



Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle biológico de *Meloidogyne* spp. em cana-de-açúcar e tomateiro

Patrícia Elias Haddad

Tese apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Dr. Ricardo Harakava

Coorientador: Dr. Claudio Marcelo Gonçalves Oliveira

São Paulo

2022

Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio

**Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle biológico de *Meloidogyne*
spp. em cana-de-açúcar e tomateiro**

Patrícia Elias Haddad

Tese apresentada para a obtenção do título de
Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e
Ambiental no Agronegócio. Área de concentração:
Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

São Paulo

2022

Patrícia Elias Haddad

Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle biológico de *Meloidogyne* spp. em cana-de-açúcar e tomateiro

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Orientador:

Professor Dr. Ricardo Harakava

Co-orientador:

Dr. Cláudio Marcelo Gonçalves Oliveira

São Paulo

2022

Eu **Patrícia Elias Haddad**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura:



Data 03/06/2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Haddad, Patrícia Elias.

Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle biológico de *Meloidogyne* spp. em cana-de-açúcar e tomateiro. / Patrícia Elias Haddad.
- São Paulo, 2022.

136 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2022T.PH004

Tese (Doutorado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Ricardo Harakava.

Coorientador: Claudio Marcelo Gonçalves Oliveira

Versão do título para o inglês: Selection of *Trichoderma* spp. for the biological control of *Meloidogyne* spp. in sugarcane and tomato.

1. Biocontrole 2. Nematoides de galha 3. Quitinases 4. Bioensaio
5. Compostos orgânicos voláteis I. Haddad, Patrícia Elias II. Harakava, Ricardo
III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2022/004

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Patrícia Elias Haddad

Título: Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle biológico de *Meloidogyne* spp. em cana-de-açúcar e tomateiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: 03/06/2022

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

À minha mãe Luzia, minha irmã Ana
Paula e meu marido André, por todo o apoio e
amor a mim conferidos durante todo esse
processo.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me permitir concluir este trabalho mesmo diante de tantos obstáculos. À minha mãe Luzia e minha irmã Ana Paula pelo apoio e suporte emocional incondicional. A meu marido André pelo companheirismo, conselhos, por aguentar muitas barras por mim, por toda a ajuda com os experimentos (sim ele misturou muita terra com areia e encheu muitos vasos comigo), agradeço por ser abençoada e ter uma pessoa assim ao meu lado, pois sem ele eu não conseguiria.

Ao Instituto Biológico pela oportunidade e pelo acolhimento desde 2009 quando entrei no programa de iniciação científica, e pela infraestrutura para realização desta pesquisa.

À Dra. Cleusa M. Mantovanello Lucon, por ter me dado uma chance de aprender e trabalhar com um fungo tão maravilhoso como *Trichoderma* e me inserir no mundo da pesquisa científica, por todos os ensinamentos técnicos e de vida, por toda a paciência e confiança, por ser mais do que uma orientadora, por ser amiga.

Ao programa de pós-graduação por todo o aprendizado e contato com excelentes profissionais, que agregaram muito na minha formação.

Ao meu orientador Dr. Ricardo Harakava, por me aceitar como aluna e apoiar meu trabalho, por confiar e não desistir de mim, por estar sempre disponível para sanar minhas dúvidas e ter paciência e calma, por entender minha falta de “jeito” com a parte molecular.

À minha grande amiga Amanda Aparecida de Oliveira, parceira de laboratório, por todas as conversas, aprendizados, cafés, ajuda com a análise estatística e por sempre me colocar para cima nas situações de extremo estresse, pelos ensinamentos técnicos e por me mostrar o que é ser uma profissional de excelência.

Ao meu amigo Samuel LaMarck, por todo apoio e companheirismo, pelas risadas e ensinamentos, pelas sessões de psicologia e por me fazer enxergar as coisas sob outra perspectiva.

Aos membros do grupo e amigos Carlos Albuquerque, Maria Julia e Keila Santos pelas conversas, risadas e diversos favores prestados.

Às estagiárias Beatriz Nóbrega Titato e Vanessa Rodrigues dos Santos, pela ajuda nos ensaios, por me permitirem ensinar o pouco que sei e aprender muito durante o processo.

Aos colegas de laboratório Camila Chabi, Pedro L. Ramos-González, Mariane Rodrigues, Matheus Postclam, pelo ótimo convívio, amizade, dicas e cafés.

Às amigas Laura Bononi e Marta Alves Moitinho, pela amizade, ótima recepção na Embrapa Meio ambiente, e pela ajuda com as análises estatísticas, valeu Laurinha!

Ao meu coorientador Dr. Claudio Marcelo Gonçalves Oliveira, por me apresentar ao mundo da nematologia, lá em 2012, quando eu ainda estava no mestrado, e me mostrar como esse assunto é interessante e importante. Obrigada por toda a ajuda com os inóculos, os experimentos, por ceder a equipe para me auxiliar, por sanar todas as minhas dúvidas e por ser tão gentil, prestativo e bem-humorado, sempre.

À toda a equipe da nematologia, Juliana Eulálio, as estagiárias, a Dona Maria Inês e Sr. Joaquim, por toda a ajuda na montagem, observação, cuidados e avaliação dos ensaios, por todo companheirismo durante minhas estadas no laboratório, pelos almoços ao ar livre e todos os ensinamentos.

Em especial à Dra. Juliana Magrinelli O. Rosa, que além de todo esse suporte junto com a equipe, me ajudou muitas vezes sanando dúvidas, respondendo e-mails, sendo sempre muito gentil, inteligente e atenciosa. Vocês foram sensacionais. Agradeço por facilitarem minha vida.

Ao Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida, por ceder a casa de vegetação para o ensaio de promoção de crescimento e pela gentileza em obter os toletes de cana.

Ao Dr. Marcos Gonçalves, pela carona para buscar as mudas de cana-de-açúcar em Ribeirão Preto.

Ao Dr. Mauro Xavier, do Centro de Cana IAC, por gentilmente ceder a mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar.

Ao técnico agrícola Celso, por lavar a casa de vegetação e os vasos quando eu precisei. À auxiliar Ana pela ajuda com a limpeza das vidrarias.

Ao Dr. Pedro Luiz Martins Soares e Me. Rivanildo Júnior, do Laboratório de Nematologia da Unesp de Jaboticabal, por toda ajuda e inóculos cedidos.

Ao Dr. Harold Alexander Vargas Hoyos, pela ajuda com os ensaios de quantificação de quitinase.

Aos membros da banca Dr. César Júnior Bueno, Dra. Larissa de Brito Caixeta, Dr. Luís Garrigós Leite e Dra. Zayame Vegette Pinto por terem aceitado o convite e contribuído para a melhoria da escrita desse trabalho.

À empresa Lallemand (antigo Laboratório Farroupilha), por conceder a bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Todos vocês têm a minha mais sincera gratidão.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton

RESUMO

HADDAD, Patrícia Elias. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle biológico de *Meloidogyne* spp. em cana-de-açúcar e tomateiro.** 2022. 136f. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2022.

A cana-de-açúcar está entre as maiores commodities mundiais e é acometida por diversas doenças e pragas. Os nematoides de galhas são uns dos mais destrutivos para a cultura, e usualmente são combatidos com produtos químicos, por isso a busca por tecnologias mais limpas para o meio ambiente e a saúde humana está cada vez maior. O objetivo desse trabalho foi selecionar isolados de *Trichoderma* com capacidade de promover crescimento e controlar *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em cana-de-açúcar e plantas de tomate. Os isolados avaliados foram submetidos a testes de confronto direto e indireto contra os nematoides para verificar capacidade de parasitismo, liberação de compostos tóxicos voláteis e não voláteis e produção de quitinases. Nos ensaios *in vivo* foi avaliada a promoção de crescimento das plantas e o controle dos nematoides. Os resultados mostram que nove dentre os 16 isolados de *Trichoderma* avaliados foram capazes de parasitar os ovos de *M. incognita*. Todos emitiram metabólitos voláteis que reduziram a taxa de eclosão de J2 e dentre eles cinco isolados causaram 100% de mortalidade dos juvenis. Todas as cepas degradaram quitina em meio sólido e cinco apresentaram atividade quitinolítica em meio líquido. Nos ensaios *in vivo* todos os isolados colonizaram o sistema radicular da variedade de cana-de-açúcar IAC-SP-95-5000, mas somente dois (IB18/03 e IB 19/17) promoveram o crescimento das plantas com aumentos de até 32 e 29%. Os isolados IB 07/01, IB 18/03, IB 19/17, IB 22/08 e IB 38/11 reduziram a população de *M. incognita* em cana-de-açúcar em até 89,6% (IB 22/08). Nos ensaios com *M. javanica* não houve controle dos nematoides diretamente nas plantas. Houve uma redução na viabilidade dos ovos e J2 provenientes das raízes da cana, que foi refletida em menor infectividade e reprodução no bioensaio inoculado em tomate. Os isolados de *Trichoderma* IB 07/01 e IB 43/14 demonstraram capacidade de reduzir as futuras gerações de *M. javanica* em plantas de cana-de-açúcar, provando ser uma excelente ferramenta para ser utilizada dentro do manejo integrado de nematoides de galha.

Palavras-chave: Biocontrole. Nematoides de galha. Quitinases. Bioensaio. Compostos orgânicos voláteis.

ABSTRACT

HADDAD, Patrícia Elias. **Selection of *Trichoderma* spp. for the biological control of *Meloidogyne* spp. in sugarcane and tomato.** 2022. 136p. Thesis (Doctorate in Plant and Animal Health, Food and Environmental Safety in the Agribusiness) – Biological Institute, APTA, SAA, São Paulo, 2022.

Sugarcane is among the world's largest commodities and is affected by several diseases and pests. Root-knot nematodes are one of the most destructive to the crop, and are usually fought with chemical products, which is why the search for cleaner technologies for the environment and human health is increasing. The objective of this work was to select *Trichoderma* isolates capable of promoting growth and controlling *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* in sugarcane and tomato plants. The considered isolates were submitted in tests of direct and indirect confrontation against nematodes to verify the capacity of parasitism, release of volatile and non-volatile compounds and production of chitinases. In the *in vivo* tests, the promotion of plant growth and the control of nematodes were evaluated. The results show that nine out of the 16 *Trichoderma* isolates were considered capable of parasitizing *M. incognita* eggs. All isolates emitted volatile metabolites that reduced the hatching rate of J2 and among them five isolates caused 100% mortality of juveniles. All strains degraded chitin in solid medium and five showed chitinolytic activity in liquid medium. In the *in vivo* assays, all isolates colonized the root system of the sugarcane variety IAC-SP-95-5000, but only two (IB18/03 and IB 19/17) promoted plant growth with increases of up to 32 and 29%. The isolates IB 07/01, IB 18/03, IB 19/17, IB 22/08 and IB 38/11 reduced the population of *M. incognita* in sugarcane by up to 89.6% (IB 22/08). In the tests with *M. javanica* there was no control of the nematodes directly in the plants. There was a reduction in the viability of eggs and J2 from sugarcane roots, which was reflected in lower infectivity and reproduction in the bioassay inoculated in tomato. The *Trichoderma* IB 07/01 and IB 43/14 isolates produced the ability to reduce future generations of *M. javanica* in sugarcane plants, proving to be an excellent tool to be used within the integrated management of root-knot nematodes

Keywords: Biocontrol. Root-knot nematodes. Chitinases. Bioassay. Volatile organic compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Método da microgota para avaliação do parasitismo de ovos de nematoide de galha por isolados de *Trichoderma* spp. (Fonte: A autora)..... 40
- Figura 2. Método Carneiro e Gomes (1993) (adaptado) para avaliação de parasitismo de ovos de nematoide de galhas. (Fonte: A autora)..... 41
- Figura 3. Aspecto do microecossistema criado para avaliação dos efeitos de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. sobre a eclosão de J2 de *Meloidogyne javanica*. (Fonte: A autora)..... 43
- Figura 4. Placa de 96 poços contendo as diluições da curva padrão de N-acetilglicosidase utilizada para quantificação de quitinase produzida por isolados de *Trichoderma* spp. (Fonte: A autora)..... 45
- Figura 5. Placa de 96 poços contendo as reações de quitina azure para quantificação de produção de quitinase de isolados de *Trichoderma* spp. (Fonte: A autora) 46
- Figura 6. Vasos com mudas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000 inoculadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp. no primeiro ensaio de promoção de crescimento em Campinas. (Fonte: A autora) 47
- Figura 7. Muda pré brotada de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000, mergulhada em suspensão de conídios do isolado de *Trichoderma koningopsis* IB 49/15 para o ensaio de colonização radicular. (Fonte: A autora) 49
- Figura 8. Mudas de tomates ‘Rutgers’ inoculadas com *Meloidogyne javanica* tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp. para o ensaio de controle biológico. (Fonte: A autora) 52
- Figura 9. Porcentagem de ovos de *Meloidogyne incognita* parasitados por isolados de *Trichoderma* spp. no primeiro ensaio..... 54
- Figura 10. Ovos de *Meloidogyne incognita* parasitados pelo isolado de *Trichoderma* IB 43/14. (Fonte: A autora) 54
- Figura 11. Porcentagem de ovos de *Meloidogyne incognita* parasitados por isolados de *Trichoderma* spp. no segundo ensaio. 55

Figura 12. Porcentagem de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> parasitados por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no terceiro ensaio.	56
Figura 13. Porcentagem de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> parasitados por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no quarto ensaio.	57
Figura 14. Porcentagem de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> parasitados por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no quinto ensaio.	58
Figura 15. Ovo de <i>Meloidogyne incognita</i> envelado pelas hifas do isolado de <i>Trichoderma</i> IB 43/14. (Fonte: A autora)	58
Figura 16. Porcentagem de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> parasitados por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no sexto ensaio.	59
Figura 17. Porcentagem de juvenis de segundo estágio eclodidos no primeiro ensaio de efeitos de filtrados fúngicos de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre a mortalidade de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i>	63
Figura 18. Porcentagem de juvenis de segundo estágio eclodidos no segundo ensaio de efeitos de filtrados fúngicos de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre a mortalidade de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i>	64
Figura 19. Porcentagem de juvenis de segundo estágio eclodidos no terceiro ensaio de efeitos de filtrados fúngicos de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre a mortalidade de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i>	65
Figura 20. Porcentagem de juvenis de segundo estágio eclodidos no ensaio de efeitos de filtrados fúngicos de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre a mortalidade de ovos de <i>Meloidogyne javanica</i>	66
Figura 21. Média do número de juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> eclodidos após 7 dias em contato com os metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. em teste <i>in vitro</i>	68
Figura 22. Porcentagem de juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> mortos após contato com os metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. em teste <i>in vitro</i>	69

Figura 23. Aspecto das placas contendo meio de cultura acrescido de quitina coloidal com (A) e sem (B) adição de Triton X-100, inoculadas com <i>Trichoderma</i> spp. após 48 h. (Fonte: A autora).....	71
Figura 24. Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. inoculados em meio basal acrescido de quitina coloidal apresentando halos de degradação (violeta) após 48 h de incubação em B.O.D.	72
Figura 25. Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. inoculados em meio basal acrescido de quitina coloidal apresentando halos de degradação (violeta) após 168 h de incubação em B.O.D.	73
Figura 26. Porcentagem de aumento da concentração de NAGA (N-acetil-D-glucosamina) liberado por isolados de <i>Trichoderma</i> em meio contendo quitina coloidal.	76
Figura 27. Aspecto do desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000, após 60 dias em casa de vegetação, tratadas ou não com isolados de <i>Trichoderma</i> spp., no ensaio de promoção de crescimento I. (Fonte: A autora).....	78
Figura 28. Porcentagem de aumento da massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) e massa de matéria seca de raízes (MMSR) de plantas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000, 60 dias após tratamento com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no ensaio de promoção de crescimento I.....	80
Figura 29. Porcentagem de crescimento da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em relação as plantas do grupo controle do ensaio de promoção de crescimento II.	82
Figura 30. Aspecto do desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000 do ensaio de promoção de crescimento II, 60 dias após a inoculação do isolado de <i>Trichoderma</i> IB22/08 comparado ao tratamento controle, sem adição de microrganismos. (Fonte: A autora)	82
Figura 31. Aspecto do desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000 do ensaio de promoção de crescimento III, 60 dias após a inoculação dos isolados de <i>Trichoderma</i> comparados ao tratamento controle, sem adição de microrganismos. (Fonte: A autora).....	83

Figura 32. Porcentagem de crescimento da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em relação as plantas do grupo controle do ensaio de promoção de crescimento III.	85
Figura 33. Fragmentos de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no ensaio de promoção de crescimento I.	88
Figura 34. Fragmentos de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no ensaio de promoção de crescimento II. (Fonte: A autora)	89
Figura 35. Fragmentos de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no ensaio de promoção de crescimento III. (Fonte: A autora).....	90
Figura 36. Aspecto das raízes de cana-de-açúcar plaqueadas em meio BDA com antibióticos tratadas com o isolado IB 49/15 com 1, 3, 5, 7, 9 e 11 dias após a inoculação. (Fonte: A autora)	91
Figura 37. Raízes de cana-de-açúcar tratadas com o isolado IB 49/15 por diferentes períodos, submetidas a esterilização superficial com hipoclorito de sódio (1%), plaqueadas em meio BDA com antibióticos. (Fonte: A autora).....	92
Figura 38. Número de ovos e de juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> extraídos de plantas de cana-de-açúcar tratadas ou não com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. após 365 dias de cultivo.	94
Figura 39. Estimativa da população total de <i>Meloidogyne incognita</i> extraída de plantas de cana-de-açúcar tratadas ou não com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. após 365 dias de cultivo.....	94
Figura 40. Porcentagem de crescimento da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Meloidogyne incognita</i> e tratadas ou não com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no ensaio de controle biológico II.	95
Figura 41. Fator de reprodução de <i>Meloidogyne javanica</i> em plantas de cana-de-açúcar variedade IAC-SP-95-5000, tratadas ou não com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	98
Figura 42. Número total de <i>Meloidogyne javanica</i> (ovos e J2) recolhidos de raízes de cana-de-açúcar tratadas ou não com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e de tomateiros ‘Rutgers’ utilizados como padrão de viabilidade no ensaio de controle biológico I.	99

Figura 43. Porcentagem de aumento da massa de matéria seca da parte aérea e massa de matéria fresca de raízes de plantas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000, inoculadas com <i>Meloidogyne javanica</i> , tratadas ou não com isolados de <i>Trichoderma</i> ou Carbofuram no ensaio de controle biológico II.....	100
Figura 44. Porcentagem de redução de ovos e juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne javanica</i> extraídos de plantas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000, tratadas ou não com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ou Carbofuram no ensaio de controle biológico II.....	101
Figura 45. Porcentagem de redução da população total de <i>Meloidogyne javanica</i> extraídos de plantas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000, tratadas ou não com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ou Carbofuram no ensaio de controle biológico II.	102
Figura 46. Porcentagem de aumento da massa de matéria seca da parte aérea (MMPSA) e massa de matéria fresca de raízes (MMFR) de plantas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000, inoculadas com <i>Meloidogyne javanica</i> , e tratadas ou não com <i>Trichoderma</i> spp. no ensaio de controle biológico III.	103
Figura 47. Porcentagem de redução de ovos e juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne javanica</i> extraídos de plantas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000, tratadas ou não com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no ensaio de controle biológico III.....	104
Figura 48. Porcentagem de redução da população total de <i>Meloidogyne javanica</i> extraídos de plantas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000, tratadas ou não com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no ensaio de controle biológico III.	105
Figura 49. Aparência dos ovos de <i>Meloidogyne javanica</i> extraídos de plantas de cana-de-açúcar do ensaio de controle biológico III. (Fonte: A autora)	110
Figura 50. Porcentagem de aumento da massa de matéria fresca de raízes (MMFR) de tomateiro ‘Rutgers’ inoculados com <i>Meloidogyne javanica</i> proveniente de raízes de cana-de-açúcar tratadas ou não com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	113
Figura 51. Porcentagem de redução da população de <i>Meloidogyne javanica</i> em tomateiro ‘Rutgers’ inoculados com suspensão de ovos e J2 proveniente de raízes de cana-de-açúcar tratadas ou não com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	114

Figura 52. Porcentagem de redução de ovos e juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* em tomateiro 'Rutgers' infectados com inóculo proveniente de raízes de cana-de-açúcar tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp. 114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Procedência dos isolados de <i>Trichoderma</i>	37
Tabela 2 - Porcentagem de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> parasitados por isolados de <i>Trichoderma</i> pp. nos seis ensaios realizados.....	60
Tabela 3. Atividade quitinolítica de filtrados de cultura de isolados de <i>Trichoderma</i> crescidos em meio líquido suplementado com quitina coloidal.....	75
Tabela 4. Atividade de quitinase de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. mensurada utilizando o substrato colorimétrico quitina azure.	77
Tabela 5. Efeito de 14 isolados de <i>Trichoderma</i> spp. na altura da planta em cm (AP), número de folhas (NF), número de perfilhos (NP), número de folhas nos perfilhos (NFP), massa de matéria seca da parte aérea em gramas (MMSPA) e massa de matéria seca das raízes em gramas (MMSR) da variedade IAC-SP-95-5000 de cana-de-açúcar, 60 dias após inoculação dos microrganismos do ensaio de promoção de crescimento I.	79
Tabela 6. Efeito de 16 isolados de <i>Trichoderma</i> spp. na altura da planta (AP), número de folhas (NF), número de perfilhos (NP), número de folhas nos perfilhos (NFP) e massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) na variedade IAC-SP-95-5000 de cana-de-açúcar, 60 dias após inoculação dos microrganismos do ensaio de promoção de crescimento II.....	81
Tabela 7. Efeito de 16 isolados de <i>Trichoderma</i> spp. na altura da planta (AP), número de folhas (NF), número de perfilhos (NP), número de folhas nos perfilhos (NFP) e massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) na variedade IAC-SP-95-5000 de cana-de-açúcar, 30 dias após inoculação dos microrganismos do ensaio de promoção de crescimento III.	84
Tabela 8. Médias da massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP 95-5000, em gramas e estimativa do número de ovos e juvenis e população de nematoides totais (NT) de <i>Meloidogyne incognita</i> presentes nas raízes das plantas tratadas ou não com isolados de <i>Trichoderma</i> spp, após 365 dias do ensaio de controle biológico.	93
Tabela 9. Médias da massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa de matéria fresca das raízes (MMFR) em gramas, número de folhas (NF), número de perfilhos (NP) e população de nematoides presentes em cana-de-açúcar, variedade IAC-SP 95-5000, infestadas ou não com	

<i>Meloidogyne javanica</i> e tratadas ou não com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no ensaio de controle biológico I.....	98
Tabela 10. Médias da massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa de matéria fresca das raízes (MMFR) em gramas, número de ovos, número de juvenis de segundo estágio e população de nematoides totais (NT) presentes em cana-de-açúcar, variedade IAC-SP 95-5000, infestadas ou não com <i>Meloidogyne javanica</i> e tratadas ou não com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no ensaio de controle biológico II.....	100
Tabela 11. Médias da massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa de matéria fresca das raízes (MMFR) em gramas, número de ovos, número de juvenis de segundo estágio e população de nematoides totais (NT) presentes em cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000, infestadas ou não com <i>Meloidogyne javanica</i> e tratadas ou não com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no ensaio de controle biológico III.	103
Tabela 12. Médias da massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa de matéria fresca das raízes (MMFR) em gramas, número de ovos, número de juvenis de segundo estágio, população de nematoides totais (NT), fator de reprodução (FR), índice de galhas (IG) e índice de massas de ovos (IMO) presentes em tomateiros ‘Rutgers’, no ensaio de controle biológico de <i>Meloidogyne javanica</i>	108
Tabela 13. Médias da massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa de matéria fresca das raízes (MMFR) em gramas, número de ovos, número de juvenis de segundo estágio, população de nematoides totais (NT), eficiência de controle (E%), índice de galhas (IG), índice de massas de ovos (IMO) e fator de reprodução (FR) de <i>Meloidogyne javanica</i> , presentes em tomateiros ‘Rutgers’, inoculados com uma população de nematoides proveniente de cana-de-açúcar tratada ou não com <i>Trichoderma</i> spp.....	112

Sumário

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	Gerais	22
2.2	Específicos	22
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1	Cana-de-açúcar	23
3.2	Nematoides na cultura de cana-de-açúcar e métodos de manejo.....	24
3.3	Gênero <i>Meloidogyne</i>	27
3.4	A cultura do tomateiro	29
3.5	<i>Trichoderma</i> spp. : visão geral e o biocontrole de fitonematoides	30
3.6	<i>Trichoderma</i> spp. na promoção de crescimento de plantas	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	Material vegetal	35
4.2	Microorganismos utilizados nos ensaios	35
4.2.1	<i>Trichoderma</i> spp.....	35
4.2.2	<i>Meloidogyne incognita</i> e <i>Meloidogyne javanica</i>	38
4.3	Preparo do inóculo de <i>Trichoderma</i> spp. para os ensaios <i>in vivo</i>	38
4.4	Ensaio <i>in vitro</i>	39
4.4.1	Parasitismo de ovos de <i>M. incognita</i>	39
4.4.1.1	Ensaio de avaliação do parasitismo de ovos de <i>M. incognita</i> por <i>Trichoderma</i> spp. <i>in vitro</i> – Método da microgota.....	39
4.4.1.2	Ensaio de avaliação do parasitismo de ovos de <i>M. incognita</i> por <i>Trichoderma</i> spp. <i>in vitro</i> - Método da lâmina.....	40
4.4.2	Filtrados fúngicos	41
4.4.2.1	Ensaio de avaliação <i>in vitro</i> da mortalidade de ovos de <i>M. incognita</i> por filtrados fúngicos de <i>Trichoderma</i> spp.	41
4.4.2.2	Ensaio de avaliação <i>in vitro</i> da mortalidade de ovos de <i>M. javanica</i> por filtrados fúngicos de <i>Trichoderma</i> spp.	42
4.4.3	Metabólitos voláteis.....	42
4.4.3.1	Ensaio de efeito de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. sobre a eclosão de juvenis de segundo estágio de <i>M. incognita</i>	42
4.4.4	Atividade de quitinase	43
4.4.4.1	Ensaio de avaliação do potencial quitinolítico <i>in vitro</i> dos isolados de <i>Trichoderma</i> em meio sólido - Método do carimbo.....	43

4.4.4.2	Ensaio de avaliação do potencial quitinolítico in vitro dos isolados de <i>Trichoderma</i> em meio sólido colorimétrico	44
4.4.4.3	Ensaio de quantificação de atividade enzimática de quitinase dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	44
4.4.4.4	Ensaio de quantificação de quitinase – quitina azure	45
4.5	Ensaos <i>in vivo</i>	47
4.5.1	Promoção de crescimento.....	47
4.5.1.1	Ensaos de promoção de crescimento de cana-de-açúcar	47
4.5.2	Colonização radicular	48
4.5.2.1	Avaliação da colonização radicular	48
4.5.2.2	Isolado IB 49/15 na colonização de raízes de cana-de-açúcar.....	48
4.5.3	Ensaos de controle biológico.....	49
4.5.3.1	Ensaio de avaliação de <i>Trichoderma</i> spp. no controle de <i>M. incognita</i> em cana-de-açúcar, em casa de vegetação	49
4.5.3.2	Ensaio de avaliação de <i>Trichoderma</i> spp. no controle de <i>M. javanica</i> em cana-de-açúcar, em casa de vegetação - I	50
4.5.3.3	Ensaio de avaliação de <i>Trichoderma</i> spp. no controle de <i>M. javanica</i> em cana-de-açúcar, em casa de vegetação - II	50
4.5.3.4	Ensaio de avaliação de <i>Trichoderma</i> spp. no controle de <i>M. javanica</i> em cana-de-açúcar, em casa de vegetação - III.....	51
4.5.3.5	Ensaio de avaliação de <i>Trichoderma</i> spp. no controle de <i>M. javanica</i> em tomateiro, em casa de vegetação	51
4.5.3.6	Avaliação da viabilidade de inóculo de <i>M. javanica</i> proveniente de raízes de cana-de-açúcar tratadas ou não com <i>Trichoderma</i> spp.	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	Ensaos <i>in vitro</i>	53
5.1.1	Parasitismo de ovos de <i>Meloidogyne</i> spp.....	53
5.1.1.1	1º Ensaio de avaliação do parasitismo de ovos de <i>M. incognita</i> por <i>Trichoderma</i> spp. in vitro – Método da microgota	53
5.1.1.2	2º Ensaio de avaliação do parasitismo de ovos de <i>M. incognita</i> por <i>Trichoderma</i> spp. in vitro - Método da lâmina	55
5.1.1.3	3º Ensaio de avaliação do parasitismo de ovos de <i>M. incognita</i> por <i>Trichoderma</i> spp. in vitro – Método da lâmina.....	55
5.1.1.4	4º Ensaio de avaliação do parasitismo de ovos de <i>M. incognita</i> por <i>Trichoderma</i> spp. in vitro - Método da lâmina	56
5.1.1.5	5º Ensaio de avaliação do parasitismo de ovos de <i>M. incognita</i> por <i>Trichoderma</i> spp. in vitro - Método da lâmina	57

