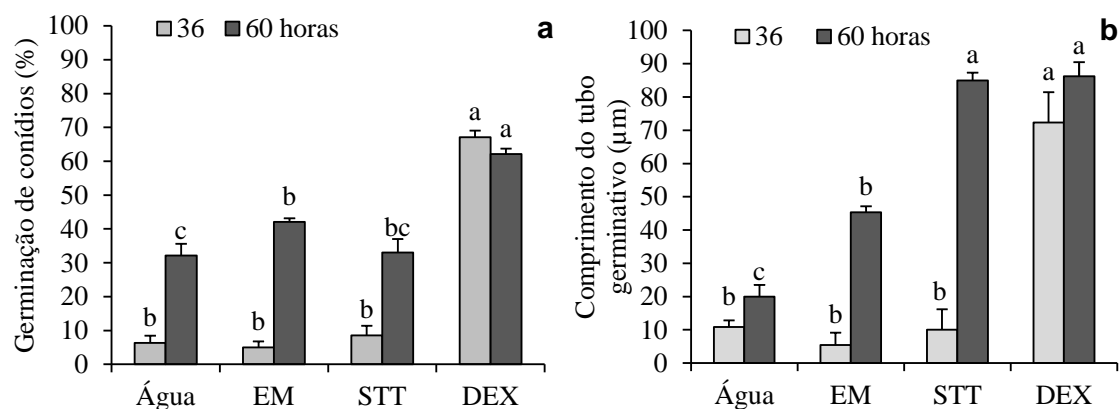
**Fig 2.4** Plantas jovens de eucalipto (*E. urophylla*) testemunha (a) e inoculada apresentando sintomas (b, c) aos 30 dias após inoculação.

Em plantas infectadas, as células do parênquima paliçádico são mais reativas e o parênquima esponjoso é desorganizado (Fig 2.5). Os conídios infectam as plantas através do poro estomático. Após infecção, as hifas colonizam os espaços intercelulares ocasionando desestruturação do mesofilo. As estruturas reprodutivas se desenvolvem na câmara subestomática e, com a progressão da doença, o picnídio maduro passa a liberar conídios na superfície foliar (Fig 2.5c).



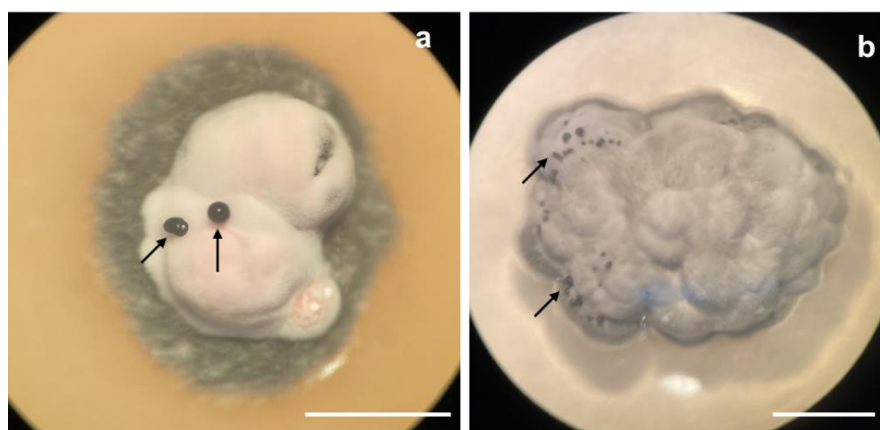
**Fig 2.5** Cortes transversais de plantas jovens de eucalipto (*E. urophylla*) sadia (a) e infectada por *Teratosphaeria epicoccoides* (b-d). Em c detalhe da formação inicial de estruturas reprodutivas na câmara subestomática e em d picnídio liberando conídios. Escala: 100  $\mu$ m

A germinação de conídios é maior em solução de dextrose tanto às 36 como às 60 horas, após adição em solução, atingindo cerca de 62% de germinação (Fig 2.6a). O comprimento do tubo germinativo às 36 horas foi maior em solução de dextrose, e às 60 horas nas soluções de dextrose e suco de tomate temperado, que não diferiram entre si, com 85 e 86,25  $\mu$ m, respectivamente (Fig 2.6b).



