

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

Maísa Didoné Wohlenberg

SUPRESSÃO DE *Meloidogyne* sp. POR ISOLADOS DE *Trichoderma*, NA SOJA

Santa Maria, RS
2018

Maísa Didoné Wohlenberg

SUPRESSÃO DE *Meloidogyne* sp. POR ISOLADOS DE *Trichoderma*, NA SOJA

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em Biologia do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciência do Solo**.

Orientadora: Prof^a Dr^a Zaida Inês Antonioli

Santa Maria, RS
2018

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com dados fornecidos pelo (a) autor (a),

Wohlenberg, Maísa Didoné
SUPRESSÃO DE Meloidogyne sp. POR ISOLADOS DE
Trichoderma, NA SOJA / Maísa Didoné Wohlenberg.- 2018.
93 p.; 30 cm

Orientadora: Zaida Inês Antonioli
Coorientador: Rodrigo Jacques
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Ciência do Solo, RS, 2018

1. Fungos 2. Nematoides de Galhas 3. Controle
Biológico I. Antonioli, Zaida Inês II. Jacques, Rodrigo
III. Título.

©2018

Todos os direitos autorais reservados a Maísa Didoné Wohlenberg. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

SUPRESSÃO DE *Meloidogyne* sp. POR ISOLADOS DE *Trichoderma*, NA SOJA

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em Biologia do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciência do Solo**.

Aprovado em 28 de fevereiro de 2018:

Zaida Inês Antonioli, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Caroline Borges Bevilacqua, Dra.(UFSM)

Ricardo Bemfica Steffen, Dr.

Santa Maria, RS
2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, aos meus pais Heine Wohlenberg e Marlene Didoné e minha avó Holanda Didoné, pelo exemplo de vida, por seus ensinamentos, amor e apoio incondicionais em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, Seu amor incondicional, Graça e perdão durante o percorrer dos meus dias.

Aos meus pais, Heine Wohlenberg e Marlene Didoné, pelo exemplo de caráter, honestidade, família, amor e ensinamentos transmitidos durante toda minha vida.

A minha avó Holanda Didoné, pela amizade, companheirismo, apoio e presença em todos os momentos da minha vida, bons ou ruins.

Ao meu namorado Álvaro Luís Pasquetti Berghetti pelo apoio, ensinamento, amor e companheirismo.

A minha orientadora Professora Dr. Zaida Inês Antonioli, pelos ensinamentos transmitidos, paciência, amizade, dedicação, bondade e auxílio.

Ao meu co-orientador Professor Dr. Rodrigo Jacques.

A amiga Mariana Dossin, obrigada pela amizade verdadeira, por sempre estar presente, pela prestatividade e atenção.

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Microbiologia do Solo em especial Valdemir Bittencourt, Joane Turcatto, Igor Schardong, Natielo Santana, Joice Freiberg e Nariane de Andrade obrigada pela amizade, companheirismo, aprendizado e por toda a ajuda durante a realização do meu trabalho e nas disciplinas no decorrer destes anos.

A banca de defesa, agradeço por aceitarem o convite, bem como pela leitura, críticas e sugestões feitas ao texto da dissertação.

A CAPES, pela concessão de Bolsa de Estudos durante o Mestrado.

Aos professores e funcionários da UFSM, do Departamento de Solos e do Programa de Pós-graduação de Ciência do Solo que contribuíram de uma forma ou de outra para minha formação.

Em especial aos amigos e colegas que conheci durante esta etapa, por me apoiaram durante este período, pela amizade e momentos compartilhados. Enfim, a todas as pessoas que me acompanharam e vivenciaram essa jornada comigo.

Meu muito obrigada!

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”
(Albert Einstein)

“Tudo é possível àquele que crê”
Marcos 9:23

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo
Universidade Federal de Santa Maria

AUTOR: Maísa Didoné Wohlenberg
ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Zaida Inês Antonioli
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de fevereiro de 2018.

Fitonematoides são vermes que parasitam plantas. O gênero *Meloidogyne* sp. é considerado o mais cosmopolita e polífago entre os fitonematoides, causando grandes prejuízos em culturas de importância agrícola, como a soja. Muitos métodos de controle são utilizados para conter os danos desse patógeno, entre eles destaca-se o controle biológico com fungos nematófagos. O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito do fungo *Trichoderma* spp. na supressão de *Meloidogyne* sp., no estabelecimento da cultura, produção de matéria fresca/seca e atributos da clorofila *a*, através da microbiolização de sementes de soja. Foram conduzidos ensaios em laboratório para isolar fungos do gênero *Trichoderma* spp. de solos infestados de *Meloidogyne* sp. Foram realizados testes *in vitro* para avaliação da mortalidade de juvenis e eclosão de ovos de *Meloidogyne javanica* sob ação de filtrados de *Trichoderma* spp. Em casa de vegetação foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento foram utilizados dois isolados de *Trichoderma* spp. com três doses, $0,25 \times 10^8$, $1,25 \times 10^8$ e $2,50 \times 10^8$ conídios por 50 g^{-1} de semente para supressão de *M. incognita*. No segundo experimento foram utilizados três isolados de *Trichoderma* spp. com três doses, $0,25 \times 10^8$, $1,25 \times 10^8$ e $2,50 \times 10^8$ conídios por 50 g^{-1} de semente para a supressão de *M. javanica*. Avaliou-se o índice de velocidade de germinação e germinação, a matéria seca radicular e a penetração de juvenis de segundo estágio de *M. javanica*. No período de florescimento da soja avaliou-se a fluorescência da clorofila *a*, a matéria fresca/seca da parte aérea e radicular, número de galhas, número de massa de ovos e fator de reprodução de *M. incognita*, e *M. javanica*. O isolado *Trichoderma* UFSMQ36 $2,50 \times 10^8$ conídios foi eficaz na supressão de *M. incognita*. O mesmo isolado *Trichoderma* $1,25 \times 10^8$ conídios, mostrou resultados positivos para a produção de matéria seca e atributos fluorescência da clorofila *a*. O isolado *Trichoderma* UFSMQ1 e UFSMQ40 promoveram a mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* *in vitro*. *Trichoderma* UFSMQ1 e UFSMQ40 suprimiram a atividade de *Meloidogine javanica*. A maior quantidade possível avaliada neste estudo de inóculo de *Trichoderma* UFSMQ40 favoreceu a supressão de *Meloidogyne javanica*. O isolado UFSMQ36 proporcionou maior germinação, índice de velocidade de germinação e taxa de transporte de elétrons.

Palavras-chave: Fitonematoides - Biocontrole – Fungos - Soja

ABSTRACT

Masters dissertation
Post-Graduation Course in Soil Science
Federal University of Santa Maria

AUTHOR: Máisa Didoné Wohlenberg
ADVISOR: Prof^a Dr^a Zaida Inês Antonioli
Date and Place of Defense: Santa Maria, February 28th, 2018.

Plant-parasitic nematodes are worms that parasitize plants. The genus *Meloidogyne* sp. is considered the most cosmopolitan and polyphagous among plant-parasitic nematodes, causing great damage in crops of agricultural importance, such as soybeans. Several control methods are used to contain the damage of this pathogen, among them the biological control with nematophagous fungi. The objective of this study was to evaluate the effect of the fungus *Trichoderma* spp. in the suppression of *Meloidogyne* sp., in the establishment of the crop, production of fresh / dry matter and attributes of chlorophyll a, through the microbiolization of soybean seeds. Laboratory tests were carried out to isolate fungus of the genus *Trichoderma* spp. of soils infested with *Meloidogyne* sp. In vitro tests were executed out to measure juvenile mortality and egg hatching of *Meloidogyne javanica* under the action of *Trichoderma* spp. Two experiments were executed out under greenhouse conditions. In the first experiment, two isolates of *Trichoderma* spp. with three doses, 0.25x10⁸, 1.25x10⁸ and 2.50x10⁸ conidia per 50 g⁻¹ of seed for suppression of *M. incognita*. In the second experiment three *Trichoderma* spp. with three doses, 0.25x10⁸, 1.25x10⁸ and 2.50x10⁸ conidia per 50 g⁻¹ of seed for the suppression of *M. javanica*. The rate of germination and germination, root dry matter and penetration of second stage juveniles of *M. javanica* were measured. In the period of soybean flowering, chlorophyll a fluorescence, fresh/dry matter of shoot and root, number of galls, egg mass number and reproduction factor of *M. incognita* and *M. javanica* were measured. The *Trichoderma*'s isolate UFSMQ36 2.50x10⁸ conidia was effective in the suppression of *M. incognita*. The same isolate *Trichoderma* 1.25x10⁸ conidia, showed positive results for the dry matter of shoots and attributes chlorophyll a fluorescence. The *Trichoderma*'s isolates UFSMQ1 and UFSMQ40 promoted the mortality of juveniles of second stage of *Meloidogyne javanica* in vitro. The *Trichoderma* UFSMQ1 and UFSMQ40 suppressed the activity of *M. javanica*. The highest possible amount evaluated in this *Trichoderma* UFSMQ40 inoculum study favored the suppression of *M. javanica*. The UFSMQ36 isolate provided higher germination, germination velocity index and electron transport rate.

Keywords: Plant-parasitic nematodes - Biocontrol - Fungi – Soybean

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Número de juvenis penetrados de <i>Meloidogyne incognita</i> em plantas de soja inoculadas com <i>Trichoderma</i> | 41 |
| Tabela 2. Número de Galhas (NG), número de massa de ovos (NMO) e fator de reprodução (FR) de <i>Meloidogyne incognita</i> em plantas de soja submetidas à isolados de <i>Trichoderma</i> | 42 |
| Tabela 3. Número de juvenis penetrados, número de galhas (NG), número de massa de ovos (NMO) e fator de reprodução (FR) de <i>Meloidogyne incognita</i> em plantas de soja submetidas à isolados de <i>Trichoderma</i> | 43 |
| Tabela 4. Germinação (%) e Índice de velocidade de germinação de plantas de soja inoculadas com <i>Meloidogyne incognita</i> submetidas à isolados de <i>Trichoderma</i> | 43 |
| Tabela 5. Matéria seca radicular (MSR) e matéria seca da parte aérea (MSPA) aos 22 dias após emergência (DAE), e MSPA aos 80 DAE de plantas de soja inoculadas com <i>Meloidogyne incognita</i> submetidas à isolados de <i>Trichoderma</i> | 44 |
| Tabela 6. Matéria seca radicular (MSR) e matéria seca da parte aérea (MSPA) aos 22 dias após emergência (DAE), e MSPA aos 80 DAE de plantas de soja inoculadas com <i>Meloidogyne incognita</i> submetidas à isolados de <i>Trichoderma</i> | 44 |
| Tabela 7. Taxa de transporte de elétrons (ETR _m), fluorescência inicial (F _o), fluorescência máxima (F _m) e rendimento quântico máximo (F _v /F _m) de plantas de soja inoculadas com <i>Meloidogyne incognita</i> submetidas à isolados de <i>Trichoderma</i> | 45 |
| Tabela 8. Número de juvenis penetrados, número de massa de ovos (NMO), número de galhas (NG) e fator de reprodução (FR) de <i>Meloidogyne javanica</i> em plantas de soja submetidas à isolados de <i>Trichoderma</i> | 62 |
| Tabela 9. Germinação (%) e Índice de velocidade de germinação (IVG) de plantas de soja inoculadas com <i>Meloidogyne javanica</i> submetidas à isolados de <i>Trichoderma</i> | 63 |
| Tabela 10. Matéria seca radicular (MSR) aos 22 dias após emergência (DAE), matéria fresca radicular (MFR) e matéria seca da parte aérea (MSPA) aos 80 (DAE) de plantas de soja inoculadas com <i>Meloidogyne javanica</i> submetidas à isolados de <i>Trichoderma</i> | 64 |
| Tabela 11. Taxa de transporte de elétrons (ETR _m), fluorescência inicial (F _o), fluorescência máxima (F _m) e rendimento quântico máximo (F _v /F _m) de plantas de soja inoculadas com <i>Meloidogyne javanica</i> submetidas à isolados de <i>Trichoderma</i> | 65 |
| Tabela 12. Afiliações taxonômicas do isolado de <i>Trichoderma</i> UFSMQ1 baseado no banco de dados de sequências do gene translation elongation factor 1 alpha do National Center for Biotechnology Information (http://ncbi.nlm.nih.gov/)..... | 91 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Placas de Petri com crescimento do isolado de *Trichoderma* UFSMQ1....55
- Figura 2.** Número de ovos de *Meloidogyne javanica* eclodidos (%) e morte de juvenis de segundo estágio (%) submetidos a suspensões fúngicas de *Trichoderma* em condições de laboratório.61
- Figura 3.** Correlação entre as variáveis fator de reprodução (FR) e número de juvenis penetrados (A), número de galhas e número de massa de ovos (B), número de juvenis penetrados e fluorescência máxima (C), matéria fresca radicular aos 80 dias após emergência (DAE) e matéria fresca radicular aos 22 DAE (D), número de juvenis penetrados e fluorescência inicial (E), rendimento quântico máximo e matéria fresca radicular aos 22 DAE (F) em plantas de soja inoculadas com *Meloidogyne javanica* e submetidas a isolados de *Trichoderma*.66

LISTA DE EQUAÇÕES

| | |
|---|----|
| Equação 1. Fator de reprodução (FR)..... | 40 |
| Equação 2. Índice de velocidade de Germinação (IVG)..... | 40 |
| Equação 3. Fator de reprodução (FR)..... | 59 |

LISTA DE APÊNDICE

| | |
|--|----|
| Apêndice 1. Atributos químicos e físicos do solo camada 0,0-0,20 metros da área de solo coletado em Santa Maria, RS..... | 89 |
| Apêndice 2. Análise Molecular..... | 90 |
| Apêndice 3. Resultado da análise de correlação de Pearson entre as variáveis matéria seca radicular (MSR) aos 22 dias após emergência (DAE), matéria fresca radicular (MFR) matéria seca da parte aérea (MSPA) aos 80 (DAE), número de juvenis penetrados, número de massa de ovos (NMO), número de galhas (NG) fator de reprodução (FR), taxa de transporte de elétrons (ETRm), fluorescência inicial (Fo), fluorescência máxima (Fm) e rendimento quântico máximo (Fv/Fm) em plantas de soja inoculadas com <i>Meloidogyne javanica</i> submetidas a isolados de <i>Trichoderma</i> | 93 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 19 |
| 2.1 CULTURA DA SOJA..... | 19 |
| 2.2 FITONEMATOIDES: <i>Meloidogyne</i> sp..... | 20 |
| 2.3 CONTROLE DE <i>Meloidogyne</i> sp..... | 22 |
| 2.3.1 Controle biológico | 24 |
| 2.3.1.1 <i>Fungos</i> | 26 |
| 2.3.1.1.1 <i>Trichoderma</i> spp..... | 27 |
| 2.4 MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES..... | 29 |
| 2.5 FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A DAS PLANTAS DE SOJA..... | 30 |
| 3 HIPÓTESES | 32 |
| 4 OBJETIVOS | 32 |
| 5 CAPÍTULO I: <i>Trichoderma</i> NA SUPRESSÃO DE <i>Meloidogyne incognita</i> EM PLANTAS DE SOJA | 33 |
| 5.1 INTRODUÇÃO..... | 35 |
| 5.2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 36 |
| 5.2.1 Inóculo de <i>Meloidogyne incognita</i> | 36 |
| 5.2.2 Obtenção dos fungos..... | 37 |
| 5.2.3 Teste de germinação de sementes e microbiolização de sementes..... | 38 |
| 5.2.4 Delineamento experimental..... | 38 |
| 5.2.5 Atributos do solo e cultivo das plantas..... | 39 |
| 5.2.6 Parâmetros de dano do <i>Meloidogyne incognita</i> na planta..... | 39 |
| 5.2.7 Estabelecimento, produção de matéria seca e fluorescência da clorofila a..... | 40 |
| 5.2.8 Análise estatística..... | 41 |
| 5.3 RESULTADOS..... | 41 |
| 5.3.1 Parâmetros de dano do <i>Meloidogyne incognita</i> | 41 |
| 5.3.2 Estabelecimento da cultura, produção de matéria seca e atributos fisiológicos..... | 43 |
| 5.4 DISCUSSÃO..... | 45 |
| 5.5 CONCLUSÃO..... | 49 |
| 6 CAPÍTULO II: <i>Trichoderma</i> COMO SUPRESSOR DE <i>Meloidogyne javanica</i> VIA SEMENTES DE SOJA | 50 |
| 6.1 INTRODUÇÃO..... | 52 |
| 6.2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 53 |
| 6.2.1 Inóculo de <i>Meloidogyne javanica</i> | 53 |

| | |
|--|----|
| 6.2.2 Obtenção dos fungos | 54 |
| 6.2.3 Identificação à nível de gênero dos isolados fúngicos. | 55 |
| 6.2.4 Testes de mortalidade de J2 e eclosão de ovos de <i>Meloidogyne javanica</i> (%) sob ação de suspensão de <i>Trichoderma</i> spp. em laboratório | 56 |
| 6.2.5 Teste de germinação de sementes e microbiolização de sementes em laboratório | 57 |
| 6.2.6 Atributos do solo usado em casa de vegetação | 57 |
| 6.2.7 Parâmetros de dano de <i>Meloidogyne javanica</i> | 58 |
| 6.2.7.1 <i>Trichoderma</i> spp. na penetração de <i>Meloidogyne javanica</i> em soja em condições de casa de vegetação. | 58 |
| 6.2.7.2 <i>Trichoderma</i> spp. na reprodução de <i>Meloidogyne javanica</i> em soja em condições de casa de vegetação. | 58 |
| 6.2.8 <i>Trichoderma</i> spp. na germinação, crescimento (matéria fresca/seca) em plantas de soja parasitadas por <i>Meloidogyne javanica</i>. | 59 |
| 6.2.9 <i>Trichoderma</i> spp. nos parâmetros de clorofila a em plantas de soja parasitadas por <i>Meloidogyne javanica</i>. | 60 |
| 6.2.10 Análise estatística | 60 |
| 6.3 RESULTADOS | 61 |
| 6.3.1 Teste in vitro | 61 |
| 6.3.2 Parâmetros de dano de <i>Meloidogyne javanica</i> | 62 |
| 6.3.3 Germinação, crescimento (matéria fresca/seca) e parâmetros da clorofila a | 63 |
| 6.3.4 Correlação entre parâmetros de dano de <i>Meloidogyne javanica</i>, crescimento (matéria fresca/seca) e atributos da fluorescência da clorofila a | 66 |
| 6.4 DISCUSSÃO | 67 |
| 6.5 CONCLUSÃO | 71 |
| 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 72 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 73 |

1 INTRODUÇÃO

Os fitonematoides são patógenos do solo de difícil controle, que tem demandado altos custos para a produção agrícola (APARECIDA DA COSTA, 2015). Estima-se que esses patógenos ocasionam à produção agrícola mundial perdas anuais entre US\$ 100 bilhões e US\$ 157 bilhões (SINGH; HODDA; ASH, 2013). No Brasil, as perdas são estimadas em R\$ 16,2 bilhões, de acordo com dados da Sociedade Brasileira de Nematologia (SBN, 2017). Na cultura da soja os danos podem alcançar 30% ou em casos mais severos podem comprometer toda produção agrícola (DIAS et al., 2010).

Dentre as espécies de nematoides, o gênero *Meloidogyne* sp. tem grande importância econômica, devido ao seu hábito alimentar polífago, e pela severidade/intensidade de parasitismo. O parasitismo deste fitonematoide provoca redução na translocação de solutos para a parte aérea, provocando distúrbios fisiológicos na planta (MESSCHMIDT, 2013). Os nematoides do gênero *Meloidogyne* ao penetrarem no sistema radicular, provocam a formação de estruturas denominadas de galhas. Ainda, outro problema está na persistência do nematoide no ambiente, que mesmo em condições adversas de clima têm a capacidade de manter sua viabilidade, podendo permanecer em estado de dormência no solo por muito tempo (ASMUS et al., 2015). Por causar danos expressivos às culturas, os fitonematoides tem sido alvo de inúmeros estudos, apresentando-se como um desafio aos agricultores, técnicos e pesquisadores.

Existem diversas formas de controle de fitonematoides com o intuito de manter a população destes patógenos à baixo do nível de dano, como a rotação de culturas, cultivares resistentes, adubação verde, plantas antagonistas, pousio, controle químico e controle biológico (BARKER; KOENNING, 1998; MACHADO A. C.; KANEKO L.; PINTO Z.V., 2016). O método mais recorrente é o uso de controle químico, entretanto esse método causa poluição ambiental, alta periculosidade de manuseio, resistência, perda de eficiência e pode deixar resíduo nos alimentos (DONG; ZHANG, 2006; SUASSUNA N.; SCOZ L.B.; GIBAND M., 2016). Ainda causa desbalanço biológico no solo, tornando o sistema não autossuficiente.

Neste contexto, o controle biológico apresenta-se como uma alternativa viável, visto que, refere-se ao controle de microrganismos fitopatogênicos por antagonistas benéficos às plantas (LUCON, C.M.; CHAVES A. L.; BACILIERI S. 2014), de

ocorrência natural ou introduzidos ao sistema através da aplicação de bioprodutos. O manejo biológico tem apresentado importantes vantagens em relação ao manejo químico, reduz a poluição ambiental, a contaminação dos alimentos por agrotóxicos e não promove a seleção de populações resistentes (SOARES, 2006). Diante disso, diversos microrganismos têm revelado efeito antagônico à fitopatógenos. Os de maior importância são fungos habitantes do solo (FREITAS, 2011), sendo que muitos destes fungos apresentam potencial de biocontrole em fitonematoides (APARECIDA DA COSTA, 2015).

Os fungos apresentam elevada importância agrícola, pois são os decompositores primários em todos os ecossistemas terrestres e possuem funções ecológicas críticas no ciclo do carbono e na ciclagem de nutrientes (BALDONI, 2016). Estes microrganismos também possuem significativa utilização na agricultura, para produção biológica e biotecnológica (CHAMBERGO; VALENCIA, 2016). Os fungos se utilizam de diferentes estratégias de infecção ou captura de nematoides, podendo ser através de predação, endoparasitismo, parasitismo em ovos e fêmeas e pela produção de metabolitos tóxicos aos nematoides (STIRLING, 1991; JANSSON *et al.*, 1997; FERRAZ *et al.*, 2010).

Existem diversos fungos com a capacidade de supressão de fitonematoides com diferentes mecanismos de ação. Pesquisas com fungos *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson, *Pochonia chlamydosporia*, *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & W. Gams, *Trichoderma harzianum* Rifai e *Trichoderma viride* Pers., tem apresentado bons resultados na supressão de fitonematoides como o reportado para o fungo *Pochonia chlamydosporia* em alface (VIGGIANO; DE FREITAS; LOPES, 2014), *Paecilomyces lilacinus* para controle de *Meloidogyne* em pepino (HUANG *et al.*, 2016), *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samsom e *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) no controle de *Meloidogyne incognita* em soja (NUNES *et al.*, 2010) e *T. harzianum* utilizado em goiabeira para combate de *M. Enterolobii* (JINDAPUNNAPAT; CHINNASRI; KWANKUAE, 2013).

Dentre os fungos nematófagos pode-se destacar o gênero *Trichoderma*, a capacidade deste fungo de crescimento saprofítico na rizosfera é importante na prevenção e controle de agentes patogênicos como os fitonematoides (AMIR-AHMADI; MOOSAVI; MOAFPOURIAN, 2017). O gênero *Trichoderma* pode suprimir os patógenos de forma direta e indireta, através de mecanismos de parasitismo, competição, produção de enzimas hidrolíticas, produção de compostos orgânicos

voláteis e não voláteis (HARMAN, 2006) estimulação de hormônios de defesa das plantas e promoção de crescimento (MARTÍNEZ-MEDINA et al., 2017).