5.1.1.6	6° Ensaio de avaliação do parasitismo de ovos de <i>M. incognita</i> por <i>Trichoderma</i> spp. in vitro – Método da lâmina.....	59
5.1.2	Filtrados fúngicos.....	62
5.1.2.1	1° Ensaio de avaliação in vitro da mortalidade de ovos de <i>M. incognita</i> por filtrados fúngicos de <i>Trichoderma</i> spp.	62
5.1.2.2	2° Ensaio de avaliação in vitro da mortalidade de ovos de <i>M. incognita</i> por filtrados fúngicos de <i>Trichoderma</i> spp.	63
5.1.2.3	3° Ensaio de avaliação in vitro da mortalidade de ovos de <i>M. incognita</i> por filtrados fúngicos de <i>Trichoderma</i> spp.	64
5.1.2.4	Ensaio de avaliação in vitro da mortalidade de ovos de <i>M. javanica</i> por filtrados fúngicos de <i>Trichoderma</i> spp.	65
5.1.3	Metabólitos voláteis.....	67
5.1.3.1	Efeito de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. sobre a eclosão de juvenis de segundo estágio de <i>M. incognita</i>	67
5.1.4	Atividade de quitinase	71
5.1.4.1	1° Ensaio de avaliação do potencial quitinolítico in vitro dos isolados de <i>Trichoderma</i> em meio sólido – Método do carimbo	71
5.1.4.2	2° Ensaio de avaliação do potencial quitinolítico in vitro dos isolados de <i>Trichoderma</i> em meio sólido colorimétrico	72
5.1.4.3	Ensaio de quantificação de atividade enzimática de quitinase dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	74
5.1.4.4	Ensaio de quantificação de quitinase – quitina azure	76
5.2	Ensaos <i>in vivo</i>	78
5.2.1	Promoção de crescimento.....	78
5.2.1.1	1° Ensaio de promoção de crescimento de cana-de-açúcar utilizando MPB (mudas pré brotadas).....	78
5.2.1.2	2° Ensaio de promoção de crescimento de cana-de-açúcar utilizando MPB (mudas pré brotadas).....	80
5.2.1.3	3° Ensaio de promoção de crescimento de cana-de-açúcar utilizando MPB (mudas pré brotadas).....	83
5.2.2	Colonização radicular.....	87
5.2.2.1	Avaliação da colonização radicular da cana-de-açúcar por isolados de <i>Trichoderma</i> nos ensaios de promoção de crescimento.....	87
5.2.2.2	Isolado IB 49/15 na colonização de raízes de cana-de-açúcar.....	91
5.2.3	Controle biológico.....	93
5.2.3.1	Ensaio de avaliação de <i>Trichoderma</i> spp. no controle de <i>M. incognita</i> em cana-de-açúcar, em casa de vegetação	93

5.2.3.2	Ensaio de avaliação de Trichoderma spp. no controle de M. javanica em cana-de-açúcar, em casa de vegetação - I	97
5.2.3.3	Ensaio de avaliação de Trichoderma spp. no controle de M. javanica em cana-de-açúcar, em casa de vegetação - II	99
5.2.3.4	Ensaio de avaliação de Trichoderma spp. no controle de M. javanica em cana-de-açúcar, em casa de vegetação - III.....	102
5.2.3.5	Ensaio de avaliação de Trichoderma spp. no controle de M. javanica em tomateiro, em casa de vegetação	108
5.2.3.6	Avaliação da viabilidade de ovos de M. javanica provenientes de raízes de cana-de-açúcar tratadas ou não com Trichoderma spp.	109
6	CONCLUSÕES.....	118
	REFERÊNCIAS	119
	ANEXO.....	135
	ANEXO.....	136

1 INTRODUÇÃO

O Brasil desempenha importante papel no setor sucroenergético como maior produtor mundial de cana-de-açúcar. A produção para a safra 2020/2021 foi de 654.527,81 milhões de toneladas, em uma área de 9.981,6 milhões de hectares. Por conta do promissor potencial para produzir etanol e outros subprodutos, a cana-de-açúcar é uma excelente alternativa para o setor de biocombustíveis, que segue numa linha de operação positiva e sustentável (CONAB, 2021).

O setor sucroenergético movimenta cerca de R\$ 40 bilhões por ano no Brasil, o que corresponde a 2% do PIB, sendo um dos setores que mais empregam no país, gerando em torno de 2,4 milhões de empregos diretos e indiretos agregando mais de 70.000 agricultores (UNICA, 2020).

Devido à grande procura por produtos da indústria da cana-de-açúcar ao longo do tempo, o total de área plantada aumentou e novos canaviais foram implementados em solos pobres e arenosos, favorecendo o aumento dos problemas fitossanitários, entre os quais destacam-se os causados por fitonematoides (MOURA, 2000). Dependendo das condições em que é realizado o cultivo da cana-de-açúcar, as perdas de produtividade causadas por esses parasitos podem chegar a 50% (DINARDO-MIRANDA; MIRANDA, 2008).

Dentre os nematoides que atacam a cultura, as espécies de *Meloidogyne* tem destaque, sendo *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood e *M. javanica* (Treub) Chitwood as que mais causam prejuízos nos canaviais (THOMAZELLI *et al.*, 2020) e estão presentes em praticamente todas as áreas produtoras (DIAS-ARIEIRA *et al.*, 2010). O controle é feito basicamente com nematicidas químicos e por isso, alternativas mais sustentáveis vêm sendo pesquisadas no intuito de proporcionar um manejo integrado mais eficiente e duradouro. Dentre essas alternativas, o controle biológico é bastante estudado e tem mostrado ser um método promissor (FERRAZ; SANTOS, 1995; MWAHEB *et al.*, 2017; NORDLUND, 1996).

Espécies de *Trichoderma* são há muito tempo conhecidas por serem excelentes bioagentes de controle de diversas doenças de plantas. São fungos de vida livre encontrados no solo e na rizosfera, e que podem exercer efeitos benéficos no desenvolvimento e produtividade de plantas (HARMAN *et al.*, 2004; MONTE; BETTIOL; HERMOSA, 2019).

Atuando no controle biológico de fitopatógenos, espécies de *Trichoderma* podem utilizar diversos mecanismos como, antibiose, parasitismo, competição e indução de resistência (HOWELL, 2007; MELO, 1998). Os isolados mais eficazes no controle biológico e na promoção de crescimento são aqueles que conseguem estabelecer interações duradouras com a

planta, como as rizosfera-competentes e endofíticas, pois os efeitos benéficos que causam persistem por todo ou grande parte do ciclo de vida da planta (HARMAN, 2000).

Durante a interação fungo-planta muitas proteínas do vegetal têm a expressão alterada e/ou aumentada. Quitinases, β -glicosidases, peroxidases, entre outras proteínas são ativadas nesse processo (HARMAN; SHORESH, 2007), alterando o metabolismo da planta podendo levar a indução de resistência sistêmica e/ou localizada contra agentes patogênicos (SHORESH; YEDIDIA; CHET, 2005; YEDIDIA *et al.*, 2000, 2003; YEDIDIA; BENHAMOU; CHET, 1999).

Com todo esse potencial para comunicação com a planta e os mecanismos de ação contra fitopatógenos, *Trichoderma* se torna uma ferramenta interessante para ser testada no controle de fitonematoides. Algumas das habilidades como produção de compostos tóxicos e parasitismo podem ser eficientes no combate aos parasitos. Ademais, dada a importância da cultura da cana-de-açúcar para o agronegócio nacional e os prejuízos que os nematoides causam neste cultivo, torna-se viável a busca por alternativas biológicas para esse problema, já que poucos são os estudos direcionados para esta interação quando os agentes biológicos são fungos do gênero *Trichoderma*.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Selecionar isolados de *Trichoderma* spp. que promovam o crescimento de cana-de-açúcar e tomate e controlem *M. incognita* e *M. javanica* nas culturas.

2.2 Específicos

- Avaliar a capacidade dos isolados de *Trichoderma* no parasitismo de ovos de *M. incognita in vitro*;
- Verificar os efeitos de filtrados fúngicos de *Trichoderma* sobre ovos de *M. incognita* e *M. javanica in vitro*;
- Aferir os efeitos dos metabólitos voláteis de *Trichoderma* sobre a eclosão de juvenis de *M. incognita in vitro*;
- Examinar *in vitro* o potencial quitinolítico dos isolados de *Trichoderma*;
- Determinar a atividade enzimática de quitinase das cepas de *Trichoderma*;
- Avaliar a capacidade de *Trichoderma* spp. em promover o crescimento de cana-de-açúcar em casa de vegetação;
- Averiguar a colonização radicular de cana-de-açúcar por isolados de *Trichoderma*;
- Testar a capacidade de *Trichoderma* no biocontrole de *M. incognita* e *M. javanica* em cana-de-açúcar e tomate.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea alta, perene, tropical ou subtropical que armazena sacarose no caule e tem grande importância alimentar e bioenergética. É uma cultura que evoluiu sob condições de alta luz solar, altas temperaturas e grandes quantidades de água, estando hoje adaptada a uma zona climática de 35 °C ao redor do mundo entre o norte e o sul do equador (MOORE; PATERSON; TEW, 2013).

Propaga-se vegetativamente por meio do plantio de toletes com dois ou mais nós. Dentro de alguns dias após o plantio, raízes finas se desenvolvem a partir de primórdios ao redor dos nós sustentando o crescimento inicial e o desenvolvimento dos brotos primários. Outros brotos se desenvolvem por perfilhamento, e juntamente com os brotos primários desenvolvem raízes caulinares que, posteriormente, substituirão as raízes sedimentadas. As plantas de cana-de-açúcar crescem em tufos com vários caules, tipo colmo, de comprimentos variados. À medida que os caules jovens crescem, eles competem por luz e espaço e uma grande parte deles morre. Aqueles que sobrevivem aumentam em diâmetro e comprimento. Após cerca de 12–24 meses, dependendo da umidade do solo e da temperatura, o conteúdo de sacarose nos caules se aproxima de seu pico e a safra pode ser colhida (BERRY, CADET; SPAULL, 2017).

Há muito tempo é reconhecida como uma das culturas mais eficientes do mundo na conversão de energia solar em energia química podendo ser colhida como sacarose e biomassa. A taxonomia atual divide a cana-de-açúcar em seis espécies, duas das quais são silvestres e sempre reconhecidas (*Saccharum spontaneum* L. e *Saccharum robustum* Brandes e Jewiet ex Grassl) (MOORE; PATERSON; TEW, 2013), sendo a cana-de-açúcar cultivada um híbrido multiespecífico, recebendo a designação *Saccharum* spp. (TOPPA *et al.*, 2010).

A cana-de-açúcar foi trazida ao Brasil em 1532 e sempre teve forte importância econômica. O Brasil segue como o maior produtor da cultura, seguido por Índia e China, de acordo a União da Indústria da Cana-de-açúcar (UNICA, 2021). É também o maior produtor e exportador de açúcar, segundo United States Department of Agriculture (USDA); e maior produtor de etanol de cana-de-açúcar (CONAB, 2021).

Segundo o Agrostat, o setor sucroenergético foi responsável por cerca de 8,48% das exportações do agronegócio nacional em 2020.

O setor produtivo gerou mais de 774 mil empregos formais em 2019 e juntamente com os empregos indiretos tem cerca de 2,4 milhões de pessoas trabalhando na cadeia da cana-de-açúcar (UNICA, 2020).

O Estado de São Paulo produz o equivalente a 20% do total produzido no país, demonstrando seu importante papel nesse mercado. Comparando-se às cifras oficiais fornecidas pela Organização para a Alimentação e Agricultura – FAO, em 2010, para a produção de cana-de-açúcar, de um total de 42 países produtores, somente o Estado de São Paulo apresentou a terceira maior do mundo, atrás apenas da produção brasileira e da Índia (BIOSEV S. A., 2013).

A agroindústria brasileira vem desenvolvendo uma tecnologia agrícola e industrial completa, que visa o aproveitamento máximo da cana-de-açúcar e seus derivados para a fabricação de produtos. A cultura representa um importante papel para o meio ambiente, já que o etanol é uma das melhores alternativas para reduzir a emissão de gases causadores do efeito estufa, pois a sua queima como combustível reduz em 70% a emissão de CO₂ na atmosfera quando comparado à gasolina (Embrapa Agrobiologia) – (CONAB, 2014).

A produção mundial de etanol tem crescido rapidamente. De acordo com dados disponibilizados pela Renewable Fuels Association, a produção mundial de etanol evoluiu de aproximadamente 13,1 bilhões de galões em 2007 para 29,1 bilhões de galões em 2019. O Brasil foi o segundo maior produtor de etanol do mundo em 2019 tendo produzido 8,6 bilhões de galões, ficando apenas atrás dos Estados Unidos da América, que produziu, no mesmo período, 15,8 bilhões de galões (BIOSEV, 2021).

3.2 Nematoides na cultura de cana-de-açúcar e métodos de manejo

Os nematoides são os animais multicelulares mais abundantes da Terra e depois dos insetos formam o grupo que mais impactou a humanidade, tanto diretamente pelos parasitas humanos, quanto indiretamente pelos danos a agricultura (KIMPINSKI; STURZ, 2003).

Os nematoides são essencialmente aquáticos e a maioria dos indivíduos é de vida livre. Uma parte pode parasitar plantas e, espécies distintas podem infectar tanto os órgãos subterrâneos quanto a parte aérea dos vegetais (FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

Muitas espécies de nematoides são encontradas associadas a cana-de-açúcar, porém, no Brasil, as três economicamente mais importantes em função dos danos que causam à cultura são: *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *M. javanica* (Treub) Chitwood e *Pratylenchus zae*

Graham (BELLÉ *et al.*, 2017; DINARDO-MIRANDA, 2005; LORDELLO, 1981; MOURA; RÉGIS; MOURA, 1990; NOVARETTI; TÉRAN, 1983)

Os danos causados por estes nematoides ocorrem nas raízes das plantas, comprometendo a capacidade de absorção de água e nutrientes necessários para o desenvolvimento saudável da planta. Estes patógenos injetam toxinas no sistema radicular, o que resulta em deformações, como as galhas provocadas por *Meloidogyne*, e extensas áreas necrosadas, quando os nematoides presentes são do gênero *Pratylenchus* (DINARDO-MIRANDA, 2011; KIMATI *et al.*, 1997). A maior parte dos danos causados pelos nematoides são decorrentes de alterações diretas nas células das plantas, normalmente interferindo no ciclo celular normal ou pela retirada dos nutrientes do citoplasma celular (PALOMARES-RIUS *et al.*, 2017). Em condições de campo os sintomas são observados em reboleiras, onde nota-se plantas menores e cloróticas no meio de outras de porte e coloração aparentemente normais (DINARDO-MIRANDA, 2011).

Dinardo-Miranda (2008) menciona que os fatores que podem interferir na severidade dos danos causados por nematoides são a densidade populacional, a variedade cultivada e as condições ambientais. A autora afirma que para a cultura de cana-de-açúcar, *M. javanica* e *P. zaeae* causam cerca de 20 a 30% de redução de produtividade no primeiro corte de variedades suscetíveis. Já *M. incognita* pode causar perdas em torno de 40%. Quando as variedades apresentam alta suscetibilidade e as populações alcançam níveis muito altos, as perdas podem chegar a até 50% da produtividade.

Consequentemente, os prejuízos causados por estes patógenos podem reduzir a longevidade do canavial e inviabilizar a utilização dessas áreas para novos cultivos (DINARDO-MIRANDA, 2005; LORDELLO, 1981; MOURA; RÉGIS; MOURA, 1990; NOVARETTI; TÉRAN, 1983).

O método de controle mais recomendado para áreas infestadas por nematoides, é a utilização de variedades resistentes. Mas a aplicação dessa importante ferramenta de controle é prejudicada devido à baixa quantidade de variedades comerciais com essa característica (MAZZUCHELLI; MAZZUCHELLI; DE ARAUJO, 2020; VASCONCELOS; DINARDO-MIRANDA, 2011). Então, o manejo dos locais infestados é baseado na aplicação de nematicidas químicos no momento do plantio e/ou nas soqueiras, associado ou não ao uso de matéria orgânica (torta de filtro) (VASCONCELOS; DINARDO-MIRANDA, 2011).

Os nematicidas proporcionam um controle eficiente, aumentando a produtividade agrícola (HALBRENT; LAMONDIA, 2003) mas, causam sérios problemas ao meio ambiente por conta da alta toxicidade e pela inconstância dos resultados (BARROS; MOURA; PEDROSA, 2003), pois alguns estudos constataram que a densidade populacional dos nematoides no

segundo ciclo da planta aumenta rapidamente após o uso do químico (MOURA; MACEDO, 1997).

No intuito de baixar as populações de nematoides, a um nível que não provoque danos econômicos, vários métodos de controle têm sido pesquisados nos últimos anos para integração das técnicas disponíveis, visando tornar o processo mais produtivo, racional, eficiente e econômico (ABD-ELGAWAD; ASKARY, 2018; NOVARETTI; TÉRAN, 1983).

As técnicas que estão sendo estudadas para um manejo integrado das fitonematoses são: o uso de cultivares resistentes, controle biológico, incorporação de matéria orgânica, emprego de plantas antagonicas, rotação de culturas com plantas não hospedeiras, pousio de áreas com alta incidência de fitonematoides e a aplicação de nematicidas sistêmicos (BARROS; MOURA; PEDROSA, 2000; KERRY, 1987; LUAMBANO *et al.*, 2015; MOURA, 2000).

Dentre as técnicas citadas, o controle biológico tem se destacado como ferramenta ao manejo integrado desses organismos, visando à redução do número de populações desses patógenos (CARNEIRO, 1992; ESCUDERO *et al.*, 2017; KERRY, 1987; MANKAU, 1980).

Hoje são conhecidos mais de 200 antagonistas que podem ser utilizados no controle biológico de fitonematoides. O uso desses agentes no solo visando o biocontrole dos nematoides é uma estratégia menos agressiva ao meio ambiente, podendo diminuir a população dos parasitos no campo e favorecer o equilíbrio da microbiota do solo, tornando-o supressivo ao patógeno (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Dentre os antagonistas de fitonematoides, os fungos são muito utilizados, pois oferecem estratégias aprimoradas para infectar ou capturar os nematoides (FERRAZ; SANTOS, 1995), e juntamente com as bactérias têm demonstrado um excelente potencial de controle (STIRLING, 1991).

Os fungos antagonistas a nematoides são conhecidos como fungos nematófagos e apresentam diversos mecanismos de ação. Podem capturar nematoides usando uma variedade de métodos, como adesivos especializados ou dispositivos mecânicos de captura (fungos predadores), infectarem nematoides por fixação de conídios e invasão da cutícula (fungos endoparasitos), parasitar ovos ou fêmeas de nematoides com as hifas (fungos parasitas de ovos) ou excretar toxinas que imobilizam e matam os nematoides (produtores de metabólitos tóxicos). Normalmente são divididos em fungos predadores, endoparasitos, oportunistas (parasitos de ovos, cistos ou fêmeas) e produtores de metabólitos tóxicos (FERRAZ; SANTOS, 1995; LIANG *et al.*, 2019). Alguns autores ainda acrescentam mais uma categoria a lista, a de fungos produtores de dispositivos especiais de ataque, que infectam com estruturas diferenciadas e

matam os nematoides mas não se alimentam deles (SOARES; SUFIATE; DE QUEIROZ, 2018).

Dentre os fungos predadores destacam-se os gêneros *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactylella* e *Monacrosporium*. No grupo de endoparasitas, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* são bastante estudados, e em condições de campo, *P. lilacinus* obteve sucesso nos ensaios realizados (CARNEIRO, 1992).

Os microrganismos oportunistas, que impedem ou limitam a reprodução atacando fêmeas ou ovos, são mais propensos a serem agentes de controle biológico úteis no combate aos nematoides de galha. Como os juvenis de segundo estágio (J2) e os adultos parasitas ficam protegidos pela raiz, os bioagentes em potencial devem ser altamente especializados e capazes de entrar na raiz junto com os J2 ou atacar a fêmea depois que ela rompe o córtex radicular na maturidade (STIRLING; MANKAU, 1978). Muitos desses microrganismos colonizam e crescem facilmente na matriz gelatinosa que protege os ovos dos nematoides de galhas, e isso aumenta o potencial para serem utilizados como agentes de controle biológico de nematoides (CARNEIRO, 1992).

3.3 Gênero *Meloidogyne*

As espécies de *Meloidogyne* pertencem ao Filo Nematoda e estão inseridas na Classe Chromadorea, Ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Superfamília Tylenchoidea e Família Meloidogynidae (DE LEY; BLAXTER, 2002; PERRY; MOENS, 2006).

O gênero *Meloidogyne* Göldi (1892), abriga espécies que são conhecidas como nematoides de galhas, e está no topo da lista dos 10 gêneros de fitonematoides de maior importância científica e econômica. O grupo contempla mais de 100 espécies, sendo *M. javanica* (Treub) Chitwood, *M. arenaria* (Neal) Chitwood, *M. hapla* Chitwood e *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood as mais devastadoras para a produção agrícola. As espécies de *Meloidogyne* estão distribuídas mundialmente, possuem uma vasta gama de hospedeiros e desenvolvem uma dinâmica de doenças complexa com espécies de fungos e bactérias que pode acentuar a incidência de doenças em plantas cultivadas (BERNARD; EGNIN; BONSI, 2017).

Os nematoides de galhas são endoparasitas sedentários obrigatórios, que necessitam infectar uma planta hospedeira para completar seu ciclo de vida (IBRAHIM *et al.*, 2019), que tem início quando a fêmea faz a postura dos ovos nos tecidos radiculares da planta ou solo.

Junto aos ovos, a fêmea secreta via glândulas retais, uma matriz gelatinosa que envolve e protege os ovos formando a massa de ovos (WEISCHER; BROWN, 2000).

As massas de ovos contêm entre 400 e 500 ovos cada e são geralmente depositadas pela fêmea na superfície da raiz ou na parte interna no parênquima cortical. Poucas horas após a postura os juvenis de primeiro estágio (J1) já estão formados dentro dos ovos e sofrem uma ecdise onde se transformam em juvenis de segundo estágio (J2), que é a forma infectante de *Meloidogyne*. Quando estão maduros e as condições de temperatura e umidade são favoráveis, os J2 eclodem utilizando o estilete para romper a casca dos ovos e saem para o solo em busca de um hospedeiro suscetível para se alimentarem (ABAD *et al.*, 2009).

Os nematoides de galhas detectam gradientes químicos dos exsudatos radiculares liberados pela planta hospedeira, e então iniciam o processo de interação com a planta pela migração intercelular. O J2 entra, com o auxílio do estilete, na zona de alongamento da raiz e, no apoplasto secreta enzimas hidrolíticas da parede celular (endoglucanas, endoxilanas, pectateliases entre outras) que são provenientes de suas glândulas esofagianas, atinge o cilindro vascular entrando na área do meristema radicular. Dessa forma os danos mecânicos às células da planta são minimizados quando comparados a outros grupos de nematoides como os do cisto (PALOMARES-RIUS *et al.*, 2017).

Após estabelecido dentro da raiz, o J2 libera secreções das glândulas esofagianas, e um grupo de cinco a oito células no cilindro vascular sofre hipertrofia e se transforma em células de alimentação, chamadas de células gigantes ou nutridoras (LORDELLO, 1984; PALOMARES-RIUS *et al.*, 2017). No periciclo ocorre a hiperplasia celular, processo que está envolvido com a formação das galhas, que se dá quando as células dos tecidos circundantes as células nutridoras sofrem hiperplasia e hipertrofia, resultando no engrossamento da raiz, principal sintoma da infecção por *Meloidogyne* spp. (MOENS; PERRY; STARR, 2009; PALOMARES-RIUS *et al.*, 2017).

Após essas mudanças na morfologia do sistema radicular da planta, o sítio de alimentação está formado e os J2 alojados não se movimentam mais, tornando-se sedentários. Enquanto se alimentam e se desenvolvem o formato do corpo se diferencia em um aspecto salsichoide e partir daí ocorrem mais três ecdises para o terceiro e quarto estágio juvenil (J3 e J4) e finalmente a forma adulta (MOENS; PERRY; STARR, 2009).

Quando se transformam em adultos machos, a morfologia muda e estes se tornam nematoides longos e filiformes retidos na cutícula da última ecdise, então perfuram com o estilete a cutícula na qual estão contidos e deixam as raízes em direção ao solo. Na muda para fêmea o formato do corpo é semelhante ao estágio J4, porém, quando se torna madura, a fêmea

de *Meloidogyne* apresenta uma forma maior e periforme, permanecendo de forma endoparasita sedentária no interior das raízes até o final do seu ciclo de vida (KARSSSEN; MOENS, 2006).

O tempo do ciclo de vida dos nematoides de galha é altamente influenciado pelas condições ambientais como temperatura e umidade, e pela planta hospedeira, porém de forma geral pode levar de 20 a 30 dias a 26 °C para ser fechado (TAYLOR; SASSER, 1978).

3.4 A cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma planta da família das solanáceas originária da região andina (Peru, Bolívia e Chile). Os espanhóis levaram a planta para a Europa onde era utilizada principalmente como planta ornamental por causa da estética agradável dos frutos amarelos intensos. No século XVII iniciou-se o consumo do tomate na Itália e Espanha, e ao longo dos anos o uso na alimentação foi se espalhando pelos países e hoje é plantado em quase todo o mundo (FILHO; DOMINGUES, 2014).

Trata-se de uma planta anual, que pode alcançar mais de dois metros de altura. Na América do Sul, é possível fazer a colheita dos frutos das mesmas plantas durante vários anos consecutivos, sendo que a primeira colheita pode ser realizada aos 45-55 dias após a florescência, ou 90-120 dias depois da sementeira. O formato dos frutos pode divergir conforme a cultivar (variedade cultivada) e a cor deles pode variar entre amarelo e vermelho (NAIKA *et al.*, 2006).

A planta de tomateiro é o segundo vegetal mais produzido no mundo depois das batatas. Os tomates são ricos em vários micronutrientes como minerais, vitaminas e antioxidantes que são essenciais na alimentação humana. Eles contém altos níveis de licopeno, um antioxidante que reduz os riscos associados com muitas doenças neurológicas e cânceres (EL-SAPPAH *et al.*, 2019).

Embora a cultura do tomate seja plantada em praticamente todo o globo, o maior produtor mundial é a China com uma área de mais de um milhão de hectares e produção anual de 56 milhões de toneladas (CONAB, 2019). O Brasil produz cerca de 4 milhões de toneladas de tomate por ano e os principais estados produtores são Goiás e São Paulo responsáveis por 28,9% e 25,6% da produção nacional (IBGE, 2019).

O tomate é severamente acometido por diversas doenças causadas por nematoides fitoparasitos, sendo uma das culturas mais prejudicadas pelo ataque desses microrganismos. As perdas são recorrentes de redução na produção ou danos na qualidade dos frutos gerados,

podendo chegar a 100% de perda se a infestação for alta no início do plantio (OLIVEIRA; ROSA, 2014).

Dentre todas as nematoses que ocorrem em tomate, a meloidoginose é considerada uma das principais e mais danosa a cultura podendo inviabilizar áreas produtivas quando os níveis de infestação estão altos. Em cultivo de sistema protegido (estufa), a produção de frutos de tomates pode sofrer perdas entre 14 a 44% quando afetados pelos nematoides de galha (ROSA; WESTERICH; WILCKEN, 2014).

As espécies mais importantes para o tomateiro são *M. javanica*, *M. incognita* e *M. enterolobii* e estão amplamente distribuídas no Brasil e geram prejuízos significativos a cultura (OLIVEIRA; ROSA, 2014).

Muitos cultivares de tomate apresentam alta suscetibilidade ao ataque dos nematoides de galhas (KIRWA *et al.*, 2018; LEONETTI *et al.*, 2017; PARVEEN; ALAM, 2001; ROSA; WESTERICH; WILCKEN, 2014), por essa razão muitos estudos são realizados no intuito de controlar os parasitos nesta cultura, além de ser muitas vezes utilizada como uma planta modelo para avaliação das medidas de controle empregadas em outras culturas (BELLÉ *et al.*, 2017; DIAS-ARIEIRA *et al.*, 2010; HADDAD, 2014; LUIZ; SOARES; MAIA, 2009; SILVA *et al.*, 2012, 2016; THOMAZELLI *et al.*, 2020; VILJOEN *et al.*, 2019).