**Fig 2.6** Germinação de conídios (a) e comprimento do tubo germinativo (b) de *Teratosphaeria epicoccoides* após 36 e 60 horas em água destilada e soluções de extrato de malte (EM), suco de tomate temperado (STT) e dextrose (DEX). Médias seguidas de letras diferem entre tratamentos às 36 ou 60 horas, isoladamente, pelo teste de Tukey a 5%

A esporulação foi obtida após exposição à luz branca em meio STT e com menor frequência em BDA. As colônias são aveludadas, de coloração branca a rósea e bordas cinza escuro em meio STT e acinzentadas em BDA (Fig 2.7).



**Fig. 2.7** Colônias de *Teratosphaeria epicoccoides* em meio STT(A) e BDA (B). Setas indicam massa viscosa contendo conídios. Escala: 5 mm

Em folhas coletadas, observou-se que, na maioria das vezes, a massa escura formada por picnídios e conídios que se forma sobre a superfície abaxial não era viável à germinação. No entanto, após 72 a 96 horas em câmara úmida, os picnídios exsudavam conídios viáveis (Fig 4B) similares ao do isolado, o que foi observado aos 3, 6 e 9 meses após armazenamento. O fungo sobrevive nas folhas armazenadas por cerca

de 9 meses, após esse período, não foi observada exsudação de conídios e houve intensa colonização das folhas por fungos saprófitos.

#### 4.4 DISCUSSÃO

O patógeno infecta folhas maduras de eucalipto através do poro estomático, colonizam os espaços intercelulares ocasionando desestruturação do mesofilo e reatividade das células do parênquima paliçádico, similar ao relatado por Solís et al. (2022). Analisando alterações histoquímicas em dois clones resistentes (clone 47 - *E. pellita* e clone 79 - *E. pellita* × *E. brassiana*) e um suscetível (clone 79 - *E. pellita* × *E. brassiana*) e à infecção por infecção por *Teratosphaeria* (= *Phaeophleospora* spp.), Rahayu et al. (2020) verificaram que a maior espessura do parênquima paliçádico se correlaciona com menor severidade da doença.

A ocorrência da doença, apenas em folhas basais maduras, pode ser explicada pelo fato de as folhas jovens serem mais cerosas, apresentarem alta hidrofobicidade, reduzindo a deposição do inóculo e, conseqüentemente, a infecção pelo patógeno (Vieira Júnior et al. 2014). Além disso, folhas jovens possuem maior teor de antocianinas (Farnier e Steinbauer 2016), o que confere maior defesa contra o patógeno (Lin et al. 2021).

Os sintomas foliares caracterizados por lesões angulares, exsudação de cirros e a morfologia dos conídios (Mafia e Alfenas, 2003) nos levam a crer que o patógeno é *T. epicoccoides* ((Cooke & Massae) Rossman & W.C. Allen). No entanto, a identificação precisa de espécies de *Teratosphaeria* depende do sequenciamento de DNA (Andjic et al. 2010).

O patógeno ocasionou lesões foliares em folhas basais em plantios jovens de AEC 144 (*E. urophylla*) e lesões foliares, amarelecimento e intensa desfolha na região basal das plantas de eucalipto clone AEC 2034 ((*E. camaldulensis* × *E. grandis*) × *E. urophylla*). Como a doença geralmente está limitada às folhas basais, a doença é subestimada. No entanto, a ocorrência de infecções sucessivas pode resultar em declínio de plantações suscetíveis (Carnegie 2007). *T. epicoccoides* ocasiona sintomas diferentes a depender do hospedeiro. A maior ocorrência em folhas basais e intensa desfolha evidencia que o clone AEC 2034 é mais suscetível à doença que o AEC 144.

Em geral, espécies de *Teratosphaeria* apresentam crescimento lento em cultura, nem sempre ocorre esporulação, o que se constitui entraves à inoculação visando à

seleção de genótipos resistentes (Teodoro et al. 2012). Neste estudo, o crescimento em cultura foi lento e ocorreu esporulação e meio STT e BDA.