Trabalhos relacionados ao controle biológico de fitonematoides com *Trichoderma* spp. demonstram resultados positivos. O fungo *Trichoderma longibrachiatum* apresentou efeito letal em juvenis de segundo estágio de *M.incognita* in vitro (ZHANG; GAN; XU, 2015); *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride* diminuíram a reprodução de *Meloidogyne javanica* em tomate (AL-HAZMI; TARIQJAVEED, 2016). Tratamento do solo com isolados de *T. harzianum* reduziram a suscetibilidade do tomate para o parasitismo de *M. incognita* (LEONETTI et al., 2017).

A grande diversidade de raças de fitonematoides adaptadas aos diferentes climas, culturas e solos dificulta o seu controle. Elevadas perdas de produtividade são recorrentes devido a incidência deste patógeno nas mais diversas culturas agrícolas, inclusive a soja (SASSER; KIRBY, 1979). Dessa forma, é necessário monitorar as plantações para efetuar o controle de forma rápida e precisa para amenizar os danos. Uma alternativa para avaliação da sanidade das plantas é observar alterações no metabolismo das mesmas. Essas alterações são causadas por algum estresse, como a presença de fitonematoide no sistema radicular e podem ser medidos por parâmetros da fluorescência da clorofila *a*. Essa análise consegue mensurar possíveis danos antes desses provocarem alterações nos atributos morfológicos ou na produtividade (BAKER, 2008).

Nesse sentido este estudo buscou avaliar isolados fúngicos do gênero *Trichoderma* com potencial de supressão de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* aplicados via sementes na soja.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CULTURA DA SOJA

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é originária do continente asiático da região correspondente à China Antiga. No ocidente, o Estados Unidos (EUA) foi o primeiro país a iniciar a exploração comercial da cultura, primeiro como forrageira e, depois como grãos (EMBRAPA, 2017). Já no Brasil, o primeiro registro da cultura foi em 1914 no município gaúcho de Santa Rosa, RS. Porém somente décadas mais tarde, a partir de 1940, a cultura começou a ter importância econômica. Nas décadas de 80 e 90, houve uma grande expansão e crescimento da produtividade com o avanço da soja para a região centro oeste do Brasil (EMBRAPA, 2017).

Hoje, a soja é cultivada em quase todos os estados brasileiros o que torna o Brasil o segundo maior produtor mundial do grão, ficando atrás apenas dos EUA, que na safra 2016/2017 atingiu 118,69 milhões de toneladas (CONAB, 2017). Juntos, EUA, Brasil e Argentina são responsáveis por 82,2% da safra mundial da oleaginosa (CONAB, 2017).

A relevância econômica da cultura da soja deve-se à extração de óleo para a alimentação humana e a produção de biodiesel. Outra forma de utilização da soja baseia-se no seu farelo que tem como destino principal a alimentação animal (LOVATO, 2013). As principais perdas de produtividade que acometem a cultura da soja são devidas a fatores abióticos e bióticos do ambiente. Dentre os fatores bióticos destaca-se incidência de insetos, plantas daninhas e fitopatógenos com perdas de 15,6%, 13,2% e 13,3%, respectivamente (MENTEN; BANZATO, 2016)

Mais de 100 espécies de nematóides de 50 gêneros diferentes podem causar danos à cultura da soja (BRIDA et al., 2016). No Brasil, os nematóides mais prejudiciais à cultura são os formadores de galhas (*Meloidogyne sp.*), o de cisto (*Heterodera glycines*), *Pratylenchus* e *Rotylenchus* (FERRAZ, 2001; DIAS et al., 2010). Dentre os formadores de galhas, destaca-se *M. incognita* e *M. javanica*. O primeiro ocorre em regiões sojícolas anteriormente cultivadas com algodão e café, e o segundo tem ocorrência disseminada por diversas áreas de cultivo da soja (HADDAD, 2014). Os danos de fitonematoides podem comprometer toda a produção em estágio avançado de infestação (DIAS et al., 2010).

Segundo o United States Department of Agriculture (USDA, 2017) o Brasil é o maior exportador de soja em grãos do mundo, responsável por 41,93% de todas as

exportações mundiais. Os números mostram a grande importância da soja para o Brasil e o mundo. Com o esgotamento de novas fronteiras agrícolas faz-se necessário o aumento vertical de produtividade aliada a supressão de fitonematoides. O controle destes patógenos pode ser feito através do manejo biológico com fungos específicos antagônicos de nematoides de galha. Isto pode tornar o controle biológico um importante aliado para a produção agrícola mundial.

2.2 FITONEMATOIDES: *Meloidogyne* sp.

Os nematoides são vermes que podem ocorrer em diversos ambientes naturais, porém necessitam de umidade para sobreviver, como o filme de água que existe entre as partículas de solo (FERRAZ; BROW, 2016). Os nematoides possuem diferentes hábitos alimentares, podendo ser divididos em nematoides de vida livre e parasitas. Os nematoides de vida livre se alimentam de fungos, bactérias e outros nematoides, desempenhando papel de biocontroladores; já os parasitas causam doenças em animais e vegetais; sendo que nas plantas, os fitonematoides parasitam estruturas como caules e raízes, de onde retiram alimento através da cavidade bucal transformada em estilete, e impedindo assim o desenvolvimento da cultura (FERRAZ et al., 2010).

Os fitonematoides são agentes causadores de perdas elevadas de produtividade na agricultura. Pela ação severa e intensa sobre o sistema radicular, os fitonematoides influenciam na absorção e a translocação de nutrientes, podendo também predispor as plantas à doenças e estresses ambientais (GOMES & CAMPOS, 2003). Já foram descritas mais de 100 espécies de *Meloidogyne* (JONES et al., 2013), sendo *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* e *M. javanica* são as mais polífagas, cosmopolitas e prejudiciais à agricultura, responsáveis por aproximadamente 95% das perdas no setor – (MOURA, 1996; NOE, 2010; FERRAZ; BROW, 2016). Os nematoides do gênero *Meloidogyne* sp. têm grande disseminação nas áreas de plantio do Brasil, onde encontram condições de umidade e temperatura ideais para sua reprodução e alimentação (BRUINSMA, 2013).

O gênero *Meloidogyne* sp. causadores de galhas radiculares, são um dos principais patógenos agrícolas, em função de sua ampla distribuição, vasta gama de hospedeiros e elevados prejuízos provocados (APARECIDA DA COSTA, 2015). Dessa forma, diversos estudos estão sendo desenvolvidos com o intuito de conhecer

os hábitos, morfologia, especificidades e formas de controle dos diferentes tipos de nematoides parasitas de plantas (MOREIRA et al., 2015; BRIDA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017).

Uma característica fundamental do nematoide-das-galhas é sua habilidade de sobreviver na inexistência da planta hospedeira em potencial (GALBIERI; ASMUS, 2016). Na ausência destas plantas o nematoide das galhas pode sobreviver de seis a 12 meses no solo (ASMUS et al., 2015). Isso é possível devido à redução do metabolismo, conhecida como diapausa, sendo dependente das reservas de nutrientes e das condições ambientais (LORDELLO, 1984; FERRAZ; BROW, 2016). As estratégias de sobrevivência, conhecidas em fitonematoides, que envolvem o processo de diapausa, são a quiescência (redução parcial nas atividades metabólicas, a curto prazo - dias), e a criptobiose (quando há persistência de condições desfavoráveis ao ciclo de vida do patógeno, a longo prazo – meses e/ou anos) (FERRAZ; BROW, 2016). Além disso, a população de *Meloidogyne* sp. pode persistir para a safra seguinte mesmo ocorrendo grande mortalidade de ovos e juvenis de segundo estágio por conta da alta taxa de multiplicação durante a safra (GALBIERI; ASMUS, 2016).

Em relação a fatores abióticos, temperaturas inferiores a 15° C e superiores a 30° C podem levar a redução metabólica dos nematoides. O teor de umidade (solos secos ou saturados) também apresenta influência no ciclo de vida desses patógenos, (LORDELLO, 1984; FERRAZ; BROW, 2016). A faixa considerada ótima para o desenvolvimento dos fitonematoides são teores de umidade no solo próximos à capacidade de campo, apresentando maior mobilidade e desenvolvimento, em solos mais arenosos (FERRAZ; BROW, 2016).

O ciclo de vida do nematoide das galhas tem duração aproximada de quatro semanas, porém em condições desfavoráveis, esse ciclo pode prolongar-se (SANTIN, 2008). O ciclo consiste do ovo, de quatro estádios juvenis (J1 a J4) e dos adultos, macho e fêmea. Poucas horas após a fêmea liberar ovo, o juvenil de primeiro estágio está formado. Após uma ecdise dentro do ovo forma-se o juvenil de segundo estágio (J2), que eclode utilizando de seu aparelho bucal em forma de estilete (ABAD et al., 2009). Os juvenis J2 são guiados pelos exsudados liberados pelas raízes das plantas (sinais químicos) que os atraem até a região meristemática onde ocorre a penetração dos fitonematóides até a região do córtex (TIHOHOD, 2000).

Após encontrar um sítio de alimentação adequado, o fitonematoide, torna-se sedentário, e passa a liberar secreções esofagianas pelo estilete bucal que ocasionam mudanças morfológicas (hipertrofia) e fisiológicas (hiperplasia). Tais mudanças incitam a formação de células nutridoras ao fitonematoide, provocando a formação das galhas, característica em raízes de plantas parasitadas por *Meloidogyne* sp. (LORDELLO, 1984; GALBIERI; ASMUS, 2016).

Após a maturidade sexual, os fitonematoides do gênero *Meloidogyne* sp. apresentam acentuado dimorfismo sexual. As fêmeas apresentam corpo globoso, periforme ou em forma de saco, sem mobilidade dentro da planta. Esse hábito sedentário é responsável pela formação de galhas nas raízes das plantas. Cada fêmea pode colocar em média 400 ovos, razão pela qual conseguem completar quatro a até cinco gerações e atingir níveis populacionais altíssimos nas culturas anuais brasileiras (FERRAZ; BROW, 2016). Os machos desse gênero, apresentam corpo vermiforme, e não causam galhas, pois além de não parasitarem plantas, são móveis no solo, possuindo ciclos mais curtos que as fêmeas (TIHOHOD, 2000; FERRAZ; BROW, 2016), podendo viver por semanas no solo.

Contudo, em situações de estresse, como em condições ambientais desfavoráveis, ou alta população de fitonematoides no solo, os mesmos acionam um mecanismo conhecido como reversão sexual em juvenis femininos ainda não completamente desenvolvidos, originando machos com dois testículos (FERRAZ; BROWN, 2016). Dessa forma, diminui-se a formação de ovos tornando o parasitismo na planta menos severo.

2.3 CONTROLE DE *Meloidogyne* sp.

A maneira como os alimentos são produzidos favorece a disseminação e o aumento dos níveis populacionais de fitonematoides principalmente pelas mudanças de padrão de preparo do solo. O controle é dificultado pois os nematoides têm hábito alimentar polífago podendo parasitar um elevado número de espécies vegetais com ampla distribuição geográfica, estando presente em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (GOULART, 2003; FERRAZ; BROW, 2016).

Muitas técnicas são recomendadas para o manejo de fitonematóides, principalmente estratégias combinadas, como rotação de culturas, cultivares resistentes, higienização de máquinas utilizadas em áreas contaminadas antes de

utilizá-las em áreas sadias, incorporação de adubos orgânicos, plantas antagonistas, alqueive, revolvimento do solo, controle químico e biológico (BARKER & KOENNING, 1998; GALBIERI et al., 2016). Tais práticas agrícolas tem o objetivo de reduzir a densidade populacional dos fitonematoides e a redução dos impactos do parasitismo sobre as culturas (INOMOTO, 2016)

Para a adoção de estratégias de manejo faz-se necessário o conhecimento da(s) espécie(s) que está presente na área de cultivo, bem como a densidade populacional. A densidade populacional pode ser manejada por uma rotação de culturas bem planejada, uma vez que sem hospedeiro, o fitonematoide não conseguem aumentar o nível populacional (DAVIS; STETINA, 2016). Entretanto a rotação de culturas muitas vezes se torna limitada pelo fator econômico e pela presença de equipamentos agrícolas específicos para determinadas culturas. A escolha de plantas não hospedeiras pode ser dificultada pela presença de mais de uma espécie de fitonematoides na mesma área (INOMOTO, 2016)

O uso de plantas antagonistas como algumas espécies de crotalária (*Crotalaria sp*) mucuna preta, mucuna cinza (*Mucuna sp.*) ou nabo forrageiro (*Brassica sp.*) ocasionam a redução populacional das espécies de fitonematoides (GRIGOLLI; ASMUS, 2013), pois apesar de não apresentarem resistência a penetração dos nematoides, não permitem o desenvolvimento até a fase adulta. Quando incorporadas ao solo, plantas com as crotalárias produzem substâncias tóxicas como a monocrotalina que impedem a movimentação dos juvenis (PINHEIRO et al, 2015).

A utilização de substâncias naturais como extratos vegetais e óleos essenciais também é uma alternativa muito utilizada no manejo de fitonematoides. Espécies como feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis L.*), possui propriedades químicas com potencial nematicida natural (MORILLO; SILVA, 2015). Determinadas plantas possuem substâncias que podem apresentar ação biológica direta contra fitonematoides como alcaloides, ácidos graxos, isotiocianatos, compostos fenólicos, taninos (GARDIANO et al., 2011).

O alqueive, diferentemente do pousio que é a manutenção da área agrícola sem nenhum tipo de manejo durante a entressafra, constitui-se em manter o solo sem a presença de culturas ou plantas infestantes de 20 dias a 3 meses (PINHEIRO et al, 2013). O intuito do alqueive é não fornecer alimento para o fitonematoide se multiplicar na entressafra. No pousio, a densidade de fitonematoides é extremamente variável

(INOMOTO, 2016), pois as plantas invasoras que irão se estabelecer na área podem ser hospedeiras de *Meloidogyne sp.*

A incorporação de adubos orgânicos tem apresentado efeito antagônico aos fitonematoides devido a presença de compostos nematicidas formados com a incorporação do adubo no solo, produção de ácidos orgânicos e amônia que possuem impacto nematicida, além do aumento de microrganismos antagonistas aos nematoides (OKA, 2010). Ainda, segundo este autor, a adição de adubos orgânicos ao solo pode causar tolerância ou resistência da planta ao parasitismo de fitonematoides. Tais vantagens são aliadas ao fornecimento de nutrientes as plantas e condicionantes de propriedades físicas do solo (PINHEIRO et al, 2015).

A utilização de plantas com resistência genética é uma alternativa que possibilita efetividade de controle e é compatível com outras práticas de manejo. Cultivares resistentes têm habilidade de inibir, diminuir ou superar o ataque de fitonematoides (RITZINGER; FANCELLI, 2006). Entretanto, o uso desta tecnologia não deve ser empregada em uso contínuo pois os fitonematoides podem apresentar resistência a tais plantas adquirindo a capacidade de parasita-las (FRANZENER et al., 2005). O uso de plantas resistentes ainda é moderado devido à baixa produtividade quando comparado com cultivares não resistentes a fitonematoides.

O controle químico tem sido cada vez mais restritivo devido a sua alta toxicidade, risco de poluição ambiental, desbalanço biológico e problemas com eficácia de controle à longo prazo (DONG et al., 2004; MACHADO A. C.; KANEKO L.; PINTO Z.V., 2016) e da possibilidade dos compostos químicos causarem a esterilidade de outros agentes microbianos no solo. A consequência deste método de controle resultou em proibições e restrições de várias moléculas empregadas para o este fim (SILVA et al., 2017). Por este motivo, existe uma crescente demanda por produtos menos agressivos à saúde humana e ao ambiente e que sejam efetivos no controle de patógenos do solo, como os fitonematoides.

2.3.1 Controle biológico

Vários estudos têm demonstrado o potencial do controle biológico de fitonematoides em diversas culturas agrícolas. O controle biológico baseia-se na relação antagônica entre um microrganismo e um patógeno (BETTIOL 1991a; LUCON et al. 2014), pode ser definido como a redução da população de microrganismos

patógenos por ação de outros microrganismos (AGRIOS, 2004). Consiste na redução das populações de fitonematoides ou de sua habilidade de se alimentar do sistema radicular das plantas e causar prejuízo ao vegetal (SOARES et al., 2016).

Dentro do mercado de defensivos agrícolas os produtos desenvolvidos de forma biológica, para controle de pragas e doenças, representam 2% do mercado (MACHADO A. C.; KANEKO L.; PINTO Z.V., 2016) com crescente emprego em todas as culturas agrícolas. A adoção do controle biológico de doenças e pragas cresce 10-15% anualmente (LOBO, 2016). Aproximadamente 75% dos antagonistas microbianos já identificados são fungos e 7% são bactérias, encontrados naturalmente nos solos e inócuo às culturas (MACHADO A. C.; KANEKO L.; PINTO Z.V., 2016)

Em relação as bactérias, os gêneros *Pasteuria*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, têm mostrado grande aptidão para o controle de fitonematoides, apresentando diferentes modos de ação, como produção de antibióticos, toxinas ou enzimas, ingerência no reconhecimento do hospedeiro pelo fitonematoide, vitalidade da planta, indução de resistência sistêmica e parasitismo (MACHADO A. C.; KANEKO L.; PINTO Z.V., 2016). Espécies de *Bacillus* são também chamadas de Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) por induzirem o crescimento das plantas (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

Dentre os fungos nematófagos existem os ectoparasitas ou predadores cujo principais representantes são os gêneros *Monacrosporium spp.* e *Arthrobotrys spp.*; Os endoparasitas como *Hirsutella rhossiliensis*, *Catenaria auxiliaris*, *Acrostalagmus spp.*, *Harposporium spp.*, *Myzocytiium spp.* e *Haptoglossa spp.* (CHEN et al., 2004). Os oportunistas ou ovicidas *Pochonia chlamydosporia* e *Paecilomyces lilacinus* e os que produzem metabólitos tóxicos aos nematoides como *Aspergillus spp.*, *Pleurotus spp.*, *Penicillium spp.*, *Trichoderma spp.* e *Myrothecium spp.*.

Existe uma crescente demanda da sociedade por alimentos sem resíduos de agrotóxicos, e menor impacto ao ambiente. Mesmo assim o uso de produtos biológicos ainda é pequeno no Brasil (CAMPANHOLA; BETTIOL, 2003). Mesmo com algumas dificuldades o controle biológico traz inúmeras vantagens em relação ao controle químico pois, agride em escala muito menor o ambiente, não deixa resíduos nos produtos, não favorece o surgimento de fitonematoides resistentes, não causa desequilíbrio de microrganismos no solo por inocular microrganismos benéficos tornando o solo supressivo (SOARES, 2006).

Desta maneira é importante desenvolver pesquisas relacionadas ao controle de fitonematoides de forma menos agressiva ao ambiente e que tenha uma eficiência garantida para que os produtores possam depositar a mesma confiança em produtos biológicos como depositam no controle químico. É relevante salientar que o melhor manejo de pragas agrícolas sempre é a utilização do manejo integrado, utilizando um conjunto de medidas para amenizar os prejuízos causados por pragas como o *Meloidogyne* sp.

2.3.1.1 Fungos

Existem aproximadamente 100.000 espécies de fungos descritas no mundo, mas acredita-se que o número total de espécies fúngicas ultrapasse 1,5 milhões (MADIGAN et al., 2010). No Brasil já foram catalogadas pouco mais de 5.000 espécies (MAIA et al., 2015). A maioria desses organismos vivem no solo ou na matéria orgânica morta e desempenham papel importante no ciclo do carbono e na ciclagem de nutrientes (MADIGAN et al., 2010). Os fungos também exercem atribuição como agentes de controle biológico de patógenos, podendo atuar no controle de doenças causadas por outros fungos, bactérias e nematoides (CHAMBERGO; VALENCIA, 2016).

Os fungos nematófagos, abrangem capacidade de capturar, parasitar ou paralisar nematoides em qualquer estágio de ciclo de vida (MACHADO A. C.; KANEKO L.; PINTO Z.V., 2016). Para isso, possuem diferentes mecanismos de ação, e são separados pela forma como atacam os fitonematoides (BARRON, 1977). A utilização de armadilhas é uma estratégia de ataque, na qual os fungos produzem estruturas em forma de anéis, hifas, botões e redes adesivas ao longo do micélio. Fungos endoparasitas penetram o ovo dos nematoides com suas hifas e expandem seu volume no interior do mesmo. Já os fungos parasitas produzem hifas férteis ou conidióforos com esporos no corpo dos nematoides e se alimentam do fitopatógeno (CARDOSO, 2007). Na antibiose o fungo produz uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a reprodução do nematoide no ambiente ou na planta (LUCON, C.M.; CHAVES A. L.; BACILIERI S. 2014),

Os filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* são os mais estudados atualmente para utilização biotecnológica. Inserido no Filo *Ascomycota*, o gênero *Trichoderma* possui mais de cem espécies conhecidas (LUCON, C.M.; CHAVES A. L.; BACILIERI S.

2014). O *Trichoderma* é um fungo filamentosos; suas colônias crescem rapidamente e apresenta superfície lisa quase translúcida que com o tempo tornam-se flocosas ou compactas; possuem coloração esverdeada, comumente chamado de bolor ou mofo.

2.3.1.1.1 *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma* spp. são amplamente distribuídos mundialmente, presentes em materiais celulósicos, preferem solos ricos em matéria orgânica, mas não se limitam a esta condição (JAKLITSCH, 2009). Estes fungos são colonizadores de diversos habitats, desde locais com alta diversidade como uma floresta tropical, até ambientes laboratoriais como um fermentador biotecnológico ou placa Petri (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010). A colonização bem-sucedida de um habitat depende do potencial para defender o nicho ecológico e prosperar apesar da concorrência por nutrientes, espaço e luz, o *Trichoderma* spp. utiliza eficientemente o local no qual está inserido através da alta capacidade de secreção de metabólitos e enzimas antibióticas (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010), responde rapidamente aos variados estímulos do ambiente, como a luminosidade e temperatura e possui habilidade de se desenvolver numa ampla faixa de pH do solo (CARRERAS-VILLASENOR; SANCHEZ-ARREGUIN; HERRERA-ESTRELLA, 2012) .

O gênero *Trichoderma* possui alto potencial biotecnológico (BALDONI, 2016) e é eficaz contra diversos fitopatógenos, principalmente os de solo, como *Sclerotinia*, *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp (HADDAD, 2014; NAWROCKA; SZCZEC; MAŁOLEPSZA, 2017), e fitonematoides (HAMZA et al., 2017; JINDAPUNNAPAT; CHINNASRI; KWANKUAE, 2013; SILVA et al., 2017). O gênero *Trichoderma* spp. é um dos muitos fungos com propriedades de controle sob fitonematoides que se destaca pelas múltiplas formas de exercer o controle biológico, seja por antagonismo, competição, micoparasitismo, produção de metabólitos tóxicos e produção de enzimas extracelulares (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010). Além disto o *Trichoderma* pode induzir resistência sistêmica nas plantas, tornando-as mais fortes contra o ataque de patógenos (HADDAD, 2014).

No gênero *Trichoderma* são observados produção de micotoxinas e mais de 100 metabólitos com atividade antibiótica incluindo policétides, pironas, terpenos, metabólitos derivados de aminoácidos e polipéptidos (SIVASITHAMPARAM; GHISALBERTI 1998). Demonstram produzir também uma ampla gama de compostos

orgânicos voláteis (STOPPACHER et al., 2010). O primeiro relato sobre a produção de metabólitos tóxicos ocorreu em 1934, por Weindling.

Assim, o gênero *Trichoderma* é intensamente estudado principalmente pelo fato de produzir enzimas líticas extracelulares degradadoras de parede celular de fungos, tais como quitinases, β -1, 4-glucanases e proteases (CORABI-ADELL; LUCON, 2002). A capacidade do *Trichoderma* spp. em degradar quitina permite a sua aplicação no controle de fitonematoides (FREITAS, 2011; GALBIERI; ASMUS, 2016). Essa habilidade é uma das principais armas do *Trichoderma* spp., pois a quitina é o principal constituído do ovo de fitonematoides (SANTIN, 2008; MACHADO A. C.; KANEKO L.; PINTO Z.V., 2016).