3.5 *Trichoderma* spp. : visão geral e o biocontrole de fitonematoides

Espécies do gênero *Trichoderma* são fungos de vida livre que podem ser encontrados em praticamente qualquer lugar do mundo. Possuem alta capacidade de interação em ambientes radiculares, de solo e foliares, e são facilmente isolados de vários tipos de solos e materiais celulósicos em decomposição (HARMAN *et al.*, 2004; HARMAN; LORITO; LYNCH, 2004; HOWELL, 2003).

Estão entre os microrganismos mais estudados no mundo devido ao grande potencial industrial, tecnológico e ecológico, pois produzem diversas enzimas de interesse para as indústrias farmacêutica, têxtil e alimentícia (SOOD *et al.*, 2020). Apresentam capacidades de antagonismo a vários patógenos de solo e de parte aérea (FONTENELLE *et al.*, 2011; HADDAD *et al.*, 2017; PEDRO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2011).

Trichoderma é conhecido como um fungo oportunista que pode interagir com as plantas de forma simbiótica e incrementar o desenvolvimento vegetal auxiliando na nutrição vegetal por meio da solubilização e disponibilização de diversos micronutrientes do solo (BONONI *et*

al., 2020; GARCÍA-LÓPEZ; AVILÉS; DELGADO, 2015; MARTÍNEZ-MEDINA; VAN WEES; PIETERSE, 2017; YEDIDIA *et al.*, 2001). A indução de resistência contra patógenos é um dos vários efeitos benéficos que *Trichoderma* pode proporcionar para as plantas hospedeiras (HARMAN, 2006).

Trichoderma possui muitas características favoráveis para um bom agente de controle biológico e promotor de crescimento, e dentre os mecanismos de ação que esses fungos podem utilizar estão a antibiose, parasitismo, competição por espaço e nutrientes e a indução de resistência (HOWELL *et al.*, 1997; MELO; AZEVEDO, 1998).

Devido a todas essas características vantajosas, *Trichoderma* spp. é um agente muito conhecido e utilizado no controle de doenças (ELAD; KIRSHNER, 1993; PAPAVIDAS, 1985), mas poucas foram as pesquisas realizadas sobre a sua ação no manejo de nematoides (SHARON *et al.*, 2001; SPIEGEL; CHET, 1998). Segundo algumas observações, o principal modo de controle foi a produção de compostos tóxicos e o parasitismo de ovos de fitonematoides (EAPEN; BEENA; RAMANA, 2005; POVEDA; ABRIL-URIAS; ESCOBAR, 2020; SHARON *et al.*, 2001; SPIEGEL; CHET, 1998).

Esses modos de ação são fruto da vasta produção de enzimas extracelulares e compostos tóxicos que fungos do gênero *Trichoderma* podem produzir e excretar. Essas enzimas são responsáveis por degradar a parede celular de outros organismos e muitos dos metabólitos liberados possuem atividade antimicrobiana (MELO, 1991; MENEZES; SOUZA, 1995). Segundo Harman *et al.* (2004) *Trichoderma* spp. podem produzir mais de 100 tipos de enzimas e metabólitos extracelulares de interesse comercial e ecológico.

De acordo com as observações de Sahebani e Hadavi (2008), dois mecanismos foram utilizados pelas espécies de *Trichoderma* no controle de nematoides, o parasitismo direto de ovos e juvenis, pois detectaram o aumento da atividade de quitinases e proteases, e a indução dos mecanismos de defesa do hospedeiro. No estudo foi verificado que enzimas extracelulares, com atividade antifúngica, participam da relação de interação entre *Meloidogyne* spp. e *Trichoderma* spp. (SHARON *et al.*, 2001; SUAREZ *et al.*, 2004).

Em estudos realizados em condições de campo, Affokpon *et al.* (2011) avaliaram o potencial de 17 isolados de *Trichoderma* spp. no controle de fitonematoides em plantas de tomate e cenoura. Os resultados obtidos demonstraram que houve inibição significativa da reprodução do nematoide, diminuição das lesões nas raízes e um aumento de 30% na produção de tomate, em comparação às plantas do tratamento controle. Observaram ainda, que *Trichoderma asperellum* (T-16) eliminou a densidade da segunda fase dos juvenis (J2) nas raízes em até 80% e que *T. brevicompactum* (T-3) reduziu a produção de ovos em 86%. Embora

não foram observados efeitos significativos no rendimento das plantas de cenoura, a densidade de J2 no solo foi reduzida em até 94% com a utilização de *T. asperellum* (T-12), nas parcelas tratadas, em comparação com a testemunha.

Trichoderma foi avaliado no controle de *M. incognita* em experimentos realizados *in vitro* e em casa de vegetação. Nos ensaios *in vitro*, 64% dos ovos e juvenis do segundo estágio foram parasitados pelo antagonista. E no ensaio realizado em condições de casa de vegetação, plantas de pepino tratadas com *T. harzianum*, antes e depois da inoculação com o parasito, tiveram o número de nematoides reduzido em 50% e redução significativa do número de galhas, demonstrando potencial para ser utilizado como nematicida biológico (MASCARIN; FERREIRA; VIEIRA DE ARAÚJO, 2012).

Alguns trabalhos têm demonstrado que muitos compostos orgânicos voláteis (COV) emitidos por microrganismos de solo e endofíticos apresentam capacidade nematicida (FIALHO *et al.*, 2012; LUO *et al.*, 2018; PIMENTA *et al.*, 2017).

Os COV são provenientes do metabolismo primário e secundário de vários microrganismos. Diferentemente de outros metabólitos como enzimas, antibióticos e toxinas, os voláteis são menores e possuem várias características que facilitam a evaporação e difusão no solo e rizosfera, como alta pressão de vapor, baixa massa molecular e baixo ponto de ebulição (SCHMIDT *et al.*, 2015).

Os voláteis têm várias funções, como comunicação entre indivíduos da mesma espécie e entre formas de vida de diferentes reinos tais quais insetos e plantas. Estão envolvidos na sinalização da comunicação célula a célula, como possível válvula de liberação de carbono, reações de defesa por diversos organismos ou no estabelecimento de simbiose, promovendo crescimento ou inibindo patógenos (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010; WERNER; POLLE; BRINKMANN, 2016).

Por serem moléculas muito pequenas, os COV podem facilmente se dispersar no ambiente. Quando em contato com a água, esses gases ficam retidos na molécula, e isso inibe a volatilização fazendo com que permaneçam por mais tempo no ambiente (TERRA *et al.*, 2017).

Os COV podem ser uma ferramenta muito promissora no controle de fitonematoides, pois as poucas pesquisas realizadas avaliando esse potencial, demonstraram resultados positivos (FREIRE *et al.*, 2012; RIGA; LACEY; GUERRA, 2008).

Trabalhos *in vitro* com COV de *Trichoderma* demonstraram alta eficiência na mortalidade dos nematoides *Panagrellus redivivus*, *Caenorhabditis elegans* e *Bursaphelenchus xylophilus* (YANG *et al.*, 2012).

A escassez de estudos com COV de *Trichoderma* no biocontrole de nematoides abre uma lacuna nesse campo, pois pesquisas dos COV emitidos por plantas e microrganismos têm sido cada vez mais estudados como candidatos a biofumigantes para o controle de vários patógenos do solo, incluindo nematoides fitoparasitos (BUI; DESAEGGER, 2021), sendo que pesquisas dessa natureza ampliariam a forma como *Trichoderma* vem sendo utilizado na agricultura.

3.6 *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento de plantas

Há anos a interação entre plantas e microrganismos tem sido estudada e, exceto pela associação entre plantas e fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio, essa relação foi considerada prejudicial por muito tempo, pois acreditava-se que durante a interação os tecidos vegetais fossem lesionados podendo ocasionar até a morte da planta (LIPKA; PANSTRUGA, 2005).

Nos últimos anos, muitos estudos têm comprovado que a presença de microrganismos no interior de tecidos vegetais favorece a planta elevando a eficácia biológica de forma considerável. Sendo assim, mesmo que muitos microrganismos possam apresentar potencial fitopatogênico, grande parte das interações permanecem assintomáticas, pois a planta possui um sistema de defesa altamente sofisticado (LIPKA; PANSTRUGA, 2005).

Espécies de *Trichoderma* spp. são capazes de modificar o transcriptoma e proteoma das plantas provocando alterações no metabolismo que podem ser benéficas, podendo ocorrer a ativação de vias que levam à indução de resistência localizada e/ou sistêmica (SHORESH; YEDIDIA; CHET, 2005; YEDIDIA; BENHAMOU; CHET, 1999; YEDIDIA et al., 2000; 2003) ou a promoção de crescimento das raízes e parte aérea (HARMAN; BJÖRKMAN, 1998).

A promoção de crescimento proporcionada por *Trichoderma* spp. pode ser observada desde a germinação das sementes até o completo crescimento vegetal. Estes efeitos têm sido relacionados à produção de hormônios ou fatores de crescimento; maior eficiência no uso de alguns nutrientes e aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pela planta (BENÍTEZ et al., 2004).

Outro fator relacionado a promoção de crescimento é o fato de algumas linhagens de *Trichoderma* spp. serem capazes de aumentar a superfície total do sistema radicular vegetal, possibilitando um maior acesso aos elementos minerais presentes no solo (ALTOMARE et al., 1999).

Outras linhagens são capazes de solubilizar e disponibilizar para a planta o fosfato de rocha, ferro, cobre, manganês e zinco. Também podem melhorar os mecanismos ativos de absorção de cobre, fósforo, ferro, manganês, sódio, cobalto, cádmio, cromo, níquel, chumbo, vanádio, magnésio, boro, zinco e alumínio; bem como aumentar a eficiência da planta para utilizar alguns nutrientes importantes, como o nitrogênio (HARMAN et al., 2004).

Isolados benéficos de *Trichoderma* spp. podem melhorar o desenvolvimento vegetal aumentando a resistência aos estresses abióticos (p.ex.: umidade, pH, temperatura). Pesquisas apontam que plantas tratadas com esses agentes podem ter seu desempenho favorecido quando cultivadas em condições de estresse (HARMAN, 2000).

Os efeitos de *Trichoderma* podem variar dependendo da espécie vegetal e até da variedade utilizada. Em cacau e tomate, algumas linhagens de *Trichoderma* aumentaram a expressão de genes relacionados a taxa de expansão celular, que favoreceu o crescimento das plantas (ALFANO et al., 2007; BAILEY et al., 2006). Em outro estudo utilizando o tomate como planta alvo, 20 linhagens de *Trichoderma* promoveram o crescimento das plantas acima de 100% e um isolado avaliado alcançou aumentos de 900% em relação as plantas do grupo controle em ensaios conduzidos em casa de vegetação (FONTENELLE et al., 2011).

Em um experimento feito em milho, foi comprovado que a promoção de crescimento foi controlada por um componente genético da própria planta, resultando em reações diferentes conforme a variedade avaliada (HARMAN; SHORESH, 2007).

Em cana-de-açúcar, Serna-cock, Arias-garcia e Hernandez (2011) constataram aumento no diâmetro do caule, do sistema radicular e no comprimento das folhas das plantas, quando utilizaram *Trichoderma lignorum* no tratamento das plantas.

Isolados de *Trichoderma* spp. promoveram aumento significativo da massa de matéria fresca e no comprimento da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *M. incognita* em ensaios realizados em condições de casa de vegetação, demonstrando eficiência na promoção de crescimento mesmo na presença dos fitoparasitos (FREITAS et al., 2012). Esse resultado é muito interessante, pois nem sempre os isolados de *Trichoderma* podem beneficiar a planta com promoção de crescimento e proteção contra doenças ao mesmo tempo, uma vez que os elicitores fúngicos que desencadeiam os processos de ambos os benefícios são diferentes, ou seja, um isolado que promove crescimento pode não induzir resistência na planta e vice-versa (HARMAN et al., 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Em todos os ensaios *in vivo* foram utilizados toletes ou mudas pré brotadas (MPB) de cana-de-açúcar da variedade IAC-SP-95-5000. As mudas foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Mauro Alexandre Xavier, do Centro de Cana-de-açúcar - IAC. Os ensaios de promoção de crescimento foram estabelecidos na casa de vegetação da Unidade Laboratorial de Referência em Biologia Molecular Aplicada (ULRBMA) do Instituto Biológico, São Paulo, SP, e na casa de vegetação da Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico do Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Agropecuária (Capsa), Campinas, SP. O plantio das mudas e toletes foi feito em substrato comercial Bioplant Prata, em vasos (Nutriplan) com capacidade de 5 litros.

Os ensaios de controle biológico foram realizados na casa de vegetação do Laboratório de Nematologia do Capsa, Campinas-SP e as mudas de cana-de-açúcar foram cultivadas em vasos (Nutriplan) com capacidade de 4 litros contendo terra com textura média, misturada com areia na proporção 1:1, previamente autoclavada, ou substrato comercial Tropstrato Hortaliça 2 - HT (Vida Verde - Mogi Mirim, São Paulo). As plantas de todos os experimentos foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas por micro aspersão automática, duas vezes ao dia durante 5 minutos, com médias de temperaturas variando entre 18 e 32 °C.

Embora a cana-de-açúcar tenha sido a cultura alvo no presente estudo, o tomate da variedade “Rutgers” foi incluído como cultura modelo (padrão de viabilidade do inóculo) devido à alta suscetibilidade aos nematoides de galhas utilizados neste estudo.

4.2 Microrganismos utilizados nos ensaios

4.2.1 *Trichoderma* spp.

Foram utilizados 16 isolados de *Trichoderma* spp. (Tabela 1), pertencentes à coleção de culturas da ULRBMA do Instituto Biológico, Micoteca Mário Barreto Figueiredo, selecionados em trabalhos anteriores como bons antagonistas a *Rhizoctonia solani* (LUCON *et al.*, 2009), *Pythium aphanidermatum* (dados não publicados) e *Colletotrichum lagenarium* em plântulas de pepino (SILVA *et al.*, 2011), *C. lindemuthianum* em feijão (PEDRO *et al.*, 2012) e *S.*

sclerotiorum (HADDAD *et al.*, 2017) e *Meloidogyne incognita* em soja (HADDAD, 2014). Os isolados foram mantidos por repicagem sucessiva em meio de Batata Dextrose Ágar (BDA) e conservados pelos métodos de congelamento a -20 °C em glicerol 13% e em papel de filtro.

Tabela 1. Procedência dos isolados de *Trichoderma*

Isolados	Procedência	Latitude	Longitude	Espécie
IB 01/13	Aguai - SP, solo cultivado, tomate	S 22° 10' 34,3"	W 047° 01' 04,8"	<i>T. asperelloides</i>
IB 04/05	Itapira - SP, solo	S 22° 19' 11,6"	W 046° 48' 27,5"	<i>T. asperelloides</i>
IB 07/01	Piracicaba - SP, IPEF/ESALQ, solo	S 22° 42' 21,9"	W 047° 37' 48,0"	<i>T. atroviride</i>
IB 15/06	Pirassununga - SP, SP 330 - Anhanguera	S 22° 01' 18,6"	W 047° 26' 12,8"	<i>T. lentiforme</i>
IB 18/03	São José dos Campos - SP, solo	S 23° 09' 07,8"	W 045° 46' 57,2"	<i>T. koningiopsis</i>
IB 19/17	Taubaté - SP, BR 116 - Km 102	S 22° 59' 56,5"	W 045° 29' 50,5"	<i>T. camerunense</i>
IB 22/08	Cunha - SP, SP 171	S 23° 05' 50,7"	W 044° 57' 21,4"	<i>T. endophyticum</i>
IB 28/07	Bertioga - SP, SP 055 - Km 223	S 23° 49' 18,8"	W 046° 07' 46,7"	<i>T. strigosum</i>
IB 28/15	Bertioga - SP, SP 055 - Km 223	S 23° 49' 18,8"	W 046° 07' 46,7"	<i>T. endophyticum</i>
IB 30/07	Pedro Barros, SP, BR 116	S 24° 16' 26,8"	W 047° 24' 54,7"	<i>T. lentiforme</i>
IB 37/01	Piratiniga, SP, SP 590 - Km 7	S 22° 21' 15,1"	W 049° 10' 11,9"	<i>T. orientale</i>
IB 38/11	Marília, SP, SP 294 - Km 469	S 22° 09' 43,9"	W 050° 03' 36,4"	<i>T. lentiforme</i>
IB 43/14	Andradina - SP, solo	S 20° 55' 54,5"	W 051° 18' 26,4"	<i>T. asperelloides</i>
IB 48/06	Olímpia - SP, solo	S 20° 42' 18,1"	W 048° 57' 11,9"	<i>T. asperelloides</i>
IB 49/15	Morro Agudo - SP, solo	S 20° 43' 46,0"	W 048° 01' 01,7"	<i>T. koningiopsis</i>
IB 51/09	Cravinhos, SP, SP 255 - Km 25	S 21° 24' 24,3"	W 047° 51' 47,6"	<i>T. lentiforme</i>

(Fonte: Instituto Biológico)

4.2.2 *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*

Nos primeiros ensaios *in vitro* e *in vivo*, foi utilizada uma população de *M. incognita*, raça 3, recuperada de raízes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) procedente da região de Barreiras-BA, cedida pelo Dr. Pedro Luiz Martins Soares, do Laboratório de Nematologia da FCAV/Unesp, Campus de Jaboticabal, SP. A espécie foi identificada com base nos caracteres morfológicos do padrão perineal, preparado conforme Taylor & Netscher (1974), na morfologia da região labial dos machos (EISENBACK *et al.*, 1981) e no fenótipo isoenzimático para esterase, obtido pela técnica de Esbenshade & Triantaphyllou (1990) utilizando um sistema tradicional de eletroforese vertical mini protean II da Biorad. A raça 3 de *M. incognita* foi identificada conforme o North Carolina Differential Host Test, segundo Hartman & Sasser (1985).

As suspensões de *M. incognita* utilizadas nos ensaios foram obtidas a partir de raízes de tomateiros Santa Cruz Kada (*Lycopersicon esculentum* Mill) com galhas, utilizando a metodologia de Hussey & Barker (1973).

Nos demais ensaios utilizou-se uma população de nematoides de galha da espécie *M. javanica*, extraída de raízes de cana-de-açúcar, procedente da cidade de Jaú – SP, cedida pelo Dr. Claudio Marcelo Gonçalves Oliveira, do laboratório de Nematologia do Capsa, Campinas, SP. A identificação da espécie foi realizada através da análise da configuração perineal de fêmeas adultas e confirmada através de técnicas eletroforéticas do perfil de esterases (OLIVEIRA, C. M. G. *et al.*, 2011).

As suspensões de *M. javanica* utilizadas nos ensaios foram obtidas a partir de raízes de tomates anões com galhas, utilizando a metodologia de Coolen & D'Herde (1972).

4.3 Preparo do inóculo de *Trichoderma* spp. para os ensaios *in vivo*

No preparo do inóculo dos isolados de *Trichoderma* spp., dois discos de 9 mm de diâmetro de meio de cultura BDA contendo estruturas propagativas das cepas foram transferidos assepticamente para sacos plásticos de polipropileno transparentes, capacidade de 500 mL, contendo 100 g de arroz umedecidos em água, na proporção de 1:1 (50 g de arroz e 50 mL de água) e previamente autoclavados a 121 °C e 1 atm de pressão, por meia hora. As culturas

foram incubadas em câmara incubadora tipo BOD a 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas de luz e escuro, durante sete dias (PAPAVIZAS, 1982).

Nos ensaios de promoção de crescimento utilizando MPB, o inóculo foi obtido a partir da extração dos conídios dos grãos de arroz colonizados pelos isolados de *Trichoderma*. Frascos Erlenmeyers contendo 90 mL de água destilada foram autoclavados por 30 minutos. Após o resfriamento, 10 g de grãos de arroz colonizados pelos fungos foram colocados separadamente nos frascos com água, que foram encaminhados para o agitador orbital e permaneceram sob agitação por 60 minutos a 120 rpm (rotações por minuto). Após esse intervalo, as suspensões de conídios obtidas foram filtradas com auxílio de gaze esterilizada, e calibradas para a concentração de $1,5 \times 10^7$ conídios por mL utilizando-se a câmara de Neubauer para contagem.

4.4 Ensaios *in vitro*

4.4.1 Parasitismo de ovos de *M. incognita*

4.4.1.1 Ensaio de avaliação do parasitismo de ovos de *M. incognita* por *Trichoderma* spp. *in vitro* – Método da microgota

Foram utilizados 16 isolados de *Trichoderma* spp. crescidos em meio BDA durante 7 dias. Discos de BDA de 5 mm de diâmetro, contendo micélio e outras estruturas das linhagens de *Trichoderma*, foram removidos das bordas das culturas e transferidos para o centro de placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo ágar-água a 2%. Em seguida, foram adicionados 100 µL de suspensão com ovos e eventuais juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita*, distribuídos em 5 microgotas de 20 µL, totalizando 100 ovos por repetição. As microgotas de suspensão de *M. incognita* foram depositadas em formato circular em torno do disco de BDA contendo o potencial antagonista (Figura 1). As placas foram incubadas em BOD a 25 °C por 14 dias. Após esse período foram avaliados aleatoriamente 15 ovos por placa, com auxílio de microscópio óptico, e realizado o cálculo do percentual de ovos colonizados pelos isolados de *Trichoderma* spp. O ensaio foi realizado com três repetições, em delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.



Figura 1. Método da microgota para avaliação do parasitismo de ovos de nematoide de galha por isolados de *Trichoderma* spp. (Fonte: A autora)

4.4.1.2 Ensaio de avaliação do parasitismo de ovos de *M. incognita* por *Trichoderma* spp. in vitro - Método da lâmina

Suspensões de conídios dos isolados de *Trichoderma* foram preparadas conforme descrito no item 4.3 e calibradas para a concentração de $1,5 \times 10^4$ conídios/ml.

Ovos de *M. incognita* foram desinfestados com ampicilina a 1% e mercaptaetanol a 0,1%, durante quatro minutos; lavados em água esterilizada e coletados com micropipeta. Em lâmina de vidro, foram dispostos dois discos de ágar-água 2%, com diâmetro de 10 mm, contendo 20 ovos no disco da direita e 20 no da esquerda, conforme metodologia (adaptada) descrita por Carneiro & Gomes (1993) (Figura 2). Em seguida, 10 μ L de suspensões de conídios dos isolados de *Trichoderma* foram depositados sobre os discos de ágar-água contendo os ovos. As placas foram incubadas em BOD a 25 °C e as avaliações foram realizadas após 15 dias, determinando-se os números de ovos parasitados. O ensaio foi repetido 5 vezes com 3 repetições para cada tratamento em delineamento experimental inteiramente casualizado. A análise estatística foi feita como mencionada no item anterior.



Figura 2. Método Carneiro e Gomes (1993) (adaptado) para avaliação de parasitismo de ovos de nematoide de galhas. (Fonte: A autora)

4.4.2 Filtrados fúngicos

4.4.2.1 Ensaio de avaliação in vitro da mortalidade de ovos de *M. incognita* por filtrados fúngicos de *Trichoderma spp.*

Os isolados foram cultivados em placa de Petri contendo meio de cultura BDA, por sete dias à 25 °C. Após esse período, três discos de 5 mm foram retirados das bordas das culturas e colocados em tubos de ensaio de 50 mL, contendo 30 mL de meio Czpeck dox, e mantidos em incubadora a 25 °C, sob agitação (180 rpm) por 15 dias. Posteriormente, todo o conteúdo dos tubos foi filtrado em membrana de acetato celulose com 0,22 µm de abertura. Os filtrados fúngicos obtidos foram congelados, até o estabelecimento do ensaio. Parte da suspensão de ovos foi desinfetada em solução de antibiótico (ampicilina).

O ensaio foi conduzido utilizando quatro tipos de tratamento controle: C1 – Ovos não desinfetados com antibiótico imersos em H₂O; C2 – Ovos não desinfetados com antibiótico imersos em meio Czapek dox; C3 – Ovos desinfetados com antibiótico imersos em H₂O; e C4 – Ovos desinfetados com antibiótico imersos em meio Czapek dox. Em microtubos de 1,5 mL foram adicionados 100 µL de filtrados fúngicos e 20 µL de suspensão de ovos, contendo aproximadamente 50 ovos, exceto nos tratamentos controle, onde foram adicionados água ou meio de cultivo, conforme citado acima, mais a suspensão de ovos. Foram feitos três ensaios

independentes com três repetições cada. Os microtubos foram alocados em uma rack e incubados em BOD a 25 ± 2 °C por 15 dias. A avaliação foi realizada pela contagem do número de juvenis eclodidos.

4.4.2.2 Ensaio de avaliação in vitro da mortalidade de ovos de *M. javanica* por filtrados fúngicos de *Trichoderma* spp.

Discos de BDA de 7 mm de diâmetro contendo os isolados de *Trichoderma* (16) foram transferidos para Erlenmeyers contendo 50 mL de meio líquido BD (Batata Dextrose) previamente autoclavado por 20 minutos a 1 atm de pressão.

Os Erlenmeyers foram colocados em agitador orbital por 12 dias à 160 rpm, em temperatura ambiente. Após o período de agitação cada suspensão foi filtrada em gaze esterilizada e depois em membrana de acetato celulose de 0,22 µm de abertura. Os filtrados foram acondicionados em tubos Falcon esterilizados e guardados em geladeira por um dia.

O ensaio foi conduzido utilizando dois tipos de tratamento controle: C1 – Ovos imersos em H₂O e C2 – Ovos imersos em meio BD. Em placa de cultura celular de 24 poços (Falcon) foram colocados 50 µL de suspensão contendo ± 100 ovos de *M. javanica* e 1 mL dos filtrados dos fungos separadamente, 6 repetições para cada tratamento.

As placas foram incubadas em BOD a 25 °C por 14 dias. Após esse período foi avaliado o número de J2 eclodidos dos ovos.

4.4.3 Metabólitos voláteis

4.4.3.1 Ensaio de efeito de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. sobre a eclosão de juvenis de segundo estágio de *M. incognita*

Os isolados foram cultivados em placa de Petri contendo meio de cultura BDA, por sete dias à 25 °C. Após esse período, um disco de 5 mm de cada isolado foi retirado das bordas das culturas e colocados em placas de Petri de 7 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA. Essas placas foram alocadas dentro de placas de Petri de 14 cm de diâmetro. Em volta da placa contendo o plug com o fungo foram depositados nove discos de ágar-água. Sobre esses discos foram colocados 150 µL de uma suspensão de ovos de *M. incognita* contendo aproximadamente 500 ovos (Figura 3). As placas maiores foram vedadas com parafilm® e plástico filme, e

incubadas em BOD por 7 dias a 25 °C. A avaliação foi feita pela contagem de juvenis eclodidos após esse período.

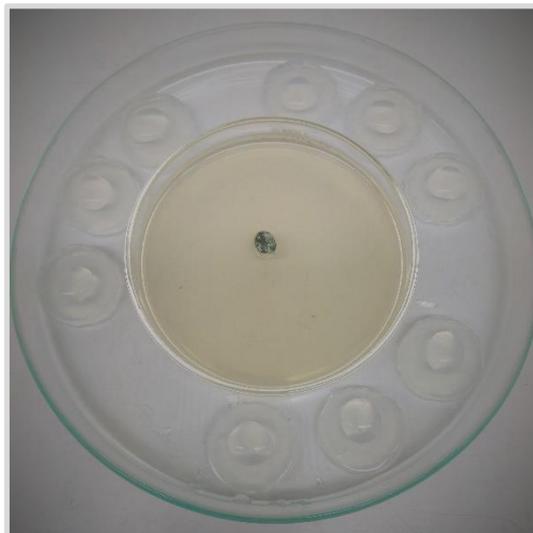


Figura 3. Aspecto do microecossistema criado para avaliação dos efeitos de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. sobre a eclosão de J2 de *Meloidogyne javanica*. (Fonte: A autora)

4.4.4 Atividade de quitinase

4.4.4.1 Ensaio de avaliação do potencial quitinolítico in vitro dos isolados de Trichoderma em meio sólido - Método do carimbo

Suspensões de conídios de 16 isolados de *Trichoderma* spp. foram feitas conforme citado no item 4.3 e transferidas para placas de acrílico de 96 poços (Placa de Elisa) estéreis. Com auxílio de uma ferramenta similar a um “carimbo” com pontas de metal, os conídios presentes nas suspensões foram transferidos para placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo meio de cultivo Extrato de Levedura e Ágar, suplementado à 1% de quitina coloidal, com e sem Triton X-100. Foram realizadas 3 repetições para cada tratamento. As placas foram incubadas a 25 °C, durante 15 dias, e foi observado o potencial da linhagem à degradação de quitina.