A não ocorrência de infecção em teste realizado com vários clones de eucalipto se justifica por condições ambientais desfavoráveis à germinação de conídios do fungo. De acordo com Solís et al. (2022), a temperatura ótima para germinação de *T. epicoccoides* é de 15 a 20 °C e não ocorre germinação em temperaturas superiores a 30 °C. Por outro lado, a reprodução sexuada de vários fungos é iniciada por condições desfavoráveis que paralisam repentinamente o crescimento do micélio, previamente estabelecido (Cochrane 1958). Não foi observada a fase teleomórfica do fungo nas plantas afetadas, o que pode estar relacionado às condições ambientais no campo serem favoráveis ao fungo, além disso, observamos que o patógeno sobrevive por longos períodos em folhas destacadas das árvores.

*Teratosphaeria* spp. são patógenos comuns em viveiros e podem ser disseminados com mudas infectadas (Old et al. 2003). A sobrevivência em folhas caídas e subsequente dispersão de esporos também é provável em ambientes úmidos (Old et al. 2003). Nas lesões localizadas na face inferior das folhas os picnídios exsudam conídios em abundância, formando cirros que são facilmente dispersos pelo vento. A ocorrência da doença em plantios de eucalipto em fase inicial de implementação indica que a disseminação da doença ocorre por mudas já infectadas. Além disso, novas áreas de cultivo são estabelecidas próximo a plantios adultos que podem atuar como fonte de inóculo.

A recuperação de estruturas viáveis em folhas armazenadas após nove meses evidencia que o patógeno pode sobreviver sob condições adversas, minimizando suas necessidades nutricionais. Em condições de campo, o período de sobrevivência é provavelmente inferior, devido à colonização das folhas por outros fungos e ao processo de decomposição.

Em geral, a estratégia mais adequada para o controle da mancha foliar de *Teratosphaeria* é o desenvolvimento de clones resistentes ou tolerantes (Cândido et al. 2014). O controle químico de *Teratosphaeria* spp. pode ser necessário em viveiros e instalações clonais (Old et al. 2003). No entanto, em campo, é dificultado por questões operacionais e viabilidade econômica. Como árvores estressadas são mais suscetíveis à mancha foliar de *Teratosphaeria* (Knipscheer et al. 1990), a nutrição adequada das plantas é fundamental para minimizar os efeitos da doença e permitir uma rápida recuperação das árvores. Em geral, as árvores recuperaram o crescimento após a

epidemia, mas o crescimento é retardado. Em árvores de *E. globulus*, uma epidemia de *T. nubilosa* ocasionou atraso de cerca de 1,2 anos para altura e diâmetro, em comparação com o povoamento não afetado (Smith et al. 2016).

#### 4.5 CONCLUSÕES

Baseado em características morfológicas do fungo e na sintomatologia da doença, o patógeno associado à mancha foliar em plantas de eucalipto foi identificado como *Teratosphaeria epicoccoides*. O patógeno infecta as plantas através do poro estomático. Após infecção, as hifas colonizam os espaços intercelulares, ocasionando desestruturação do mesofilo e reatividade de células do parênquima paliçádico. Picnídios se desenvolvem na câmara subestomática e exsudam conídios, formando cirros externamente.

As colônias possuem crescimento lento em meio de cultura. A germinação de conídios é maior em solução de dextrose e a esporulação ocorre tanto em meio suco de tomate temperado como em batata dextrose ágar. Em folhas armazenadas, o fungo sobrevive por até nove meses.