O uso de espécies de *Trichoderma* spp. no controle biológico de fitonematóides depende de uma vasta compreensão deste fungo, e uma implementação bem sucedida depende da compatibilidade entre o isolado fúngico, seu hospedeiro e também a cultivar (AL-HAZMI; TARIQJAVEED, 2016). Muitos artigos foram publicados sobre *Trichoderma* spp. no controle de *Meloidogyne* sp. com resultados satisfatórios (AFFOKPON et al., 2011a; HAMZA et al., 2017; SAHEBANI; HADAVI, 2008).

Estudos apontam que o uso de *Trichoderma* spp. contribui para diminuir a massa de ovos (ZHANG; GAN; XU, 2015), a reprodução do fitonematoide (ovos, J2, e FR) (AL-HAZMI; TARIQJAVEED, 2016) e o número de nematoides nas raízes (JINDAPUNNAPAT; CHINNASRI; KWANKUAE, 2013). Além do controle biológico a interação do fungo *Trichoderma* spp. com a planta promove outras vantagens como uma maior resistência a patógenos; aumento da eficiência fotossintética; elevada absorção de nutrientes devido a produção de ácidos orgânicos (como ácido cítrico, fumárico e glucônico que promove a solubilização de micronutrientes), fosfatos e cátions minerais como o ferro (ASADUZZAMAN; ALAM; ISLAM, 2013) indução de resistência sistêmica a doenças (RYDER et al., 2012); produção de vitaminas, hormônios como auxinas, giberelinas; aumento da absorção de água pelo maior volume de raiz, maior crescimento radicular pela produção de proteína rica em cisteína capaz de mudar a arquitetura da raiz (MOREIRA, 2014). Outro benefício proporcionado por isolados de *Trichoderma* spp. é o aumento da resistência a estresses bióticos e abióticos nas plantas (HADDAD, 2014), através da melhor absorção de água e nutrientes tornando a planta mais forte e saudável.

A demanda por produtos que contribuam para uma agricultura mais sustentável e amigável ao ambiente é cada vez maior. Uma alternativa é o uso de controle biológico através de fungos, especialmente *Trichoderma* spp. que podem ser utilizados no controle de diversos fitopatógenos, como fungos patógenos de solo e fitonematoides incluindo o gênero *Meloidogyne* sp., que causam grande prejuízo à agricultura (HADDAD, 2014).

2.4 MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES

A microbiolização, também conhecida como controle biológico via tratamento de semente, refere-se a aplicação de microrganismos vivos às sementes para o controle de doenças, parasitas, inclusive os fitonematoides, e/ou para promover o crescimento de plantas (MELO, 1996). O controle biológico via microbiolização apresenta vantagens de estabelecimento, pois o processo de germinação de sementes libera exsudados de carboidratos e aminoácidos, e os organismos introduzidos com as sementes no solo utilizam os exsudatos como fonte nutricional e colonizam as raízes rapidamente (PACHECO et al, 2014). O ambiente de emergência da semente é propício para o estabelecimento tanto de microrganismos benéficos como patógenos, além disso, o contato direto do fungo com a semente pode influenciar a germinação e crescimento de plântulas.

Sementes de soja tratadas com fungicidas químicos e bioprotetores à base de *Trichoderma* spp. e *Bacillus pumilus* foram avaliadas quanto a emergência e estatura de plantas (MERTZ; HENNING; ZIMMER, 2009). O uso de *Trichoderma harzianum*, em sementes de algodão comparado a tratamentos fúngicos de carboxin+thiram, carbendazin+thiram e flutolanil apresentou porcentagem estatisticamente superior à testemunha na germinação, no vigor das sementes e na promoção de crescimento de plântulas de algodão (FARIA et al., 2003).

Um dos benefícios dessa prática são a otimização de operacionalidade, pois evita a entrada adicional na lavoura, a melhoria na eficiência de controle e da redução da poluição do ambiente (LUZ, 2003). Através do controle biológico via microbiolização das sementes ocorre o rápido estabelecimento de organismos no solo. Cada organismo manifesta um potencial de conter naturalmente os patógenos do solo. Por isso a importância de conhecer e aplicar práticas agrícolas que estimulem

a sobrevivência e a multiplicação de organismos (BETTIOL; MORANDI, 2009). E aliar a técnica de microbiolização ao controle biológico de fitonematoides.

2.5 FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A DAS PLANTAS DE SOJA

Os atributos fisiológicos como a emissão da fluorescência da clorofila *a* são parâmetros importantes à serem mensurados, pois demonstram com confiança as alterações no metabolismo das plantas causadas por algum estresse (CAMPOE et al., 2014; COOKE; SUSKI, 2008). Esta avaliação fornece informações qualitativas e quantitativas sobre o processo fotossintético das plantas, por meio não destrutivo, preciso e rápido (CORREA et al., 2010).

A análise dos atributos da fluorescência da clorofila *a* permite diagnosticar o efeito de diferentes tipos de estresse na planta (BAKER, 2008). Isso é possível porque durante a fotossíntese, parte da energia luminosa absorvida pelos pigmentos cloroplastídicos da folha são transmitidas como fluorescência (GLYNN et al., 2003). A fluorescência da clorofila *a* é uma via de dissipação da energia luminosa excedente, na qual ocorre a emissão da radiação na região do visível (TAIZ; ZEIGER, 2013). Dessa maneira, essa variável tem sido utilizada para avaliar o efeito de fatores que ocasionam estresse sobre o metabolismo fotossintético da planta, pois quanto maior for esse valor, maior a quantidade de energia que não está sendo convertida em foto assimilados (RITCHIE et al., 2010).

A emissão de fluorescência da clorofila *a* representa a perda de energia, o que permite avaliar o efeito de estresses sobre a fotossíntese (ZANANDREA, 2006). A partir disso, são estimados atributos referentes ao desempenho funcional do fotossistema II (PSII) como a fluorescência inicial (F_0), a fluorescência máxima (F_m), a fluorescência variável (F_v), e a relação entre esses parâmetros, como a eficiência quântica do PSII (F_v/F_m e F_v/F_0), e a taxa de transporte de elétrons (ETR) (KRAUSE; WEISS, 1991).

Dessa maneira, em plantas de soja torna-se importante realizar esse tipo de avaliação, pois alterações importantes no processo fotossintético podem ocorrer devido a menor capacidade das raízes infectadas por fitonematoides suprir a parte aérea da planta (HUSSEY et al. 1998) e isso pode ser diagnosticado antes do surgimento de sintomas morfológicos como perda de produção de matéria seca e produtividade. Entretanto, pouco se sabe sobre a influência do gênero *Trichoderma*

spp. microbiolizado nas sementes de soja sob os parâmetros da clorofila *a*. Por isso ressalta se a importância de avaliar parâmetros de clorofila *a* em plantas submetidas a estresse ocasionados por *Meloidogyne* sp. na presença de *Trichoderma* spp

3 HIPÓTESES

“A utilização de fungos *Trichoderma* via microbiolização de sementes de soja é eficaz na supressão de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*”.

“A microbiolização de sementes de soja com *Trichoderma* auxilia no estabelecimento da cultura, massa seca radicular e aérea e atributos da clorofila a da planta de soja”.

4 OBJETIVOS

1. Isolar, caracterizar e identificar fungos do gênero *Trichoderma* de solos contaminados por fitonematoides.
2. Aplicar a técnica de microbiolização de sementes com os isolados fúngicos para restringir o desenvolvimento de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*.
3. Comprovar a eficiência do gênero *Trichoderma* na supressão de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*.
4. Avaliar a clorofila a de plantas de soja com presença de nematoides e fungos em condição de casa de vegetação.

5 CAPÍTULO I: *Trichoderma* NA SUPRESSÃO DE *Meloidogyne incognita* EM PLANTAS DE SOJA

RESUMO

Meloidogyne incognita é um dos principais fitonematoides encontrados no solo, parasitando diversas culturas, inclusive a soja, reduzindo o rendimento da cultura em até 80% nos casos mais severos. Dessa maneira, torna-se necessário desenvolver medidas de controle eficazes e ambientalmente adequadas para suprimir esse fitopatógeno. O objetivo do trabalho foi avaliar a supressão de *M. incognita* no desenvolvimento da cultura da soja após a microbiolização das sementes com dois isolados de *Trichoderma* spp. Foram testados dois isolados de fungo UFSMQ1, UFSMQ36, em sementes de soja cultivar Nidera 5909, em três doses de inóculo, $0,25 \times 10^8$, $1,25 \times 10^8$ e $2,50 \times 10^8$ por $50g^{-1}$ de sementes. O *Trichoderma* UFSMQ36 $1,25 \times 10^8$ favoreceu a maior produção de matéria seca radicular e matéria seca da parte aérea no estágio fenológico R5, e resultou em maiores médias dos parâmetros da fluorescência clorofila *a*. A supressão de *Meloidogyne incognita* foi efetiva com a utilização do inóculo *Trichoderma* UFSMQ36 na dose $2,50 \times 10^8$.

Palavras chave: Fungos - Nematoides de Galha – Biocontrole.

5 CHAPTER I: Trichoderma IN THE SUPPRESSION OF *Meloidogyne incognita* IN SOYBEAN PLANTS

ABSTRACT

Meloidogyne incognita is one of the main plants-parasitic nematodes found in soil, parasitizing diverse cultures. The soybean crop can suffer losses of yield up to 80% in the most severe cases of infestation by this pathogen. Then, it becomes necessary to develop effective and environmentally adequate control measures to suppress this phytopathogen. The objective of this work was to evaluate the suppression of *M. incognita* in the development of soybean culture after the microbiolization of the seeds with two isolates of *Trichoderma* spp. Two fungal isolates UFSMQ1, UFSMQ36, were tested in Nidera 5909 soybean seeds at three inoculum doses, 0.25×10^8 , 1.25×10^8 and 2.50×10^8 per 50g^{-1} of seeds. The isolated of *Trichoderma* UFSMQ36 $1,25 \times 10^8$ favored the higher dry matter of roots and shoots in the phenological stage R5, and resulted in higher averages of chlorophyll a fluorescence parameters. The suppression of *M. incognita* was effective with the use of the isolated *Trichoderma* UFSMQ36 at 2.50×10^8 dose.

Key words: Fungus - Root gall nematodes - Biological control.

5.1 INTRODUÇÃO

Os fitonematoides do gênero *Meloidogyne*, conhecidos como nematoides de galhas são parasitas obrigatórios presentes em todas as regiões agrícolas do mundo, e infectam uma grande variedade de culturas (TRUDGILL; BLOK, 2001). No Brasil, a ação destes organismos tem ocasionado reduções significativas nas culturas, principalmente na cultura da soja (DALLA CORTE, 2013).

Diversas alternativas de controle são propostas, porém a maioria é dificultada por diversos fatores como o tipo de habitat (solo e o interior da raiz), características morfológicas (presença de cutícula resistente) e o hábito polífago (SOARES et al., 2016). O controle químico é o método mais utilizado atualmente, no entanto apresenta custo elevado, não possui comprovada eficiência, e pode gerar poluição ambiental (LEONETTI et al., 2017). Assim, o controle biológico através do uso de parasitoides, parasitas, predadores, patógenos bem como os metabólitos produzidos por estes organismos, surge como uma alternativa de baixo custo, reduzido impacto ambiental, e com relativa eficiência para o controle de fitonematoides.

Fungos nematófagos são de grande interesse para o biocontrole (HAMZA et al., 2017). Fungos do gênero *Trichoderma* são reconhecidos por sua capacidade antagonista no controle de fitonematoides, através de diferentes mecanismos de ação, como por exemplo, a produção de compostos orgânicos que atuam na deterioração de membranas ou na desativação de enzimas específicas (STOPPACHER et al., 2010). Além disso, este gênero apresenta fácil adaptação a diferentes condições ambientais, produção e secreção de enzimas hidrolíticas como quitinases e proteases, atuando no controle dos fitonematoides através do rompimento da cutícula destes organismos (DE LIMA et al., 2017).

O *Trichoderma* também proporciona benefício às plantas por meio da sua capacidade de produção de hormônios de crescimento como o ácido indolacético (FILHO et al., 2008) e a produção de sideróforos (HOYOS-CARVAJAL; ORDUZ; BISSETT, 2009) usados para a solubilização de muitos nutrientes do solo. Na interação *Trichoderma* e planta numerosos elicitores são liberados pelas hifas do fungo como ácido jasmônico ou ácido salicílico que podem provocar a ativação de defesa da planta (NAWROCKA; MAŁOLEPSZA, 2013).

Diversos estudos já demonstraram a ação do *Trichoderma* no controle biológico de fitonematoides. SOKHANDANI; MOOSAVI; BASIRNIA, (2016) avaliaram o efeito de diferentes níveis de inóculo de um isolado indígena de *T. longibrachiatum* contra *M. javanica* em plantas de abobrinha, e verificaram que na presença do fungo houve redução de 15% no fator de reprodução do fitonematoide. Plantas de soja apresentaram 53% menos massa de ovos de *M. incognita* quando tratadas com *Trichoderma pseudokoningii* (OYEKANMI et al., 2007). A ação do *Trichoderma* como promotor do crescimento e indução de resistência sistêmica é reportado por TOGHUEO et al., (2016) onde *T. atroviridae* em planta de feijão otimizou parâmetros agronômicos, comprimento da raiz e peso fresco da raiz.

No entanto, ainda existe a necessidade de elucidar a eficiência do uso de fungos no controle de fitonematoides na cultura da soja. Deste modo, a hipótese deste trabalho é que fungos do gênero *Trichoderma*, isolados a partir de solos contaminados com nematoides, reduzem os danos causados pelos fitonematoides na cultura da soja. O objetivo do trabalho foi avaliar a supressão de *Meloidogyne incognita*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Inóculo de *Meloidogyne incognita*

O inóculo do nematoide constituiu-se de uma população pura de *M. incognita* multiplicada em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) da cultivar Santa Cruz de Kada. O preparo do inóculo foi realizado pelo tritramento das raízes conforme técnica descrita por Hussey; Barker (1973). As raízes foram lavadas em água corrente para retirada do solo aderido. Em seguida, foram cortadas em pedaços de 1 cm e colocadas em liquidificador, onde foram trituradas por 1 minuto em uma solução de hipoclorito de sódio 0,1%. Logo após, o material foi vertido em peneiras de 20 e 500 mesh (0,8 e 0,025 mm) e lavado com água. O material retido na peneira foi recolhido em um béquer, quantificado e realizada a inoculação nos vasos com plântulas de soja. Os ovos de nematoides foram obtidos conforme a metodologia de Hussey; Barker (1973) e a suspensão de nematoides no estágio de desenvolvimento J2 foi obtida a partir da câmara de incubação com papel de seda.

5.2.2 Obtenção dos fungos

Foram coletadas amostras de Argissolo Vermelho – Amarelo (EMBRAPA, 2013) na região de Santa Maria (29°43'6" S, 53°42'31" O), com incidência de nematoides, que foram levadas para o laboratório, onde foram transferidas para placas de Petri. Nas mesmas placas de Petri foram adicionados juvenis de nematoides do gênero *Meloidogyne*. Esses nematoides foram adicionados as placas em torno do solo contaminado para possibilitar melhor visibilidade da possível infecção de fungos nematófagos.

À placa de Petri adicionou-se um meio composto de água, ágar 2% e 0,05% de sulfato de estreptomicina. As placas de Petri foram acondicionadas em estufa a 26° C por 10 dias. Durante esse período os fungos presentes na amostra de solo com capacidade de infecção em fitonematoides formaram hifas sob os nematoides. As hifas de fungos que cresceram sob os nematoides foram transferidas para placas de Petri com meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (BDA). Método de espalhamento de solo adaptado de (DUDDINGTON, 1955, modificado por BARRON, 1977; SANTOS *et al.*, 1991;).

As placas com inóculos de fungos foram incubadas a 28 °C com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. As culturas foram repicadas até a obtenção de culturas puras e armazenadas a 4 °C no banco de fungos do Laboratório de Biologia e Microbiologia do Solo - Professor Marcos Rubens Fries, da Universidade Federal de Santa Maria. Além destes fungos, foi utilizado um fungo quitinolíticos (UFSMQ36) do banco de fungos deste mesmo laboratório, que foi isolado de percevejos mortos (BALDONI *et al.*, 2013).

A suspensão de conídios foi obtida após o crescimento dos fungos em meio de cultura contendo 50 g de arroz e 29 mL de água destilada, 8 mL de meio salino de macronutrientes (Cloreto de Cálcio 0,8 g/L, Sulfato de Magnésio 0,4g/L, Sulfato de Potássio 1,4g/L, Nitrato de Amônio 0,2g/L, Fosfato monopotássico 0,2g/L e Extrato de Levedura 0,2g/L), esterilizado a 121 ° C durante 30 min. O meio de cultura foi inoculado com fungos (1 cm). Após as culturas foram incubadas em BOD a 25 ± 2 °C, fotoperíodo de doze horas de luz e escuro, durante sete dias (PAPAVIZAS; LEWIS; MOITY, 1982). Os conídios foram removidos por adição de 100 mL de Tween® 80 (0,01%) ao meio de cultura, e a quantidade de inóculo foi estimada numa

câmara de Neubauer. Posteriormente, a solução foi ajustada para 1×10^8 conídios ml^{-1} .

5.2.3 Teste de germinação de sementes e microbiolização de sementes

O teste de germinação de sementes foi realizado antes e após a microbiolização. Foram utilizadas 200 sementes para cada tratamento, divididas em quatro repetições de 50 sementes, semeadas em rolo de papel umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa seca do papel. Os rolos, contendo as sementes, foram mantidos em germinador, a 25 °C e fotoperíodo de 12 h. Foram realizadas duas contagens, aos cinco e oito dias, e obteve-se o percentual de germinação de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

As sementes foram desinfestadas com solução de álcool etílico 70% por 1 minuto seguido de hipoclorito de sódio 2,5% por 4 minutos, e três banhos em água destilada e esterilizada (MEHTA et al., 2005). Logo após, as sementes foram secas em ambiente estéril por 48 h. Após a esterilização, as sementes foram microbiolizadas em câmara de fluxo laminar. As sementes foram embebidas com as respectivas doses com suspensão de fungos, inoculante bacteriano biológico (*Bradyrhizobium japonicum*) e polímero Collor Seed® He Verde. O polímero foi aplicado conforme recomendação do fabricante, 50 mL do produto para cada 100 kg de sementes, com a finalidade de garantir que todas as sementes fossem recobertas com os isolados fúngicos, através da fácil visualização do polímero.

5.2.4 Delineamento experimental

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 12 repetições, sendo que seis repetições foram usadas para avaliação aos 13 dias após inoculação de *M.incognita*, e seis repetições para avaliações aos 60 dias após a inoculação de *M.incognita*. Em esquema unifatorial com sete tratamentos. Seis tratamentos com as espécies de fungos antagonistas UFSMQ1 e UFSMQ36 em combinação com três doses $0,25 \times 10^8$, $1,25 \times 10^8$ e $2,50 \times 10^8$ conídios para cada 50 g de semente de soja, além disso foi acrescentado o tratamento testemunha sem *Trichoderma* spp., apenas suspensão de nematoides e água.

5.2.5 Atributos do solo e cultivo das plantas

Um solo de textura arenosa, classificado como um Argissolo Vermelho - Amarelo (EMBRAPA, 2013), foi coletado na camada de 0-20 cm de profundidade, excluindo-se os resíduos vegetais da superfície, em uma área de pastagem nativa, sem histórico de cultivo, no campus da UFSM na cidade de Santa Maria – RS.

Após a coleta, o solo foi autoclavado, durante 1,5 hora a 121°C, seco à temperatura ambiente, peneirado e separado em vasos, contendo 4 kg de solo e 0,5 Kg de substrato comercial a base de turfa *sphagnum* e vermiculita. O solo utilizado no estudo apresentou: argila (método pipeta) 190 g kg⁻¹; matéria orgânica (Walkley-Black) 15 g kg⁻¹; pH (água 1:1) 4,9; P (Mehlich-1) 14,6 mg dm⁻³; K (Mehlich-1) 44 mg dm⁻³; Mg 0,5 (Mehlich-1); Ca 1,7 mg dm⁻³ (Mehlich-1); Al trocável (Mehlich-1) 0,7 mg dm⁻³; saturação por bases 25,3%. A análise química de solo foi realizada pelo Laboratório de Análise de Solos UFSM (Apêndice 1).

Após o tratamento das sementes, o estudo foi conduzido em casa de vegetação. Na semeadura foram utilizados vasos de poliestireno (capacidade para 5L) com solo e substrato (8:1). A adubação foi realizada conforme as recomendações da Comissão de Química e Fertilidade do Solo - RS/SC (2016). A semente de soja utilizada foi Nidera 5909. A semeadura foi realizada com oito sementes microbiolizadas por vaso. Aos 8 dias inoculou-se na região da rizosfera, próximo ao colo, suspensão aquosa contendo 1.000 juvenis de segundo estágio da espécie de *M. incognita*. Durante o período experimental, as temperaturas máximas e mínimas (°C) foram monitoradas diariamente por meio de termômetro (Incoterm®).

5.2.6 Parâmetros de dano do *Meloidogyne incognita* na planta

Aos 13 dias após a inoculação foi avaliada a penetração de *M. incognita* no sistema radicular. Para tanto, as raízes foram separadas da parte aérea, lavadas cuidadosamente, clarificadas e coloridas pela metodologia descrita por Bybd Jr; Kirkpatrick; Barker; (1983).

Após 60 dias da inoculação, foram determinados o índice de galhas e o fator de reprodução do fitonematoide (Equação 1). Também foram avaliados o número de galhas e o número de massas de ovos no sistema radicular. Para possibilitar a contagem do número de massas de ovos, as raízes foram lavadas sob água corrente

e imersas por 15 minutos em solução de Floxina B 0,0015% para coloração e melhor visualização das massas de ovos.

Equação 1. Fator de reprodução (FR)

$$FR = \frac{P_f}{P_i} \quad (1)$$

Onde: FR é o Fator de reprodução de nematoides

Pf é a população final de nematoides

Pi é a população inicial de nematoides

5.2.7 Estabelecimento, produção de matéria seca e fluorescência da clorofila *a*

O Índice de Velocidade de Germinação (IVG) foi determinado no quinto, oitavo e décimo terceiro dia após a emergência das plântulas de soja, sendo calculado pela (Equação 2). Aos dez dias após a emergência foi determinado a porcentagem de germinação de plântulas de soja.

Equação 2. Índice de velocidade de Germinação (IVG)

$$IVG = \sum \left(\frac{n_i}{t_i} \right) \quad (2)$$

Onde: ni = número de sementes que germinaram no tempo 'i';

ti = tempo após instalação do teste;

i = 1

Aos 13 dias após a inoculação dos fitonematoides foi determinado a matéria seca da parte aérea e o peso seco radicular. Ao final do experimento (70 dias) foi avaliado novamente a matéria seca da parte aérea da cultura.

A fluorescência da clorofila *a* foi mensurada aos 60 dias após a emergência (R3) com um fluorômetro portátil de luz modulada JUNIOR-PAM (Walz, Effeltrich, Germany), no período entre 8:00 e 10:00 horas. Para as medições utilizou-se uma folha de soja por repetição, sendo essas pré-adaptadas no escuro pelo período de 30 minutos para medição da fluorescência inicial (F₀). Depois, as folhas foram submetidas a um pulso de luz saturante (10000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 0,6 s para avaliar a fluorescência

máxima (F_m), enquanto o rendimento quântico máximo PSII (F_v/F_m) e a taxa de transporte de elétrons (ETR_m) foram avaliados utilizando a curva de indução de fluorescência.