4.4.4.2 Ensaio de avaliação do potencial quitinolítico in vitro dos isolados de *Trichoderma* em meio sólido colorimétrico

Foram utilizados 16 isolados de *Trichoderma* spp. crescidos em meio BDA, por sete dias. Foi utilizado o meio de cultivo de mínimo acrescido de quitina coloidal, constituído de um meio basal contendo (por litro): 0,3 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 3,0 g de $(NH_4)_2SO_4$; 2,0 g de KH_2PO_4 ; 1,0 g de ácido cítrico monohidratado; 15 g de agar; 200 μ l de Tween 80; 4,5 g de quitina coloidal e 0,15 g púrpura de bromocresol. Em seguida, o pH foi ajustado para 4,7 e o meio foi autoclavado a 121°C (1 atm) durante 20 minutos (AGRAWAL E KOTASTHANE, 2012). O meio em estado líquido foi vertido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Após a solidificação, foram transferidos discos de BDA de 9 mm de diâmetro, contendo estruturas propagativas dos isolados de *Trichoderma*, para o centro das placas. Posteriormente, as placas foram incubadas em BOD, a 25 °C. A análise qualitativa foi realizada pela observação da formação ou não, de halos de cor violeta, nos períodos de 48, 72 e 168 h após a inoculação dos fungos.

4.4.4.3 Ensaio de quantificação de atividade enzimática de quitinase dos isolados de *Trichoderma* spp.

Neste ensaio foram utilizados 16 isolados de *Trichoderma*, crescidos conforme citado no item 4.5.4.2. Após o crescimento os fungos foram colocados em meio líquido conforme metodologia descrita por Agrawal; Kotasthane (2012). O meio de cultura foi preparado e o pH foi ajustado para 4,7 e então distribuídos 80 mL em Erlenmeyers com capacidade de 125 mL. Os frascos contendo o meio de cultivo foram fechados com tampão de algodão e gaze e autoclavados a 121 °C por 20 minutos a 1 atm de pressão. Após o resfriamento do meio, inoculou-se em cada frasco um disco de 0,5 cm de diâmetro contendo estruturas propagativas dos isolados de *Trichoderma* individualmente. Os frascos foram acondicionados em agitador orbital e permaneceram sob agitação a 150 rpm por 6 dias.

Após o intervalo de crescimento os extratos enzimáticos foram obtidos por filtração em duplo tecido perflex autoclavado, membrana de 0,45 μ m com auxílio de bomba de vácuo e membrana de 0,22 μ m de diâmetro e congelados até o momento da quantificação.

Para quantificar a atividade enzimática foi realizado o método descrito Agrawal & Kotasthane (2012) adaptado, no qual a atividade de quitinase é calculada por meio da medição

da liberação de N-acetil-D-glucosamina (NAGA) a partir da quitina coloidal. A curva padrão para NAGA foi feita usando uma curva de 0.062 mg até 4 mg (Figura 4).



Figura 4. Placa de 96 poços contendo as diluições da curva padrão de N-acetilglicosidase utilizada para quantificação de quitinase produzida por isolados de *Trichoderma* spp. (Fonte: A autora)

Uma mistura de reação contendo 50 μL de extrato enzimático e 50 μL de quitina coloidal ($0,45 \text{ g L}^{-1}$) e 50 μL de tampão de acetato de sódio (50 mM) pH 5 foi incubada em termociclador por 1 h a 50°C .

Após o tempo de incubação, a mistura foi centrifugada a 13000 rpm por 5 min. E uma alíquota de 100 μL do sobrenadante foi retirada e transferida para outra placa de 96 poços juntamente com 70 μL de solução de DNS (ácido dinitrosalicílico). A placa foi aquecida a 95°C por 10 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 520 nm. Quatro réplicas para cada isolado foram usadas. A curva de calibração com NAGA foi usada como um padrão para determinar a redução da concentração de sacarídeo. A atividade quitinolítica foi estimada em termos da concentração (mg/ml) de NAGA liberado.

4.4.4.4 Ensaio de quantificação de quitinase – quitina azure

Neste ensaio além dos 16 isolados de *Trichoderma* spp. citados anteriormente, foram utilizados dois isolados provenientes da coleção da Embrapa Meio Ambiente, selecionados por serem produtores eficientes da enzima quitinase (CMMA1169 e CMMA1170).

Frascos individuais de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio sintético mínimo (MSM) (TWEDDELL *et al.*, 1994) suplementado com quitina coloidal (10 g por L⁻¹) foram inoculados com 1 mL de suspensão de cada isolado (um isolado por frasco) e incubado em agitador orbital (Modelo 4530 - Forma Scientific) a 200 rpm por 5 dias a 28 ± 2 °C.

Após a incubação, as suspensões de cada frasco foram centrifugadas por 30 min a 2000 g. O sobrenadante foi filtrado em membranas Milipore estéreis de 0,22 µm de abertura e coletados em tubos estéreis. Os filtrados obtidos foram congelados até o momento do estabelecimento do ensaio.

A atividade da quitinase foi determinada seguindo o método descrito por Ramírez *et al.* (2004) pela quantificação espectrofotométrica do remazol violeta brilhante liberado da quitina azure (SIGMA), usada como substrato. A mistura de reação continha: 100 µL de extrato enzimático (filtrado fúngico), 100 µL de tampão fosfato de sódio (pH 7,0) e 0,5 mg de quitina azure (Figura 5), que foram incubados à 50 °C em termociclador por 3 horas. Os tubos foram centrifugados e a leitura de absorbância foi realizada no comprimento de onda de 560nm em espectrofotômetro.

O resultado foi expresso em unidade enzimática, sendo uma unidade de quitinase (unidade enzimática) equivalente a 0,01 de aumento de absorbância, quando comparado ao controle.

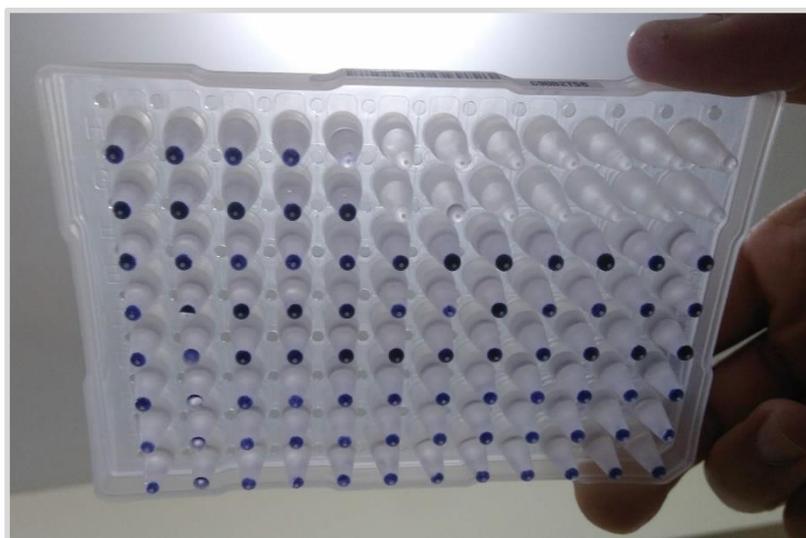


Figura 5. Placa de 96 poços contendo as reações de quitina azure para quantificação de produção de quitinase de isolados de *Trichoderma* spp. (Fonte: A autora)

4.5 Ensaio *in vivo*

4.5.1 Promoção de crescimento

4.5.1.1 Ensaio de promoção de crescimento de cana-de-açúcar

Mudas pré brotadas com ± 90 dias de idade foram plantadas em vasos com capacidade para 5 L, contendo 3 L de substrato comercial Bioplant Prata. Foram inoculados 20 mL de suspensões de conídios dos isolados de *Trichoderma* spp. ($1,5 \times 10^7$) diretamente nas raízes das mudas, que foram imediatamente cobertas com substrato. As plantas foram mantidas em casa de vegetação por 60 dias e irrigadas por 5 minutos 2 vezes ao dia. O delineamento experimental foi totalmente casualizado, com quinze tratamentos, 8 repetições cada (Figura 6). Após 60 dias da aplicação dos isolados de *Trichoderma* spp., foram avaliadas as seguintes variáveis:

- 1- Massa seca da parte aérea de cada uma das plantas;
- 2- Altura das plantas: medida feita com auxílio de uma régua graduada, do colo da planta até a inserção da folha +1;
- 3- Número de folhas no ramo principal;
- 4- Número de perfilhos;
- 5- Número de folhas nos perfilhos.

Foram estabelecidos três experimentos. O primeiro no Capsa – Campinas/SP e os demais na casa de vegetação da ULRBMA em São Paulo/SP.



Figura 6. Vasos com mudas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000 inoculadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp. no primeiro ensaio de promoção de crescimento em Campinas. (Fonte: A autora)

4.5.2 Colonização radicular

4.5.2.1 Avaliação da colonização radicular

Para avaliar a capacidade de sobrevivência e colonização de raízes de cana-de-açúcar dos isolados de *Trichoderma* spp., ao final dos ensaios de promoção de crescimento foram coletadas amostras das raízes das plantas. Em seguida, fragmentos das raízes foram aleatoriamente retirados, lavados em água corrente e plaqueados em meio BDA contendo antibióticos (ampicilina [400mg/L] e pentabiótico [500mg/L]) e Triton-X100 (25g/L). Foram realizadas três repetições para cada isolado de *Trichoderma* spp. e tratamento controle, onde cada placa foi considerada uma unidade experimental. Após três a quatro dias de incubação das placas em BOD a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 h, foi constatado visualmente a presença ou não de *Trichoderma* ao longo de cada fragmento radicular.

4.5.2.2 Isolado IB 49/15 na colonização de raízes de cana-de-açúcar

O ensaio foi realizado com o intuito de verificar com quantos dias o isolado de *Trichoderma* IB 49/15 pode colonizar as raízes de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000.

Mudas pré-brotadas foram mergulhadas em uma suspensão de conídios ($2,0 \times 10^7$ conídios por mL) em constante agitação durante 20 segundos (Figura 7) e imediatamente plantadas em vasos plásticos com capacidade para 2 L, contendo solo autoclavado. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, com irrigação por microaspersão 2 vezes ao dia. As avaliações foram feitas com 1, 3, 5, 7, 9 e 11 dias após o plantio. Foram feitas três repetições para cada dia de avaliação. Após a coleta das plantas, o sistema radicular foi gentilmente lavado em água corrente, a fim de retirar todo o solo da superfície radicular. Após a lavagem, as raízes foram secas com papel absorvente e cortadas em fragmentos de aproximadamente 1,5 cm de comprimento e plaqueadas em meio BDA contendo triton X-100 (0,01%) e antibióticos (ampicilina [400mg] e pentabiótico [500mg/litro]). Um terço das raízes de cada repetição foi submetida a assepsia superficial (1 min em hipoclorito de sódio a 1% e enxágue em água destilada estéril (3x)), para verificar uma possível condição endofítica do isolado. As placas

contendo os fragmentos de raízes foram incubadas em BOD a 25 °C até o crescimento das colônias fúngicas.



Figura 7. Muda pré brotada de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000, mergulhada em suspensão de conídios do isolado de *Trichoderma koningopsis* IB 49/15 para o ensaio de colonização radicular. (Fonte: A autora)

4.5.3 Ensaios de controle biológico

4.5.3.1 Ensaio de avaliação de *Trichoderma* spp. no controle de *M. incognita* em cana-de-açúcar, em casa de vegetação

Neste ensaio foram utilizados cinco isolados de *Trichoderma* spp. (IB 07/01, IB 18/03, IB 19/17, IB 22/08 e IB 38/11) escolhidos por apresentarem bons resultados nos ensaios *in vitro* e promoção de crescimento. Mudanças de cana-de-açúcar foram cultivadas em vasos com capacidade de 5 L, contendo solo autoclavado. O solo foi infestado com nematoides pela deposição de 10.000 ovos, em quatro perfurações de 2 cm de profundidade ao redor de onde foi feito o plantio da cana-de-açúcar. Em seguida os isolados de *Trichoderma* spp. foram inoculados pela aplicação de 20 mL das suspensões de conídios dos isolados na concentração de $1,5 \times 10^7$ conídios por mL próximo as raízes das mudas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação a temperatura ambiente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos, incluindo dois tipos de controle com e sem a presença de

nematoide, oito repetições cada. Após 365 dias da inoculação do nematoide, foram avaliadas as massas das partes aéreas de cada uma das plantas e foi realizada a estimativa populacional de *M. incognita* presentes nas raízes da cana-de-açúcar.

4.5.3.2 Ensaio de avaliação de *Trichoderma* spp. no controle de *M. javanica* em cana-de-açúcar, em casa de vegetação - I

Neste ensaio foram utilizados seis isolados *Trichoderma* spp. (IB 07/01, IB 18/03, IB 28/07, IB 43/14, IB 48/06 e IB 49/15), selecionados por terem apresentado um bom desempenho nos ensaios *in vitro* e de promoção de crescimento. Mudanças de cana-de-açúcar foram cultivadas em vasos com capacidade de 4 L, contendo solo autoclavado. O solo foi infestado com nematoides pela deposição de 5.000 ovos, ao redor das raízes da planta. A aplicação dos isolados de *Trichoderma* spp. foi realizada por pipetagem de 10 mL das suspensões de conídios dos isolados na concentração de $1,5 \times 10^7$ conídios por mL próximo as raízes das mudas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação a temperatura ambiente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos, incluindo dois tipos de controle com e sem a presença de nematoide, sete repetições cada. Após 60 dias da inoculação do nematoide, foram avaliadas as massas das partes aéreas e raízes de cada uma das plantas, contagem do número de folhas, número de perfilhos e foi realizada a estimativa populacional de *M. javanica* presentes nas raízes da cana-de-açúcar.

4.5.3.3 Ensaio de avaliação de *Trichoderma* spp. no controle de *M. javanica* em cana-de-açúcar, em casa de vegetação - II

Foram utilizados os mesmos isolados do ensaio anterior e o modo de plantio das MPBs foi realizado da mesma forma. Os isolados de *Trichoderma* foram inoculados quatro dias antes dos nematoides. As mudas foram mergulhadas nas suspensões de conídios ($2,0 \times 10^7$ conídios/mL) separadamente, durante dez segundos e imediatamente plantadas nos vasos contendo o solo autoclavado. O solo foi infestado com nematoides pela deposição de 3.000 ovos, ao redor das raízes da planta de cana-de-açúcar. As plantas foram mantidas em casa de vegetação a temperatura ambiente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com nove tratamentos, incluindo dois tipos de controle com e sem a presença de nematoide e um controle químico (Carbofuran 350 SC). Para cada tratamento foram feitas sete repetições.

Após 180 dias da inoculação do nematoide, foram avaliadas as massas das partes aéreas e raízes de cada uma das plantas e foi realizada a estimativa populacional de *M. javanica* presentes nas raízes da cana-de-açúcar.

4.5.3.4 Ensaio de avaliação de *Trichoderma* spp. no controle de *M. javanica* em cana-de-açúcar, em casa de vegetação - III

A metodologia foi a mesma descrita para o segundo ensaio de controle biológico de *M. javanica*, exceto pelo tratamento químico que não foi utilizado no presente ensaio, e pelo substrato de plantio, que foi utilizado Bioplant Prata ao invés de solo com areia.

4.5.3.5 Ensaio de avaliação de *Trichoderma* spp. no controle de *M. javanica* em tomateiro, em casa de vegetação

Neste ensaio foram utilizados seis isolados *Trichoderma* spp. (IB 07/01, IB 18/03, IB 28/07, IB 43/14, IB 48/06 e IB 49/15), selecionados por terem um bom desempenho nos ensaios *in vitro* e de promoção de crescimento. Mudanças de tomate 'Rutgers', foram cultivadas em vasos com capacidade de 800 mL, contendo solo autoclavado. O solo foi inoculado próximo as raízes das plantas com 7 mL de suspensão de conídios de cada isolado de *Trichoderma* spp. na concentração de $2,0 \times 10^7$ conídios por mL. Após quatro dias, foi realizada a infestação do solo dos vasos com os nematoides, pela deposição de 2.000 ovos e J2, ao redor das raízes da planta de cana-de-açúcar. As plantas foram mantidas em casa de vegetação a temperatura ambiente.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com nove tratamentos, incluindo três tipos de controle: com e sem a presença de nematoide e um controle químico (Carbofuran 350 SC), quatro repetições cada (Figura 8). Após 90 dias da inoculação do nematoide, foram avaliadas as massas das partes aéreas e raízes de cada uma das plantas, índice de massa de ovos, índice de galhas e realizada a estimativa populacional de *M. javanica* presentes nas raízes dos tomates.



Figura 8. Mudas de tomates ‘Rutgers’ inoculadas com *Meloidogyne javanica* tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp. para o ensaio de controle biológico. (Fonte: A autora)

4.5.3.6 Avaliação da viabilidade de inóculo de *M. javanica* proveniente de raízes de cana-de-açúcar tratadas ou não com *Trichoderma* spp.

Para esta avaliação foram utilizadas mudas de tomate ‘Rutgers’, plantadas em vasos de 800 mL contendo substrato comercial autoclavado. Foram feitas três repetições para cada tratamento. Foram inoculados 1200 nematoides (ovos + juvenis) de *M. javanica* que foram extraídos das raízes de cana-de-açúcar tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* do terceiro ensaio de controle biológico. As plantas permaneceram em casa de vegetação por 67 dias em temperatura ambiente e foram irrigadas 2 vezes ao dia. Para avaliar o ensaio foi realizada a estimativa populacional de *M. javanica* presentes nas raízes dos tomates e aferição de massa de matéria seca da parte aérea e massa de matéria fresca de raízes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaios *in vitro*

5.1.1 Parasitismo de ovos de *Meloidogyne* spp.

5.1.1.1 1º Ensaio de avaliação do parasitismo de ovos de *M. incognita* por *Trichoderma* spp. *in vitro* – Método da microgota

Neste ensaio foi utilizado o método da microgota, que consistiu em depositar os ovos do nematoide por pipetagem de microgotas da suspensão diretamente sobre o meio de cultura em torno do disco de micélio de cada fungo. Deve-se ressaltar que esse método se mostrou menos efetivo do que os outros, pois a após a absorção da água da suspensão pelo meio de cultivo, os ovos ficaram muito dispersos pela placa, aumentando o tempo gasto no processo de avaliação, pois foi necessário procurar os ovos para realizar a contagem. A porcentagem de parasitismo de ovos de *M. incognita* variou conforme as espécies e os isolados de *Trichoderma*. Neste experimento oito isolados (IB 07/01, IB 15/06, IB 18/03, IB 30/07, IB 37/01, IB 38/11, IB 43/14 e IB 49/15) se destacaram diferindo estatisticamente do tratamento controle. O isolado IB 43/14 (*T. asperelloides*) parasitou 39% dos ovos do nematoide, representando neste ensaio a maior porcentagem de parasitismo. Para os demais isolados a porcentagem de parasitismo variou entre 13 e 27%, conforme dados exibidos na Figura 9.

Na Figura 10 podem ser observadas hifas do antagonista enovelando os ovos do parasito, característica típica do parasitismo promovido por fungos do gênero *Trichoderma*.

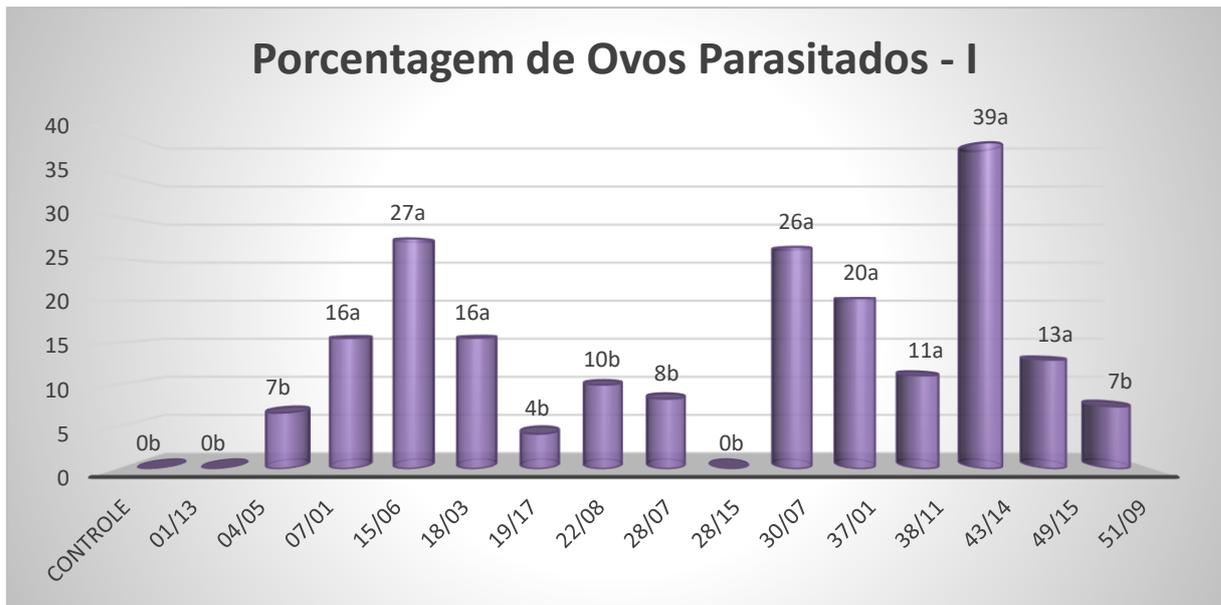


Figura 9. Porcentagem de ovos de *Meloidogyne incognita* parasitados por isolados de *Trichoderma* spp. no primeiro ensaio.

Os dados originais foram apresentados. Para análise estatística os dados foram transformados em $\arcsin \sqrt{x/100}$. Letras iguais não distinguem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



Figura 10. Ovos de *Meloidogyne incognita* parasitados pelo isolado de *Trichoderma* IB 43/14. (Fonte: A autora)

5.1.1.2 2° Ensaio de avaliação do parasitismo de ovos de *M. incognita* por *Trichoderma* spp. *in vitro* - Método da lâmina

Os resultados demonstram diferença significativa entre os tratamentos, sendo que dos 16 isolados avaliados, 11 foram capazes de parasitar os ovos do nematoide. As porcentagens de parasitismo de ovos variaram entre 35% (IB 28/15 – *T. endophyticum*) e 94% (IB 18/03 – *T. koningiopsis*) conforme os dados apresentados na Figura 11. Os isolados que mais se destacaram com taxa de parasitismo acima de 50% foram: IB 18/03, IB 43/14, IB 48/06, IB 51/09 e IB 49/15, com 94, 69, 63, 58 e 56% de parasitismo, respectivamente.

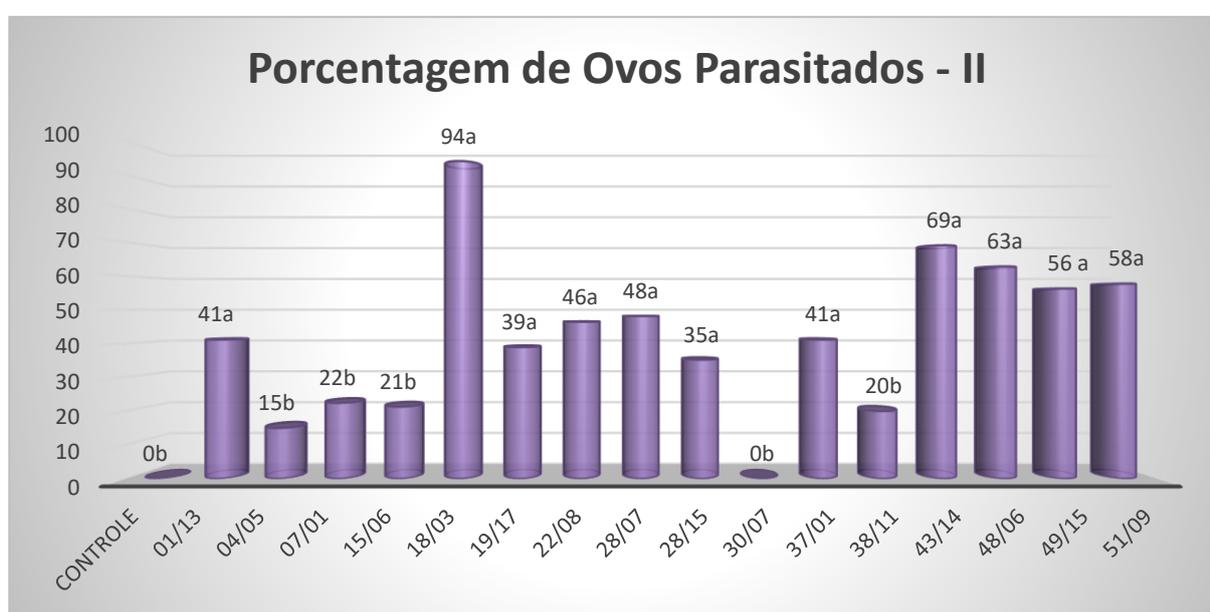


Figura 11. Porcentagem de ovos de *Meloidogyne incognita* parasitados por isolados de *Trichoderma* spp. no segundo ensaio.

Os dados originais foram apresentados. Para análise estatística os dados foram transformados em $\arcsin \sqrt{x/100}$. Letras iguais não distinguem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

5.1.1.3 3° Ensaio de avaliação do parasitismo de ovos de *M. incognita* por *Trichoderma* spp. *in vitro* – Método da lâmina

Segundo a análise estatística, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 12). Em oposição aos ensaios realizados anteriormente, neste experimento, os isolados de *Trichoderma* demonstraram baixa eficiência em parasitar os ovos do nematoide. A maior porcentagem foi de 15% pelo isolado IB 37/01 (*T. orientale*), que também apresentou capacidade em parasitar os ovos de *M. incognita* nos dois ensaios prévios.

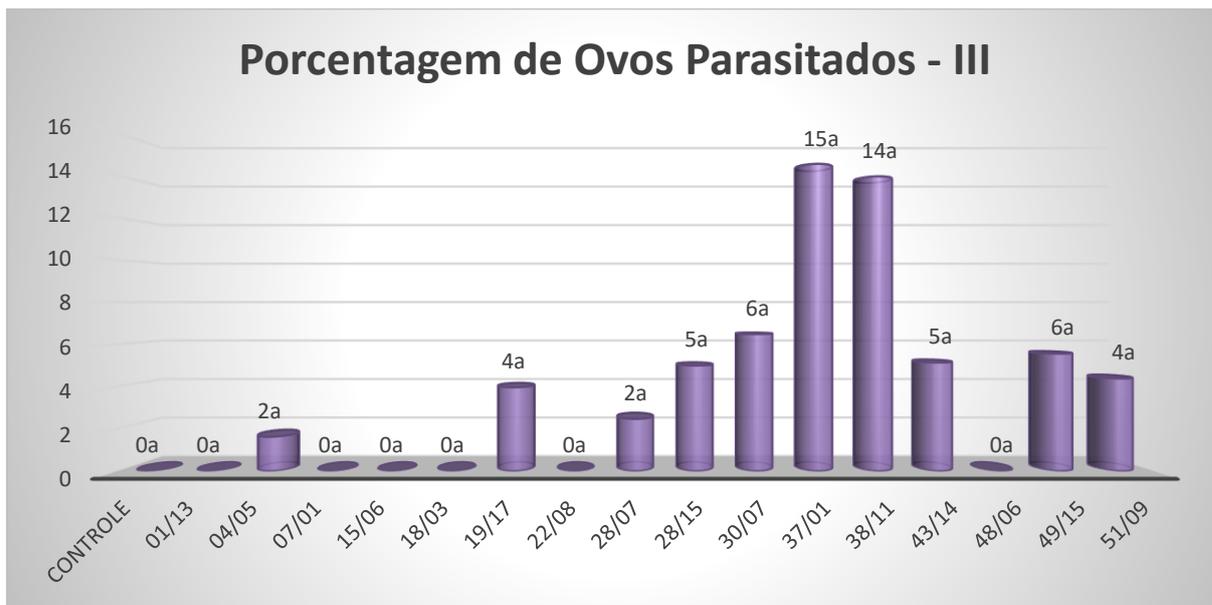


Figura 12. Porcentagem de ovos de *Meloidogyne incognita* parasitados por isolados de *Trichoderma* spp. no terceiro ensaio.

Os dados originais foram apresentados. Para análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{x/100}$. Letras iguais não distinguem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

5.1.1.4 4º Ensaio de avaliação do parasitismo de ovos de *M. incognita* por *Trichoderma* spp. in vitro - Método da lâmina

A porcentagem de parasitismo de ovos variou entre os tratamentos com os diferentes isolados de *Trichoderma*. Na Figura 13, pode ser observado que o isolado que mais parasitou os ovos de *M. incognita* foi o IB 04/05 (*T. asperelloides*) com 40%. Dentre os 16 isolados avaliados, dez diferiram significativamente conforme a análise estatística, demonstrando alguma capacidade de infectar ovos do nematoide de galhas. A porcentagem de ovos parasitados variou entre 11 e 40%.