#### 4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF (2009) Clonagem e doenças do eucalipto. 2nd Ed. Viçosa, Brazil. Editora UFV.
- Andjic V, Pegg GS, Carnegie AJ, Callister A, Hardy GS, Burgess TI (2010) *Teratosphaeria pseudoeucalypti*, new cryptic species responsible for leaf blight of Eucalyptus in subtropical and tropical Australia. Plant Pathol 59:900–912. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02308.x>
- Andjic V, Hardy GE, Cortinas MN, Wingfield MJ, Burgess TI (2007) Multiple gene genealogies reveal important relationships between species of *Phaeophleospora* infecting *Eucalyptus* leaves. FEMS Microbiol Lett 268(1):22–33. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00637.x>
- Cândido TS, Silva AC, Guimarães LMS, Ferraz HGM, Borges Júnior N, Alfenas AC (2014) *Teratosphaeria pseudoeucalypti* on eucalyptus in Brazil. Trop Plant Pathol 39(5):407–412. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000500008>
- Carnegie AJ (2007) Forest health condition in New South Wales, Australia, 1996–2005. II. Fungal damage recorded in eucalypt plantations during forest health surveys and their management. Australas Plant Pathol 36:225–239.
- Chen B, Wu B, Chen S (2024) Wide distribution of *Teratosphaeria epicoccoides* and *T. destructans* associated with diseased eucalyptus leaves in plantations in southern China. Microorganisms 12(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010129>

- Cochrane VW. Physiology of fungi. New York: John Wiley & Sons, 1958. 524 p.
- Crous PW, Summerell BA, Carnegie AJ, Wingfield MJ, Hunter GC, Burgess TI, Andjic V, Barber PA, Groenewald, JZ (2009) Unravelling *Mycosphaerella*: do you believe in genera? Pers.: Mol. Phylogeny Evol. Fungi 23:99-118. <https://doi.org/10.3767/003158509X479487>
- Crous PW, Wingfield MJ, Mansilla JP, Alfenas AC, Groenewald JZ (2006) Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on Eucalyptus II. Stud Mycol 55:99-131. <https://doi.org/10.3114/sim.55.1.99>
- Crous PW, Braun U, Groenewald JZ (2007) *Mycosphaerella* is polyphyletic. Stud Mycol 58:1-32. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.58.01>
- Farnier K, Steinbauer MJ (2016) Elevated anthocyanins protect young *Eucalyptus* leaves from high irradiance but also indicate foliar nutritional quality to visually attuned psyllids. Ecol Entomol 41(2):168-181. <https://doi.org/10.1111/een.12286>
- Gonçalves JLDM, Alvares CA, Higa AR, Silva LD, Alfenas AC, Stahl J, Ferraz SFDB, Lima WDP, Brancalion PHS, Hubner A, Bouillet JPD, Laclau JP, Nouvellon Y, Epron, D (2013) Integrating genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations. For Ecol Manag 301:6-27. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.12.030>.
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J Cell Biol 27:137-138.
- Knipscheer NS, Wingfield MJ, Swart WJ (1990) Phaeoseptoria leaf spot of *Eucalyptus* in South Africa. South Afr For J 154:56-59.
- Lin Y, Fan L, He J, Wang Z, Yin Y, Cheng Y, Li Z (2021) Anthocyanins contribute to fruit defense against postharvest green mold. Postharvest Biol Technol 181:111661. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111661>
- Mafia RG, Alfenas AC (2003) Diferenciação sintomatológica de manchas foliares em *Eucalyptus* spp. causadas por patógenos fúngicos e bacterianos. Fitopatol Bras 28:688-688. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000600019>
- Müller E, Oehrens E (1982). On the genus *Teratosphaeria* (Ascomycetes). Sydowia 35:138-142.
- Old KM, Wingfield MJ, Yuan ZQ (2003) A manual of diseases of Eucalyptus in South-East Asia: Phaeophleospora leaf diseases. Cifor, p. 25-30.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine blue O. Protoplasma 59:368-373. <https://doi.org/10.1007/BF01248568>
- Pérez G, Slippers B, Wingfield BD, Finkenauer E, Wingfield MJ (2009) *Mycosphaerella* leaf disease (MLD) outbreak on Eucalyptus globulus in Brazil caused by *Teratosphaeria* (*Mycosphaerella*) *nubilosa*. Phytopathol Mediterr 48:302-306. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-2799](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-2799)

Quaedvlieg W, Binder M, Groenewald JZ, Summerell BA, Carnegie AJ, Burgess TI, Crous PW (2014) Introducing the consolidated species concept to resolve species in the Teratosphaeriaceae. *Pers: Mol Phylogeny Evol Fungi* 33(1):1-40. <https://doi.org/10.3767/003158514x681981>