5.2.8 Análise estatística

Os resultados expressos em valores contínuos que seguiram a normalidade e homogeneidade foram analisados por ANOVA em análise uni fatorial com teste Scott Knott e teste T a 5%. As variáveis que não seguiram os pressupostos de normalidade e homogeneidade foram transformados para $(x + 1)^{0,5}$. As variáveis germinação e índice de velocidade e de germinação foram avaliadas pelo teste Kruskal Wallis. As análises foram realizadas com auxílio do pacote ExpDes do software R, versão 3.1.3.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Parâmetros de dano do *Meloidogyne incognita*

Verificou-se que ocorreu diferença estatisticamente significativa para as variáveis penetração do *M. incognita* de segundo estágio no sistema radicular ($p=0,0005$), número de massa de ovos ($p=0,0024$) e fator de reprodução ($p=0,0006$).

Tabela 1. Número de juvenis penetrados de *Meloidogyne incognita* em plantas de soja inoculadas com *Trichoderma*.

| Fungo | Dose** | Penetração*** |
|------------|----------------------|---------------|
| | | nº ind /raiz |
| UFSM Q1 | 0,25x10 ⁸ | 7,25 b* |
| | 1,25x10 ⁸ | 17,25 a |
| | 2,50x10 ⁸ | 11,00 b |
| UFSM Q36 | 0,25x10 ⁸ | 7,50 b |
| | 1,25x10 ⁸ | 9,00 b |
| | 2,50x10 ⁸ | 11,00 b |
| Testemunha | | 14,87 a |
| CV% | | 14,23 |

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p<0,05$);

**Suspensão de conídios de *Trichoderma* em 50 g⁻¹ de semente.

*** Número de Juvenis Penetrados por raiz.

Fonte: O Autor (2018).

Para a variável penetração do sistema radicular o tratamento UFSMQ1 $1,25 \times 10^8$ conídios diferiu significativamente dos demais tratamentos, apresentando o maior número de penetração de juvenis de segundo estágio de *M. incognita*, não diferindo estatisticamente do tratamento controle. Os demais fungos apresentaram menor número de indivíduos nas raízes, porém não diferiram estatisticamente entre si.

O menor número de massa de ovos foi encontrado nos tratamentos UFSMQ36 e UFSMQ1 ambos $2,50 \times 10^8$ (Tabela 2). Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p=0,1976$) entre os tratamentos para número de galhas. O tratamento UFSMQ36 $2,50 \times 10^8$ obteve o menor fator de reprodução (FR) de *M. incognita*, 4 vezes menos que o tratamento controle, mostrando ser eficiente na supressão deste patógeno. A adição das doses crescentes independente dos fungos reduziram o FR e massa de ovos (Tabela 2).

Tabela 2. Número de Galhas (NG), número de massa de ovos (NMO) e fator de reprodução (FR) de *Meloidogyne incognita* em plantas de soja submetidas à isolados de *Trichoderma*.

| Fungo | Dose** | NG | NMO | FR |
|------------|--------------------|--------|--------|--------|
| UFSM Q1 | $0,25 \times 10^8$ | 1,4 a* | 17,6 a | 3,31 a |
| | $1,25 \times 10^8$ | 2,0 a | 18,4 a | 2,47 a |
| | $2,50 \times 10^8$ | 1,0 a | 11,0 a | 2,35 a |
| UFSM Q36 | $0,25 \times 10^8$ | 3,6 a | 16,8 a | 1,48 b |
| | $1,25 \times 10^8$ | 2,5 a | 16,2 a | 1,87 b |
| | $2,50 \times 10^8$ | 2,6 a | 4,2 b | 0,59 c |
| Testemunha | 0,00 | 3,6 a | 20,6 a | 3,04 a |
| CV % | | 29,74 | 20,97 | 15,64 |

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$);

**Suspensão de conídios em 50 g^{-1} de semente.

Fonte: O Autor (2018).

A utilização dos tratamentos com *Trichoderma*, mostrou-se eficiente na redução de danos às plantas de soja pelo *M. incognita*. O fungo UFSMQ36 apresentou maior eficiência no parâmetro FR quando comparado ao fungo UFSMQ1 pelo teste T (Tabela 3).

Tabela 3. Número de juvenis penetrados, número de galhas (NG), número de massa de ovos (NMO) e fator de reprodução (FR) de *Meloidogyne incognita* em plantas de soja submetidas à isolados de *Trichoderma*.

| Isolados | Penetração** | NG | NMO | FR |
|----------|--------------|--------|---------|--------|
| UFSMQ1 | 11,80 a* | 1,46 a | 15,66 a | 2,71 a |
| UFSMQ36 | 9,16 a | 2,94 a | 12,40 a | 1,31 b |

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de T ($p < 0,05$);

** Número de Juvenis Penetrados

Fonte: O Autor (2018).

5.3.2 Estabelecimento da cultura, produção de matéria seca e atributos fisiológicos

Independente do fungo e das doses aplicadas, houve redução do índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de germinação em relação ao tratamento controle (Tabela 4). O tratamento controle obteve um IVG e germinação 64% e 53% maiores, respectivamente, do que a média observada nos demais tratamentos que foi de 38% e 39%. Verificou-se que o tratamento UFSMQ1 $0,25 \times 10^8$ apresentou maior IVG e germinação (Tabela 4).

Tabela 4. Germinação (%) e Índice de velocidade de germinação de plantas de soja inoculadas com *Meloidogyne incognita* submetidas à isolados de *Trichoderma*.

| Fungo | Dose** | IVG | % Germinação |
|------------|--------------------|----------|--------------|
| UFSM Q1 | $0,25 \times 10^8$ | 0,52 ab* | 65 ab |
| | $1,25 \times 10^8$ | 0,47 b | 60 abc |
| | $2,50 \times 10^8$ | 0,47 b | 59 abc |
| UFSM Q36 | $0,25 \times 10^8$ | 0,47 bc | 57 bcd |
| | $1,25 \times 10^8$ | 0,32 d | 49 d |
| | $2,50 \times 10^8$ | 0,34 cd | 47 cd |
| Testemunha | | 0,61 a | 74 a |

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de KRUSKAL-WALLIS ($p < 0,05$);

**Suspensão de conídios em 50 g^{-1} de semente.

Fonte: O Autor (2018).

Verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) para as variáveis matéria seca radicular (MSR) ($p = 0,0021$), matéria seca da parte aérea (MSPA) aos 22 dias após emergência (DAE) ($p < 0,0001$) e matéria seca da parte aérea (MSPA) aos 80 DAE ($p = 0,0033$) (Tabela 5). O tratamento testemunha apresentou maior produção de

MSPA e MSR aos 22 DAE. Seguido do tratamento UFSMQ36 $0,25 \times 10^8$ que apresentou a segunda maior MSPA diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos, para a variável MSPA aos 22 DAE. A MSR para os tratamentos UFSMQ1 $0,25 \times 10^8$ e UFSMQ36 $1,25 \times 10^8$ não apresentaram diferença do tratamento testemunha, o qual apresentou maior acúmulo de MSR. A variável MSPA, aos 80 DAE, mostrou que o tratamento UFSMQ36 $2,5 \times 10^8$ apresentou matéria seca equivalente ao tratamento testemunha, e ao tratamento UFSMQ36 $1,25 \times 10^8$.

Tabela 5. Matéria seca radicular (MSR) e matéria seca da parte aérea (MSPA) aos 22 dias após emergência (DAE), e MSPA aos 80 DAE de plantas de soja inoculadas com *Meloidogyne incognita* submetidas à isolados de *Trichoderma*.

| Fungo | Dose** | MSPA | | MSR 22 DAE |
|------------|--------------------|----------|--------|------------|
| | | 22 DAE | 80 DAE | |
| UFSM Q1 | $0,25 \times 10^8$ | 0,376 c* | 6,25 b | 0,228 a |
| | $1,25 \times 10^8$ | 0,380 c | 7,72 b | 0,186 b |
| | $2,50 \times 10^8$ | 0,357 c | 5,99 b | 0,176 b |
| UFSM Q36 | $0,25 \times 10^8$ | 0,427 b | 7,70 b | 0,172 b |
| | $1,25 \times 10^8$ | 0,357 c | 9,96 a | 0,236 a |
| | $2,50 \times 10^8$ | 0,367 c | 9,44 a | 0,165 b |
| Testemunha | | 0,495 a | 9,16 a | 0,270 a |

*Médias seguidas pelas mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$);

**Suspensão de conídios em 50 g^{-1} de semente.

Fonte: O Autor (2018).

Tabela 6. Matéria seca radicular (MSR) e matéria seca da parte aérea (MSPA) aos 22 dias após emergência (DAE), e MSPA aos 80 DAE de plantas de soja inoculadas com *Meloidogyne incognita* submetidas à isolados de *Trichoderma*.

| Isolados | MSR 22 DAE | MSPA 22 DAE | MSPA 80 DAE |
|----------|------------|-------------|-------------|
| UFSMQ1 | 0,19 a* | 0,37 a | 6,61 b |
| UFSMQ36 | 0,19 a | 0,38 a | 9,01 a |

*Médias seguidas pela mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de T ($p < 0,05$);

Fonte: O Autor (2018).

Aos 22 DAE, observou-se que as plantas microbiolizadas com *Trichoderma* (UFSMQ1 e UFSMQ36) apresentaram em média 70% menos de MSR e 75% de MSPA do que as plantas cultivadas no tratamento testemunha, evidenciando que o *Trichoderma* pode ter causado fito toxidez nas sementes de soja. O tratamento

UFSMQ36 teve melhor influência sobre a variável MSPA aos 80 DAE do que o fungo UFSMQ1, com 50 % mais massa seca (Tabela 6).

Os tratamentos promoveram mudanças significativas nos parâmetros da fluorescência da clorofila *a*. Verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) para as variáveis taxa de transporte de elétrons (ETRm) ($p < 0,0001$), fluorescência inicial (F_o) ($p = 0,0001$) e rendimento quântico máximo (F_v/F_m) do fotossistema II (PS II) ($p = 0,0003$) (Tabela 7).

Tabela 7. Taxa de transporte de elétrons (ETRm), fluorescência inicial (F_o), fluorescência máxima (F_m) e rendimento quântico máximo (F_v/F_m) de plantas de soja inoculadas com *Meloidogyne incognita* submetidas à isolados de *Trichoderma*.

| Fungo | Dose** | Etrm | Fo | Fm | Fv/Fm |
|------------|----------------------|----------|---------|-----------|---------|
| UFSM Q1 | 0,25x10 ⁸ | 105,0 b* | 504,0 a | 1123,33 a | 0,646 a |
| | 1,25x10 ⁸ | 110,6 b | 502,0 a | 1035,50 a | 0,498 b |
| | 2,50x10 ⁸ | 137,7 a | 393,3 b | 1029,67 a | 0,615 a |
| UFSM Q36 | 0,25x10 ⁸ | 118,1 b | 558,3 a | 1134,66 a | 0,507 b |
| | 1,25x10 ⁸ | 146,5 a | 360,5 b | 1117,57 a | 0,677 a |
| | 2,50x10 ⁸ | 111,4 b | 389,0 b | 1119,33 a | 0,649 a |
| Testemunha | 0,00 | 68,0 c | 330,5 b | 1197,33 a | 0,722 a |

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$);

**Suspensão de conídios em 50 g⁻¹ de semente.

Fonte: O Autor (2018).

As plantas submetidas aos isolados de *Trichoderma* UFSMQ1 1,25x10⁸ e UFSMQ36 2,50x10⁸ apresentaram a maior ETRm nas folhas de soja. Observou-se que a fluorescência inicial aumentou nos tratamentos UFSMQ1 0,25x10⁸ e 1,25x10⁸ e UFSMQ36 0,25x10⁸ diferindo dos demais tratamentos e da testemunha, que apresentaram os melhores resultados. O maior valor de rendimento quântico máximo do PSII foi obtido no tratamento testemunha juntamente com os tratamentos com *Trichoderma* spp., exceto para os tratamentos UFSMQ1 1,25x10⁸ e UFSMQ36 0,25x10⁸ que diferiram estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 7).

5.4 DISCUSSÃO

Neste estudo, a presença do fungo *Trichoderma*, independente do isolado e dose, de 10⁸ conídios, influenciou nos parâmetros do crescimento, atributos da

fluorescência da clorofila *a* e de danos do *M. incognita* na planta de soja. Diáñez Martínez et al., (2016) observaram resultados semelhantes na cultura da pimenta em que isolados de *Trichoderma* influenciaram parâmetros de crescimento como matéria seca radicular e total. Plantas de abobrinha submetidas a *T. longibrachiatum* apresentaram alterações nos parâmetros número de galhas e fator de reprodução 31% e 15% menores que a testemunha respectivamente (SOKHANDANI; MOOSAVI; BASIRNIA, 2016).

No nosso estudo, a utilização do *Trichoderma* (UFSMQ1 e UFSMQ36) reduziu a penetração de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* em média 41% quando comparado com o tratamento controle. Isto provavelmente ocorreu devido aos elicitores ácido jasmônico, ácido salicílico, ácido glucônico, fumárico ou cítrico que são liberados pelas hifas do fungo que podem provocar a ativação de defesa da planta (NAWROCKA; MAŁOLEPSZA, 2013). Além disto, a maioria das cepas de *Trichoderma* acidifica seu ambiente circundante através da secreção destes ácidos orgânicos, (DE LA TORRE; GOMEZ-ALARCON, 1994) o que pode ter causado o desnorтеio dos J2 na hora da penetração. No sistema radicular sem fissuras a diversidade de fontes de atração que ocorre nas pontas da raiz pode confundir o direcionamento de fitonematoides J2 (CAMPOS et al., 2011). Conforme Sharon et al., (2001), solos tratados com *T. harzianum* apresentaram menor número de fêmeas dentro do sistema radicular, sem diferença estatística do controle. O fungo pode ter influenciado na penetração de nematoides nas raízes ao invés do desenvolvimento de nematoides dentro das raízes.

O presente estudo indicou que a microbiolização de sementes de soja com *Trichoderma* tem efeito positivo na redução de massas de ovos e no fator de reprodução (FR) de *M. incognita* em especial o isolado de *Trichoderma* UFSMQ36 $2,5 \times 10^8$ (Tabela 2). A atividade de supressão do *Trichoderma* UFSMQ36 para parâmetros de danos de *M. incognita* em plantas de soja pode estar associada a capacidade desse fungo produzir enzimas que provocam danos fisiológicos em juvenis de nematoides (ZHANG; GAN; XU, 2015). Muitas destas enzimas são proteases que possuem a capacidade de cortar ligações peptídicas de proteínas, como as que estão na cutícula dos nematoide, causando efeito nematicida (SUAREZ et al., 2004). Além disso, o *Trichoderma* pode produzir compostos que melhoram a capacidade da planta em enfrentar os danos ocasionados pelos fitonematoides (RADWAN et al., 2012). Plantas de pepino semeadas em solo inoculado com

diferentes concentrações de *T. longibrachiatum* suprimiram juvenis de *M. incognita*, densidades de ovos, e nódulos da raiz, quando comparado com o controle (ZHANG; GAN; XU, 2015).

Para o fator de reprodução e massa de ovos a utilização de quantidades crescentes de conídios (10^8) de *Trichoderma* influenciou a eficiência de supressão do fitonematoide. Isto pode ter ocorrido devido a maior concentração do fungo no ambiente e o maior poder de antagonismo. O mesmo ocorreu com estudo de Radwan et al., (2012) as doses de *Trichoderma* influenciaram o número de galhas que diminuíram com o aumento da taxa dos bioprodutos à base de *Trichoderma*.

Os tratamentos com as maiores concentrações 10^8 de *Trichoderma* resultaram em menores médias de estabelecimento da cultura. A redução da germinação e IVG pode estar associada ao solo autoclavado que levou a ausência de outros microrganismos que poderiam ser usados como fonte nutricional pelo *Trichoderma* (LÓPEZ-BUCIO; PELAGIO-FLORES; HERRERA-ESTRELLA, 2015). Além disso, a menor germinação e IVG ocorreu, provavelmente, porque o *Trichoderma* favoreceu a deterioração das sementes (ETHUR et al., 2008). Estes resultados corroboram com o estudo de Faria et al., (2003), que não observaram efeito estimulante do agente bioprotetor *Trichoderma* spp. sobre a velocidade de emergência de plântulas de algodão. Diferente de outros resultados onde a microbiolização com *Trichoderma* foi positiva na emergência de plântulas de tomate e de fumo (Windhamet al., 1986) e no aumento da porcentagem de germinação de sementes de pimenta em comparação à testemunha (ASADUZZAMAN; ALAM; ISLAM, 2013).

As menores médias de MSPA e MSR aos 22 DAE nos tratamentos com a presença de *Trichoderma* ocorreu provavelmente devido à rápida colonização do ambiente rizosférico pelo fungo *Trichoderma* quando adicionado em tratamento de sementes (MACHADO et al., 2012), que ocasionou efeito negativo no crescimento do sistema radicular (Tabela 5). Para o isolado UFSMQ1 o aumento da dose influenciou a diminuição da matéria seca radicular, como o ocorrido no trabalho de Sokhandani; Moosavi; Basirnia, (2016) em que a maior concentração de *T. longibrachiatum* 10^8 conídios / ml resultou em raízes significativamente menores que as observadas em plantas que receberam 0 ou 10^5 conídios / ml. Com o decorrer do ciclo da cultura da soja, estágio fenológico R5, a presença do tratamento UFSMQ36 perdeu a influência negativa sob variável MSPA. No estudo de Haddad (2014) cepas de *Trichoderma* inoculadas no solo promoveram o aumento da parte aérea e do

sistema radicular da cultura da soja. Plântulas de trigo inoculadas com *T. longibrachiatum* apresentaram maior crescimento (ZHANG; GAN; XU, 2014).

A taxa de transporte de elétrons (ETR_m) transfere elétrons do fotossistema II para o fotossistema I, portanto quanto maiores os valores mais eficiente a planta é em converter luz solar em carbono. Neste estudo o tratamento controle obteve o menor valor de ETR_m (Tabela 7) revelando que a presença do fungo é positiva para ETR_m e que *M. incognita* prejudica a conversão de luz solar em carbono. Em plantas de milho, a utilização de tratamento de sementes com isolados de *Trichoderma*, em condições de estresse salino, ocasionou um incremento de 4% em F_v/F_m e de 5,88% em ETR_m (PEHLIVAN et al., 2017).

Os isolados de *Trichoderma*, em determinadas doses, juntamente com o tratamento testemunha, apresentaram os menores valores para a variável Fo. O que indica que a presença de 1,25x10⁸ e 2,50x10⁸ conídios de suspensão fúngica do isolado UFSMQ36 melhora a efetividade da planta de soja em converter energia luminosa em energia fotoquímica, pois quanto menor o valor de Fo maior a eficiência de conversão (PRADO; CASALI, 2006).

Os dados relativos ao rendimento quântico máximo (F_v/F_m) do PSII apresentaram o mesmo comportamento para o isolado UFSMQ36 1,25x10⁸ e 2,50x10⁸ conídios de suspensão fúngica, juntamente com o tratamento testemunha sem *Trichoderma*, revelaram as maiores médias de F_v/F_m. Tal isolado melhorou o aproveitamento da energia luminosa do PSII o que indica que maior parte da energia luminosa está sendo direcionada à etapa fotoquímica da fotossíntese, ao invés de se perder por fluorescência da clorofila *a* (BAKER, 2008). Na cultura do milho submetida a condições de salinidade a presença ou ausência do *Trichoderma* não diferiu estatisticamente para a variável rendimento quântico máximo (YASMEEN; SIDDIQUI ZAMIN, 2017).

O tratamento testemunha apresentou os melhores resultados para estas variáveis possivelmente porque a quantidade inoculada de *M. incognita* não foi suficiente para ocasionar dano perceptível ao Fo e F_v/F_m. A elevação da taxa fotossintética com inoculação de 5000 ovos e j2 de *M. incognita* em plantas de algodão deve-se à emissão de novas raízes secundárias ocasionadas pelo parasitismo do nematoide, o que pode ter provocado mudanças no padrão de distribuição dos foto assimilados (ABRÃO; MAZZAFERA, 2001) Por outro lado vários trabalhos citam

redução da fotossíntese após a inoculação de grande número de nematóides na ordem de 30.000 a 50.000 J2 de *M. javanica* em tomateiro (LOVEYS; BIRD, 1973).

Neste estudo a utilização de *Trichoderma* através de microbiolização de sementes de soja mostrou ser eficiente para reduzir os parâmetros de danos de *M. Incognita*. Entretanto não obteve-se a mesma resposta para os parâmetros de estabelecimento da cultura, matéria seca e florescência da clorofila *a*, o que sugere maiores investigações sobre o assunto, principalmente na forma de aplicação do *Trichoderma*, pois o contato direto com a semente pode ter prejudicado o estabelecimento da planta. Por isso deve-se continuar buscando isolados com melhor capacidade de microbiolização em sementes e crescimento junto às raízes. O uso de *Trichoderma* é promissor para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável.

5.5 CONCLUSÃO

O *Trichoderma* UFSMQ36 $2,50 \times 10^8$ conídios via microbiolização de sementes de soja é eficaz na supressão do nematoide *Meloidogyne incognita*.

Há uma maior produção de matéria seca, taxa de transporte de elétrons, menor perda de energia fotoquímica e maior rendimento quântico do fotossistema II com a utilização do *Trichoderma* UFSMQ36 $1,25 \times 10^8$ conídios via sementes de soja.

6 CAPITULO II: *Trichoderma* COMO SUPRESSOR DE *Meloidogyne javanica* VIA SEMENTES DE SOJA

RESUMO

Os nematoides das galhas são um dos principais patógenos de plantas, causando grandes perdas na produtividade das mais diversas culturas. Fungos do gênero *Trichoderma* possuem grande capacidade de suprimir este patógeno. No presente estudo avaliou-se a eficiência de três isolados de *Trichoderma* na supressão de *M. javanica* in vitro e em casa de vegetação. Para compreender os mecanismos de isolados de *Trichoderma* no estabelecimento, crescimento e parâmetros da fluorescência da clorofila *a* em plantas de soja. Foram utilizados três isolados de fungos UFSMQ1, UFSMQ36, UFSMQ40. As sementes de soja (Cultivar BRS 5601) foram microbiolizadas com três isolados do fungo em três diferentes doses, $0,25 \times 10^9$; $1,25 \times 10^9$ e $2,50 \times 10^9$ por $50g^{-1}$. O isolado *Trichoderma* UFSMQ40 suprimiu a eclosão de ovos de *M. javanica*, enquanto os isolados UFSMQ40 e UFSMQ1 promoveram a mortalidade de juvenis de segundo estágio de *M. javanica* in vitro. UFSMQ40 e UFSMQ1 suprimiram a atividade de *M. javanica*. Doses crescentes do isolado *Trichoderma* UFSMQ40 favoreceram a supressão de *M. javanica*. O isolado de *Trichoderma* UFSMQ36 proporcionou maior germinação, índice de velocidade de germinação e taxa de transporte de elétrons.

Palavras Chaves: Nematoides de galhas - Biocontrole com fungos -Microbiolização.

6 CHAPTER II: *Trichoderma* AS A SUPPRESSOR OF *Meloidogyne javanica* VIA SOY SEEDS

ABSTRACT

Root gall nematodes are one of the main plant pathogens, causing large losses in the productivity of the most diverse crops. Fungi of the genus *Trichoderma* have great capacity to suppress this pathogen. In the present study, the efficiency of three *Trichoderma* isolates was evaluated in the suppression of *M. javanica* in vitro and in greenhouse. To understand the mechanisms of *Trichoderma* isolates in the establishment, growth and parameters of chlorophyll a fluorescence in soybean plants. three fungal isolates UFSMQ1, UFSMQ36, UFSMQ40 were used. The soybean seeds (Cultivar BRS 5601) were microbiolized with three fungus isolates in three different doses, 0.25×10^9 ; 1.25×10^9 and 2.50×10^9 per $50g^{-1}$. The *Trichoderma*'s isolate UFSMQ40 suppressed the hatch of *M. javanica* eggs, while isolates UFSMQ40 and UFSMQ1 promoted the mortality of second stage juveniles of *M. javanica* in vitro. UFSMQ40 and UFSMQ1 suppressed the activity of *M. javanica*. Increasing doses of the *Trichoderma* UFSMQ40 isolate favored the suppression of *M. javanica*. The *Trichoderma*'s isolate UFSMQ36 provided higher germination, germination speed rate and electron transport rate.