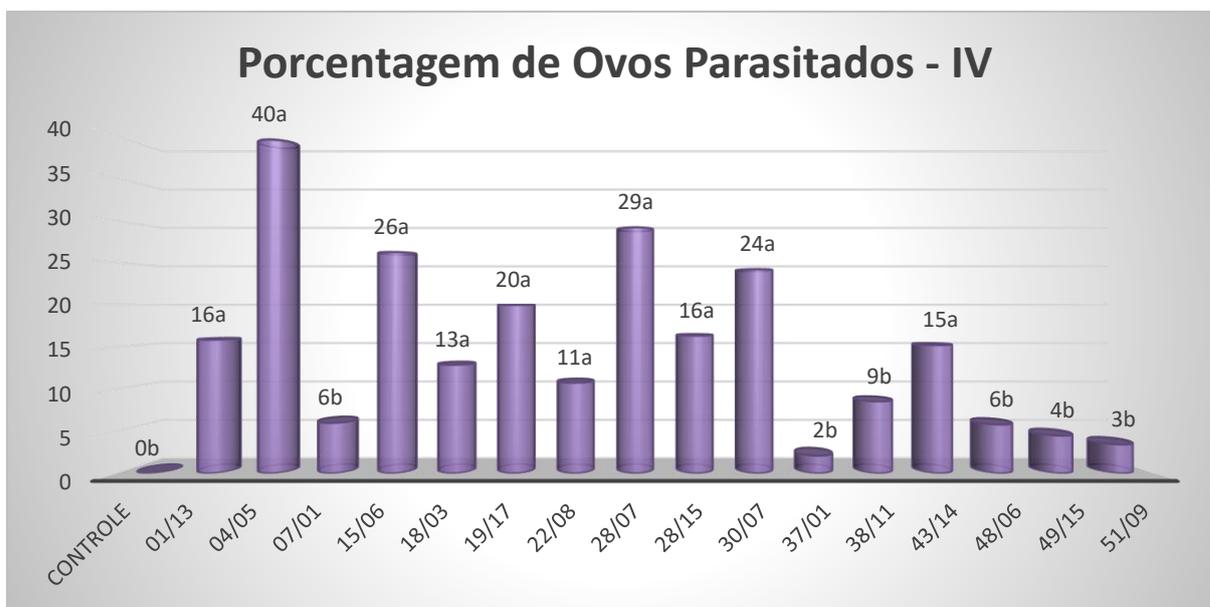


Figura 13. Porcentagem de ovos de *Meloidogyne incognita* parasitados por isolados de *Trichoderma* spp. no quarto ensaio.

Os dados originais foram apresentados. Para análise estatística os dados foram transformados em $\arcsin \sqrt{x/100}$. Letras iguais não distinguem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

5.1.1.5 5° Ensaio de avaliação do parasitismo de ovos de *M. incognita* por *Trichoderma* spp. in vitro - Método da lâmina

Os resultados demonstram diferença significativa entre os tratamentos, sendo que dos 16 isolados avaliados, 13 foram capazes de parasitar os ovos do nematoide. As porcentagens de parasitismo de ovos variaram entre 16% (IB 04/05 – *T. asperelloides*) e 66% (IB 48/06 – *T. asperelloides*) conforme os dados apresentados na Figura 14. Os isolados que mais se destacaram foram: IB 28/07 (*T. strigosum*) e IB 48/06 com 55 e 66% de parasitismo, respectivamente.

Na Figura 15 pode ser observado um ovo de *M. incognita* envelado pelas hifas do isolado de *Trichoderma* IB 18/03.

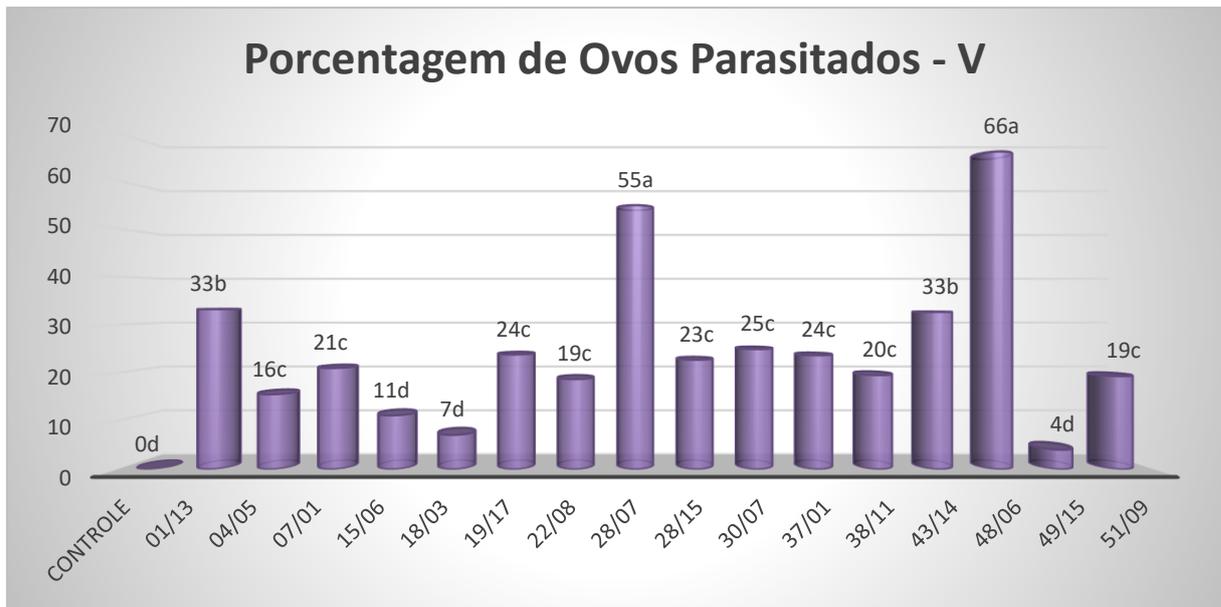


Figura 14. Porcentagem de ovos de *Meloidogyne incognita* parasitados por isolados de *Trichoderma* spp. no quinto ensaio.

Os dados originais foram apresentados. Para análise estatística os dados foram transformados em $\arcsin \sqrt{x/100}$. Letras iguais não distinguem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

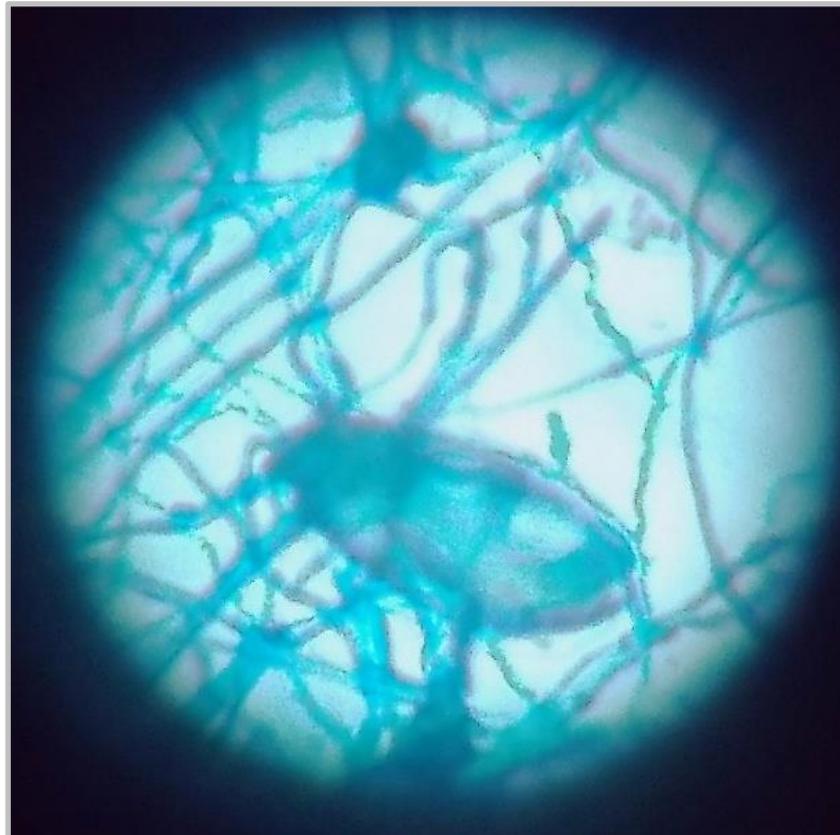


Figura 15. Ovo de *Meloidogyne incognita* enovelado pelas hifas do isolado de *Trichoderma* IB 43/14. (Fonte: A autora)

5.1.1.6 6° Ensaio de avaliação do parasitismo de ovos de *M. incognita* por *Trichoderma* spp. *in vitro* – Método da lâmina

Neste ensaio 13 isolados de *Trichoderma* foram capazes de parasitar os ovos do nematoide *M. incognita*. A taxa de parasitismo variou entre 26 e 49%, conforme dados exibidos na Figura 16. Os isolados que obtiveram os maiores percentuais de parasitismo foram: IB 43/14 (*T. asperelloides*), com 49%, seguido de IB 48/06 (*T. asperelloides*) com 45% e IB 51/09 (*T. lentiforme*) e IB 07/01 (*T. atroviride*), ambos com 44% de ovos parasitados durante o ensaio.

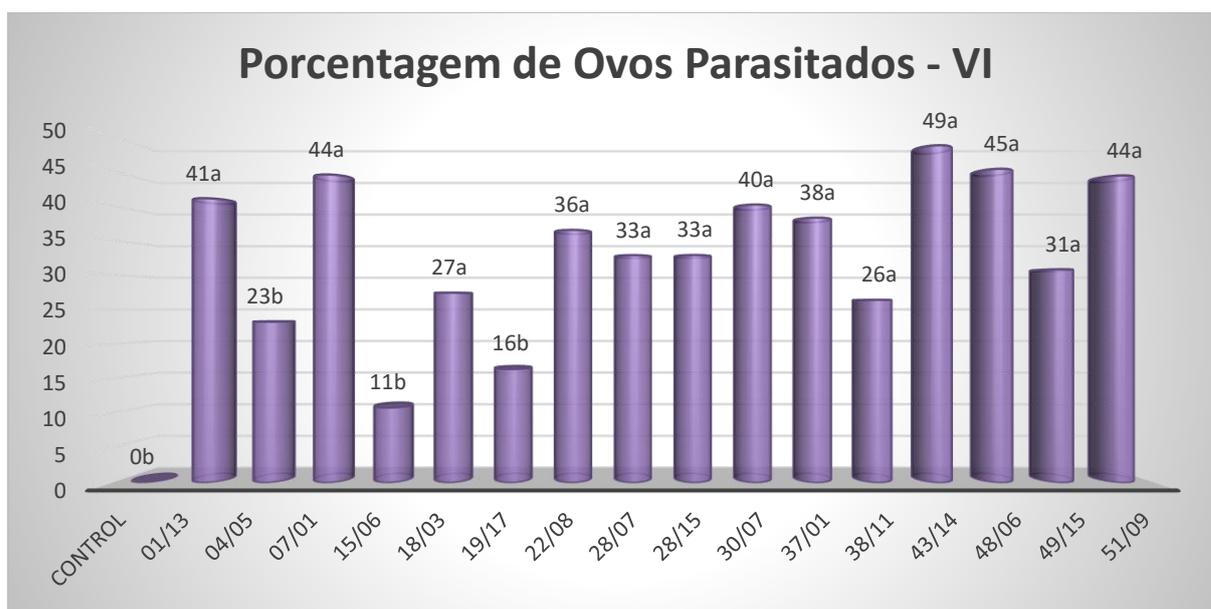


Figura 16. Porcentagem de ovos de *Meloidogyne incognita* parasitados por isolados de *Trichoderma* spp. no sexto ensaio.

Os dados originais foram apresentados. Para análise estatística os dados foram transformados em $\arcsin \sqrt{x/100}$. Letras iguais não distinguem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A Tabela 2 apresenta um agrupamento dos resultados obtidos em todos os ensaios de parasitismo de ovos realizados, onde é possível e observar que nove, dos 16 isolados de *Trichoderma* avaliados, apresentaram taxa de parasitismo em pelo menos quatro dos seis ensaios realizados. As cepas IB 01/13, IB 43/14, IB 48/06 (*T. asperelloides*), IB 37/01 (*T. orientale*), IB 30/07 (*T. lentiforme*), IB 28/15 (*T. endophyticum*), IB 28/07 (*T. strigosum*), IB 22/08 (*T. endophyticum*), IB 19/17 (*T. camerunense*) e IB 18/03 (*T. koningiopsis*), apresentaram resultados significativos em pelo menos 66% dos ensaios concretizados, portanto, associados a outros parâmetros de avaliação, podem ser elegíveis para testes *in vivo* em confronto com o nematoide.

Tabela 2 - Porcentagem de ovos de *Meloidogyne incognita* parasitados por isolados de *Trichoderma* pp. nos seis ensaios realizados.

Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			Ensaio 5			Ensaio 6		
Trat.	%OP	Estat.															
43/14	39	a	18/03	94	a	37/01	15	a	04/05	40	a	48/06	66	a	43/14	49	a
15/06	27	a	43/14	69	a	38/11	14	a	28/07	29	a	28/07	55	a	48/06	45	a
30/07	26	a	48/06	63	a	30/07	6	a	15/06	26	a	01/13	33	b	07/01	44	a
37/01	20	a	51/09	58	a	49/15	6	a	30/07	24	a	43/14	33	b	51/09	44	a
18/03	16	a	49/15	56	a	43/14	5	a	19/17	20	a	30/07	25	c	01/13	41	a
07/01	16	a	28/07	48	a	28/15	5	a	28/15	16	a	19/17	24	c	30/07	40	a
49/15	13	a	22/08	46	a	51/09	4	a	01/13	16	a	37/01	24	c	37/01	38	a
38/11	11	a	01/13	41	a	19/17	4	a	43/14	15	a	28/15	23	c	22/08	36	a
22/08	10	b	37/01	41	a	28/07	2	a	18/03	13	a	07/01	21	c	28/15	33	a
28/07	8	b	19/17	39	a	04/05	2	a	22/08	11	a	38/11	20	c	28/07	33	a
51/09	7	b	28/15	35	a	Controle	0	a	38/11	9	b	51/09	19	c	49/15	31	a
04/05	7	b	07/01	22	b	48/06	0	a	07/01	6	b	22/08	19	c	18/03	27	a
19/17	4	b	15/06	21	b	22/08	0	a	48/06	6	b	04/05	16	c	38/11	26	a
Controle	0	b	38/11	20	b	18/03	0	a	49/15	4	b	15/06	11	d	04/05	23	b
01/13	0	b	04/05	15	b	15/06	0	a	51/09	3	b	18/03	7	d	19/17	16	b
28/15	0	b	Controle	0	b	07/01	0	a	37/01	2	b	49/15	4	d	15/06	11	b
			30/07	0	b	01/13	0	a	Controle	0	b	Controle	0	d	Controle	0	b

Trat. = Tratamentos

%OP = Porcentagem de ovos parasitados

Estat. = Resultado da análise estatística. Os dados originais foram apresentados. Para análise estatística os dados foram transformados em $\arcsin \sqrt{x/100}$. Letras iguais não distinguem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Sabe-se que cepas de *Trichoderma* são capazes de produzir diversas enzimas extracelulares, como glucanases, endoglucanases, proteases e quitinases, que estão associadas aos diversos mecanismos que podem ser utilizados no biocontrole de doenças de plantas (BENÍTEZ *et al.*, 2004; VITERBO *et al.*, 2002).

Dentre todas as enzimas produzidas por isolados de *Trichoderma*, as quitinases desempenham um importante papel no parasitismo de ovos de nematoides (RAJINIKANTH *et al.*, 2016; SHARON *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2017). A casca dos ovos das várias espécies de fitonematoides é composta basicamente pelas mesmas substâncias. Todos os ovos são formados por camadas de vitelina, quitina e lipídeos (BIRD; MCCLURE, 1976), sendo a quitina o componente estrutural mais abundante na casca dos ovos (LI, *et al.*, 2015). A diferença entre os ovos de espécies distintas está na espessura dessas camadas (BIRD; MCCLURE, 1976). Portanto, para que algum organismo seja capaz de penetrar a casca do ovo do fitoparasito, é fundamental a produção de enzimas responsáveis por quebrar essas proteínas, como por exemplo a quitinase.

Alguns estudos descrevem a importante participação das quitinases nos processos de parasitismo de ovos de nematoides. Szabó *et al.* (2012) demonstraram que na espécie *T. harzianum* os níveis de expressão dos genes *chi18-5* (*chit42*) e *chi18-12* (*chit33*), que codificam duas endoquitinases, aumentaram em poucas horas a partir do contato do fungo com os ovos dos nematoides. Assim, o fungo utiliza esse tipo de enzima para romper a casca do ovo do nematoide e completar o parasitismo (RAJINIKANTH *et al.*, 2016).

A porcentagem de parasitismo pode ser altamente variável dependendo da cepa utilizada nos testes. Ferreira *et al.* (2008) observaram taxas de parasitismo de ovos de *M. exigua* entre 33 e 53% quando utilizaram diferentes isolados de *Trichoderma* em teste *in vitro*. Nos estudos conduzidos por Eapen, Beena e Ramana (2005), a porcentagem de parasitismo de ovos de *M. incognita* por *Trichoderma* spp., variou entre 10 e 24%.

Essa variação no potencial de parasitismo é muito natural, pois cada cepa tem uma capacidade de produção enzimática extracelular intrínseca, que é fruto do metabolismo fúngico e que está associada a interferência de fatores externos como pH, temperatura e substrato de crescimento (HERRERA ESTRELLA; CHET, 1998). Sendo assim, a secreção de enzimas extracelulares pode ser considerada um dos determinantes mais significativos da virulência fúngica contra os nematoides (CUMAGUN; MOOSAVI, 2015).

Existem na natureza fungos que possuem ação antagônica contra nematoides em geral, e esses microrganismos são classificados de acordo com o modo de ação sobre os nematoides,

como fungos predadores ou fungos parasitas de ovos, por exemplo. Espécies de *Trichoderma* são usualmente colocados na categoria dos produtores de toxinas microbianas, e esta classificação descreve bem um dos mecanismos de ação desse fungo (TRANIER *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram claramente que alguns isolados deste microrganismo também são capazes de atuar como parasitas de ovos e juvenis de *Meloidogyne*, característica que não é habitualmente atribuída a este gênero fúngico, mas que já foi descrita em alguns trabalhos (FREITAS *et al.*, 2012; UDAY, BHAGAWATI e NEOG, 2019; ZHANG, GAN e XU, 2015), que associaram o controle de nematoides de galha por *Trichoderma* à adesão de conídios, parasitismo de massa de ovos, ovos e predação de juvenis (SHARON *et al.*, 2007).

5.1.2 Filtrados fúngicos

5.1.2.1 1º Ensaio de avaliação *in vitro* da mortalidade de ovos de *M. incognita* por filtrados fúngicos de *Trichoderma* spp.

Na Figura 17 pode-se observar a porcentagem de juvenis de segundo estágio (J2) eclodidos após contato com filtrados dos isolados de *Trichoderma*. Houve diferença estatística entre os tratamentos. A porcentagem de J2 eclodidos foi maior no tratamento C1, onde os ovos não foram esterilizados com antibióticos e foram colocados nos tubos com água estéril. Analisando os resultados obtidos nota-se que nos tratamentos nos quais os ovos foram submetidos à assepsia com antibióticos, houve redução na quantidade de juvenis eclodidos quando comparados com os tratamentos onde os antibióticos não foram empregados. Os tratamentos com os isolados de *Trichoderma* IB 07/10, IB 15/06, IB 22/08, IB 28/07 e IB 28/15 apresentaram maior porcentagem de eclosão de J2, sendo estatisticamente iguais aos dois controles com ausência de antibióticos.

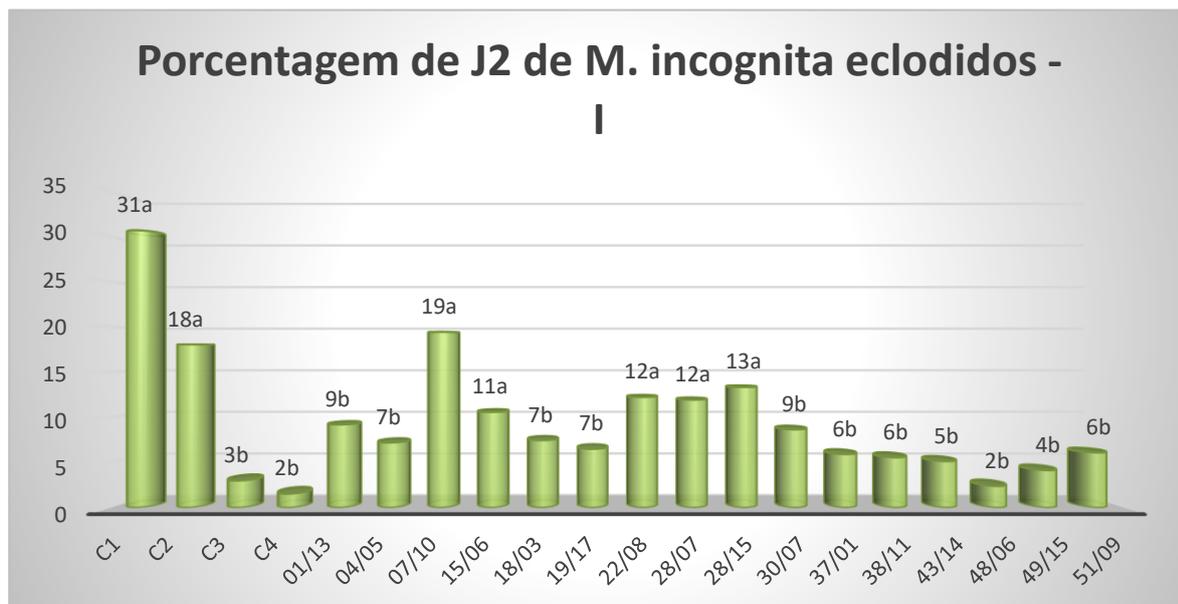


Figura 17. Porcentagem de juvenis de segundo estágio eclodidos no primeiro ensaio de efeitos de filtrados fúngicos de isolados de *Trichoderma* spp. sobre a mortalidade de ovos de *Meloidogyne incognita*. Os dados originais foram apresentados. Para análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{x/100}$. Letras iguais não distinguem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. C1: Ovos não desinfetados com antibiótico e imersos em água; C2: Ovos não desinfetados com antibiótico e imersos em meio Czapek dox; C3: Ovos desinfetados com antibiótico e imersos em água; C4: Ovos desinfetados com antibiótico e imersos em meio Czapek dox.

5.1.2.2 2° Ensaio de avaliação *in vitro* da mortalidade de ovos de *M. incognita* por filtrados fúngicos de *Trichoderma* spp.

Neste ensaio não houve diferença significativa entre os tratamentos. A porcentagem de eclosão de juvenis variou entre 17 e 4% (Figura 18). A taxa de viabilidade dos ovos foi baixa, visto que no tratamento C1, no qual os ovos não foram desinfetados e estavam imersos em água autoclavada, a porcentagem de eclosão foi de 12%.

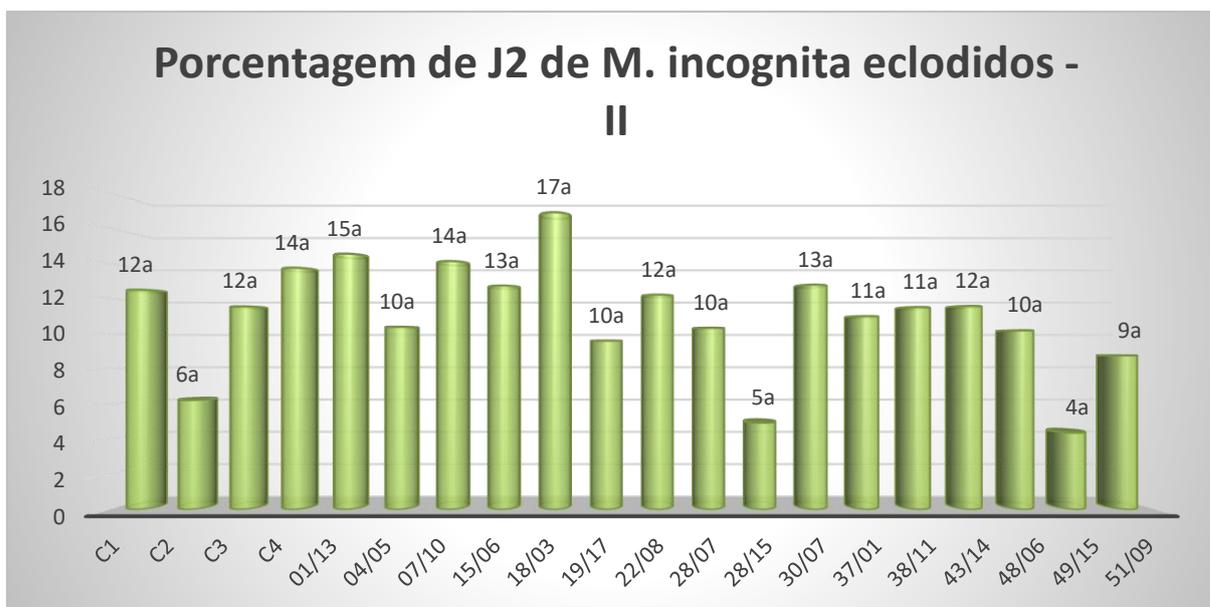


Figura 18. Porcentagem de juvenis de segundo estágio eclodidos no segundo ensaio de efeitos de filtrados fúngicos de isolados de *Trichoderma* spp. sobre a mortalidade de ovos de *Meloidogyne incognita*. Os dados originais foram apresentados. Para análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{x/100}$. Letras iguais não distinguem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. C1: Ovos não desinfetados com antibiótico e imersos em água; C2: Ovos não desinfetados com antibiótico e imersos em meio Czapek dox; C3: Ovos desinfetados com antibiótico e imersos em água; C4: Ovos desinfetados com antibiótico e imersos em meio Czapek dox.

5.1.2.3 3° Ensaio de avaliação *in vitro* da mortalidade de ovos de *M. incognita* por filtrados fúngicos de *Trichoderma* spp.

Em quase todos os tratamentos desse experimento o número de juvenis eclodidos foi menor do que no tratamento C4, que é o controle com condições mais semelhantes aos tratamentos contendo os filtrados, ou seja, os ovos foram banhados em antibióticos e colocados em contato com o meio de cultura Czapek dox. Porém, a análise estatística indica que não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 19), assim como ocorrido no segundo ensaio.

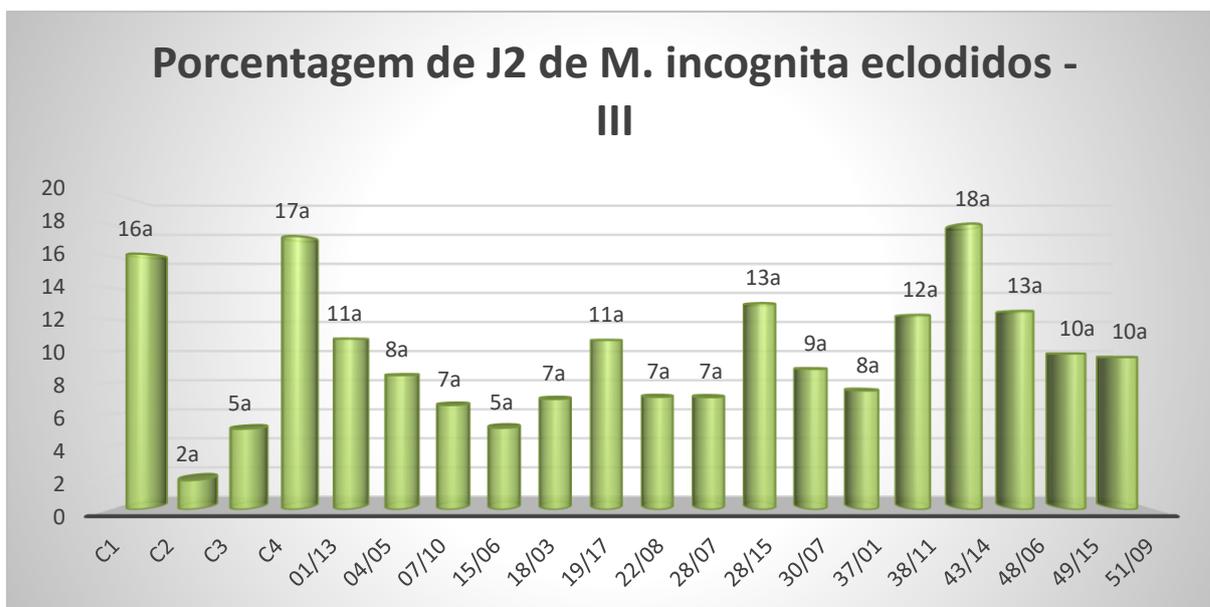


Figura 19. Porcentagem de juvenis de segundo estágio eclodidos no terceiro ensaio de efeitos de filtrados fúngicos de isolados de *Trichoderma* spp. sobre a mortalidade de ovos de *Meloidogyne incognita*. Os dados originais foram apresentados. Para análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{x/100}$. Letras iguais não distinguem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. C1: Ovos não desinfetados com antibiótico e imersos em água; C2: Ovos não desinfetados com antibiótico e imersos em meio Czapek dox; C3: Ovos desinfetados com antibiótico e imersos em água; C4: Ovos desinfetados com antibiótico e imersos em meio Czapek dox.