Rahayu S, Tudon IE, Hardiyanto EB (2020) Correlations of anatomical and chemical leaf characteristics of eucalyptus clones with spontaneous leaf spot disease severity associated with *Phaeophleospora* fungi. *Taiwan J For Sci* 35(3):239-249. [https://doi.org/10.7075/TJFS.202009\\_35\(3\).0004](https://doi.org/10.7075/TJFS.202009_35(3).0004)

Ribeiro VC, Leitão CAE (2020) Utilisation of Toluidine blue O pH 4.0 and histochemical inferences in plant sections obtained by free-hand. *Protoplasma* 257:993-1008. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01473-0>

Rossmann AY, Crous PW, Hyde KD, Hawksworth DL, Aptroot A, Bezerra JL. et al. Recommended names for pleomorphic genera in *Dothideomycetes*. *IMA Fungus* 6(2):507-523. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2015.06.02.14>

Smith AH, Wardlaw TJ, Pinkard EA, Ratkowsky D, Mohammed CL (2017) Impacts of *Teratosphaeria* leaf disease on plantation *Eucalyptus globulus* productivity. *Forest Pathol* 47(2):e12310. <https://doi.org/10.1111/efp.12310>

Solís M, Wingfield MJ, Hammerbacher A, Naidoo S (2022) Comparison of the infection biology of *Teratosphaeria destructans* and *Teratosphaeria epicoccoides* on *Eucalyptus*. *Plant Dis* (7):1944-1951. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-1877-RE>

Taole MM, Burgess TI, Gryzenhout M, Wingfield BD, Wingfield MJ (2012). DNA sequence incongruence and inconsistent morphology obscure species boundaries in the *Teratosphaeria suttonii* species complex. *Mycoscience* (53):270-283. <https://doi.org/10.1007/S10267-011-0164-X>

Taylor JE, Groenewald JZ, Crous PW (2003) A phylogenetic analysis of Mycosphaerellaceae leaf spot pathogens of Proteaceae. *Mycol Res* 107: 653-658. <https://doi.org/10.1017/s0953756203007950>

Vieira Júnior JR, Cipriani H, Fernandes CDF, De Santana NR, Dos Passos AMA, Da Silva DSG, Souza Filho FM, Freire TC, Matos S (2014) Escala diagramática de severidade da mancha-de-phaeophleospora em eucalipto. *Comunicado Técnico*, 391. Porto Velho: Embrapa Rondônia.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em plantas cultivadas em vaso, independente do regime hídrico, a taxa fotossintética, a eficiência do uso da água e teores de açúcares solúveis e aminoácidos foram maiores sob inoculação com *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma harzianum*. No entanto, essas alterações não foram suficientes para mitigar os efeitos da deficiência hídrica sobre o crescimento das plantas. Por outro lado, em condições de campo, o número de folhas, altura de plantas e diâmetro do caule foram maiores e os teores de açúcares redutores e solúveis e de amido menores, sob inoculação com *T. asperellum* e *T. harzianum*, evidenciando uma maior demanda energética direcionada para o crescimento das plantas. Estudos futuros devem ser realizados por um período mais prolongado para melhor avaliar a contribuição da inoculação com *Trichoderma* sp. para mitigação da deficiência hídrica em plantas de eucalipto.