Key Words: Root gall nematodes – Microbiolization - biological control by fungus.

6.1 INTRODUÇÃO

Dentre os fitonematoides, o gênero *Meloidogyne* (Goeldi 1887) é considerado o mais relevante devido as elevadas perdas em áreas de produção agrícola mundial (GABIA, 2017), podendo inviabilizar o cultivo em áreas de culturas suscetíveis (EDWARD et al., 2014). Os nematoides do gênero *Meloidogyne* podem infectar mais de 3 mil espécies de plantas (BANORA et al., 2011), dentre estas a cultura da soja, que pode apresentar perdas elevadas de produtividade (SOARES et al., 2017). As perdas de produtividade da cultura da soja, estão relacionadas a obstrução dos feixes vasculares, devido a penetração dos nematoides no sistema radicular das plantas, provocando interferência e/ou redução na translocação de água e solutos do sistema radicular a parte aérea (GALBIERI; ASMUS,2016), limitando o seu potencial produtivo.

O gênero *Meloidogyne* possui capacidade de multiplicação e a população pode persistir para a próxima safra, pois mesmo sob diferentes métodos de controle, muitos organismos ainda permanecem no solo (GALBIERI; ASMUS,2016). Essa permanência no solo pode estar relacionada a ocorrência de plantas invasoras, que podem servir como hospedeiras durante a entressafra da cultura principal (DAVIS; WEBSTER, 2005). Atualmente, o gênero *Meloidogyne* conta com mais de 100 espécies descritas (KARSSSEN G, WESEMAEL W, MOENS M., 2013) sendo *M. javanica* considerada uma das mais importantes do ponto de vista produtivo e econômico.

Existem diferentes práticas para o controle de fitonematoides, como rotação de culturas, controle químico, controle biológico, que visam impedir o aumento populacional ou a diminuição da população (GALBIERI; ASMUS, 2016), bem como evitar a disseminação destes patógenos para áreas sadias. O uso de nematicidas químicos tem promovido consequências negativas ao agrossistema, além de demonstrar resistência após longo prazo de utilização (SILVA et al., 2017). Nesse sentido, o controle biológico apresenta-se como uma prática sustentável e benéfica aos seres vivos e ao ambiente, por isso tem se apresentado como uma ferramenta viável no controle de fitonematoides (SOARES et al., 2017).

Os fungos são os microrganismos que ocupam posição de destaque no controle biológico de patógenos inclusive fitonematoides. Alguns fungos do gênero *Trichoderma* como o *T. atroviride* (P. Karst), *T. harzianum* (Rifai), *T. viride* (Pers) tem sido utilizados para a promoção de crescimento vegetal e no controle de

fitopatógenos. O gênero *Trichoderma* tem sido relacionado com o aumento da resistência das plantas por meio de fitormônios, produção de enzimas, e compostos benéficos as plantas (MUKHERJEE et al., 2013; AHMAD et al., 2015; MARTÍNEZ-MEDINA et al., 2017). Ainda, tem sido relacionado a melhorias na capacidade de assimilação de nutrientes pelo vegetal, aumentando a resistência diante de fatores bióticos e abióticos não favoráveis ao desenvolvimento das plantas (HARMAN et al., 2004a).

Em relação ao controle de patógenos, o gênero *Trichoderma* tem apresentado respostas satisfatórias em relação a produção e secreção de enzimas hidrolíticas como quitinases, lipases, proteases e glucanases e sua rápida adaptação ao ambiente (LIMA et al., 2017), o que ressalta a sua importância como agente de biocontrole. A multifuncionalidade de modos de ação, tem feito com que esse gênero tenha grande aplicabilidade na agricultura e no ambiente.

Neste sentido, estudos recentes tem demonstrado grande potencial de alguns isolados de *Trichoderma* no controle de fitonematoides (SAHEBANI; HADAVI, 2008); (SHARON et al., 2009); (SZABÓ et al., 2012); (SOKHANDANI; MOOSAVI; BASIRNIA, 2016); (LEONETTI et al., 2017). Em trabalho realizado por Medeiros et al., (2017) plantas de tomate inoculadas com *T.atroviride* reduziram significativamente o número de galhas (20%). Plantas de feijão cultivadas em solos argilosos e arenosos tratadas com *T. harzianum* tiveram o sistema de defesa ativado pelo fungo e menor taxa de reprodução de *M. incognita* (AMIR-AHMADI; MOOSAVI; MOAFPOURIAN, 2017).

Apesar do gênero *Trichoderma* ser utilizado como agente de biocontrole em muitos estudos, ainda há necessidade de mais informações sobre o desempenho deste fungo sob fitonematoides, e a importância e benefícios de isolados de *Trichoderma*. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial de isolados de *Trichoderma* na supressão de *Meloidogyne javanica* em plantas de soja.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Inóculo de *Meloidogyne javanica*

O inóculo do nematoide constituiu-se de população pura de *M. javanica* multiplicada em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) da cultivar Santa Cruz Kada. Para o preparo do inóculo, as raízes das plantas de tomate foram coletadas e

posteriormente lavadas em água corrente para retirada do solo aderido. Em seguida, foram cortadas em pedaços de 1 cm e colocadas em liquidificador, onde foram por 1 minuto em uma solução de hipoclorito de sódio 0,1% de acordo com a trituras técnica descrita por Hussey, R. S.; Barker, (1973) adaptado por Bonetti e Ferraz (1981). Logo após, o material foi vertido em peneiras de 20 e 500 mesh (0,8 e 0,025 mm) e lavado com água corrente. O material retido na peneira de 500 mesh foi recolhido em um béquer e quantificado utilizando-se de uma câmara de Peters. Os ovos de nematoides foram obtidos conforme a metodologia de Hussey, R. S.; Barkey (1973) adaptado por Bonetti e Ferraz (1981), e a suspensão de nematoides no estágio de desenvolvimento J2 foi obtida a partir da câmara de incubação com papel de seda após 72 horas de incubação a 25° C.

6.2.2 Obtenção dos fungos

Amostras de solo com a presença de nematoides da horta do Campus da UFSM, foram coletadas e levadas para o laboratório, onde foram transferidas para o centro de placas de Petri. Nas mesmas placas de Petri foram adicionados juvenis de nematoides do gênero *Meloidogyne*. Esses nematoides foram adicionados as placas em torno do solo contaminado para possibilitar melhor visibilidade da possível infecção de fungos nematófagos presentes no solo.

Na placa Petri foi adicionada meio de cultura composto por água, ágar 2% e 0,05% de sulfato de estreptomicina. As placas de Petri foram acondicionadas em estufa a 26° C por 10 dias. Durante esse período os fungos presentes na amostra de solo com capacidade de infecção em fitonematoides formaram hifas sob os nematoides. As hifas de fungos que cresceram sob os nematoides foram transferidas para placas de Petri com meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (BDA). Método de espalhamento de solo adaptado de (DUDDINGTON, 1955, modificado por BARRON, 1977; SANTOS *et al.*, 1991;).

As placas com inóculos de fungos foram incubadas a 28 °C com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. As culturas foram repicadas até a obtenção de culturas puras e armazenadas a 4 °C no banco de fungos do Laboratório de Biologia e Microbiologia do Solo - Professor Marcos Rubens Fries, da Universidade Federal de Santa Maria. Além destes fungos, foram utilizados dois fungos quitinolíticos

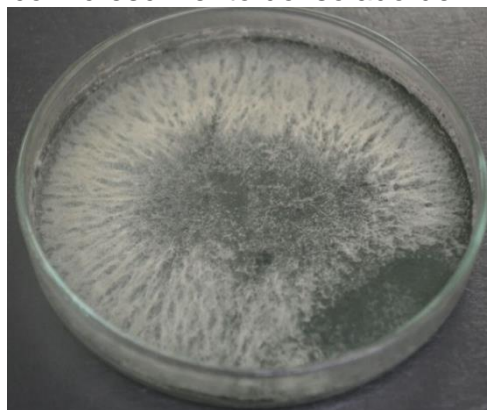
(UFSMQ36 e UFSMQ40) do banco de fungos deste mesmo laboratório, que foram isolados de percevejos mortos (BALDONI, 2016).

Para a produção da suspensão de conídios, utilizou-se um disco de 1cm de fungo. Este foi inoculado em meio de cultura contendo 50 g de arroz e 29 mL de água destilada, 8 mL de meio salino de macronutrientes (Cloreto de Cálcio 0,8 g/L, Sulfato de Magnésio 0,4g/L, Sulfato de Potássio 1,4g/L, Nitrato de Amônio 0,2g/L, Fosfato monopotássico 0,2g/L e Extrato de Levedura 0,2g/L), esterilizado a 121 ° C durante 30 min. Após as culturas foram incubadas em BOD a 25 ± 2 °C, fotoperíodo de doze horas de luz e escuro, durante sete dias(PAPAVIZAS; LEWIS; MOITY, 1982). Os conídios foram removidos por adição de 100 ml de Tween® 80 (0,01%) ao meio de cultura e a quantidade de inóculo foi estimada numa câmara de Neubauer. Posteriormente, a solução foi ajustada para 1x10⁹ conídios ml⁻¹.

6.2.3 Identificação à nível de gênero dos isolados fúngicos.

Os isolados fúngicos foram cultivados em meio de cultura Batata- Dextrose-Agar (BDA) a 25 ± 2 °C para posterior observação das características morfológicas e medição das estruturas em microscópio ótico para diferenciação de gênero. As características obtidas foram colocadas na chave interativa *on line* para identificação de gênero pela chave proposta por Samuels *et al.* (2007). A identificação também foi realizada seguindo a chave de identificação de Gams, W.; Bissett, J. (1998). Esta baseia-se na identificação da forma e do diâmetro de conídios, tipo de ramificação dos conídios e o modo de disposição das fiáides. Confirmado pelo Micologista Dr. Marcelo Sulzbacher.

Figura 1. Placas de Petri com crescimento do isolado de *Trichoderma* UFSMQ1.



Fonte: O Autor (2018).

Dos fungos isolados de solos contaminados com nematoides apenas um isolado apresentou características Do gênero *Trichoderma*. Este isolado foi denominado UFSMQ1 (Figura 1). Os demais isolados foram caracterizados como *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp.

6.2.4 Testes de mortalidade de J2 e eclosão de ovos de *Meloidogyne javanica* (%) sob ação de suspensão de *Trichoderma* spp. em laboratório

Para a obtenção dos J2 de *M. javanica* utilizados no ensaio de mortalidade foram preparadas câmaras de eclosão, compostas por béquer e papel *Kleenex*. A partir da suspensão obtida, foram pescados 30 nematoides, os quais foram transferidos para cavidades individuais de placas de Elisa. Em cada cavidade, juntamente com os 30 J2, adicionaram-se 80 µL de suspensão fúngica. Em seguida, as placas foram mantidas fechadas com filme plástico e colocadas em estufa a 25°C, no escuro. A avaliação da mortalidade foi realizada após 24 horas. No momento da avaliação, em cada cavidade da placa de Elisa foram adicionados 10 µL de Hidróxido de sódio (NaOH) 1M a 1% para melhor observação dos nematoides vivos. Foi utilizada uma adaptação da metodologia proposta por Chen; Dickson, (2000), onde os J2 cujos corpos permaneceram completamente distendidos durante 3 minutos após a adição de NaOH, foram considerados como mortos.

A partir da suspensão de ovos, obtida conforme metodologia de Hussey, R. S.; Barker, (1973), o teste de eclosão foi constituído de 30 ovos por cavidade da placa de Elisa. Em cada cavidade, juntamente com os 30 ovos, adicionaram-se 80 µL de suspensão fúngica. Em seguida, as placas foram mantidas fechadas com filme plástico e colocadas para estufa a 25°C, no escuro. A avaliação da mortalidade foi realizada oito dias após a inoculação fúngica.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram compostos por três fungos antagonistas UFSMQ1, UFSMQ36 e UFSMQ40, e o tratamento controle (sem adição de fungo) para avaliar a eclosão de ovos e mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*.

6.2.5 Teste de germinação de sementes e microbiolização de sementes em laboratório

O teste de germinação de sementes foi realizado antes e após a microbiolização com os isolados fúngicos. Foram utilizadas 200 sementes para cada tratamento, divididas em quatro repetições de 50 sementes, em rolo de papel umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa seca do papel. Os rolos, contendo as sementes, foram mantidos em incubadora BOD, a 25 °C com fotoperíodo de 12 h. Realizou-se duas contagens, aos cinco e oito dias, e obteve-se o percentual de germinação de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

As sementes foram desinfestadas com solução de álcool etílico 70% por 1 minuto seguido de hipoclorito de sódio 2,5% por 4 minutos, e três banhos em água destilada e esterilizada (MEHTA et al., 2005). Logo após, as sementes foram secas a temperatura do ambiente estéril por 48 h. Após a esterilização, as sementes foram recobertas com polímero Collor Seed® He Verde, o qual foi aplicado 50 mL do produto para cada 100 kg de sementes, conforme recomendação do fabricante.

6.2.6 Atributos do solo usado em casa de vegetação

Para a confecção das unidades experimentais, foram coletados aproximadamente 300 kg da camada de 0 – 20 cm de profundidade de um Argissolo Vermelho-Amarelo (EMPRABA,2013), excluindo-se os resíduos vegetais da superfície, em uma área de pastagem nativa, sem histórico de cultivo, na cidade de Santa Maria – RS.

Após a coleta, o solo foi autoclavado, durante 1,5 horas a 121°C, seco à temperatura ambiente, peneirado e separado em vasos, contendo 4 kg de solo e 0,500 Kg de substrato. O solo utilizado no estudo apresentou: argila (método pipeta) 190 g kg⁻¹; matéria orgânica (Walkley-Black) 15 g kg⁻¹; pH (água 1:1) 4,9; P (Mehlich-1) 14,6mg dm⁻³; K (Mehlich-1) 44 mg dm⁻³; Mg 0,5 (Mehlich-1); Ca 1,7 mg dm⁻³ (Mehlich-1); Al trocável (Mehlich-1) 0,7 mg dm⁻³; Saturação por bases 25,3%, conforme análise química de solo realizado pelo Laboratório de Análise de Solos da UFSM (Anexo 1).

6.2.7 Parâmetros de dano de *Meloidogyne javanica*

6.2.7.1 *Trichoderma spp.* na penetração de *Meloidogyne javanica* em soja em condições de casa de vegetação.

Para avaliação do índice de penetração foram utilizados copos plásticos com capacidade de 500 mL contendo uma mistura de solo e areia na proporção de 4:1 (400 g de solo/ 100 g de areia) previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 1,5 horas.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições, utilizando o nematoide *M. javanica*, em esquema unifatorial com 11 tratamentos. Nove tratamentos com os isolados de fungos UFSMQ1, UFSMQ36 e UFSMQ40 em combinação com três doses $0,25 \times 10^9$; $1,25 \times 10^9$ e $2,50 \times 10^9$ conídios para cada 50 g de semente de soja. Acrescido do tratamento testemunha, sem isolados fúngicos, apenas suspensão de *Meloidogyne javanica* e água.

A microbiolização das sementes foi realizada previamente dentro de câmara de fluxo laminar. As sementes foram embebidas na suspensão de fungos, juntamente com o polímero e o inoculante biológico específico para a cultura (*Bradyrhizobium japonicum* J.). A semente utilizada foi a BRS 5601 RR. A semeadura foi com quatro sementes microbiolizadas por copo. A suspensão aquosa contendo 700 J2 de *M. javanica* foi adicionada aos copos, cerca de dez dias após a emergência das plântulas de soja.

Aos 15 dias após a inoculação do *M.javanica* foi avaliado a penetração no sistema radicular por *M. javanica*. As raízes foram coletadas, lavadas cuidadosamente para retirada do solo aderido, clarificadas e coloridas de acordo com a metodologia de coloração de raízes com fucsina ácida descrita por Bybd JR; Kirkpatrick; Barker (1983).

6.2.7.2 *Trichoderma spp.* na reprodução de *Meloidogyne javanica* em soja em condições de casa de vegetação.

Para a condução do experimento foram utilizados vasos de plástico com capacidade de 3 L aos quais foi adicionada uma mistura de solo e areia na proporção 4:1 (2,5 kg de solo/ 0,5 kg de areia), previamente esterilizados em autoclave a 121° C por 1,5 horas.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições, em esquema unifatorial com 11 tratamentos. Nove tratamentos com os isolados de fúngicos UFSMQ1, UFSMQ36 e UFSMQ40 em combinação com três doses $0,25 \times 10^9$; $1,25 \times 10^9$ e $2,50 \times 10^9$ conídios para cada 50 g de semente de soja e *Meloidogyne javanica*. Acrescido do tratamento testemunha, sem isolados fúngicos, apenas suspensão de *Meloidogyne javanica* e água. Além do tratamento testemunha absoluta, sem suspensão fúngica e sem *Meloidogyne javanica*.

A microbiolização das sementes foi realizada dentro câmara de fluxo laminar. As sementes foram embebidas na suspensão dos isolados fúngicos juntamente com o polímero e o inoculante biológico específico para a cultura (*Bradyrhizobium japonicum*). A semeadura foi realizada em covas, com oito sementes por vaso.

Os nematoides foram inoculados nos vasos dez dias após a emergência das plântulas, por meio de uma suspensão de 2500 J2 de *M. javanica*. Após 70 dias da inoculação dos nematoides, foi determinado o fator de reprodução (Equação 3). O número de galhas, o número de massas de ovos no sistema radicular também foram avaliados. Para a contagem do número massas de ovos, as raízes foram lavadas sob água corrente e imersas por minutos em solução de Floxina B 0,0015% para coloração e melhor visualização das massas de ovos (TAYLOR e SASSER, 1978).

Equação 3:

$$FR = \frac{P_f}{P_i} \quad (3)$$

Onde: FR é o Fator de reprodução de nematoides

Pf é a população final de nematoides

Pi é a população inicial de nematoides

6.2.8 *Trichoderma* spp. na germinação, crescimento (matéria fresca/seca) em plantas de soja parasitadas por *Meloidogyne javanica*.

Foi determinado o índice de velocidade de germinação ao quinto, oitavo e décimo terceiro dia após a emergência das plântulas de soja. Calculou-se o índice de velocidade de germinação (IVG) através da fórmula de Maguire (1962): $IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$ onde: G_1, G_2, G_n = número de plântulas germinadas na primeira, segunda, até a última contagem e N_1, N_2, N_n = número de semanas desde a primeira,

segunda, até a última contagem. Aos dez dias após a emergência foi determinada a porcentagem de germinação da soja.

A determinação da matéria seca das raízes foi realizada 15 dias após a inoculação dos fitonematoides. Após a avaliação da penetração radicular, as raízes foram lavadas novamente e colocadas em estufa a 65° C por 72h para posterior análise da matéria seca radicular. Ao final do experimento, 70 dias após a inoculação de *M. javanica*, avaliou-se a matéria seca da parte aérea e matéria fresca radicular da cultura.

6.2.9 *Trichoderma* spp. nos parâmetros de clorofila a em plantas de soja parasitadas por *Meloidogyne javanica*.

A fluorescência da clorofila a foi mensurada após a entrada do estágio reprodutivo da cultura de soja, aos 65 dias após a emergência, com um fluorômetro portátil de luz modulada JUNIOR-PAM (Walz, Effeltrich, Germany), no período entre 8:00 e 10:00 horas. Para as medições utilizou-se uma folha de soja por repetição, sendo essas pré-adaptadas no escuro pelo período de 30 minutos para medição da fluorescência inicial (F_0). Depois as folhas foram submetidas a um pulso de luz saturante ($10000 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) por 0,6 s para avaliar a fluorescência máxima (F_m), enquanto o rendimento quântico máximo PSII (F_v/F_m) e a taxa de transporte de elétrons (ETR_m) foram avaliados utilizando a curva de indução de fluorescência.

6.2.10 Análise estatística

Os resultados expressos em valores contínuos, atendidos os pressupostos de normalidade e homogeneidade, foram analisados por ANOVA, seguidos de teste de Tukey 5% para comparação entre médias no experimento in vitro. Para o experimento em casa de vegetação, as variáveis que não seguiram os pressupostos de normalidade e homogeneidade foram transformados para $(x + 0,5)^{0,5}$. Os resultados foram analisados por ANOVA, em análise uni fatorial com teste Scott Knott. As variáveis germinação e índice de velocidade e de germinação foram avaliadas pelo teste Kruskal Wallis. As análises acima citadas foram realizadas com auxílio do pacote ExpDes do software R, versão 3.1.3. Ainda realizou-se análise de correlação de Pearson pelo pacote Excel seguindo a metodologia de Cohen (1988) para a

magnitude dos coeficientes, onde; $r = 0$ (não há correlação), $0,10 < r < 0,29 =$ (pequeno); $0,3 \leq r < 0,49 =$ (médio); $0,5 \leq r < 1 =$ (grande).

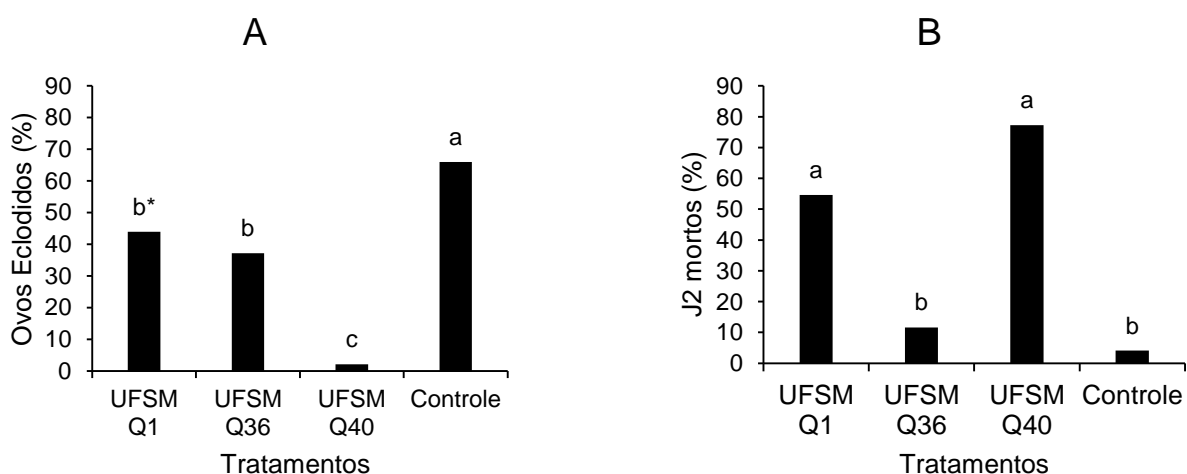
6.3 RESULTADOS

6.3.1 Teste in vitro

Os tratamentos testados apresentaram diferença significativa ($p < 0,0001$) na eclosão de ovos, e na taxa de mortalidade de juvenis de segundo estágio de *M. javanica*. O tratamento UFSMQ40 obteve as menores taxas de eclosão próximo a 3%, representando 95% menos que a média dos demais fungos. (Figura 2 A).

Para taxa de mortalidade de juvenis de segundo estágio de *M. javanica*, o fungo UFSMQ40 apresentou mortalidade 19 vezes maior que o tratamento controle, seguido do fungo UFSMQ1 que teve uma mortalidade 13 vezes superior ao tratamento controle. O fungo UFSM Q36 foi considerado estatisticamente igual ao controle (Figura 2 B).