5.1.2.4 Ensaio de avaliação *in vitro* da mortalidade de ovos de *M. javanica* por filtrados fúngicos de *Trichoderma* spp.

Na Figura 20 consta o percentual de J2 de *M. javanica* eclodidos dos ovos no ensaio com os filtrados fúngicos. Houve diferença significativa entre os tratamentos, embora nenhum isolado tenha reduzido a eclosão dos nematoides quando comparados ao “controle meio”, que é o tratamento que apresenta condições mais próximas aos tratamentos nos quais os ovos tiveram contato com os metabólitos produzidos pelos fungos. A porcentagem de eclosão de J2 variou entre 17 e 2%.

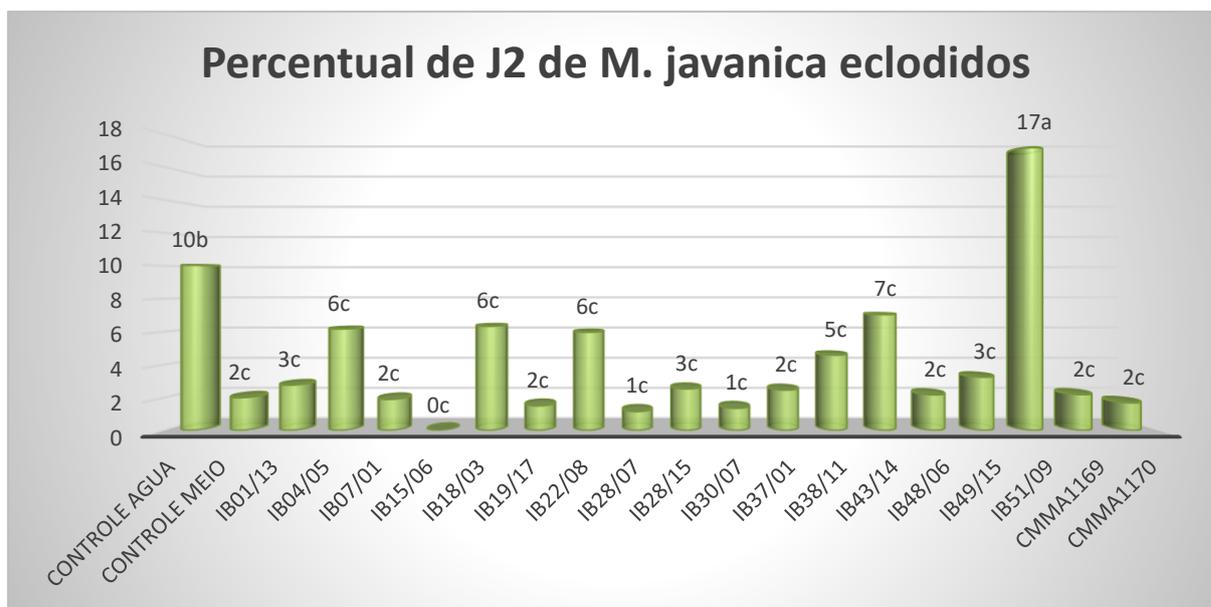


Figura 20. Porcentagem de juvenis de segundo estágio eclodidos no ensaio de efeitos de filtrados fúngicos de isolados de *Trichoderma* spp. sobre a mortalidade de ovos de *Meloidogyne javanica*.

Os dados originais foram apresentados. Para análise estatística os dados foram transformados em $\arcsin \sqrt{x/100}$. Letras iguais não distinguem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Na análise dos resultados, nota-se que a porcentagem de juvenis eclodidos foi baixa, mesmo nos controles onde foi utilizado somente água. Isto pode indicar que os ovos dos nematoides não estavam viáveis. Mas como a porcentagem de eclosão foi baixa em todos os tratamentos, pode-se sugerir que diferentemente do esperado, os isolados de *Trichoderma* não produziram nenhum metabólito secundário com ação tóxica sobre os ovos.

Os metabólitos secundários são compostos naturais que os fungos produzem para auxiliar na sobrevivência e funções básicas, como competição, simbiose, transporte de metais, diferenciação etc. Fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidos por produzirem diversos metabólitos secundários com ação antibiótica. Essa produção depende da cepa e inclui substâncias antifúngicas voláteis e não voláteis (VINALE *et al.*, 2008).

O meio de cultivo no qual o microrganismo cresce pode afetar a produção dos metabólitos secundários (KHAN *et al.*, 2020), que normalmente ocorre durante a fase estacionária, pois os produtos desse metabolismo não são essenciais para o crescimento microbiano (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995). Então, no presente estudo, o tempo de incubação para que os isolados produzissem os metabólitos, pode ter sido insuficiente. Esta hipótese pode ser plausível, pois diversos estudos demonstram que isolados de *Trichoderma* possuem capacidade de produzir compostos tóxicos em meio líquido (SANKARANARAYANAN; HUSSAINI, 1997; SUAREZ *et al.*, 2004).

No trabalho conduzido por Khan *et al.*, (2020), foram testados cinco meios de cultivos diferentes para produção de metabólitos secundários de isolados de *Trichoderma*, no intuito de avaliar o potencial antibacteriano e nematicida contra as bactérias *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas compestris* e o nematoide *M. incognita*. Os autores verificaram que dos dez isolados de *Trichoderma* avaliados, somente os metabólitos secundários de uma cepa de *T. virens* apresentaram forte atividade nematicida, causando a alta taxa de mortalidade de J2 e inibição de eclosão. Esses resultados foram relacionados com o meio de cultivo no qual o isolado cresceu.

O uso de antibióticos é um fator que pode ter causado interferência nos ensaios. Mesmo que não tenha havido diferença estatística em alguns ensaios, nota-se que nos tratamentos onde foi utilizado o antibiótico, a porcentagem de eclosão foi sempre menor do que nos controles sem a presença da substância. Em um estudo realizado por Nitao, Meyer e Chitwood (1999), o uso de antibióticos como penicilina, estreptomicina e neomicina em ensaios com filtrados fúngicos de *Fusarium equiseti*, e o meio líquido BD causou significativa diminuição da eclosão de juvenis de *Heterodera glycines*. Diferentemente da presente pesquisa, estes autores notaram que a eclosão dos juvenis foi prejudicada quando os antibióticos foram acrescentados somente ao tratamento com água e não nos tratamentos com meio BD, embora tenham notado que a eclosão dos juvenis diminuía quando a concentração de meio BD aumentava.

No último ensaio no qual foram utilizados filtrados de *Trichoderma* produzidos em meio BD, observa-se que o isolado IB 51/09 favoreceu a eclosão dos juvenis de *M. javanica*. Este resultado pode estar relacionado a produção de enzimas responsáveis por degradar o rompimento da casca dos ovos de *M. javanica*.

5.1.3 Metabólitos voláteis

5.1.3.1 Efeito de metabólitos voláteis de Trichoderma spp. sobre a eclosão de juvenis de segundo estágio de M. incognita

Já foi demonstrado que espécies de *Trichoderma* produzem compostos orgânicos voláteis que inibem o crescimento de outros fungos (DENNIS; WEBSTER, 1971; SINUCO LEÓN *et al.*, 2017). Este experimento foi realizado a fim de verificar se a produção desses compostos afetaria o desenvolvimento dos juvenis dos nematoides dentro dos ovos e impediria a sua

eclosão. Dessa forma, foi desenvolvida uma metodologia semelhante a que é utilizada em ensaios com outros fungos com adaptações para ser utilizada com suspensões de ovos do fitonematoide.

Os resultados mostram que em dez tratamentos o número de juvenis de *M. incognita* eclodidos após o tempo de exposição foi significativamente reduzido em comparação ao tratamento controle (Figura 21). Como os fungos não entraram em contato direto com os ovos, presume-se que esse efeito seja devido aos compostos orgânicos voláteis (COV) produzidos pelos isolados de *Trichoderma* durante o crescimento no meio de cultura.

Os isolados de *Trichoderma* que mais reduziram a eclosão dos juvenis foram IB 32/03, IB 28/07, IB 18/03 e IB 43/14.

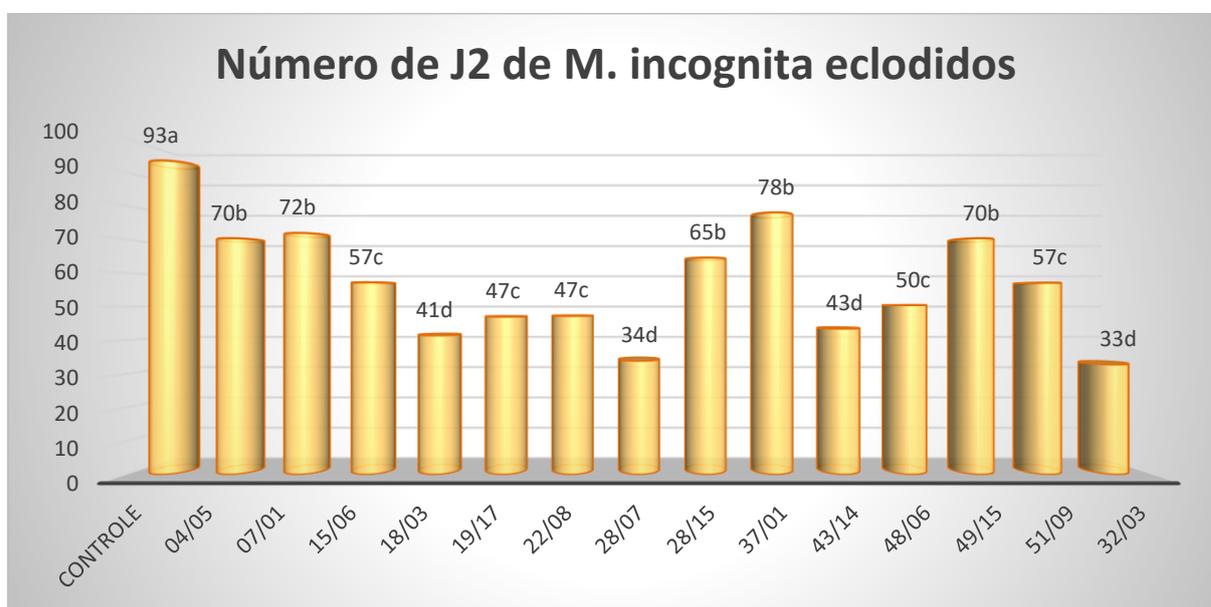


Figura 21. Média do número de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* eclodidos após 7 dias em contato com os metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. em teste *in vitro*. Os dados originais foram apresentados. Letras iguais não distinguem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Durante a avaliação do ensaio foi observada uma variação na sobrevivência dos J2 eclodidos, então foi feita a contagem do número de J2 vivos presentes nos tratamentos. Os resultados apresentados na Figura 22 mostram a mortalidade de J2 decorrente dos COVs produzidos pelos isolados de *Trichoderma*. Em nove tratamentos a taxa de mortalidade dos J2 foi significativamente maior do que o controle, chegando até 100% para os isolados IB 07/01, IB 19/17 e IB 28/07. Em três tratamentos a taxa de mortalidade foi menor do que o no controle.

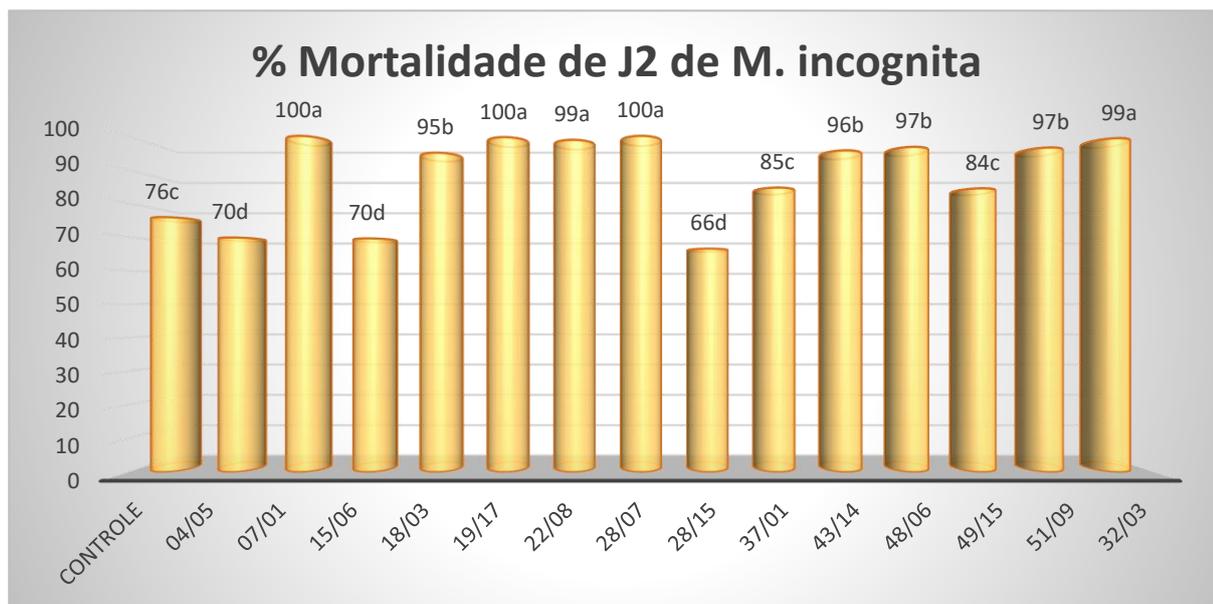


Figura 22. Porcentagem de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* mortos após contato com os metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. em teste *in vitro*.

Os dados originais foram apresentados. Para análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{x/100}$. Letras iguais não distinguem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A técnica utilizada neste estudo para avaliar os efeitos dos COVs sobre os ovos de *M. incognita* mostrou-se muito prática e apropriada, já que o intuito não era isolar e identificar as moléculas. O fato de poder retirar os discos de ágar contendo a suspensão de ovos e levar diretamente para o microscópio facilitou o processo de avaliação do ensaio. Enquanto o uso de ágar-água como substrato para deposição dos ovos supriu a necessidade de hidratação para sobrevivência dos J2 durante o período do ensaio.

Os resultados demonstram alta eficiência dos COVs produzidos pelos isolados de *Trichoderma* na mortalidade de J2 e na redução da eclosão.

Há relatos de mais de 479 COVs liberados por fungos do gênero *Trichoderma* (SIDDIQUEE, 2014) e estas moléculas estão envolvidas em diversas funções importantes como atividades antifúngicas (LÓPEZ *et al.*, 2019; WONGLOM; ITO; SUNPAPAO, 2020), indução de resistência em plantas (KOTTB *et al.*, 2015) e promoção de crescimento de plantas (HUNG; LEE; BENNETT, 2013; LEE *et al.*, 2019).

Pimenta *et al.*, (2017) testaram COVs de diferentes fungos associados a madeira contra *M. incognita* e os resultados foram de 38% de mortalidade de J2 após 24h de exposição, e até 100% de imobilidade dos juvenis no mesmo período. Foi observado que o número de ovos produzidos por J2 expostos aos COVs de *Epicoccum nigrum* e *Schizophyllum commune* foi

significativamente menor do que na testemunha, sugerindo que os voláteis podem ter afetado a infectividade e reprodução do nematoide. Os autores analisaram os compostos produzidos pelos fungos e verificaram que álcoois, ésteres, terpenos e cetonas estavam entre os COVs liberados pelos microrganismos.

Em trabalho realizado por Freire *et al.*, (2012), os COVs de diferentes fungos extraídos de rizosfera de cafeeiro foram testados contra *M. incognita in vitro*. Os autores verificaram que os COVs produzidos por isolados de *Fusarium oxysporum* causaram alta imobilidade e mortalidade de J2, enquanto o isolado *Trichoderma* não afetou as larvas, diferentemente dos resultados obtidos na presente pesquisa. Além disso, os autores observaram redução da capacidade infectiva de J2 de *M. exigua* quando expostos aos COVs de *Fusarium* e inoculados em tomateiro.

Uma pesquisa realizada com um COV purificado (ácido acético) extraído de *Purpureocillium lilacinum* (= *Paecilomyces lilacinus*) e *Trichoderma longibrachiatum* foi testado para controle de diversos fitonematoides e parasitos de animais. Os resultados demonstraram alta eficiência na inibição dos movimentos dos J2 e morte após 72h de contato somente dos nematoides fitoparasitos de raízes. Os autores também observaram que a atividade nematicida da molécula só era eficiente quando o pH do meio estava abaixo de 5, sugerindo que para o ácido acético ter função nematostática e nematicida são necessárias algumas condições específicas independente de ser proveniente de microrganismos ou o produto comercial (DJAIN *et al.*, 1991).

Dentre todos os COVs produzidos por *Trichoderma* spp. estão os compostos 6-n-pentil-6H-piran-2-ona (6PP) (HIDANGMAYUM; DWIVEDI; PADMANABH DWIVEDI, 2018), 1 β -vinylcyclopentano-1 α ,3 α -diol 4-(2-hydroxyethyl) fenol, que demonstraram ter capacidades nematicidas e nematostáticas contra os nematoides *Panagrellus redivivus*, *Caenorhabditis elegans*, e *Bursaphelenchus xylophilus* com até 72.82, 53.0 e 41.53% de mortalidade, respectivamente, após 72 h de contato com os voláteis (YANG *et al.*, 2012).

A lista de pesquisas realizadas sobre os efeitos dos COVs liberados por *Trichoderma* ssp. é extensa (CONTRERAS-CORNEJO *et al.*, 2018; GUO *et al.*, 2019; LI; ISLAM; KANG, 2019; LOPES *et al.*, 2012; MALMIERCA *et al.*, 2014; MARTÍNEZ-MEDINA *et al.*, 2017; NIETO-JACOBO *et al.*, 2017; OJAGHIAN, 2011; SINUCO LEÓN *et al.*, 2017; SUNPAPAO; CHAIRIN; ITO, 2018), no entanto, poucos foram os trabalhos dedicados a avaliação das atividades nematicidas e nematostáticas dessas moléculas.

As pesquisas com os voláteis produzidos por *Trichoderma* e os efeitos que podem causar aos nematoides é de extrema importância, pois podem apresentar potencial para o desenvolvimento de modelos estruturais de novas moléculas para futuros fumigantes e nematicidas comerciais com menor toxicidade ao ser humano (TERRA *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2012).

5.1.4 Atividade de quitinase

5.1.4.1 1ª Ensaio de avaliação do potencial quitinolítico *in vitro* dos isolados de *Trichoderma* em meio sólido – Método do carimbo

Nesse ensaio foi empregada uma metodologia que é comumente utilizada em ensaios com bactérias. Como se trata de um método muito prático foi realizada a tentativa de adaptá-lo para aplicação com fungos do gênero *Trichoderma*. No entanto, o método não foi adequado para avaliar a capacidade dos isolados de *Trichoderma* em degradar quitina. O rápido crescimento das colônias de *Trichoderma* e a transparência do meio de cultura impediram qualquer visualização de possíveis halos de degradação do substrato (Figura 23). Como o meio é translúcido e os isolados cresceram muito rápido, mesmo nas placas que continham redutor de colônia, não foi possível visualizar os halos de degradação, que se formam de maneira bem suave sobre o meio de cultivo.

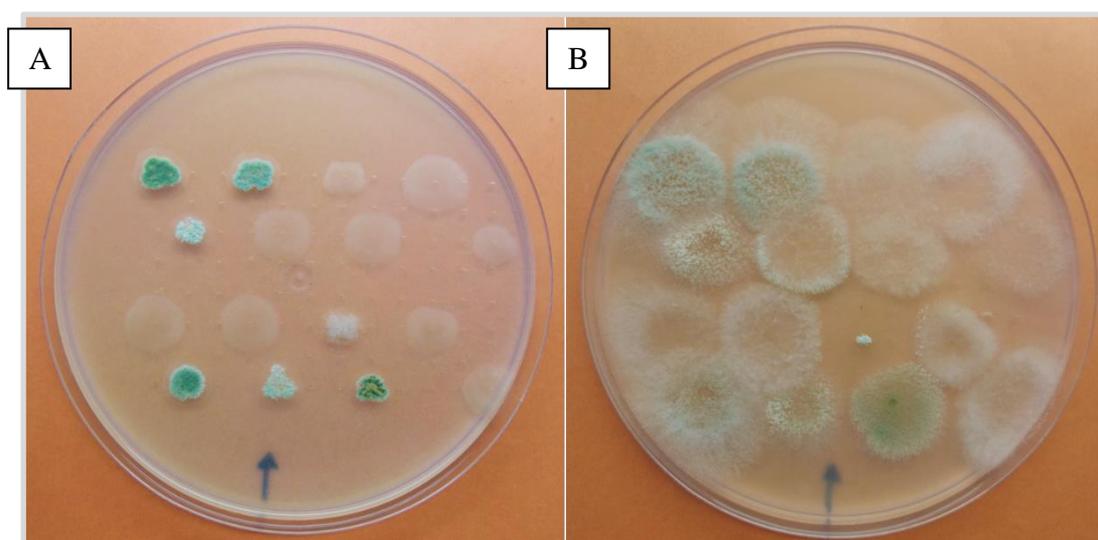


Figura 23. Aspecto das placas contendo meio de cultura acrescido de quitina coloidal com (A) e sem (B) adição de Triton X-100, inoculadas com *Trichoderma* spp. após 48 h. (Fonte: A autora)

5.1.4.2 2ª Ensaio de avaliação do potencial quitinolítico *in vitro* dos isolados de *Trichoderma* em meio sólido colorimétrico

Os resultados desse ensaio podem ser observados na Figura 24, onde nota-se que todos os isolados de *Trichoderma* com exceção de um (IB 37/01), começaram a degradar a quitina presente no meio de cultura 48 h após a inoculação.

Após 168 h quase todas as placas estavam totalmente de cor violeta, indicando conforme o método empregado, que os isolados estavam produzindo a enzima quitinase, necessária para parasitar ovos e juvenis de nematoides (Figura 25).

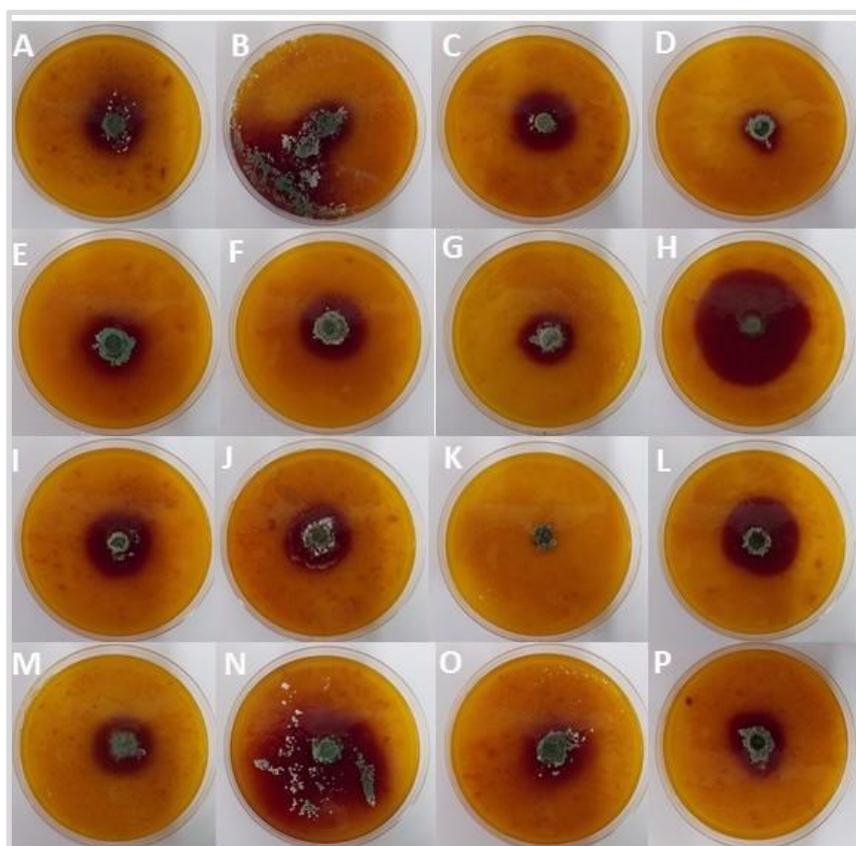


Figura 24. Isolados de *Trichoderma* spp. inoculados em meio basal acrescido de quitina coloidal apresentando halos de degradação (violeta) após 48 h de incubação em B.O.D.

A (IB 01/13), B (IB 04/05), C (IB 07/01), D (IB 15/06), E (IB 18/03), F (IB 19/17), G (IB 22/08), H (IB 28/07), I (IB 28/15), J (IB 30/07), K (IB 37/01), L (IB 38/11), M (IB 43/14), N (IB 48/06), O (IB 49/15) e P (IB 51/09). (Fonte: A autora)

Nos ensaios anteriores os isolados de *Trichoderma* apresentaram potencial de parasitismo de ovos e juvenis de *Meloidogyne* spp. Sabe-se que a enzima quitinase tem importante papel nessa função (SZABÓ *et al.*, 2012) e, portanto, foi verificado se os microrganismos avaliados

apresentariam potencial para produção dessa enzima. O método adotado tem como base a inoculação dos fungos em meio basal acrescido de quitina coloidal como fonte de carbono e o indicador de pH púrpura de bromocresol. Durante a reação química de hidrólise da quitina, pela ação das quitinases, a molécula de N-acetilglicosamina é liberada. Esse açúcar contém grupamentos carbonila e imina em sua cadeia. O corante púrpura de bromocresol é aniônico e reage com as hidroxilas desses grupamentos. Com a quebra da quitina o pH do meio se eleva e ocorre a mudança de coloração, que passa de amarelo (pH ≤ 5) para violeta (pH $>5,2$ até 6,8) (AGRAWAL; KOTASTHANE, 2012).

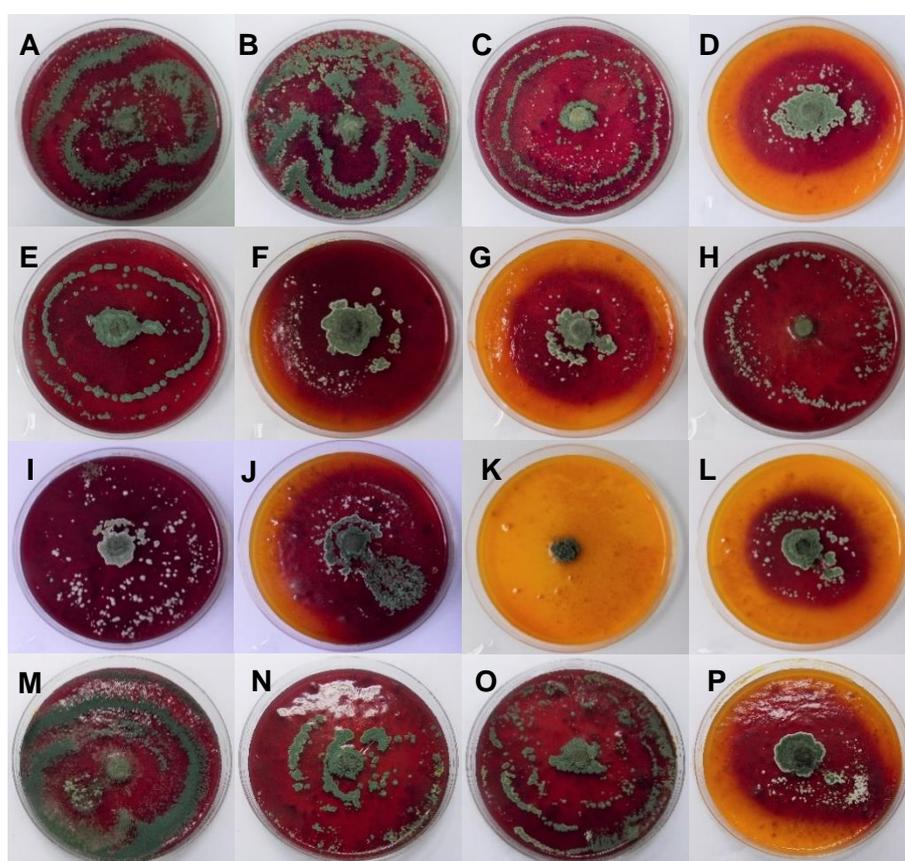


Figura 25. Isolados de *Trichoderma* spp. inoculados em meio basal acrescido de quitina coloidal apresentando halos de degradação (violeta) após 168 h de incubação em B.O.D.