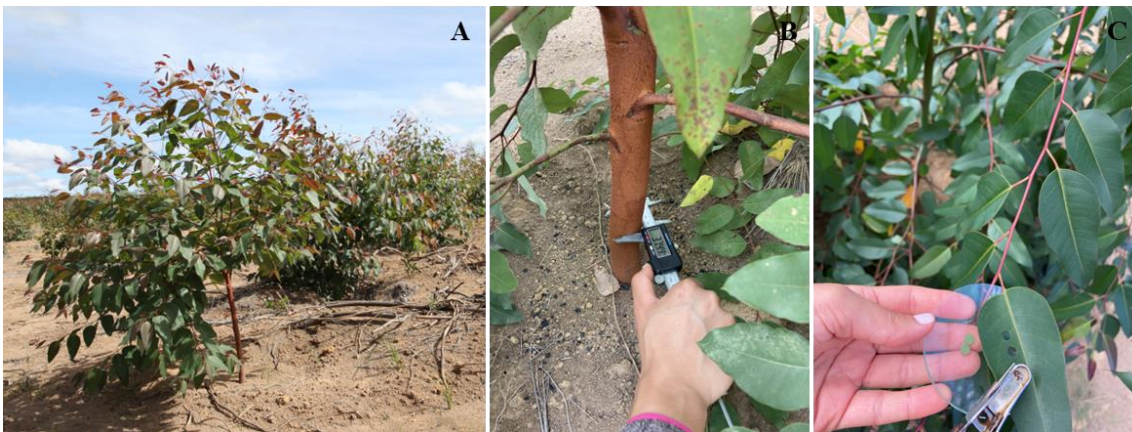
O patógeno associado à mancha foliar em plantas de eucalipto foi identificado como *Teratosphaeria epicoccoides*. A infecção ocorre através do poro estomático. Após infecção, as hifas colonizam os espaços intercelulares, ocasionando desestruturação do mesofilo e reatividade de células do parênquima paliçádico. Em cultura, o crescimento das colônias é lento e o patógeno sobrevive por até nove meses em folhas armazenadas.

## APÊNDICES

### FIGURAS



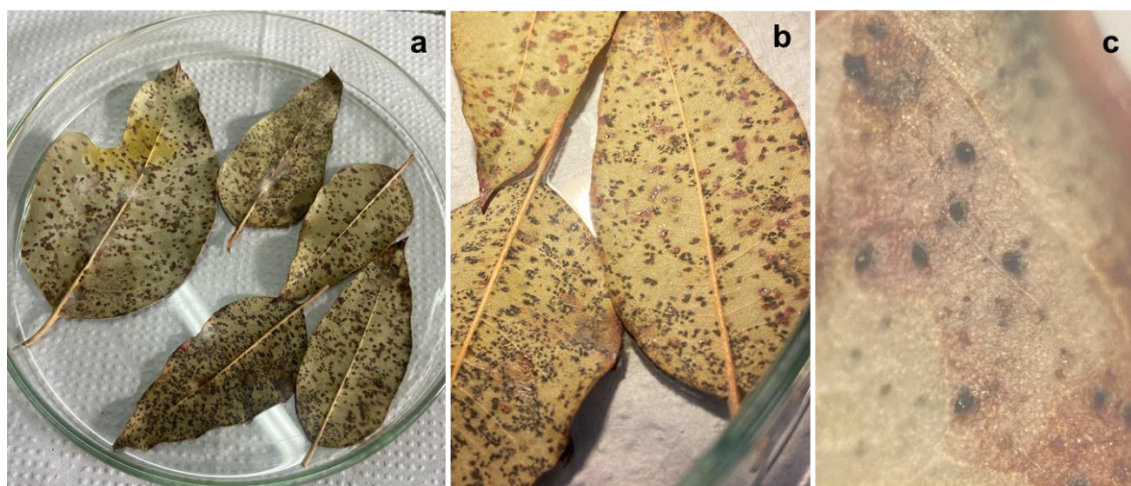
**Figura 1A.** Implementação de experimento de campo. Imersão das raízes em solução de *Trichoderma* (A), plantio semiautomatizado das mudas (B-C) e adição de 1 litro da solução de *Trichoderma* na bacia (D).



**Figura 2A.** Plantas de eucalipto aos dias 150 dias após transplântio (A). Avaliações realizadas aos 270 dias após transplântio. Determinação de diâmetro de caule (B) e retirada de discos foliares para determinação de pigmentos fotossintéticos (C).



**Figura 3A.** Inoculação de mudas de eucalipto (A-B) e manutenção em câmara úmida (C)



**Figura 4A.** Folhas sintomáticas infectadas por *Teratosphaeria epicoccoides*. Folhas em câmara úmida (A-B). Exsudação de conídios após 72-96 horas (C).