Figura 2. Número de ovos de *Meloidogyne javanica* eclodidos (%) e morte de juvenis de segundo estágio (%) submetidos a suspensões fúngicas de *Trichoderma* em condições de laboratório.



*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$);
Fonte: O Autor (2018).

6.3.2 Parâmetros de dano de *Meloidogyne javanica*

Foram observadas diferenças significativas para as variáveis penetração do sistema radicular ($p < 0,0001$) por *M. javanica*, número de massa de ovos ($p = 0,04$) e fator de reprodução ($p = 0,0001$). Para a variável penetração do sistema radicular o tratamento isolado de *Trichoderma* UFSMQ1 $2,50 \times 10^9$ e isolado de *Trichoderma* UFSMQ40 $1,25 \times 10^9$ apresentaram o menor número de penetração de juvenis de segundo estágio de *M. javanica*, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 8).

Tabela 8. Número de juvenis penetrados, número de massa de ovos (NMO), número de galhas (NG) e fator de reprodução (FR) de *Meloidogyne javanica* em plantas de soja submetidas à isolados de *Trichoderma*.

| Fungo | Dose** | Penetração*** | NMO | NG | FR |
|---------------------|--------------------|---------------|--------|--------|--------|
| UFSMQ1 | $0,25 \times 10^9$ | 38,66 b* | 0,50 b | 0,50 b | 0,53 b |
| | $1,25 \times 10^9$ | 53,66 a | 3,75 a | 1,50 a | 0,55 b |
| | $2,50 \times 10^9$ | 17,00 d | 2,00 a | 0,75 a | 0,80 b |
| UFSMQ36 | $0,25 \times 10^9$ | 54,00 a | 3,75 a | 1,25 a | 1,65 a |
| | $1,25 \times 10^9$ | 53,60 a | 3,25 a | 1,25 a | 1,50 a |
| | $2,50 \times 10^9$ | 51,60 a | 1,75 a | 0,75 a | 0,80 b |
| UFSMQ40 | $0,25 \times 10^9$ | 29,66 c | 2,23 a | 1,00 a | 1,86 a |
| | $1,25 \times 10^9$ | 14,33 d | 0,75 b | 0,75 a | 0,26 b |
| | $2,50 \times 10^9$ | 44,66 b | 0,25 b | 0,25 b | 0,30 b |
| Testemunha | | 41,33 b | 2,50 a | 1,00 a | 1,50 a |
| Testemunha absoluta | | — | 0 b | 0 b | 0 c |
| CV % | | 8,48 | 34,95 | 25,42 | 17,14 |

*Médias seguidas pela mesma letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$);

**Suspensão de conídios em 50 g^{-1} de semente;

***Número de Juvenis Penetrados por raiz.

Fonte: O Autor (2018).

O menor número de massa de ovos foi observado nos tratamentos dos isolados de *Trichoderma* UFSMQ1 $0,25 \times 10^9$ e UFSMQ40 $1,25 \times 10^9$ e $2,50 \times 10^9$ (Tabela 8). Não foram observadas diferenças significativas ($p = 0,14$) entre os tratamentos para número de galhas. Os tratamentos UFSMQ40 $1,25 \times 10^9$ e $2,50 \times 10^9$ obtiveram o menor fator de reprodução (FR) de *M. javanica*, juntamente com o isolado UFSMQ1, em média 5

vezes menos que o tratamento testemunha (apenas *M.javanica* sem *Trichoderma* spp). Os tratamentos UFSMQ36 $0,25 \times 10^9$ e $1,25 \times 10^9$ esporos fúngicos e o tratamento UFSMQ40 $0,25 \times 10^9$ não diferiram estatisticamente da testemunha. Para o fungo UFSMQ40, foi observado um comportamento linear, o aumento das quantidades de inóculos de *Trichoderma* resultaram em menor fator de reprodução e menor valor de massas de ovos.

Os tratamentos com *Trichoderma* sp. mostraram-se eficientes na redução de danos às plantas de soja por *M. javanica*.

6.3.3 Germinação, crescimento (matéria fresca/seca) e parâmetros da clorofila a

Todos os tratamentos contendo isolados de *Trichoderma* foram iguais ou superiores ao tratamento testemunha nos parâmetros de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG). Os maiores valores de germinação e IVG, com diferença estatística do tratamento testemunha ($p < 0,05$), ocorreram no tratamento UFSMQ36 $2,50 \times 10^9$, sendo respectivamente 23% e 29%, superiores estatisticamente aos demais tratamentos (tabela 9).

Tabela 9. Germinação (%) e Índice de velocidade de germinação (IVG) de plantas de soja inoculadas com *Meloidogyne javanica* submetidas à isolados de *Trichoderma*.

| Fungo | Dose** | Germinação | IVG |
|------------|--------------------|------------|----------|
| UFSMQ1 | $0,25 \times 10^9$ | 73,33 abc* | 0,59 abc |
| | $1,25 \times 10^9$ | 60,00 c | 0,48 c |
| | $2,50 \times 10^9$ | 70,00 bc | 0,56 bc |
| UFSMQ36 | $0,25 \times 10^9$ | 83,33 ab | 0,68 ab |
| | $1,25 \times 10^9$ | 80,00 abc | 0,65 abc |
| | $2,50 \times 10^9$ | 90,00 a | 0,75 a |
| UFSMQ40 | $0,25 \times 10^9$ | 73,33 abc | 0,60 abc |
| | $1,25 \times 10^9$ | 73,33 abc | 0,57 bc |
| | $2,50 \times 10^9$ | 70,00 bc | 0,56 bc |
| Testemunha | | 71,66 bc | 0,58 bc |

*Médias seguidas pela mesma letras na coluna não diferem entre si pelo teste de KRUSKAL-WALLIS ($p < 0,05$);

**Suspensão de conídios em 50 g^{-1} de semente;

Fonte: O Autor (2018).

Foram observadas diferenças significativa para as variáveis matéria seca radicular (MSR) ($p < 0,0001$) aos 22 dias após a emergência (DAE), matéria fresca radicular (MFR) ($p = 0,01$) aos 80 DAE e matéria seca da parte aérea (MSPA) ($p = 0,0001$) aos 80 DAE (Tabela 10).

Tabela 10. Matéria seca radicular (MSR) aos 22 dias após emergência (DAE), matéria fresca radicular (MFR) e matéria seca da parte aérea (MSPA) aos 80 (DAE) de plantas de soja inoculadas com *Meloidogyne javanica* submetidas à isolados de *Trichoderma*.

| Fungo | Dose** | MSR 22 DAE | MFR 80 DAE | MSPA 80 DAE |
|---------------------|----------------------|------------|------------|-------------|
| UFMQ1 | 0,25x10 ⁹ | 0,07 b* | 10,8 b | 12,50 a |
| | 1,25x10 ⁹ | 0,07 b | 12,2 b | 12,94 a |
| | 2,50x10 ⁹ | 0,09 a | 11,6 b | 12,17 a |
| UFMQ36 | 0,25x10 ⁹ | 0,07 b | 11,2 b | 13,12 a |
| | 1,25x10 ⁹ | 0,08 a | 9,0 c | 12,62 a |
| | 2,50x10 ⁹ | 0,08 a | 10,2 c | 12,49 a |
| UFMQ40 | 0,25x10 ⁹ | 0,08 a | 11,6 b | 12,56 a |
| | 1,25x10 ⁹ | 0,07 b | 12,0 b | 12,89 a |
| | 2,50x10 ⁹ | 0,08 a | 12,8 b | 12,54 a |
| Testemunha | | 0,07 b | 15,4 a | 12,27 a |
| Testemunha absoluta | | — | 7,8 c | 10,56 b |

*Médias seguidas pela mesma letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$);

**Suspensão de conídios em 50 g⁻¹ de semente.

Fonte: O Autor (2018).

O tratamento testemunha apresentou a maior MSR aos 80 DAE, 41% superior aos demais tratamentos. Para MSPA aos 80 DAE o único tratamento estatisticamente inferior aos demais foi o tratamento testemunha absoluta (sem presença de *Trichoderma spp.* e sem presença de *M.javanica*).

Os tratamentos promoveram mudanças significativas nos parâmetros da fluorescência da clorofila a (Tabela 11). Verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) para as variáveis taxa de transporte de elétrons (ETRm) ($p < 0,002$), fluorescência inicial (Fo) ($p < 0,0001$), fluorescência máxima (Fm) ($p = 0,0001$), e rendimento quântico máximo (Fv/Fm) do fotossistema II (PS II) ($p = 0,0004$).

Os isolados de *Trichoderma* spp. demonstraram favorecer a taxa de transporte de elétrons das plantas de soja. Os melhores tratamentos foram UFSMQ1 $0,25 \times 10^9$, UFSMQ36 $0,25 \times 10^9$ e $1,25 \times 10^9$ e UFSMQ40 $2,50 \times 10^9$, sendo em média 26% superior aos demais tratamentos. O isolado UFSMQ40 $1,25 \times 10^9$ e o tratamento testemunha foram estatisticamente superiores aos demais tratamentos, em média, 20% para a fluorescência inicial (Fo). A testemunha absoluta apresentou 40% menos eficiência de conversão luminosa que o tratamento UFSMQ40 $1,25 \times 10^9$ (Tabela 11).

Tabela 11. Taxa de transporte de elétrons (ETRm), fluorescência inicial (Fo), fluorescência máxima (Fm) e rendimento quântico máximo (Fv/Fm) de plantas de soja inoculadas com *Meloidogyne javanica* submetidas à isolados de *Trichoderma*.

| Fungo | Dose** | ETRm*** | Fo | Fm | Fv/Fm |
|---------------------|--------------------|----------|---------|---------|--------|
| UFSMQ1 | $0,25 \times 10^9$ | 178,0 a* | 240,5 c | 589,0 a | 0,54 b |
| | $1,25 \times 10^9$ | 116,0 b | 287,0 a | 651,0 a | 0,56 b |
| | $2,50 \times 10^9$ | 136,5 b | 249,3 c | 520,0 b | 0,52 b |
| UFSMQ36 | $0,25 \times 10^9$ | 144,0 b | 266,0 b | 643,5 a | 0,54 b |
| | $1,25 \times 10^9$ | 162,0 a | 255,5 c | 646,5 a | 0,54 b |
| | $2,50 \times 10^9$ | 183,0 a | 274,0 b | 554,0 b | 0,55 b |
| UFSMQ40 | $0,25 \times 10^9$ | 121,0 b | 252,5 c | 552,5 b | 0,62 a |
| | $1,25 \times 10^9$ | 133,0 b | 214,0 d | 479,0 b | 0,54 b |
| | $2,50 \times 10^9$ | 154,1 a | 261,6 b | 611,7 a | 0,56 b |
| Testemunha | | 140,5 b | 229,0 d | 656,5 a | 0,63 a |
| Testemunha absoluta | | 143,66 b | 301 a | 613,3 a | 0,52 b |

*Médias seguidas pela mesma letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$);

**Suspensão de conídios em 50 g^{-1} de semente;

*** $\text{umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Fonte: O Autor (2018).

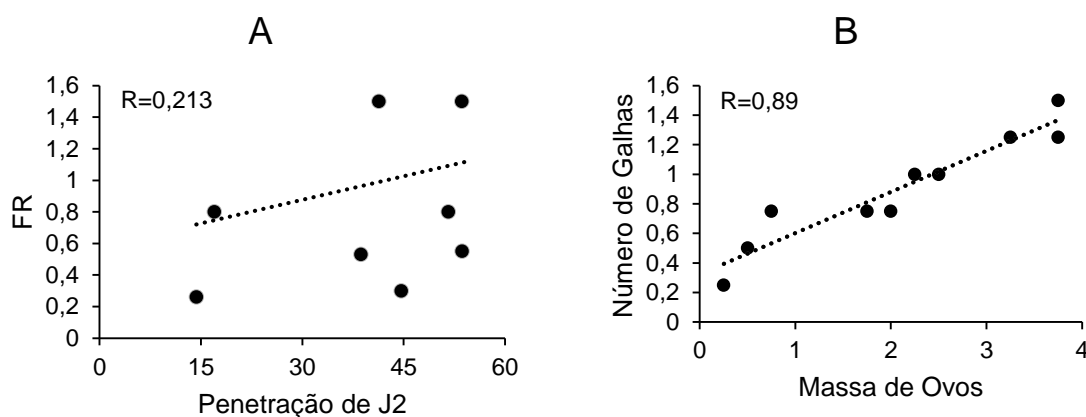
As menores médias de fluorescência máxima (Fm) foram observadas nos tratamentos UFSMQ1 $2,50 \times 10^9$, UFSMQ36 $2,50 \times 10^9$ e UFSMQ40 $0,25 \times 10^9$ e $1,25 \times 10^9$, em média 19,7% menor dos demais tratamentos. Além disso, foi verificado que para a variável rendimento quântico máximo (Fv/Fm) o isolado UFSMQ40 $0,25 \times 10^9$ esporos foi estatisticamente igual ao tratamento testemunha, e

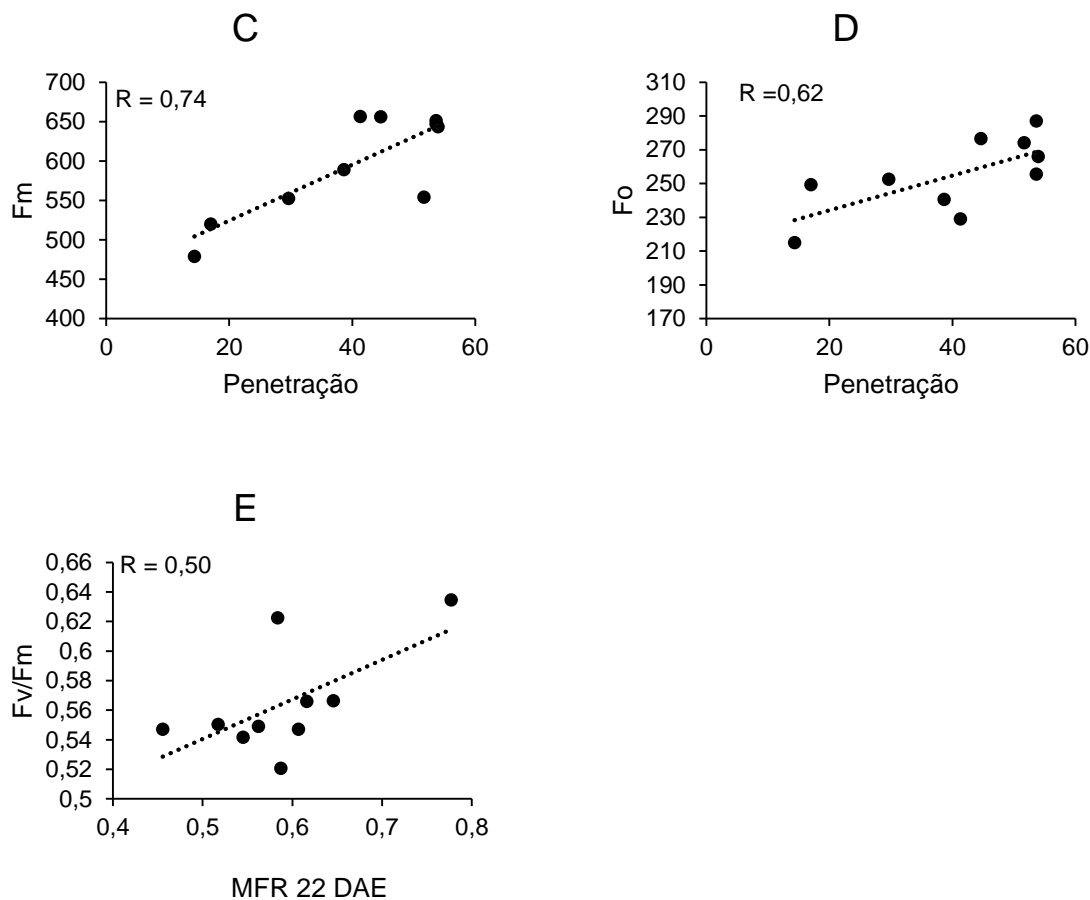
apresentaram média 15 % inferior aos demais tratamentos com diferença estatística (Tabela 11).

6.3.4 Correlação entre parâmetros de dano de *Meloidogyne javanica*, crescimento (matéria fresca/seca) e atributos da fluorescência da clorofila a

Houve correlação positiva entre o número total de juvenis penetrados de *M.javanica* e o fator de reprodução ($R= 0,247$) (Figura 3 A). Verificou-se correlação positiva com coeficiente acima de 0,5, para número de galhas e massa de ovos ($R= 0,89$) (Figura 3 B), penetração de juvenis de *M. javanica* e fluorescência máxima ($R= 0,74$) (Figura 3 C), MSR 22 DAE e MFR 80 DAE ($R=0,63$) (Figura 3 D), penetração de juvenis de *M. javanica* e fluorescência inicial ($R=0,62$) (Figura 3 E) e MFR 22 DAE e Fv/Fm ($R=0,50$) (Figura 3 F).

Figura 3. Correlação entre as variáveis fator de reprodução (FR) e número de juvenis penetrados (A), número de galhas e número de massa de ovos (B), número de juvenis penetrados e fluorescência máxima (C), número de juvenis penetrados e fluorescência inicial (D), rendimento quântico máximo e matéria fresca radicular aos 22 DAE (E) em plantas de soja inoculadas com *Meloidogyne javanica* e submetidas a isolados de *Trichoderma*.





Fonte: O Autor (2018).

6.4 DISCUSSÃO

Estudos que relatam o potencial de ação de *Trichoderma* spp. na supressão de *Meloidogyne* sp. como o de Affokpon et al.,(2011),Elgorban et al., (2014), Amir-Ahmadi; Moosavi; Moafpourian, (2017), corroboram com os resultados encontrados no presente estudo com os isolados de *Trichoderma* UFSMQ40 e UFSMQ1.

Os resultado obtidos neste estudo demonstram que o isolado de *Trichoderma* UFSMQ40 mostrou-se eficiente em controlar a taxa de eclosão de ovos e aumentar a percentagem de mortalidade de juvenis de segundo estágio de *M.javanica*. O que pode ser considerado promissor no controle de *M. Javanica* na fase de ovos.

Um dos principais mecanismos utilizados por isolados de *Trichoderma* spp. no parasitismo direto de ovos e larvas pode estar associado à excreção de enzimas proteolíticas ou quitinolíticos que possibilitam a quebra da parede celular dos ovos e larvas (ELGORBAN et al., 2014). Além da presença de compostos presentes nos filtrados de *Trichoderma* como metabólitos secundários voláteis ou não voláteis com

efeito nematicida (SELLAMI et al., 2017). Resultados semelhantes ocorreram com isolados de *T. longibrachiatum* que apresentaram um forte efeito sob a mortalidade de juvenis de segundo estágio de *M. incognita* (ZHANG; GAN; XU, 2015). Al-Shammari et al., (2013) observaram que os filtrados de cultura de *T. longibrachiatum* causaram 64,5% de mortalidade dos juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica* após 72 h de contato com o fungo.

Para as variáveis de dano, causado por *M. javanica*, nas raízes das plantas de soja, os isolados *Trichoderma* UFSMQ40 $1,25 \times 10^9$ e UFSMQ1 $2,5 \times 10^9$ apresentaram resultados promissores para redução de penetração no sistema radicular, sugerindo que estes isolados desenvolvam mecanismos de proteção das raízes evitando a penetração dos nematoides. Tais mecanismos podem estar relacionados com a capacidade do fungo em acelerar a indução de fitohormônios que coordenam a indução de defesa da planta, como por exemplo, a produção do ácido salicílico (SA) que está associada ao estágio inicial de indução da infecção (MARTÍNEZ-MEDINA et al., 2017).

Ainda, tem sido relatado que, isolados de *Trichoderma* podem induzir resistência a penetração pela acumulação de diferentes compostos antagonistas, tais como peroxidase e fenoloxidase na rizosfera da planta (SELIM et al., 2014). Em estudo realizado por Pau et al. (2012), os autores observaram que isolados de *Trichoderma* spp. produziram enzimas associadas a indução de transtornos fisiológicos em juvenis de segundo estágio, diminuindo assim a penetração radicular. Tal habilidade, foi também estudada por Affokpon et al.,(2011), onde os autores realizaram aplicações no pré plantio de mudas de tomate de isolados de *Trichoderma*, resultando em diminuição da penetração por juvenis de segundo estágio de *M.incognita*.

A microbiolização de sementes com isolados de *Trichoderma* UFSMQ40 e UFSMQ1 foram positivas para redução do fator de reprodução de *M.javanica* possivelmente pela produção de enzimas hidrolíticas (CHAVAN; DESHPANDE, 2013) e compostos orgânicos voláteis ou não voláteis com efeito nematicida (EFFMERT et al., 2012), aliado a indução de resistência à planta (DJONOVIC et al., 2007); (HARMAN et al., 2004b). Durante o período de alimentação, os fitonematoides podem suprimir a liberação de ácido jasmônico, reduzindo os mecanismos de defesa da planta. O que pode ser minimizado pela presença de *Trichoderma* spp., que aumenta

as concentrações de jasmonato na rizosfera da planta possibilitando maior defesa da planta e um menor fator de reprodução (MARTÍNEZ-MEDINA et al., 2017).

O número de juvenis penetrados apresentou uma correlação pequena e positiva com a variável fator de reprodução de *Meloidogyne javanica*, demonstrando que os tratamentos com menor penetração radicular também foram os que apresentaram menor fator de reprodução de *M. javanica* (Figura 2A). Este resultado revela que a ação dos isolados de *Trichoderma* começa no início da injúria dos fitonematoides e se mantém ao longo do ciclo da cultura.

Houve correlação entre o fator de reprodução e as doses utilizadas, sendo que as maiores supressões foram observadas nas doses mais elevadas do isolado *Trichoderma* UFSMQ40. Resultado semelhante foi observado por Al-Hazmi; Tariqjaveed, (2016) com *Meloidogyne javanica* na cultura do tomate. De um modo geral, os isolados de *Trichoderma* UFSMQ1 e UFSMQ40 foram mais eficientes do que o isolado de *Trichoderma* UFSMQ36 neste estudo. Esses resultados podem estar relacionados a grande variabilidade genética entre os isolados, onde há maior capacidade de supressão de fitonematoides de uma espécie em relação a outra, além da diferença de ambiente que cada fungo foi isolado (AL-HAZMI; TARIQJAVEED, 2016).

O isolado de *Trichoderma* UFSMQ36 foi ligeiramente superior aos isolados de *Trichoderma* UFSMQ1 e UFSMQ40 no parâmetro IVG. O efeito benéfico da presença do *Trichoderma* em sementes de soja corrobora com o estudo de (Asaduzzaman; Alam; Islam, 2013) em que sementes de pimenta foram revestidas com suspensão fúngica *T. harzianum* e apresentaram maiores médias de germinação e vigor de sementes comparados ao tratamento testemunha.

O efeito dos isolados de *Trichoderma* UFSMQ1, UFSMQ36 e UFSMQ40 nas variáveis MSR 22 DAE, MFR 80 DAE, MSPA 80 DAE sobre as plantas de soja pode estar associado a produção pelo *Trichoderma* de formas solúveis de fosfato ou pela produção de análogos de ácido indol-3-acético (IAA) ou de auxina (HOYOS-CARVAJAL; ORDUZ; BISSETT, 2009) que estimulam o desenvolvimento das plantas. Alguns isolados de *Trichoderma* são capazes de produzir metabólitos que melhoram o crescimento da planta, entretanto a produção desses metabólitos podem não se correlacionar com o maior desenvolvimento de raízes e partes aéreas de plantas (HOYOS-CARVAJAL; ORDUZ; BISSETT, 2009). É provável que o valor da MSPA aos 80 DAE no tratamento testemunha seja devido a resposta das plantas ao estresse

moderado causado pelo fitonematoide (ABRÃO; MAZZAFERA, 2001). Da mesma forma o valor da MFR aos 80 DAE pode estar associado a formação de raízes secundárias para compensar a infecção do fitonematoide (HUTANGURA et al., 1999) e a própria formação de galhas que aumenta o peso da raiz (CARNEIRO; ALMEIDA, 2000) (Tabela 10).