A (IB 01/13), B (IB 04/05), C (IB 07/01), D (IB 15/06), E (IB 18/03), F (IB 19/17), G (IB 22/08), H (IB 28/07), I (IB 28/15), J (IB 30/07), K (IB 37/01), L (IB 38/11), M (IB 43/14), N (IB 48/06), O (IB 49/15) e P (IB 51/09).
(Fonte: A autora)

No trabalho realizado por Khatri, Tiwari e Bariya (2017) foi utilizado um método similar para seleção de linhagens de *Trichoderma* com potencial quitinolítico. E assim como no

presente estudo, a utilização de meio sólido com indicador de pH se mostrou adequado para separar e classificar as cepas produtoras de quitinase.

As quitinases estão entre as enzimas degradadoras de parede celular juntamente com as glucanases e proteases e tem importante função na ação de biocontrole dos isolados de *Trichoderma*, principalmente em relação ao micoparasitismo (Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203) VITERBO *et al.*, 2002). Portanto, como os isolados avaliados demonstraram capacidade de produzir quitinase em meio sólido, a etapa seguinte consistiu em quantificar a liberação dessas enzimas em meio líquido contendo quitina coloidal.

5.1.4.3 Ensaio de quantificação de atividade enzimática de quitinase dos isolados de *Trichoderma* spp.

A atividade quitinolítica total foi mensurada pela liberação de açúcares redutores a partir da quitina coloidal e foi expressa em termos da concentração de NAGA (mg/ml) liberado em meio suplementado com quitina coloidal comercial. A concentração de NAGA liberada variou de 0,536 (IB 01/13) a 1,132 (IB 28/07) mg/ml conforme dados apresentados na Tabela 3. Os isolados IB 22/08 e IB 28/07 diferiram estatisticamente em relação ao controle equivalente (com meio de cultivo), com aumento significativo da atividade enzimática de quitinase, com percentuais de 11,5 e 8,4, respectivamente (Figura 26). A curva padrão de NAGA usada como referência para os valores de concentração apresentou $R^2 = 0,9988$.

No trabalho realizado por Agrawal e Kostasthane (2012) observaram-se números mais altos de produção de quitinase e separaram as cepas em categorias de baixa, média e alta produção de quitinase. Os valores adotados foram de 30-60mg/ml de NAGA para baixa produção, 61-80 mg/ml para média e ≥ 81 mg/ml para alta produção.

De acordo com os critérios adotados pelos autores acima, os isolados avaliados no presente estudo não apresentariam o mínimo de concentração de NAGA liberado para serem classificados como de baixa produção. Contudo, vale ressaltar que fatores como tipo de substrato utilizado, tempo de incubação e as próprias cepas podem influenciar na produção de quitinase (RIBEIRO, 2000). Por exemplo, em estudo conduzido utilizando quitinas de diferentes origens, observou-se maior produção de quitinases quando o substrato era derivado de parede celular de *Rhizoctonia* (AGRAWAL & KOSTASTHANE, 2012).

Em pesquisa onde foi utilizada quitina comercial derivada de casca de camarão (Sigma) e cistos de nematoide (*Heterodera avenae*) como substrato no meio de cultivo, houve maior produção de quitinase no meio com quitina comercial (ZHANG *et al.*, 2014).

Os resultados do presente estudo demonstraram uma baixa produção de quitinases, e isso pode ter ocorrido por diversos fatores, como o tempo de incubação no meio líquido, a capacidade enzimática das cepas ou até o congelamento dos extratos por longo período antes da quantificação. Logo, optou-se por fazer um novo experimento, utilizando um método diferente para quantificar a produção enzimática.

Tabela 3. Atividade quitinolítica de filtrados de cultura de isolados de *Trichoderma* crescidos em meio líquido suplementado com quitina coloidal.

Tratamentos	Concentração de NAGA (mg/ml)
Controle Meio	0,762 ± 0,004 b
Controle Água	0,306 ± 0,013 d
01/13	0,536 ± 0,023 c
04/05	0,743 ± 0,011 b
07/01	0,777 ± 0,011 b
15/06	0,838 ± 0,010 b
18/03	0,889 ± 0,011 b
19/17	0,876 ± 0,012 b
22/08	1,059 ± 0,012 a
28/07	1,132 ± 0,012 a
28/15	0,588 ± 0,040 c
30/07	0,631 ± 0,038 c
37/01	0,669 ± 0,039 c
38/11	0,701 ± 0,031 c
43/14	0,763 ± 0,047 b
48/06	0,795 ± 0,050 b
49/15	0,798 ± 0,033 b
51/09	0,796 ± 0,017 b
CV%	21

Os dados originais foram apresentados. Letras iguais não distinguem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

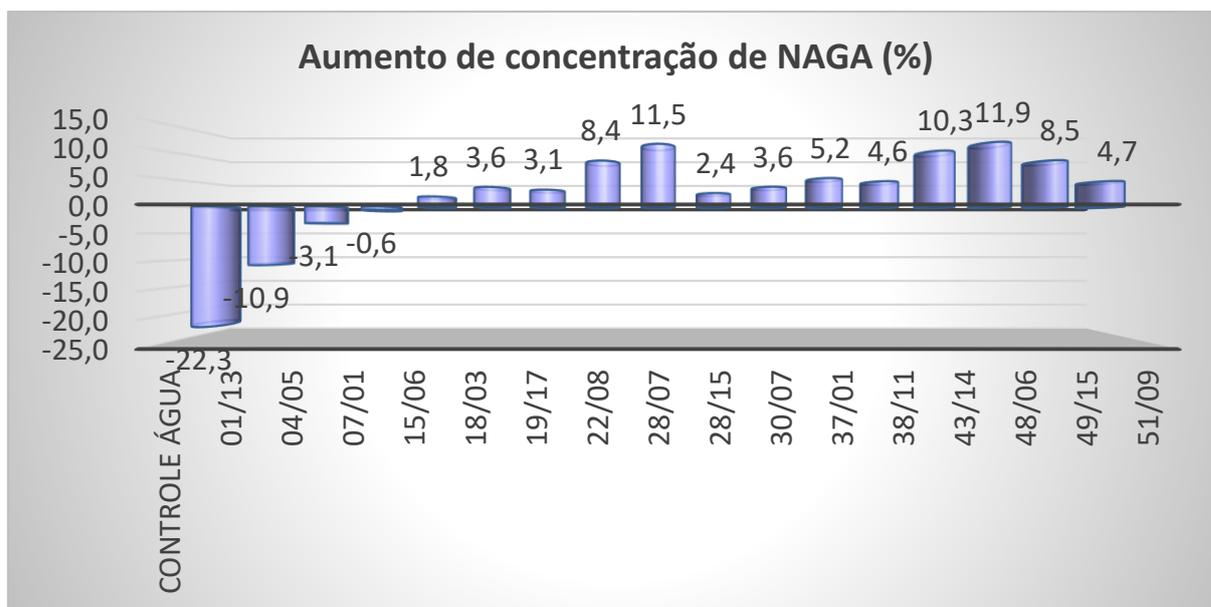


Figura 26. Porcentagem de aumento da concentração de NAGA (N-acetil-D-glucosamina) liberado por isolados de *Trichoderma* em meio contendo quitina coloidal.

5.1.4.4 Ensaio de quantificação de quitinase – quitina azure

Neste ensaio foi utilizado quitina azure para quantificação de quitinases liberadas pelos isolados de *Trichoderma*. A quitina azure foi escolhida como substrato por se tratar de um método tão sensível e eficiente quanto o método DNS, utilizado anteriormente, com a vantagem de ser mais rápido (RAMÍREZ *et al.*, 2004).

As cepas IB 28/15, IB 37/01, IB 38/11, IB 43/14, IB 48/06, IB 49/15 e IB 51/09 foram capazes de produzir mais unidades enzimáticas de quitinase quando comparados ao controle e aos controles positivos CMMA1169 e CMMA1170, selecionados para o estudo por serem bons produtores de quitinase (Tabela 4).

Os resultados mostram que os isolados IB 48/06 e IB 43/14 que diferiram significativamente do controle quanto a produção de quitinases foram os que mais parasitaram ovos de nematoides em escala percentual nos ensaios realizados *in vitro*. Isso pode demonstrar uma relação entre a capacidade de parasitismo e a produção da enzima.

Cabe ressaltar que, a correlação sinérgica entre antagonismo e a produção de enzimas degradadoras de parede celular, nem sempre é existente. Estudos conduzidos por Lopes *et al.* (2012), demonstraram que isolados de *Trichoderma asperellum* exibiram alta produção de enzimas degradadoras de parede celular e baixa capacidade de antagonismo, embora esses dados não se aplicaram a produção de quitinase.

Tabela 4. Atividade de quitinase de isolados de *Trichoderma* spp. mensurada utilizando o substrato colorimétrico quitina azure.

Tratamentos	Unidade de quitinase*	Estatística
Controle	1	b
IB01/13	0	c
IB04/05	0	c
IB07/01	0	c
IB15/06	0	c
IB18/03	0	b
IB19/17	0	b
IB22/08	0	c
IB28/07	0	b
IB28/15	3	a
IB30/07	0	b
IB37/01	3	a
IB38/11	3	a
IB43/14	3	a
IB48/06	4	a
IB49/15	3	a
IB51/09	3	a
CMMA1169	0	b
CMMA1170	0	b
CV%	0,6	

*Uma unidade de quitinase se refere ao aumento de 0,01 na absorbância da amostra comparada ao controle. Os dados originais foram apresentados. Para análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$. Letras iguais não distinguem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A produção de quitinases é uma importante característica para um fungo nematófago, pois a quitina constitui a maior parte da casca do ovo (JATALA, 1986), e essas enzimas tem função primordial no parasitismo dos ovos (SCHOUTEN, 2016).

Estudos realizados por Spiegel, Sharon e Chet (2005) demonstraram expressão de enzimas quitinolíticas sendo também induzidas na presença de ovos de nematoides, sugerindo o envolvimento da substância na penetração da casca dos ovos.

Portanto, o mais importante atributo que faz de *Trichoderma* um eficiente antagonista de microrganismos que contém quitina é a habilidade de produzir enzimas quitinolíticas. Em relação aos nematoides, o processo de parasitismo direto de ovos que é facilitado pelo aumento das atividades de quitinases e proteases, pode ser responsável pela redução da infestação de nematoides em plantas (SZABÓ *et al.*, 2012).

5.2 Ensaios *in vivo*

5.2.1 Promoção de crescimento

5.2.1.1 1º Ensaio de promoção de crescimento de cana-de-açúcar utilizando MPB (*mudas pré brotadas*)

O ensaio foi conduzido em Campinas/SP, entre junho e agosto de 2015. Após 60 dias de cultivo em casa de vegetação, as plantas foram retiradas para obtenção de dados da promoção de crescimento. Na Figura 27 pode ser observado o visual das plantas tratadas com os isolados IB 04/05, IB 18/03 e IB 19/17 ao final do experimento, comparadas a planta do tratamento controle, não tratada.

Foram avaliados seis parâmetros para a promoção de crescimento das plantas de cana-de-açúcar (Tabela 5). No parâmetro massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) dos 14 isolados de *Trichoderma* spp. avaliados, seis diferiram estatisticamente do controle. Os isolados que se destacaram foram IB 04/05, IB 18/03, IB 19/17, IB 37/01, IB 38/11 e IB 49/15 com aumentos de 15, 19, 25, 12, 18, 6 e 22%, respectivamente (Figura 28).



Figura 27. Aspecto do desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000, após 60 dias em casa de vegetação, tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp., no ensaio de promoção de crescimento I. (Fonte: A autora)

Em relação a massa seca de raízes, não houve diferença entre os tratamentos. Para a variável número de folhas a diferença entre os tratamentos também não foi significativa.

Tabela 5. Efeito de 14 isolados de *Trichoderma* spp. na altura da planta em cm (AP), número de folhas (NF), número de perfilhos (NP), número de folhas nos perfilhos (NFP), massa de matéria seca da parte aérea em gramas (MMSPA) e massa de matéria seca das raízes em gramas (MMSR) da variedade IAC-SP-95-5000 de cana-de-açúcar, 60 dias após inoculação dos microrganismos do ensaio de promoção de crescimento I.

Tratamentos	AP	NF	NP	NFP	MMSPA	MMSR*
Controle	21,56 b	7,25 a	3,00 b	11,13 b	7,53 b	5,70
04/05	21,56 b	7,75 a	5,38 a	18,13 a	8,67 a	7,01
07/01	22,00 b	7,25 a	3,88 a	12,75 b	7,47 b	6,25
15/06	20,25 b	6,88 a	4,13 a	15,00 b	7,43 b	5,80
18/03	23,31 a	7,50 a	4,88 a	18,13 a	8,93 a	6,29
19/17	24,00 a	7,88 a	4,25 a	17,63 a	9,45 a	6,49
22/08	21,31 b	7,13 a	2,63 b	11,25 b	7,44 b	6,53
28/07	23,13 a	7,13 a	4,13 a	13,38 b	7,44 b	5,45
28/15	23,44 a	7,50 a	2,75 b	10,75 b	7,36 b	5,67
30/07	23,06 a	8,00 a	3,75 a	12,63 b	7,60 b	5,17
37/01	19,81 b	7,38 a	3,50 b	14,13 b	8,43 a	6,60
38/11	19,81 b	6,25 a	4,88 a	19,00 a	8,86 a	6,98
43/14	21,65 b	7,50 a	2,38 b	7,88 b	6,43 b	5,69
48/06	21,04 b	7,38 a	4,00 a	17,38 a	8,00 b	6,55
49/15	20,75 b	7,50 a	4,50 a	20,50 a	9,20 a	7,04
CV%=	5,9	5,2	18,8	41,13	17,7	18,4

Os dados são médias de oito repetições, e o valores originais foram apresentados. Dados relativos a NP, NF e NP foram transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$.

Médias seguidas da mesma letra minúscula dentro da coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

* De acordo com o teste F as médias não podem ser consideradas diferentes.

No quesito altura da planta, os isolados que promoveram crescimento foram IB 18/03, IB 19/17, IB 28/07, IB 28/15 e IB 30/07. Na quantidade de perfilhos somente quatro isolados não apresentaram diferenças comparados ao controle. No parâmetro número de folhas nos perfilhos, seis isolados diferiram significativamente (IB 04/05, IB 18/03, IB 19/17, IB 38/11, IB 48/06 e IB 49/15), conforme dados apresentados na Tabela 5. Dentre todos os isolados avaliados, IB 18/03 e IB 19/17 se destacaram com aumentos significativos em quatro dos seis parâmetros,

sugerindo que estes microrganismos podem ser bons promotores de crescimento para a variedade de cana-de-açúcar utilizada.

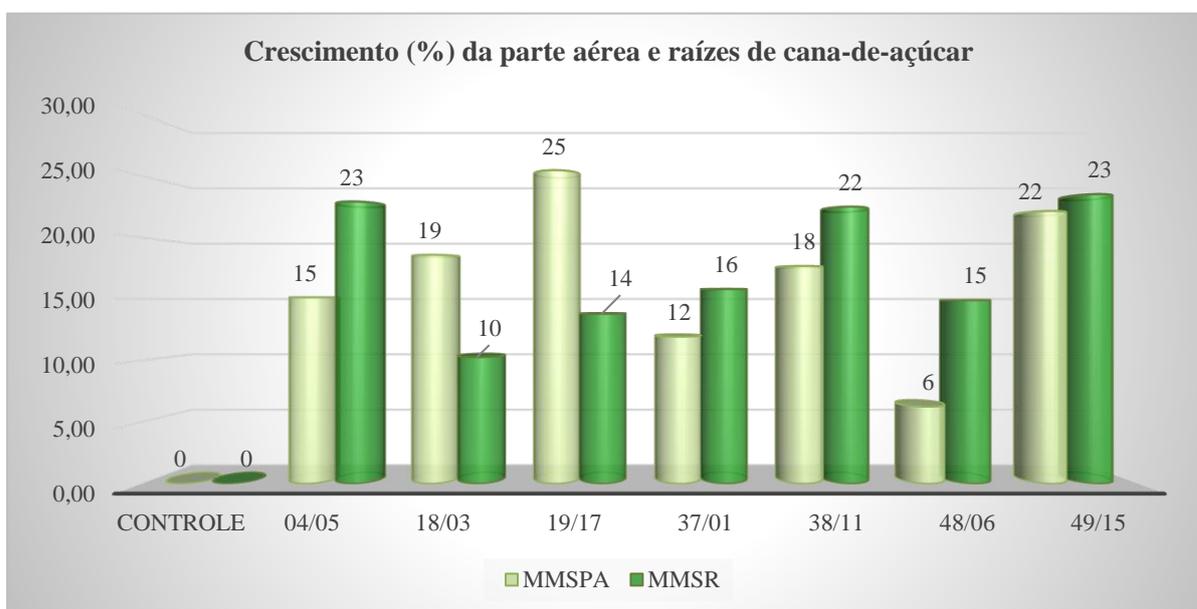


Figura 28. Porcentagem de aumento da massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) e massa de matéria seca de raízes (MMSR) de plantas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000, 60 dias após tratamento com isolados de *Trichoderma* spp. no ensaio de promoção de crescimento I.

5.2.1.2 2° Ensaio de promoção de crescimento de cana-de-açúcar utilizando MPB (mudas pré brotadas)

O segundo ensaio de promoção de crescimento foi conduzido em São Paulo, entre novembro de 2015 e janeiro de 2016. Diferente do primeiro experimento, neste, o parâmetro massa de matéria seca de raízes foi eliminado da avaliação do ensaio. Pode-se observar que sete isolados (IB 01/13, IB 18/03, IB 19/17, IB 22/08, IB 30/07, IB 43/14 e IB 48/06) aumentaram a massa de matéria seca da parte aérea das plantas, diferindo estatisticamente em relação ao controle, onde as plantas não receberam inoculo de microrganismos (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito de 16 isolados de *Trichoderma* spp. na altura da planta (AP), número de folhas (NF), número de perfilhos (NP), número de folhas nos perfilhos (NFP) e massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) na variedade IAC-SP-95-5000 de cana-de-açúcar, 60 dias após inoculação dos microrganismos do ensaio de promoção de crescimento II.

Tratamentos	¹ AP	¹ NF**	¹ NP**	¹ NFP**	¹ MMSPA
Controle	23,50 a	6,25	0,00	0,00	2,90 b
01/13	23,06 a	6,25	0,00	0,00	3,44 a
04/05	22,69 a	6,25	0,13	0,50	3,26 b
07/01	20,81 b	5,50	0,00	0,00	3,21 b
15/06	20,06 b	5,50	0,13	0,00	2,94 b
18/03	23,75 a	6,38	0,00	0,00	3,83 a
19/17	23,13 a	6,38	0,00	0,00	3,73 a
22/08	25,50 a	6,88	0,00	0,00	4,31 a
28/07	20,25 b	5,88	0,00	0,00	2,12 c
28/15	21,31 b	5,88	0,13	0,63	3,19 b
30/07	21,88 b	6,25	0,13	0,63	3,52 a
37/01	20,94 b	6,00	0,00	0,00	2,68 c
38/11	23,44 a	6,50	0,00	0,75	3,32 b
43/14	25,00 a	7,00	0,13	1,13	4,28 a
48/06	23,06 a	5,88	0,25	0,00	3,44 a
49/15	20,31 b	6,63	0,00	0,00	3,15 b
51/09	23,00 a	6,25	0,00	0,00	3,09 b
CV%=	5,8	6,6	15,7	44,6	9,7

Os dados são médias de oito repetições, e o valores originais foram apresentados. ¹Dados relativos a NP, NF, NP e MMSPA foram transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$.

Médias seguidas da mesma letra minúscula dentro da coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

** De acordo com o teste F as médias não podem ser consideradas diferentes.

Em relação à altura, os melhores isolados não apresentaram diferença quando comparados ao controle, enquanto no parâmetro número de folhas, não houve diferença estatística. As variáveis número de perfilhos e número de folhas nos perfilhos foram contabilizadas, mas a maioria das plantas não apresentou perfilhamento como mostra a tabela 6, e por este motivo a análise estatística não encontrou diferenças entre os tratamentos. Sugere-se que isso possa ter ocorrido devido à falta de luminosidade na casa de vegetação quando o ensaio estava em andamento, pois sabe-se que a luz é um dos principais fatores que induzem o perfilhamento da cana-de-açúcar (MARAFON, 2012; MARIN; JONES, 2014).

A Figura 29 mostra os percentuais de crescimento de parte aérea de cada tratamento em relação ao controle. Os valores variaram entre 19 e 49% de aumento, sendo o isolado IB 22/08 o que apresentou maior porcentagem de aumento das plantas neste ensaio (Figura 30).

Os isolados IB 18/03 e IB 19/17, apresentaram resultados positivos nos ensaios anteriores, sugerindo eficácia em promover crescimento nesta variedade de cana-de-açúcar.

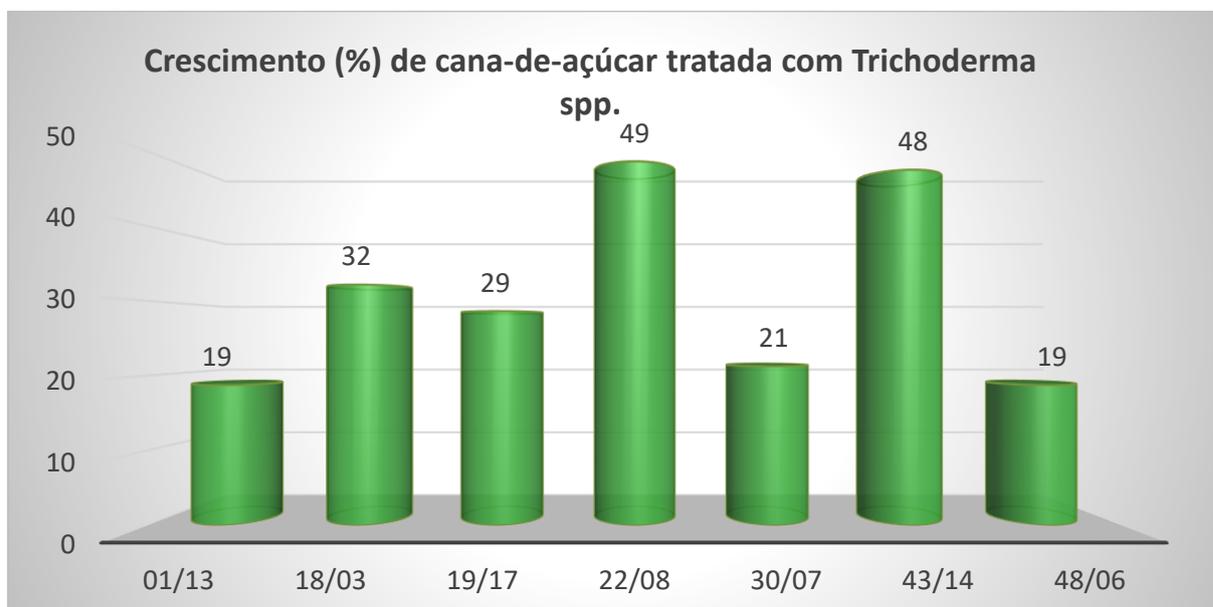


Figura 29. Porcentagem de crescimento da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com isolados de *Trichoderma* spp. em relação as plantas do grupo controle do ensaio de promoção de crescimento II.

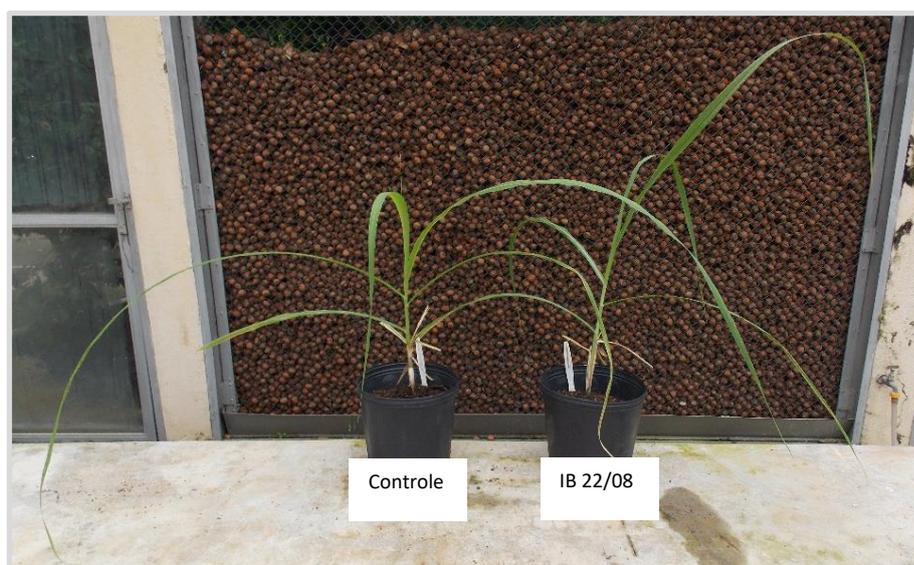


Figura 30. Aspecto do desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000 do ensaio de promoção de crescimento II, 60 dias após a inoculação do isolado de *Trichoderma* IB22/08 comparado ao tratamento controle, sem adição de microrganismos. (Fonte: A autora)

5.2.1.3 3º Ensaio de promoção de crescimento de cana-de-açúcar utilizando MPB (mudas pré brotadas)

Este ensaio foi conduzido em São Paulo, entre novembro de 2016 e janeiro de 2017, e como nos demais ensaios de promoção de crescimento, as plantas foram retiradas após 60 dias para avaliação do experimento.

Os parâmetros número de folhas, número de perfilhos e número de folhas nos perfilhos não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Assim como no segundo ensaio de promoção de crescimento as plantas não perfilharam, possivelmente pela deficiência de incidência solar dentro da casa de vegetação (Figura 31).



Figura 31. Aspecto do desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000 do ensaio de promoção de crescimento III, 60 dias após a inoculação dos isolados de *Trichoderma* comparados ao tratamento controle, sem adição de microrganismos. (Fonte: A autora)

Na Tabela 7 encontram-se os resultados de todas as variáveis avaliadas no ensaio e podemos observar que em relação a massa de matéria seca da parte aérea nenhum isolado de *Trichoderma* apresentou diferença estatística em relação ao controle na promoção de crescimento, mesmo com aumentos de até 16,62% (Figura 32). Dentre eles, os isolados que se

iguaram estatisticamente ao controle IB 04/05, IB 37/01 e IB 38/11 apresentaram bons resultados no primeiro ensaio de promoção de crescimento e o IB 48/06 mostrou eficácia no segundo ensaio.

No parâmetro altura da planta nenhum isolado de *Trichoderma* spp. se destacou em relação ao controle.

Tabela 7. Efeito de 16 isolados de *Trichoderma* spp. na altura da planta (AP), número de folhas (NF), número de perfilhos (NP), número de folhas nos perfilhos (NFP) e massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) na variedade IAC-SP-95-5000 de cana-de-açúcar, 60 dias após inoculação dos microrganismos do ensaio de promoção de crescimento III.

Tratamentos	AP	¹ NF**	¹ NP**	¹ NFP**	MMSPA
Controle	22,19 a	6,00	0,38	1,25	3,25 a
01/13	22,75 a	6,13	0,00	0,00	2,94 b
04/05	21,31 a	6,13	0,13	0,63	3,42 a
07/01	20,13 a	5,75	0,00	0,00	3,16 a
15/06	20,13 b	5,63	0,25	0,88	2,81 b
18/03	19,94 b	6,25	0,13	0,63	2,97 b
19/17	20,63 b	6,25	0,00	0,00	2,79 b
22/08	21,25 a	6,13	0,00	0,00	3,00 b
28/07	19,50 b	5,50	0,13	0,75	2,70 b
28/15	17,94 b	5,13	0,00	0,00	2,24 b
30/07	20,69 b	5,88	0,13	0,75	2,88 b
37/01	21,94 a	6,63	0,00	0,00	3,15 a
38/11	20,75 b	6,00	0,13	0,50	3,43 a
43/14	19,13 b	5,88	0,13	0,50	2,67 b
48/06	23,13 a	6,13	0,00	0,00	3,79 a
49/15	21,31 a	5,63	0,00	0,00	2,92 b
51/09	22,19 a	6,25	0,00	0,00	3,67 a
CV%=	12,6	6,9	51	19,8	9,4

Os dados são médias de oito repetições, e o valores originais foram apresentados. ¹Dados relativos a NP, NF, NP e MMSPA foram transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$.