## TABELAS

**Tabela 1A.** Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) para altura de plantas (ALT), diâmetro de caule (DC), área foliar (AF), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raízes (MSR), potencial hídrico foliar ( $\psi_w$ ), teor relativo de água na folha (TRA), teores de açúcares solúveis totais (ASOL) e redutores (AR), amido (AMI), aminoácidos totais (AA), prolina (PRO) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de plantas de *Eucalyptus urophylla* (AEC 144), em função dos fatores inoculação (IN) e regimes hídricos (RH)

Fontes de variação	GL	Quadrados médios						
		ALT	DC	AF	MSPA	MSR	$\psi_w$	TRA
IN	2	65,04 <sup>ns</sup>	7,72 <sup>**</sup>	6,57 × 10 <sup>5ns</sup>	155,51 <sup>ns</sup>	7,57 <sup>ns</sup>	0,038 <sup>ns</sup>	118,36 <sup>ns</sup>
RH	1	198,37 <sup>*</sup>	22,42 <sup>**</sup>	1,86 × 10 <sup>**</sup>	1855,56 <sup>**</sup>	194,59 <sup>**</sup>	1,170 <sup>**</sup>	857,03 <sup>*</sup>
(IN) x (RH)	2	52,12 <sup>ns</sup>	0,64 <sup>ns</sup>	1,94 × 10 <sup>5ns</sup>	15,19 <sup>ns</sup>	2,54 <sup>ns</sup>	0,008 <sup>ns</sup>	80,14 <sup>ns</sup>
Erro	18	31,79	1,15	5,72 × 10 <sup>5</sup>	51,35	7,58	0,042	55,02
CV (%)		9,90	8,08	24,65	15,29	9,50	17,77	8,60
Fontes de variação	GL	Quadrados médios						
		ASOL	AR	AMI	AA	PRO	TBARS	
IN	2	0,523 <sup>**</sup>	0,0268 <sup>**</sup>	0,0045 <sup>**</sup>	11,64 <sup>**</sup>	0,000239 <sup>*</sup>	365,26 <sup>ns</sup>	
RH	1	0,371 <sup>*</sup>	0,0270 <sup>**</sup>	0,0022 <sup>*</sup>	0,85 <sup>ns</sup>	0,000255 <sup>*</sup>	1655,93 <sup>**</sup>	
(IN) x (RH)	2	0,008 <sup>ns</sup>	0,0046 <sup>**</sup>	0,0054 <sup>**</sup>	2,83 <sup>ns</sup>	0,000070 <sup>ns</sup>	225,75 <sup>ns</sup>	
Erro	18	0,079	0,0006	0,0004	1,06	0,00055	112,05	
CV (%)		27,48	11,90	9,09	16,60	32,80	14,71	

<sup>ns</sup> não significativo; <sup>\*</sup> significativo ( $p < 0,05$ ) e <sup>\*\*</sup> ( $p < 0,01$ ), de acordo com o teste F.

**Tabela 2A.** Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) para clorofila *a* (CLO.*a*), carotenoides (CAR), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) peroxidase do guaiacol (GPX) e superóxido dismutase (SOD) de plantas de *Eucalyptus urophylla* (AEC 144), em função dos fatores inoculação (IN) e regimes hídricos (RH)

Fontes de variação	GL	Quadrados médios				
		CLO. <i>a</i>	CAR	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	GPX	SOD
IN	2	2,4 × 10 <sup>-5*</sup>	9,2 × 10 <sup>-8*</sup>	2,73 <sup>ns</sup>	1,196 <sup>**</sup>	0,066 <sup>*</sup>
RH	1	3,22 × 10 <sup>-8ns</sup>	6,3 × 10 <sup>-8ns</sup>	509,43 <sup>**</sup>	1,864 <sup>**</sup>	1,205 <sup>**</sup>
(IN) x (RH)	2	7,62 × 10 <sup>-7ns</sup>	5,86 × 10 <sup>-9ns</sup>	0,71 <sup>ns</sup>	0,101 <sup>ns</sup>	0,310 <sup>**</sup>
Erro	18	4 × 10 <sup>-6ns</sup>	2,04 × 10 <sup>-8</sup>	2,05	0,067	0,012
CV (%)		39,35	41,92	17,49	39,50	7,26

<sup>ns</sup> não significativo; <sup>\*</sup> significativo ( $p < 0,05$ ) e <sup>\*\*</sup> ( $p < 0,01$ ), de acordo com o teste F.