A microbiolização de sementes de soja com *Trichoderma* em plantas submetidas a estresse por *M.javanica* mostrou um considerável aumento nos parâmetros de taxa de transporte de elétrons (ETRm) e redução na fluorescência máxima (Fm) possivelmente porque o *Trichoderma* estimula fitormônios e enzimas da clorofila (ZHANG et al., 2013) (HASHIM et al., 2014) potencializando a taxa de transporte de elétrons e amenizando a perda de energia por fluorescência. Os tratamentos de isolados de *Trichoderma* UFSMQ40 e tratamento testemunha apresentaram os menores valores de fluorescência inicial (Fo) e os maiores valores rendimento quântico máximo. O tratamento testemunha obteve esses valores possivelmente porque a injúria causada pelo fitonematoide não foi suficiente para provocar danos nestas variáveis. Os efeitos sob a fluorescência da clorofila a geralmente só são perceptíveis a partir de uma população relativamente alta de fitonematoides(ASMUS; FERRAZ, 2001).

As variáveis apresentadas na Figura 2, com exceção da Figura 2A, mostraram correlação alta e positiva entre si, demonstrando que uma variável apresenta forte influência sobre a outra. Destaca-se a correlação entre penetração de juvenil de segundo estágio e Fo e Fm. Quanto maior a irritação no sistema radicular pela penetração dos juvenis de *M. javanica* menor a eficiência em conversão de energia solar em energia química principalmente no estágio inicial de parasitismo. Avaliações realizadas aos 18 dias após a inoculação de *M. javanica* com alta densidade de fitonematoides, com potencial de penetração do sistema radicular da plântula de soja, pode causar grande estresse hídrico interferindo na condutância estomática e conseqüentemente na fotossíntese (ASMUS; FERRAZ, 2001).

Os isolados de *Trichoderma* causaram efeitos diretos e indiretos na eclosão e mortalidade in vitro, penetração, reprodução de *M.javanica*, germinação, matéria seca/fresca e atributos da fluorescência da clorofila a. Isso mostra que esses isolados locais em especial *Trichoderma* UFSM40 e UFSMQ1 possuem potencial significativo como agentes de controle biológico contra *M. javanica* em plantas de soja.

Os isolados de *Trichoderma* UFSM40 e UFSMQ1 revelaram resultados promissores para a supressão de *M. javanica* e respostas morfológicas e fisiológicas nas plantas de soja. Estes resultados sugerem que sejam realizados novos estudos com isolados de *Trichoderma* para uma maior compreensão da relação entre *Trichoderma*/fitonematoides e *Trichoderma*/plantas de soja.

6.5 CONCLUSÃO

O *Trichoderma* UFSMQ40 controla a eclosão de ovos de *Meloidogyne Javanica* in vitro. UFSMQ40 e UFSMQ1 promovem a mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* in vitro.

Trichoderma UFSMQ40 $1,25 \times 10^9$ e UFSMQ1 $2,5 \times 10^9$ são eficientes na diminuição de juvenis de segundo estágio penetrados no sistema radicular de plântulas de soja.

Trichoderma UFSMQ40 e UFSMQ1 atuam na diminuição de reprodução de *Meloidogyne javanica*. A maior quantidade possível testada neste experimento de inóculo de *Trichoderma* UFSMQ40 favorece a supressão de *Meloidogyne javanica*.

O *Trichoderma* UFSMQ36 proporciona maior germinação, índice de velocidade de germinação e taxa de transporte de elétrons.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle biológico com espécies antagonistas é um método eficiente e com poucos riscos ao ambiente para o manejo de pragas agrícolas. Os fungos do gênero *Trichoderma* desempenham um importante papel dentre os fungos nematófagos pela atuação que desempenham no controle de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*. Entretanto é necessário mais pesquisas para a obtenção de espécies locais que possam ser usadas no controle biológico de nematoides.

No presente estudo foi isolado do solo e identificado um isolado de *Trichoderma* com a finalidade de supressão de *Meloidogyne* sp. em plantas de soja. Como também foi utilizado duas espécies de *Trichoderma* reconhecidos pela capacidade de produzir quitina para avaliar a possibilidade destes isolados de suprimirem os fitonematoides.

Por meio dos resultados obtidos neste trabalho evidenciou-se que isolados de *Trichoderma* foram eficazes na supressão de fitonematoides. As diferentes concentrações de conídios de suspensão fúngica mostraram uma heterogeneidade de resultados dependendo das variáveis analisadas e revelou um comportamento irregular para cada isolado de *Trichoderma*. Contudo recomenda-se mais estudos para elucidar as concentrações necessárias para uma eficiente supressão de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*, principalmente a campo.

No presente estudo os isolados de *Trichoderma* mostraram comportamentos distintos no controle de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*. Para a espécie *M.incognita* o isolado *Trichoderma* UFSMQ36 mostrou-se mais eficiente na supressão deste patógeno, entretanto para o *M.javanica* o mesmo isolado foi menos eficiente. Por isso há necessidade de mais pesquisas com as espécies de *Meloidogyne* para melhor compreensão da interação *Trichoderma*X*Meloidogyne*Xplanta.

Neste contexto é indispensável a realização de novos estudos para melhor compreensão dos mecanismos utilizados pelo *Trichoderma* na supressão de fitonematoides, e na interação no ambiente rizosférico do solo. A utilização de práticas agrícolas menos invasivas têm grande importância para a manutenção da biodiversidade do solo, para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável. Por isso, precisa-se elucidar o máximo das lacunas existentes na relação entre patógeno e antagonista, e rizosfera/planta/antagonista para mitigar os problemas crescentes causados por fitonematoide do gênero *Meloidogyne* sp. na soja.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, P. et al. Invasion, feeding and development. In: **Root-knot Nematodes** Perry, R.N. & M. Moens, Eds. 2009. pp. 163-181.
- ABRÃO, M. M.; MAZZAFERA, P. Efeitos do nível de inóculo de *Meloidogyne incognita* em algodoeiro. **Bragantia**, v. 60, p. 19–26, 2001.
- AFFOKPON, A. et al. Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 3, p. 600–608, 2011a.
- AFFOKPON, A. et al. Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 3, p. 600–608, 2011b.
- AGRIOS, G. Plant diseases caused by nematodes. In: Agrios, G. (ed). **Plant pathology**, Elsevier Academic Press, San Diego, Estados Unidos, 2004 p. 825-874.
- AHMAD, P. et al. Role of *Trichoderma harzianum* in mitigating NaCl stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L) through antioxidative defense system. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 868, 14 out. 2015.
- AL-HAZMI, A. S.; TARIQJAVEED, M. Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 2, p. 288–292, 2016.
- AL-SHAMMARI, T. A. et al. The use of *Trichoderma longibrachiatum* and *Mortierella alpina* against root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* on tomato. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 7, p. 199–207, 2013.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- AMIR-AHMADI, N.; MOOSAVI, M. R.; MOAFPOURIAN, G. Effect of soil texture and its organic content on the efficacy of *Trichoderma harzianum* (MIAU 145 C) in controlling *Meloidogyne javanica* and stimulating the growth of kidney beans. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 115–127, 2017.
- APARECIDA DA COSTA, M. **Biocontrole de nematoides com fungos**. Dissertação de Mestrado. 2015. 57p. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal. Jaboticaba – SP.

ASADUZZAMAN, M.; ALAM, M. J.; ISLAM, M. M. Effect of Trichoderma on seed germination and seedling parameters of chili. **Journal of Science Foundation**, v. 8, n. 1–2, p. 141–150, 2013.

ASADUZZAMAN, M.; ALAM, M.J. Effect of Trichoderma on seed germination and seedling parameters of chili. **Journal of Science Foundation**, 8(1-2), 141-150. 2010.

ASMUS, G. L.; FERRAZ, L. Relações entre a densidade populacional de Meloidogyne javanica e a área foliar, a fotossíntese e os danos causados a Variedades de soja. **Nematologia Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 1–13, 2001.

ASMUS, G. L.; INOMOTO, M. M.; SILVA, R. A.; GALBIERI, R. Manejo de nematoides. In: Freire, E.C. (ed.). **Algodão no cerrado do Brasil**. Abrapa, Brasília, Brasil: Gráfica e Editora Positiva, 2015. p.445-483

BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, n. 1, p. 89–113, 2008.

BALDONI, D. B. **Prospecção de fungos para produção de quitinases por fermentação em estado sólido**. 2016.84p. Tese (doutorado). Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, RS.

BALDONI, E. et al. Analysis of transcript and metabolite levels in Italian rice (*Oryza sativa* L.) cultivars subjected to osmotic stress or benzothiadiazole treatment. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 492–503, 2013.

BANORA, M. Y. et al. Feeding Cells Induced by Phytoparasitic Nematodes Require γ -Tubulin Ring Complex for Microtubule Reorganization. **PLOS Pathogens**, v. 7, n. 12, p. e1002343, 2011.

BARKER, K. R., KOENNING, S. R. Developing sustainable systems for nematode management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, n. 1, p. 165-205, 1998.

BARKER, K. R.; KOENNING, S. R. DEVELOPING SUSTAINABLE SYSTEMS FOR NEMATODE MANAGEMENT. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, n. 1, p. 165–205, 28 set. 1998.

BARRON, G. L. The nematode-destroying fungi. In: **Topics in mycobiology**. 1977 pp.140 pp.

BETTIOL W.; MORANDI M. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL W.; MORANDI M. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna, SP. Embrapa Meio Ambiente, 2009, p. 7-14.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. (Ed.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna. Embrapa-CNPMA. 1991. pp. 1-5.

BETTIOL, W. Controle de doenças de plantas com agentes de controle biológico e outras tecnologias alternativas. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Eds.) **Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário**. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2003. pp. 191-215.

BETTIOL, W. et al. Supressividade a Fitopatógenos Habitantes do Solo. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna, SP. Embrapa Meio Ambiente, 2009, p. 7-14.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 24 abr. 2012.

BONETTI, J.I.S. & FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira** 6:553. 1981.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : Mapa/ACS, 2009. 399 p.

BRIDA, A. et al. Variabilidade espacial de *Meloidogyne javanica* em soja. **Summa Phytopathology**, v. 42, p. 175–179, 2016.

BRUINSMA, J. S. **Avaliação de métodos para estudo da resistência de genótipos de soja a *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood**. 2013. 59p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia. Santa Maria –RS.

BYBD JR, D. W.; KIRKPATRICK, T.; BARKER, K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology**, v. 15, n. 1, p. 142, 1983.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Eds.) **Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário**. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2003a. pp. 13-51.

CAMPOE, O. C. et al. Atlantic forest tree species responses to silvicultural practices in a degraded pasture restoration plantation: From leaf physiology to survival and initial growth. **Forest Ecology and Management**, v. 313, p. 233–242, 2014.

CAMPOS, H. D. et al. Attraction and penetration of *Meloidogyne javanica* and *Heterodera glycines* in excised soybean roots. **Ciência Rural**, v. 41, n. 9, p. 1496–1502, 2011.

- CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, p. 553–556, 1999.
- CARDOSO E. R. **Fungos nematófagos em diferentes solos e caracterização fisiológica de *Arthrobotrys oligospora***. 2007 87p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal –SP.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. **Caracterização isoenzimática e variabilidade intraespecífica dos nematóides de galhas do cafeeiro no Brasil**. 2000.
- CARRERAS-VILLASENOR, N.; SANCHEZ-ARREGUIN, J. A.; HERRERA-ESTRELLA, A. H. Trichoderma: sensing the environment for survival and dispersal. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 3–16, 1 jan. 2012.
- CHAMBERGO, F. S.; VALENCIA, E. Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2567–2577, 25 mar. 2016.
- CHAMBERGO, F. S.; VALENCIA, E. Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2567–2577, 25 mar. 2016.
- CHAVAN, S. B.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an appraisal as a product of commercial potential. **Biotechnology progress**, v. 29, n. 4, p. 833–846, 2013.
- CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. A technique for determining live second-stage juveniles of Heterodera glycines. **Journal of Nematology**, v. 32, n. 1, p. 117, 2000.
- CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W.; MITCHELL, D. J. Population development of Heterodera glycines in response to mycoflora in soil from Florida. **Biological Control**, 6:226-231, 2004.
- COHEN, J. **Statistical power analysis for the behavioral sciences** (2nd ed.). New York, 1988, 579p.
- CONAB – **Companhia nacional de abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acessado em: 29 de Janeiro de 2017.
- COOKE, S. J.; SUSKI, C. D. Ecological Restoration and Physiology: An Overdue Integration. **BioScience**, v. 58, n. 10, p. 957–968, 2008.
- CORABI-ADELL C, LUCON CMM, KOIKE CM Biodiversidade do gênero Trichoderma no Estado de São Paulo– aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador. **Arqu Instit Biológico** v. 69. 2002.
- CORRÊA, M. J. P. & ALVES, P. L. da C. A. Efeitos da aplicação de herbicidas sobre a eficiência fotoquímica em plantas de soja convencional e geneticamente modificada **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 34, n. 5, p. 1136-1145, set./out., 2010.

DALLA CORTE G. **Tecnologia de aplicação de agrotóxicos no controle de fitonematoides em soja**. 2013, 62p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais. Santa Maria – RS.

DAVIS, R. F., STETINA, S. R. Resistance and tolerance to nematodes in cotton. In: GALBIERI R.; BELOT L.J. ed. **Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle**. Cuiabá, MT, Instituto Mato-grossense do Algodão, 2016. p. 11-36.

DAVIS, R. F.; WEBSTER, T. M. Relative host status of selected weeds and crops for *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis*. **J. Cotton Sci**, v. 9, n. 1, p. 41–46, 2005.

DE LA TORRE, M. A.; GOMEZ-ALARCON, G. Manganese and iron oxidation by fungi isolated from building stone. **Microbial Ecology**, v. 27, n. 2, p. 177–188, 1994.

DE LIMA, F. B. et al. *Trichoderma harzianum* T1A constitutively secretes proteins involved in the biological control of *Guignardia citricarpa*. **Biological Control**, v. 106, p. 99–109, 2017.

DIÁNEZ MARTÍNEZ, F. et al. *Trichoderma saturnisporum*, a new biological control agent. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 6, p. 1934–1944, 2016.

DIAS, W. P. et al **Nematóides em Soja: Identificação e Controle**. Circular Técnica 76. Londrina, PR. 2010. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/854178/1/CT76eletronica.pdf>. Acessado em: 15/10/2017.

DIAS, W. P. et al. Reação de Genótipos de Soja a *Meloidogyne enterolobii* e *M. ethiopica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 220, n. 344, 2010.

DJONOVIĆ, S. et al. A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. **Plant Physiology**, v. 145, n. 3, p. 875–889, 2007.

DOMINGUES, M. V. P. et al. Effect of temperature on mycelial growth of *Trichoderma*, *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*, as well as on mycoparasitism. **Summa phytopathol.**, vol.42, n.3, pp.222-227, 2016.

DONG, L. Q.; ZHANG, K. Q. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant and Soil**, v. 288, n. 1–2, p. 31–45, 25 out. 2006.

DONG, Y.-H. et al. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 2, p. 954–60, 1 fev. 2004.

DUDDINGTON, C. L. Notes on the technique of handling predaceous fungi. **Transactions British Mycological Society**, v. 38, p. 93-107, 1955.

EDWARD, O. et al. **The threat of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Africa: A review**. v. 63, 2014.

EFFMERT, U. et al. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. **Journal of chemical ecology**, v. 38, n. 6, p. 665–703, 2012.

ELGORBAN, A. M. et al. Biocontrol of *Meloidogyne javanica* on tomato plants by *Hypocrea lixii* (the Teleomorph of *Trichoderma harzianum*). **CLEAN–Soil, Air, Water**, v. 42, n. 10, p. 1464–1469, 2014.

EMBRAPA- **Sistemas de produção** – Empresa brasileira de pesquisa agropecuária sistemas de produção. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/>>. Acessado em: 29 de Janeiro de 2017.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília. v. 3.ed. 2013,319 p.

ETHUR, L. Z. et al. *Trichoderma harzianum* no desenvolvimento e na proteção de mudas contra a fusariose do tomateiro. **Ciência e Natura**, v. 30, n. 2, p. 57, 2008.

FARIA, C. et al. Mecanismos de ataque e defesa na interação nematóideplanta. In.: FERNANDES, JM; PRESTES, AM; PICININI, EC. **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: Revisão anual de patologia de plantas, v. 11, p. 373–410, 2003.

FERRAZ, L.C.C.B. As meloidogynases da soja: passado, presente e futuro. In: SILVA, J.F.V (Org.) **Relações parasito-hospedeiro nas meloidogynases da soja**. Londrina: EMBRAPA Soja/ Sociedade Brasileira de Nematologia, 2001. P.15-38

FERRAZ, L.C.C.B.; BROWN, D.J.F. **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. L.C.C.B. Ferraz e D.J.F. Brown (Orgs.). Manaus: NORMA EDITORA, 2016, p. 251.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; DIAS-ARIEIRA, C. R. **Manejo sustentável de fitonematoides**, 1 ed., Viçosa: Editora UFV, 2010. 306 p.

FILHO, M.R.C.; MELLO, S.C.M.; SANTOS, R.P. E MENÊZES, J.E. **Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético in vitro e colonização endofítica de mudas de eucalipto**. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 226. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2008

FRANZENER ET AL. Nematoides Formadores de Galha e de Cisto Patogênicos à Cultura da soja em municípios do oeste do Paraná. **Nematologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 261–265, 2005.

FREITAS, M. A. de. **Potenciais agentes de biocontrole para *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar**. 2011. 86p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife,

GABIA, A. A. [UNESP]. **Influência do manejo da cultura da soja na população de *Rotylenchulus reniformis* e seu comportamento espacial**. Dissertação Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2 fev. 2017.

GALBIERI R.; ASMUS L.G. Principais espécies de nematoides do algodoeiro no Brasil. In: GALBIERI R.; BELOT L.J. ed. **Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle**. Cuiabá, MT, Instituto Mato-grossense do Algodão, 2016. p. 11-36.

GAMS, W.; BISSETT, J. Morphology and identification of Trichoderma. In: HARMAN GE, KUBICEK CP, editors G.E., **Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics**, Taylor & Francis Ltd., London, 1998 p. 139–192

GARDIANO, C. G. et al. Efeito de extratos aquosos de espécies vegetais sobre a multiplicação de *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 4 2011.

GLYNN, P.; FRASER, C.; GILLIAN, A. Foliar salt tolerance of Acer genotypes using chlorophyll fluorescence. **Journal Arboriculture**, v.29, p.61-65, 2003.

GOMES, C. B.; CAMPOS, A. D. Nematoides. In: RASEIRA, M. C. B.; QUEZADA, A. C. (Ed.) **Pêssego: produção. Brasília: Serviço de Produção de Informações**, 2003. p. 115-122.

GOULART, A.M.C., FERRAZ, L., Comunidade de nematóides em Cerrado com vegetação original preservada ou substituída por culturas. **Nematologia Brasileira** 27, 123-128. 2003.

GRIGOLLI, J.F.J., ASMUS, G.L. **Manejo de nematoides na cultura da soja**. Embrapa Agropecuária Oeste. Capítulo em livro técnico-científico 2014. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/985986/1/cap.9.pdf>. Acessado em: 22/09/2017.

HADDAD, P. E. **Avaliação de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Meloidogyne incognita* em soja e produção em meios líquidos**. 2014, p. 100. Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós- Graduação. São Paulo-SP.

HAMZA, M. A. et al. Diversity of nematophagous fungi in Moroccan olive nurseries: Highlighting prey-predator interactions and efficient strains against root-knot nematodes. **Biological Control**, 2017.

HANADA R. et al. *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. **Mycological research** v.112 p.1335–1343, 2008.

HARMAN, G. E. et al. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v. 94, n. 2, p. 147–153, 2004b.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43, 2004a.

HARMAN, G. E. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190–194, 16 fev. 2006.

HASHEM, A. et al. Alleviation of abiotic salt stress in *Ochradenus baccatus* (Del.) by *Trichoderma hamatum* (Bonord.) Bainier. **Journal of plant interactions**, v. 9, n. 1, p. 857–868, 2014.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**, v. 51, n. 3, p. 409–416, 2009.

HUANG, W.-K. et al. Testing various biocontrol agents against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in cucumber plants identifies a combination of *Syncephalastrum racemosum* and *Paecilomyces lilacinus* as being most effective. **Biological Control**, v. 92, p. 31–37, 2016.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. B. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Dis. Rep.**, v. 57, n. 7, p. 1025–1028, 1973.

HUSSEY, R.S.; V.M WILLIAMSON. Physiological and molecular aspects of nematode parasitism. In: BARKER, K.R.; G.A. PEDERSON; G.L. WINDHAM (Ed.) **Plant and nematode interactions**. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, 1998. Cap.5, p.87-108, 1998.

HUTANGURA, P. et al. Auxin induction is a trigger for root gall formation caused by root-knot nematodes in white clover and is associated with the activation of the flavonoid pathway. **Functional Plant Biology**, v. 26, n. 3, p. 221–231, 1999.

INOMOTO Manejo Cultural de Fitonematoides. In: GALBIERI R.; BELOT L.J. ed. **Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: biologia e**

medidas de controle. Cuiabá, MT, Instituto Mato-grossense do Algodão, 2016. p. 257-287.

ISAIAS C.O. et al. Antagonistic action and bioactive metabolites of *Trichoderma* spp. against the pathogens *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae*. **Summa phytopathol.** vol.40 n.1 . 2014

JAKLITSCH, W. M. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. **Studies in Mycology**, v. 63, p. 1–91, 1 jan. 2009.

JANSSON, H.B.; TUNLIB, A.; NORDBRING-HERTZ, B. Biological control: Nematodes. In: ANKE, T. (Ed.). **Fungal Biotechnology**. Weinheim: Chapman and Hall, 1997. p.38-50.

JINDAPUNNAPAT, K.; CHINNASRI, B.; KWANKUAE, S. Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne enterolobii*) in guava by the fungus *Trichoderma harzianum*. **Journal of Developments in Sustainable Agriculture**, v. 8, n. 2, p. 110–118, 2013.

JONES, J. T. et al. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 9, p. 946–961, 1 dez. 2013.

KARSSSEN G, WESEMAEL W, MOENS M. Root-knot nematodes. In: PERRY RN, MOENS M. (Eds) **Plant Nematology**. 2nd edition, CAB International, Wallingford, UK, 73-108, 2013.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 313-349, 1991.

LEONETTI, P. et al. Induction of SA-signaling pathway and ethylene biosynthesis in *Trichoderma harzianum*-treated tomato plants after infection of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Plant cell reports**, v. 36, n. 4, p. 621–631, 2017.

LIMA, F. et al. *Trichoderma harzianum* T1A constitutively secretes proteins involved in the biological control of *Guignardia citricarpa*. **Biological Control** v. 106 p.99-106, 2017.

LOBO J. M. Controle biológico de patógenos de solo. In: Bernardo de Almeida Halfeld Vieira et al. **Defensivos Agrícolas Naturais Uso e Perspectivas**. Brasília, DF: Embrapa, 2016 p.81-100.

LÓPEZ-BUCIO, J.; PELAGIO-FLORES, R.; HERRERA-ESTRELLA, A. *Trichoderma* as biostimulant: Exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. **Scientia Horticulturae**. v. 196 p.109-123, 2015.

LORDELLO, L. G. E. **Nematóides das plantas cultivadas**. 8ª ed. São Paulo, Ed. Livraria Nobel, 1984, p.314.

LOVATO, B. V. **Ocorrência de *Pasteuria* sp. em *Heterodera glycines* no Brasil e compatibilidade do isolado PN1 de *P. nishizawae* com populações de campo do nematoide.** 2013, p. 58. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Uberlândia-MG.