**Tabela 3A.** Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) para condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ) taxa fotossintética ( $A$ ) e eficiência intrínseca do uso da água (EiUA) de plantas de *Eucalyptus urophylla* (AEC 144), em função dos fatores inoculação (IN) e regimes hídricos (RH)

Fonte de variação	GL	Quadrados médios			
		$g_s$	$E$	$A$	EiUA
IN	2	0,009 <sup>ns</sup>	0,20 <sup>ns</sup>	10,14 <sup>**</sup>	1125,66 <sup>*</sup>
RH	1	0,079 <sup>**</sup>	16,68 <sup>**</sup>	125,78 <sup>**</sup>	579,48 <sup>ns</sup>
(IN) x (RH)	2	3,8 × 10 <sup>-5ns</sup>	0,28 <sup>ns</sup>	0,47 <sup>ns</sup>	75,39 <sup>ns</sup>
Erro	18	0,005	0,34	1,46	333,50
CV (%)		25,90	10,13	7,21	27,56

<sup>ns</sup> não significativo; <sup>\*</sup> significativo ( $p < 0,05$ ) e <sup>\*\*</sup> ( $p < 0,01$ ), de acordo com o teste F.

**Tabela 4A.** Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) para altura de plantas (H), diâmetro de caule (D) e número de folhas (NF) de plantas de *Eucalyptus urophylla*, clone AEC 144 aos 90 e 150 dias após transplante, em função dos tratamentos controle e inoculação com *T. asperellum* e *T. harzianum*

Fontes de variação	GL	Quadrados médios				
		H90	D90	NF90	H150	D150
Tratamentos	2	555,25 <sup>**</sup>	3,54 <sup>**</sup>	619,78 <sup>**</sup>	2371,44 <sup>**</sup>	1027,42 <sup>**</sup>
Erro	132	12,68	0,42	26,47	239,35	64,30
CV (%)		8,88	15,62	21,52	23,24	27,20

<sup>ns</sup> não significativo; <sup>\*\*</sup> significativo ( $p < 0,01$ ), de acordo com o teste F

**Tabela 5A.** Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) para diâmetro de caule (D270) de plantas de *Eucalyptus urophylla*, clone AEC 144 aos 270 dias após transplante, em função dos tratamentos controle e inoculação com *T. asperellum* e *T. harzianum*

Fontes de variação	GL	Quadrados médios
		D270
Tratamentos	2	274,06**
Erro	25	14,40
CV (%)		10,50

<sup>ns</sup> não significativo; \*\* significativo ( $p < 0,01$ ), de acordo com o teste F.

**Tabela 6A.** Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) para clorofila total (CT), carotenoides (CAR) e teores de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR), amido (AMI) e prolina de plantas de *Eucalyptus urophylla*, clone AEC 144 aos 270 dias após transplante, em função dos tratamentos controle e inoculação com *T. asperellum* e *T. harzianum*

Fontes de variação	GL	Quadrados médios					
		CT	CAR	AST	AR	AMI	PRO
Tratamentos	2	0,000033*	$1,14 \times 10^{-7}$ *	1,71**	0,32**	283,11**	0,000028 <sup>ns</sup>
Erro	27	0,000010	$2,22 \times 10^{-8}$	0,28	0,01	12,75	0,000014
CV (%)		10,53	7,70	31,28	13,68	27,53	39,04

<sup>ns</sup> não significativo; \* significativo ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,01$ ), de acordo com o teste F.

**Tabela 7A.** Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) para germinação de conídios (G) e comprimento do tubo germinativo (CTG) de conídios de *Teratosphaeria epicoccoides* após 36 e 60 horas em função dos tratamentos, água destilada e soluções de extrato de malte (EM), suco de tomate temperado (STT) e dextrose (DEX)

Fontes de variação	GL	Quadrados médios			
		G36	CTG36	G60	CTG60
Tratamentos	3	5926,79**	5606,25**	780,52**	4018,23**
Erro	20	42,07	164,06	31,04	158,85
CV (%)		26,57	48,80	13,02	20,90

<sup>ns</sup> não significativo; \*\* significativo ( $p < 0,01$ ), de acordo com o teste F.