LOVEYS, B. R.; BIRD, A. F. The influence of nematodes on photosynthesis in tomato plants. **Physiological Plant Pathology**, v. 3, n. 4, p. 525–529, 1973.

LUCON, C.M.; CHAVES A. L.; BACILIERI S. **Trichoderma: o que é, para que serve e como usar corretamente na lavoura.** Cleusa Maria Mantovanello Lucon, 1º ed., Instituto Biológico, São Paulo, 2014, p. 28.

LUZ, W.C. da. Combinação dos tratamentos biológico e químico de semente de milho. **Fitopatologia Brasileira** 28:037-040. 2003.

MACHADO A. C.; KANEKO L.; PINTO Z.V. Controle Biológico. In: GALBIERI R.; BELOT L.J. ed. **Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle.** Cuiabá, MT, Instituto Mato-grossense do Algodão, 2016. p. 287-312.

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

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK; D.P. **Microbiologia de Brock.** Traduzido de Brock Biology of Microorganisms. 12ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAIA, L. C. et al. Diversity of Brazilian Fungi. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1033–1045, 2015.

Manual de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina / Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Comissão de Química e Fertilidade do Solo. - 1. ed. – Porto Alegre, 2016.

MARTÍNEZ-MEDINA, A. et al. Shifting from priming of salicylic acid-to jasmonic acid-regulated defences by Trichoderma protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. **New Phytologist**, v. 213, n. 3, p. 1363–1377, 2017.

MEDEIROS, H. A. DE et al. Tomato progeny inherit resistance to the nematode *Meloidogyne javanica* linked to plant growth induced by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. **Scientific Reports**, v. 7, p. 40216, 2017.

MEHTA, Y.R.; BOMFETI, C.; BOLOGNINI, V. A semi-selective agar medium to detect the presence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* in naturally infected cotton seed. **Fitopatologia Brasileira**, 30, p. 489-496. 2005.

MELO, I. S. Trichoderma e Gliocladium como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p.261-295, 1996.

- MENTEN J.O.; BANZATO T. **Agricultura, pragas, manejo integrado e produtos fitossanitários**. Conselho Científico para Agricultura Sustentável. USP, ESALQ, 2016.
- MERTZ, L. M.; HENNING, F. A.; ZIMMER, P. D. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. Bioprotectors and chemical fungicides in the treatment of soybean seeds. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 13–18, 2009.
- MESSCHMIDT, A. A. **Respostas fisiológicas induzidas por estresse hídrico e infecção por *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood em porta enxertos de *Prunus* spp.** Dissertação em Fisiologia vegetal. Universidade Federal de Pelotas, 20 dez. 2013.
- MOREIRA, S. S. **Aspectos do desenvolvimento em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculados com *Trichoderma* spp.** 2014 p.82. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal) Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- MORILLO, S. R. C.; SILVA, G. S. DA. Efeito antagônico de feijão-de-porco sobre *Meloidogyne enterolobii* em tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 41, p. 305–310, 2015.
- MOURA, R. M. Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. **Revisão Anual de Patologia de Plantas – RAPP**, Passo Fundo, Brasil. v.4, p.209-244, 1996.
- MUKHERJEE, P. K. et al. *Trichoderma* Research in the Genome Era. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, n. 1, p. 105–129, 4 ago. 2013.
- NAWROCKA, J.; MAŁOLEPSZA, U. Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. **Biological Control**, v. 67, n. 2, p. 149–156, 2013.
- NAWROCKA, J.; SZCZECH, M.; MAŁOLEPSZA, U. *Trichoderma atroviride* enhances phenolic synthesis and cucumber protection against *Rhizoctonia solani*. **Plant Prot. Sci.**, 2017.
- NOE, J. P. Nematoides parasitas de plantas. In: Trigiano, R. N.; Windham, M. T.; Windham, A. S. **Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório**. Porto Alegre, RS, Brasil: Artmed. p. 83-96, 2010.
- NUNES H.T.; MONTEIRO A.C.; POMELA A.W.V. Uso de agentes microbianos e químico para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja. **Acta Scientiarum Agronomy** Maringá, v. 32, n. 3, p. 403-409, 2010
- OJAGHIAN M.R. Potential of *Trichoderma* spp. and *Talaromyces flavus* for Biological Control of Potato Stem Rot Caused by *S. sclerotiorum*. **Phytoparasitica**, v.39, p.185-193, 2011.
- OKA, Y. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments—A review. **Applied Soil Ecology**, v. 44, n. 2, p. 101–115, 2010.

OYEKANMI, E. O. et al. Improving root-knot nematode management on two soybean genotypes through the application of *Bradyrhizobium japonicum*, *Trichoderma pseudokoningii* and *Glomus mosseae* in full factorial combinations. **Crop Protection**, v. 26, n. 7, p. 1006–1012, 2007.

PACHECO, P.V.M. et al. **Microbiolização de sementes de tomateiro com rizobactérias sobre características fisiológicas**. 8º Forum Fepeg, 2014.

PAPAVIZAS, G. C.; LEWIS, J. A.; MOITY, T. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. **Phytopathology**, v. 72, n. 1, p. 126–132, 1982.

PEHLIVAN, N. et al. *Trichoderma lixii* ID11D seed biopriming mitigates dose dependent salt toxicity in maize. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 3, p. 79, 2017.

PINHEIRO, J. et al., **Manejo de nematoides na cultura do alface**. Embrapa Hortaliças- Circular Técnica. 2013 Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1021759/1/CT143.pdf> Acessado em: 09/08/2017.

PINHEIRO, J., da SILVA, G., PEREIRA, R. **Nematoides na cultura da batata**. Embrapa Hortaliças-Circular Técnica. 2015. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1021759/1/CT143.pdf> Acessado em: 29/11/2017.

PRADO, C. H. B. A.; CASALI, C. A. **Fisiologia vegetal: práticas em relações hídricas, fotossíntese e nutrição mineral**. Barueri, SP, Editora Manole Ltda., 2006. 466 p.

RADWAN, M. A. et al. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. **Applied Soil Ecology**, v. 56, p. 58–62, 2012.

RITCHIE, G. A. et al. Assessing plant quality. . In: LANDIS, T. D.; DUMROESE, R. K.; HAASE, D. L. (Eds.). . **The container tree nursery manual: Seedling processing, storage, and outplanting**. . Washington: United States Department of Agriculture, Forest Service, 2010. p. 19–81.

RITZINGER;; FANCELLI. Manejo integrado de nematóides na cultura da bananeira. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 28, n. 2, p. 331–338, 2006.

RYDER L. S., HARRIS B. D., SOANES D. M., KERSHAW M. J., TALBOT N. J., THORNTON C. R. Saprotrophic competitiveness and biocontrol fitness of a genetically modified strain of the plant-growth-promoting fungus *Trichoderma hamatum* GD12. **Microbiology** 158, 84–97.2012.

SAHEBANI, N.; HADAVI, N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2016–2020, 2008.

SAMUELS, G.J. et al. **Trichoderma Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory**. ARS, USDA. Disponível em: <<http://nt.ars-rin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>> Acesso em: 15/10/2017.

SAMUELS, G.J.; ISMAIEL, A.; BOM, M.C.; DE RESPINIS, S.; PETRINI, O. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. **Mycologia**. v.102(4). p. 944-966. 2010.

SANTIN R. de C. M. **Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. E *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris***. 2008, p. 92. Tese (doutorado) em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

SANTOS, M. A.; FERRAZ S.; MUCHOVEJ, J. J. Detection and ecology of nematophagous fungi from Brazilian soils. **Nematologia Brasileira**, v. 15, p. 121-134, 1991.

SASSER, J. N.; KIRBY, M. F. **Crop cultivars resistant to root-knot nematodes, *Meloidogyne* species, with information on seed sources**. 1979.

SBN– **Sociedade Brasileira de Nematologia**. Disponível em: <http://nematologia.com.br/> Acessado em: 10 de Abril de 2017.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787–799, 2010.

SELIM, M. E. et al. Biological and chemical dependent systemic resistance and their significance for the control of root-knot nematodes. **Nematology**, v. 16, n. 8, p. 917–927, 2014.

SELLAMI, S. et al. Evaluation of antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against *Meloidogyne incognita*. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, v. 52, n. 2, p. 177–184, 2017.

SHARON, E. et al. **Biocontrol of root-knot nematodes by *Trichoderma*—modes of action. Proceedings of IOBC Meeting on Multitrophic Interactions in Soil**, Dijon, France. IOBC/WPRS Bulletin. Anais.2009

SHARON, E. et al. Biological Control of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 91, n. 7, p. 687–693, 2001.

SILVA, J. DE O. et al. Biocontrol agents in the management of *Meloidogyne incognita* in tomato. **Ciência Rural**, v. 47, n. 10, 2017.

SINGH, S. K.; HODDA, M.; ASH, G. J. Plant-parasitic nematodes of potential phytosanitary importance, their main hosts and reported yield losses. **EPPO Bulletin**, v. 43, n. 2, p. 334–374, ago. 2013.

SIVASITHAMPARAM K, GHISALBERTI EL. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: HARMAN GE, KUBICEK CP, editors. **Trichoderma and Gliocladium**. London: Taylor and Francis.1998 p. 139–192.

SOARES P. L. M. et al. Controle Biológico de Fitonematoides com Fungos Nematófagos In: BERNARDO DE ALMEIDA HALFELD VIEIRA et al. **Defensivos Agrícolas Naturais Uso e Perspectivas**. Brasília, DF: Embrapa, 2016.

SOARES, B. V. et al. Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, v. 469, p. 72–78, 20 fev. 2017.

SOARES, P. L. M. **Estudo do controle biológico de fitonematoides com fungos nematófagos**. 2006. 252 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal – SP.

SOKHANDANI, Z.; MOOSAVI, M. R.; BASIRNIA, T. Optimum Concentrations of *Trichoderma longibrachiatum* and *Cadusafos* for Controlling *Meloidogyne javanica* on Zucchini Plants. **Journal of Nematology**, v. 48, n. 1, p. 54–63, 2016.

STADEN, R.; JUDGE, D. P.; BONFIELD, J. K. Analyzing Sequences Using the Staden Package and EMBOSS. In: KRAWETZ, S. A.; WOMBLE, D. D. (Eds.). **Introduction to Bioinformatics: A Theoretical and Practical Approach**. Totowa, NJ: Humana Press, 2003. p. 393–410.

STIRLING, G. R. **Biological control of plant parasitic nematodes**. Progress, Problems and Prospects. UK: CAB International, Wallingford, 1991, p.282.

STOPPACHER, N. et al. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, n. 2, p. 187–193, 1 maio 2010.

SUAREZ, B. et al. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 1, p. 46–55, 2004.

SUASSUNA et al. Melhoramento genético do algodoeiro para resistência aos nematoides: seleção assistida por marcadores moleculares. In: GALBIERI R.; BELOT L.J. ed. **Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle**. Cuiabá, MT, Instituto Mato-grossense do Algodão, 2016. p. 243-256.

SZABÓ, M. et al. Control plant-parasitic nematodes with *Trichoderma* species and nematode-trapping fungi: the role of *chi18-5* and *chi18-12* genes in nematode egg-parasitism. **Biological Control**, v. 63, n. 2, p. 121–128, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TAYLOR, A.L. & SASSER, J.N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.)**. Raleigh, M.C. North Carolina State University. 1978.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2. ed. rev. amp. Jaboticabal: Funep, 2000, 473 p.

TOGHUEO, R. M. K. et al. Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. from *Terminalia catappa* against the causative agent of Common Bean Root Rot (*Fusarium solani*). **Biological Control**, v. 96, p. 8–20, 2016.

TRUDGILL, D. L.; BLOK, V. C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annu Rev Phytopathol**, v. 39, p. 53–77, 2001.

USDA – **United States department of agriculture**. Disponível em: <<http://www.usda.gov>>. Acessado em: 29 de Janeiro de 2017.

VIGGIANO, J. R.; DE FREITAS, L. G.; LOPES, E. A. Use of *Pochonia chlamydosporia* to control *Meloidogyne javanica* in cucumber. **Biological Control**, v. 69, p. 72–77, 1 fev. 2014.

WINDHAM, M.T. et al. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v.76, p.518-521, 1986.

YAO H. et al. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. **Plosone**. v.5 p.10, 2010.

YASMEEN, R.; SIDDIQUI ZAMIN, S. Physiological responses of crop plants against *Trichoderma harzianum* in saline environment. **Acta Botanica Croatica**, 2017. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/j/botcro.2017.76.issue-2/botcro-2016-0054/botcro-2016-0054.xml>>

ZANANDREA, I.; NASSI, F. de L.; TURCHETTO, A.C.; BRAGA, E.J.B.; PETERS, J.A.; BACARIN, M.A. Efeito da salinidade sob parâmetros de fluorescência em *Phaseolus vulgaris*. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v.12, n.2, p.157-161, 2006.



ZHANG, F. et al. Putative *Trichoderma harzianum* mutant promotes cucumber growth by enhanced production of indole acetic acid and plant colonization. **Plant and Soil**, v. 368, n. 1, p. 433–444, 2013.

ZHANG, S.; GAN, Y.; XU, B. Biocontrol potential of a native species of *Trichoderma longibrachiatum* against *Meloidogyne incognita*. **Applied Soil Ecology**, v. 94, p. 21–29, 2015.

ZHANG, S.; GAN, Y.; XU, B. Efficacy of *Trichoderma longibrachiatum* in the control of *Heterodera avenae*. **BioControl**, v. 59, n. 3, p. 319–331, 23 jun. 2014.

APÊNDICES

Apêndice 1. Atributos químicos e físicos do solo camada 0,0-0,20 metros da área de solo coletado em Santa Maria, RS.

| | | |
|---|---|---|
|  | <p>MEC - Universidade Federal de Santa Maria Centro de Ciências Rurais - Departamento de Solos</p> <p>Santa Maria/RS Cep:97105-900 Fone: (55) 3220-8153 http://www.ufsm.br/solos</p> <p>Laudo de Análise de Solo</p> |  |
|---|---|---|

Informações fornecidas e de responsabilidade do solicitante

| | |
|---|--------------------------|
| Solicitante: Prof. Zaida Inês Antonioli | CPF/CNPJ: |
| Proprietário: Prof. Zaida Inês Antonioli | CPF/CNPJ: |
| Município: Santa Maria / RS | Endereço: |
| Localidade: | Entrada: 05/10/16 |
| Matrícula: | Emissão: 20/10/16 |

| Registro no LAS | Identificação da amostra | Área (ha) | Sistema de cultivo | Prof. (cm) | Georref. |
|-----------------|--------------------------|-----------|--------------------|------------|----------|
| 24726 | | | | 0-20 cm | |

Informações emitidas pelo laboratório e de responsabilidade do técnico

Diagnóstico para acidez do solo e calagem

| Registro no LAS | pH água 1:1 | Ca | Mg | Al cmol _e /dm ³ | H+Al | CTC efet. | Saturação (%) | | Índice SMP |
|-----------------|-------------|-----|-----|--|------|-----------|---------------|-------|------------|
| | | | | | | | Al | Bases | |
| 24726 | 4,9 | 1,7 | 0,5 | 0,7 | 6,9 | 3,0 | 23,3 | 25,3 | 5,6 |

Diagnóstico para macronutrientes e recomendação de adubação NPK-S

| Registro no LAS | % MO | % Argila | Textura | S | P-Mehlich | C Total ¹ | K | CTC pH7 | K |
|-----------------|------|----------|---------|--------------------|--------------------|----------------------|------------------------------------|--------------------|------|
| | m/v | | | mg/dm ³ | mg/dm ³ | g/kg ¹ | cmol _e /dm ³ | mg/dm ³ | |
| 24726 | 1,5 | 19,0 | 4,0 | 13,1 | 14,6 | -X- | 0,113 | 9,2 | 44,0 |

Diagnóstico para micronutrientes e relações molares

| Registro no LAS | Cu | Zn | B | Fe | Mn | Na | Relações Molares | | |
|-----------------|--------------------|-------|-----|-----|-----|-----|------------------|-----------|--------------------------|
| | mg/dm ³ | | | | | | Ca/Mg | (Ca+Mg)/K | K/(Ca+Mg) ^{1/2} |
| 24726 | 1,053 | 1,434 | 0,2 | -X- | -X- | -X- | 3,7 | 19,60 | 0,076 |

Apêndice 2. Análise Molecular

Identificação em nível de espécie dos isolados de *Trichoderma* spp.

A identificação a nível de espécie foi realizada com o isolado UFSMQ1. O isolado UFSMQ40 já havia sido identificado como sendo *Trichoderma koningiopsi* disponível no banco de dados GenBank com o número de acesso: KX496883 (BALDONI, 2016). O isolado UFSMQ1 e foi identificado seguindo os seguintes procedimentos: o DNA foi extraído a partir de alíquotas do *pellet* do crescimento em meio de cultivo líquido Batata Dextrose (BD) usando o Kit de extração ZR Fungal/Bacterial DNA Mini Prep (ZymoResearch, Irvine, EUA). Após a extração do DNA, as amostras foram submetidas a PCR convencional (reação de cadeia de polimerase) com primer TEF1 (350 pares de base) (728F-5' CATCGAGAAGTTCGAGAAGG 3' e 986R -5' TACTTGAAGGAACCCTTACC 3'), descrito por Carbone; Kohn, (1999).

O programa utilizado no termociclador (TC-312 Termal Cycler, Techne®) para adequada amplificação das amostras iniciou com 94° por 1 minuto, seguido de 35 ciclos de 94° por 45 segundos, 56° por 1 minuto, 72° por 1 minuto e 30 segundos e finalizou com 72° por 10 minutos, permanecendo com uma extensão de 4°. Após a amplificação, foi realizada a eletroforese com gel de agarose 1% a 90V, e tampão TBE 1X. As amostras de DNA foram coradas com Blue Green Loading Dye I® (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) e observadas em transiluminador através de luz ultravioleta. O tamanho das bandas observadas foram comparadas a um marcador molecular 1Kb (Sigma-Aldrich®).

Os produtos da PCR foram purificados com o kit GenElute PCR clean-up Kit® (Sigma, Saint Louis, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento das amostras foi realizado no sequenciador ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer (AppliedBiosystems, Foster, EUA), pela empresa ACTGene Análises Moleculares. Os fragmentos sequenciados foram analisados utilizando o software Staden Package 2.0.0b (STADEN; JUDGE; BONFIELD, 2003) para a obtenção da sequência consenso.

A sequência consenso foi submetida à ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) e desta forma foi comparada a outras sequências de outros

organismos próximos presentes no banco de dados GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (ALTSCHUL et al., 1990).

Identificação dos microrganismos

A comparação da sequência consenso com outros organismos presentes no banco de dados GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Altschul et al., 1990) revelou grande similaridade do isolado UFSMQ1 com as espécies *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg e *Trichoderma asperelloides* Samuels, com suporte de arranque alto (99%) (Tabela 12).

Tabela 12. Afiliações taxonômicas do isolado de *Trichoderma* UFSMQ1 baseado no banco de dados de sequências do gene translation elongation factor 1 alpha do National Center for Biotechnology Information (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>).

| Nome de identificação da sequência no GenBank | Código de Acesso | E-value | Query cover | Ident |
|---|------------------|---------|-------------|-------|
| <i>Trichoderma asperellum</i> | LC155108 | 0.0 | 97% | 99% |
| <i>Trichoderma asperelloides</i> | KT722736 | 0.0 | 97% | 99% |
| <i>Trichoderma asperellum</i> | KP747448 | 0.0 | 97% | 99% |
| <i>Trichoderma asperelloides</i> | KU301694 | 0.0 | 97% | 99% |
| <i>Trichoderma asperelloides</i> | KU301693 | 0.0 | 97% | 99% |
| <i>Trichoderma asperelloides</i> | KU301692 | 0.0 | 97% | 99% |
| <i>Trichoderma asperelloides</i> | KU301691 | 0.0 | 97% | 99% |
| <i>Trichoderma asperelloides</i> | KU301690 | 0.0 | 97% | 99% |
| <i>Trichoderma asperelloides</i> | KU301689 | 0.0 | 97% | 99% |
| <i>Trichoderma asperelloides</i> | KU301688 | 0.0 | 97% | 99% |
| <i>Trichoderma UFSMQ1</i> | - | - | 97% | 99% |

Fonte: O Autor (2018).

A grande similaridade do isolado UFSMQ1 com *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma asperelloides* pode ser explicado segundo Samuels et al. (2010), em estudo realizado o mesmo constatou que técnicas micológicas clássicas mostraram que *T. asperellum*, *T. asperelloides* sp.. são duas espécies morfológicamente irmãs. Muitas cepas relatadas na literatura ou representadas em GenBank como *T. asperellum* podem ser re-identificadas como *T. asperelloides*. Isso porque ocorre apenas uma mudança de base na região do ITS-2 para distinguir as duas espécies.

A região ITS possui adequadas características para a identificação dos fungos em nível molecular, pela fácil amplificação e variabilidade, suficientes para distinguir espécies muito próximas (YAO et al., 2010).

As cepas identificadas como *T. asperellum*, *T. asperelloides* e *T. koningiopsi* são usadas como agentes de controle biológico contra um amplo espectro de organismos patogênicos (OJAGHIAN, 2011; ISAIAS et al., 2014; DOMINGUES et al., 2016). Já foram relatadas em várias partes do mundo. *T. koningiopsi* já foi registrado em Cuba, Brasil, Canadá, Equador, EUA (HANADA et al., 2008). *Trichoderma asperellum* e *T. asperelloides* têm ampla distribuição geográfica em vários continentes, inclusive na América do Sul, Brasil. (SAMUELS et al. 2010).

Apêndice 3. Resultado da análise de correlação de Pearson entre as variáveis matéria seca radicular (MSR) aos 22 dias após emergência (DAE), matéria fresca radicular (MFR) matéria seca da parte aérea (MSPA) aos 80 (DAE), número de juvenis penetrados, número de massa de ovos (NMO), número de galhas (NG) fator de reprodução (FR), taxa de transporte de elétrons (ETRm), fluorescência inicial (Fo), fluorescência máxima (Fm) e rendimento quântico máximo (Fv/Fm) em plantas de soja inoculadas com *Meloidogyne javanica* submetidas a isolados de *Trichoderma*.

| | MSR 22 DAE | MSPA 80 DAE | MFR 80 DAE | FR | MASSA DE OVOS | GALHAS | PENETRAÇÃO | Fo | Fm | Fv/Fm | ETRm |
|----------------------|---------------|----------------|---------------|--------|------------------|----------|------------|-------|-------|-------|------|
| MSR 22 DAE | 1 | | | | | | | | | | |
| MSPA 80 DAE | -0,1031 | 1 | | | | | | | | | |
| MFR 80 DAE | 0,63282 | -0,1438 | 1 | | | | | | | | |
| FR | 0,00542 | -0,2012 | 0,1926 | 1 | | | | | | | |
| MASSA DE OVOS | -0,08512 | 0,316 | 0,03343 | 0,2389 | 1 | | | | | | |
| GALHAS | -0,07261 | 0,3052 | -0,0586 | 0,1636 | 0,894048 | 1 | | | | | |
| PENETRAÇÃO | -0,12462 | 0,1456 | 0,15853 | 0,213 | 0,291606 | 0,17004 | 1 | | | | |
| Fo | -0,20911 | 0,0406 | 0,08981 | -0,015 | 0,152508 | 0,07415 | 0,624497 | 1 | | | |
| Fm | 0,17847 | 0,1044 | 0,37129 | 0,2171 | 0,235593 | 0,1314 | 0,743015 | 0,48 | 1 | | |
| Fv/Fm | 0,50336 | -0,0687 | 0,44632 | 0,3286 | 0,055341 | 0,028 | 0,053559 | -0,18 | 0,234 | 1 | |
| ETRm | -0,38043 | -0,1337 | -0,1779 | -0,123 | -0,22337 | -0,19375 | 0,275406 | 0,05 | 0,067 | -0,39 | 1 |