Médias seguidas da mesma letra minúscula dentro da coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

** De acordo com o teste F as médias não podem ser consideradas diferentes.

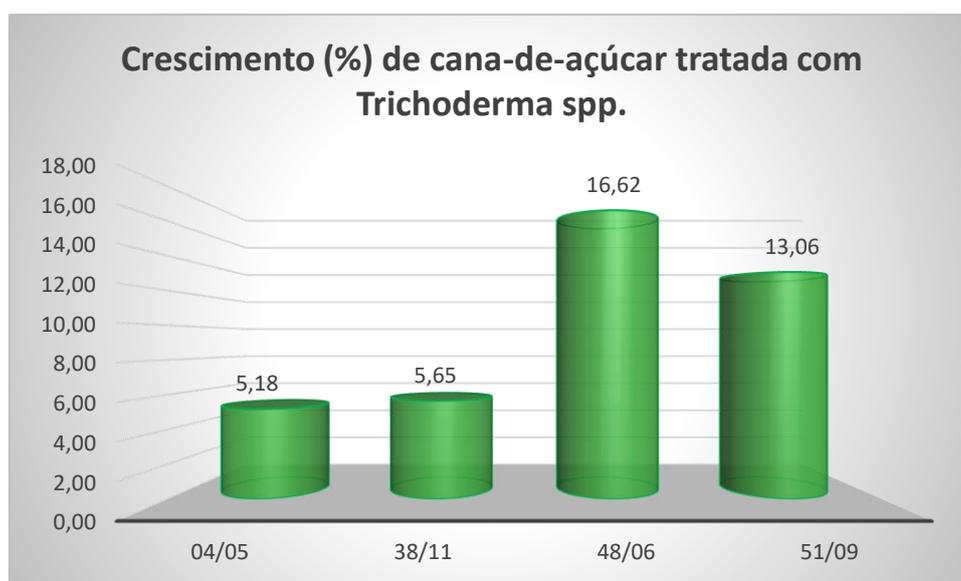


Figura 32. Porcentagem de crescimento da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com isolados de *Trichoderma* spp. em relação as plantas do grupo controle do ensaio de promoção de crescimento III.

Nota-se que as plantas do primeiro ensaio realizado em Campinas apresentaram maior massa de matéria seca em relação aos dois outros ensaios, conduzidos na cidade São Paulo. As médias de temperaturas registradas em Campinas e na cidade de São Paulo nos períodos dos ensaios foram de 20,3 °C no primeiro experimento, 22,3 °C no segundo e 21,7 °C no último ensaio, portanto não houve uma grande variação que possa ter influenciado no crescimento das plantas (IAG/USP, 2016, 2017; UNICAMP, 2015). Porém, a incidência de radiação solar na casa de vegetação em Campinas é muito maior do que na casa de vegetação de São Paulo, que estava bastante sombreada devido a presença de muitas árvores no seu entorno. A questão da luminosidade pode ter sido o fator responsável por estes resultados, afinal, a cana-de-açúcar é uma planta que precisa de muito sol para o seu pleno desenvolvimento, e isso inclusive afeta o perfilhamento, variável que apresentou bastante diferenças entre os experimentos (MARAFON, 2012).

Apesar do fator ambiental interferir nos resultados, quando analisamos o comportamento dos isolados de *Trichoderma* na interação com as plantas de cana-de-açúcar podemos observar que as cepas IB 18/03 e IB 19/17 se destacaram apresentando bons resultados no aumento da massa seca da parte aérea em pelo dois dos três ensaios realizados.

Para as demais variáveis somente no primeiro ensaio os isolados apresentaram resultados positivos, demonstrando a importância da incidência solar para esta cultura.

Fungos do gênero *Trichoderma* tem a capacidade de se associar com diversas culturas como soja, feijão, tomate e pepino e beneficiá-las com o aumento do crescimento (BONONI *et al.*, 2020; FONTENELLE *et al.*, 2011; HADDAD *et al.*, 2017; PEDRO *et al.*, 2012; SILVA, *et al.*, 2011).

O maior crescimento vegetal proporcionado pelas cepas de *Trichoderma* é frequentemente relacionado a mudanças na composição da microflora das raízes, maior absorção de nutrientes, incluindo nitrogênio, maior solubilização de nutrientes do solo, aumento no desenvolvimento radicular, aumento da formação de pelos radiculares e enraizamento mais profundo (HARMAN, 2006).

Isolados de *T. virens* e *T. atroviride* foram inoculados em mudas de *Arabidopsis* e foi verificado o efeito dos microrganismos no papel da auxina na regulação do crescimento e desenvolvimento durante a interação. Os dois fungos utilizados foram capazes de promover o crescimento das mudas e aumentaram significativamente o número de raízes laterais. Para avaliar a interferência de *T. virens* no papel da auxina os autores utilizaram plantas mutantes defeituosas no transporte ou resposta da auxina e compararam com plantas selvagens inoculadas ou não com o fungo. Após cinco dias da inoculação as plantas selvagens apresentaram aumento de 62% no peso fresco dos brotos das mudas em comparação as plantas não inoculadas, enquanto as mutantes apresentaram respostas nulas ou diminuídas na promoção de crescimento pelo fungo. Dessa forma foi demonstrado que a inoculação com *T. virens* aumentou a expressão gênica regulada por auxina tendo importante papel na sinalização da auxina para a promoção de crescimento de plantas (CONTRERAS-CORNEJO *et al.*, 2009).

No trabalho realizado por Romão-Dumaresq *et al.* (2016), os autores não encontraram alterações na massa de matéria seca da parte aérea e raízes quando inocularam em cana-de-açúcar dois tipos de *T. virens*, um selvagem e outro geneticamente modificado, quando comparados ao tratamento testemunha. Embora os isolados não tenham alterado nenhum parâmetro em relação ao crescimento, eles colonizaram de forma endofítica o sistema radicular das plantas, sugerindo que podem interagir com o hospedeiro protegendo-o da invasão de patógenos e/ou promovendo indução de resistência.

O efeito benéfico de diferentes microrganismos aplicados em cana-de-açúcar foi demonstrado no trabalho conduzido por Yadav *et al.*, (2009). A aplicação de *T. viride* junto com palhada na cana-de-açúcar soca aumentou os teores de C orgânico, P disponível e biomassa microbiana no solo. Ademais, observou-se um efeito sinérgico com a cobertura morta na

promoção de crescimento das plantas e decomposição dos resíduos, quando comparados com aplicação do fungo com a queima ou a remoção da cobertura.

Espécies de *Trichoderma* tem habilidade de promover o crescimento de diversas plantas, embora para algumas culturas especificamente nota-se uma grande variação nos resultados principalmente em relação ao crescimento e isso pode ser associado a especificidade na interação fungo-planta, como ocorre com a cultura do milho (HARMAN, 2006).

Portanto, ao selecionar um agente de biocontrole ou promotor de crescimento para determinada cultura, priorizar um microrganismo que apresente forte simbiose com a planta de interesse é tão importante quanto as características intrínsecas da cepa, como solubilizar nutrientes ou micoparasitar agentes patogênicos.

5.2.2 Colonização radicular

5.2.2.1 Avaliação da colonização radicular da cana-de-açúcar por isolados de *Trichoderma* nos ensaios de promoção de crescimento

Ao final de cada um dos três ensaios de promoção de crescimento as raízes das plantas foram retiradas e plaqueadas em meio de cultura contendo antibióticos para análise da colonização radicular pelos isolados de *Trichoderma*. Como pode ser observado nas Figura 33, Figura 34 e Figura 35, todos os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados nos ensaios de promoção de crescimento foram capazes de colonizar as raízes da variedade de cana-de-açúcar utilizada e sobreviver no substrato durante o período dos experimentos.

A colonização radicular e a competência rizosférica são habilidades que permitem que fungos do gênero *Trichoderma* façam simbiose com as plantas. É por meio do sistema radicular que a interação fungo-planta ocorre e essa comunicação pode desencadear benefícios como a promoção de crescimento e indução das defesas da planta (SZCZECH *et al.*, 2017).

A colonização das raízes de diversas plantas por *Trichoderma* induz mudanças na fisiologia e no metabolismo das plantas, alterando o conteúdo de hormônios, açúcares solúveis, compostos fenólicos e aminoácidos, taxa fotossintética, transpiração e quantidade de água sem causar danos aos tecidos vegetais (CONTRERAS-CORNEJO *et al.*, 2016).

Portanto, com base nos resultados obtidos no presente estudo, todos os isolados avaliados nos experimentos de promoção de crescimento podem colonizar o sistema radicular da

variedade de cana-de-açúcar IAC-SP-95-5000, embora nem todos tenham promovido crescimento significativo das plantas nas condições avaliadas.

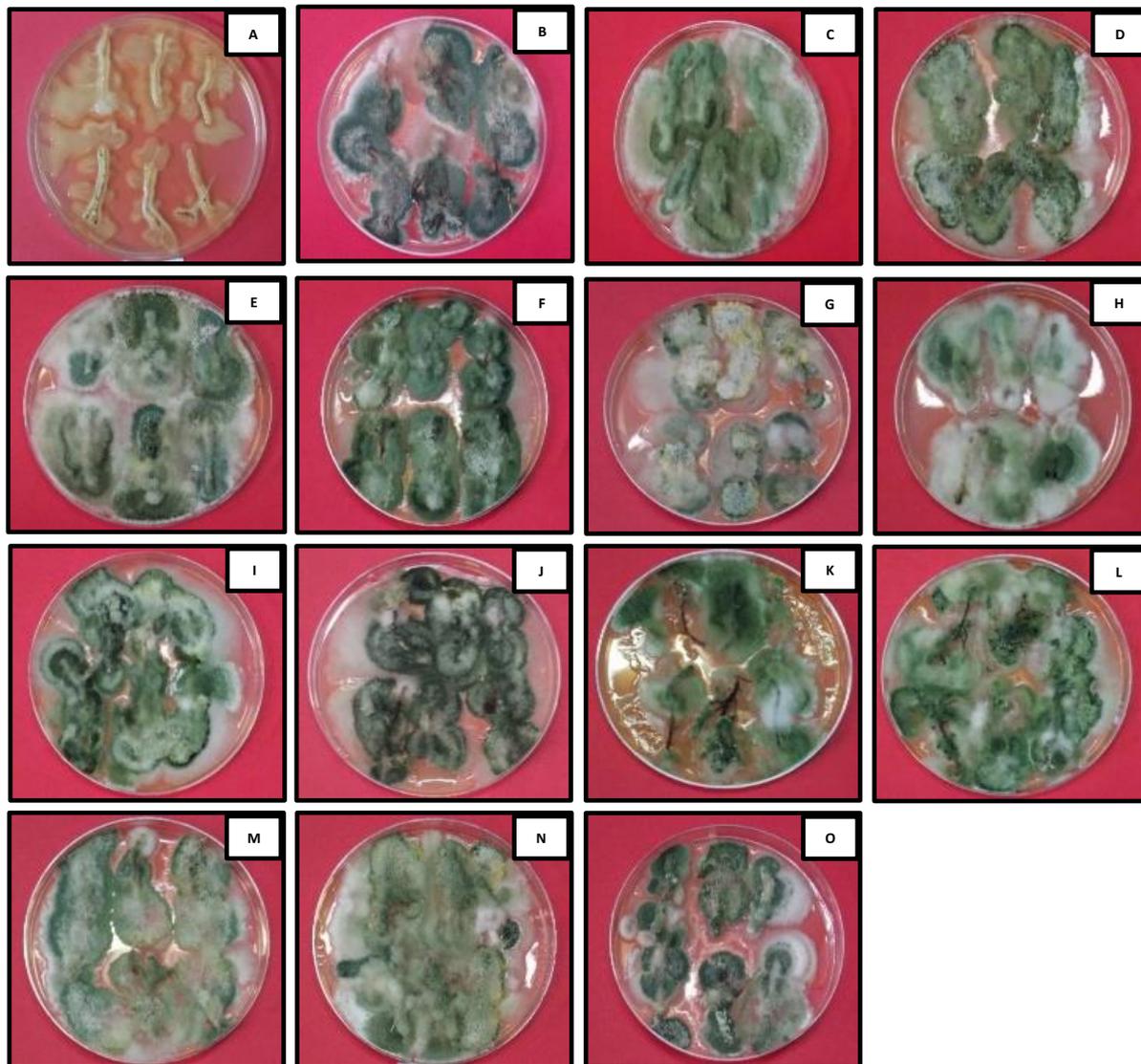


Figura 33. Fragmentos de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por isolados de *Trichoderma* spp. no ensaio de promoção de crescimento I.

A: controle; B: IB 04/05; C: IB 07/01; D: IB 15/06; E: IB18/03; F: IB 19/17; G: IB 22/08; H: IB 28/07; I: IB 28/15; J: IB 30/07; K: IB 37/01; L: IB 38/11; M: IB 43/14; N: IB 48/06; O: IB 49/15. (Fonte: A autora)

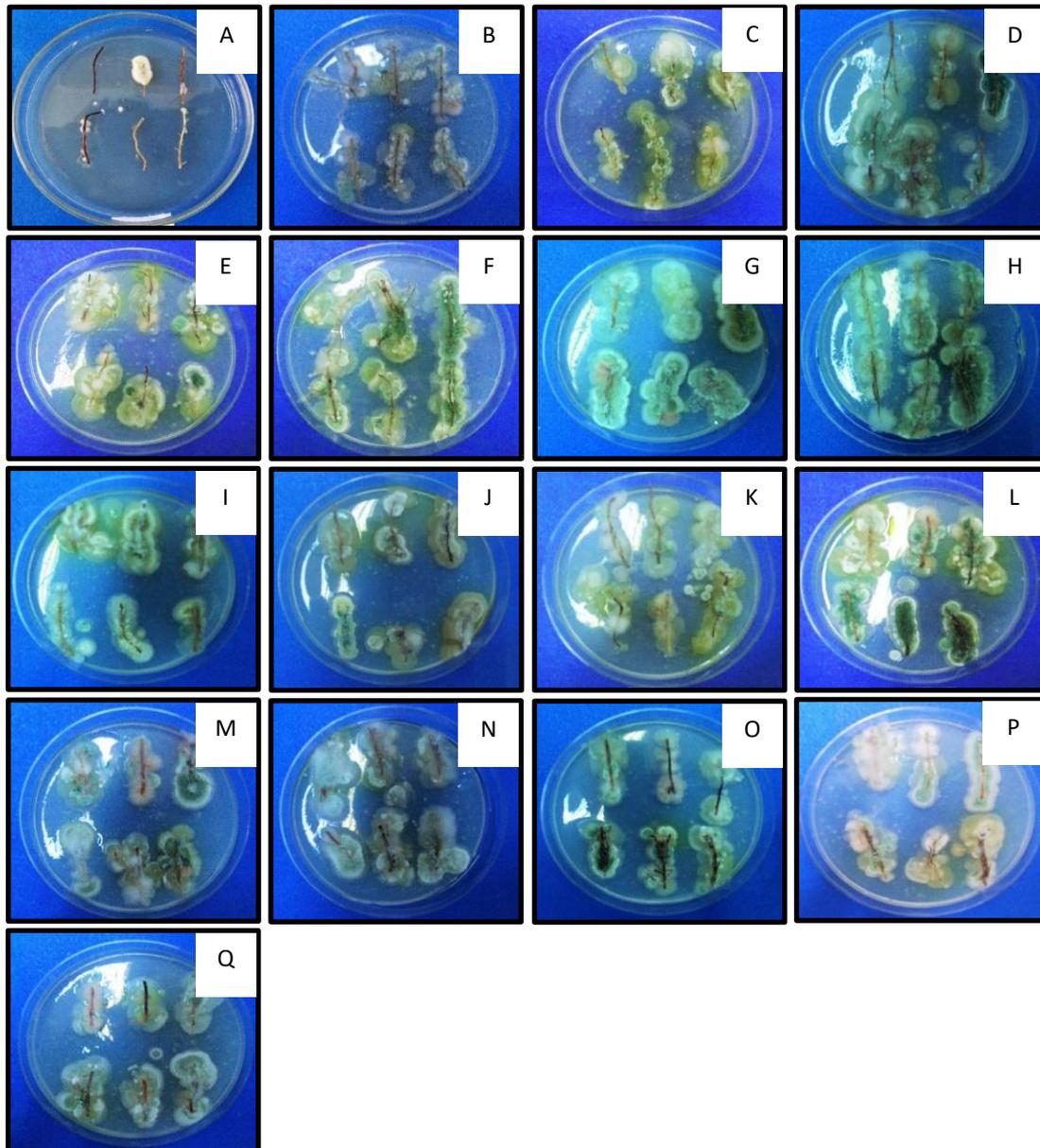


Figura 34. Fragmentos de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por isolados de *Trichoderma* spp. no ensaio de promoção de crescimento II. (Fonte: A autora)

A: controle; B: IB 01/13; C: IB 04/05; D: IB 07/01; E: IB 15/06; F: IB18/03; G: IB 19/17; H: IB 22/08; I: IB 28/07; J: IB 28/15, K: IB 30/07; L: IB 37/01; M: IB 38/11; N: IB 43/14; O: IB 48/06; P: IB 49/15; Q: IB 51/09.

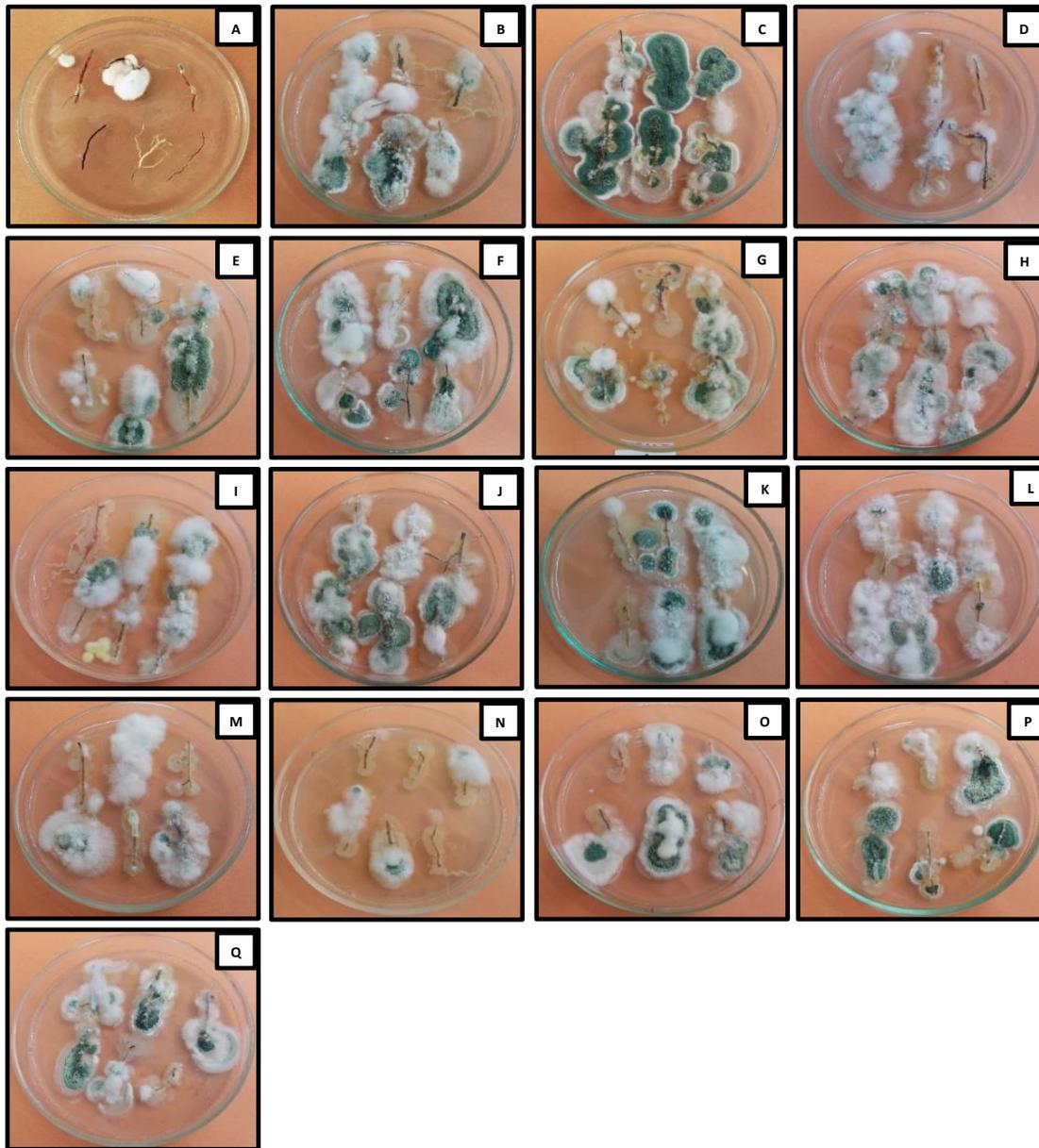


Figura 35. Fragmentos de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por isolados de *Trichoderma* spp. no ensaio de promoção de crescimento III. (Fonte: A autora)

A: controle; B: IB 01/13; C: IB 04/05; D: IB 07/01; E: IB 15/06; F: IB18/03; G: IB 19/17; H: IB 22/08; I: IB 28/07; J: IB 28/15; K: IB 30/07; L: IB 37/01; M: IB 38/11; N: IB 43/14; O: IB 48/06; P: IB 49/15; Q: IB 51/09.

5.2.2.2 *Isolado IB 49/15 na colonização de raízes de cana-de-açúcar*

Após o plaqueamento em meio de cultura BDA com antibióticos pôde-se observar que as raízes apresentaram crescimento fúngico com aspecto de *Trichoderma* em todas as amostras a partir do primeiro dia de análise, conforme a Figura 36. Pode-se presumir que todas as colônias crescidas são do fungo inoculado pois o substrato no qual as plantas cresceram foi previamente autoclavado. Esse resultado demonstra a alta velocidade com que o isolado cresceu e colonizou o sistema radicular das plantas de cana-de-açúcar da variedade IAC-SP-95-5000.

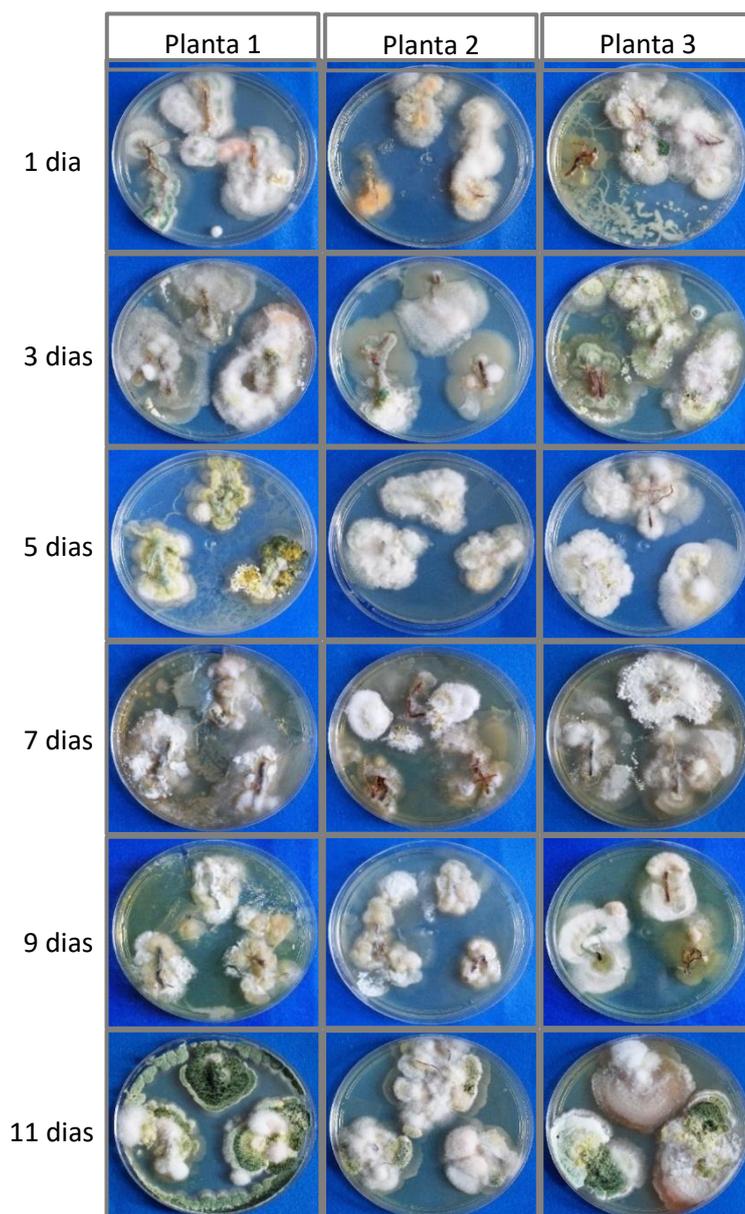


Figura 36. Aspecto das raízes de cana-de-açúcar plaqueadas em meio BDA com antibióticos tratadas com o isolado IB 49/15 com 1, 3, 5, 7, 9 e 11 dias após a inoculação. (Fonte: A autora)

Algumas cepas de *Trichoderma* apresentam comportamento endofítico em certas culturas (BAE *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2007), por isso no presente estudo foi realizado a esterilização superficial das raízes de cana-de-açúcar para verificar se o isolado IB 49/15 poderia colonizar esta variedade endofiticamente.

Os resultados mostram que houve crescimento fúngico a partir das raízes esterilizadas (Figura 37), sugerindo que este isolado pode apresentar comportamento endofítico na variedade vegetal avaliada.

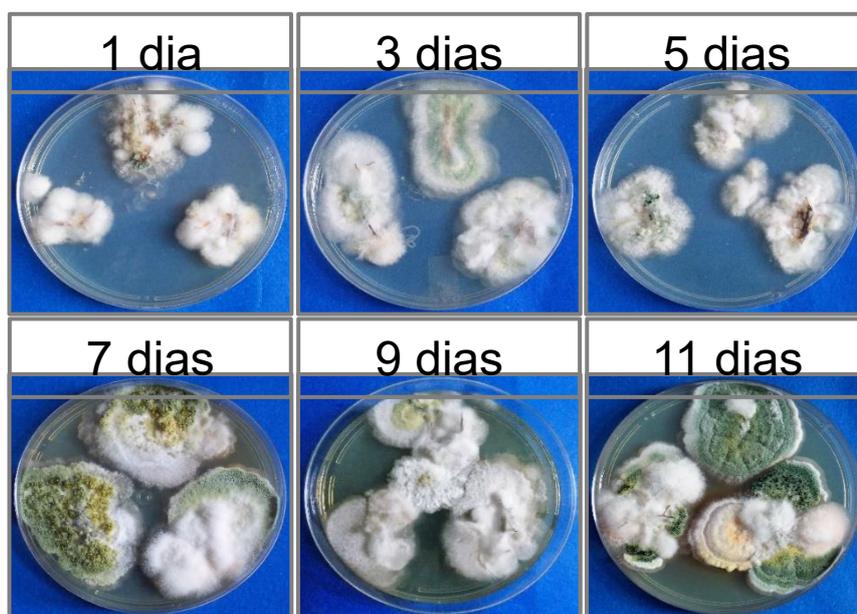


Figura 37. Raízes de cana-de-açúcar tratadas com o isolado IB 49/15 por diferentes períodos, submetidas a esterilização superficial com hipoclorito de sódio (1%), plaqueadas em meio BDA com antibióticos. (Fonte: A autora)

No trabalho realizado por Xia *et al.* (2011), os autores encontraram seis espécies de *Trichoderma* colonizando epifítica e endofiticamente raízes de banana. Dentre estes, quatro espécies, *T. asperellum*, *T. brevicompactum*, *T. virens*, e *Hypocrea lixii* foram encontradas vivendo como endofíticos no sistema radicular das plantas. Os autores observaram que certas cepas de *T. asperellum* e *T. virens* só eram encontradas na superfície das raízes enquanto outras somente endofiticamente, sugerindo que esse comportamento é relativo ao isolado que pode se adaptar a microambientes dentro e fora do sistema radicular.

5.2.3 Controle biológico

5.2.3.1 Ensaio de avaliação de *Trichoderma* spp. no controle de *M. incognita* em cana-de-açúcar, em casa de vegetação

Neste ensaio todos os isolados avaliados foram capazes de diminuir o número de ovos e a população total de *M. incognita* nas plantas de cana-de-açúcar (Tabela 8). O isolado IB 22/08 apresentou porcentagens de redução de ovos e nematoides totais (ovos + J2) de 91 e 89,6%, respectivamente (Figura 38 e Figura 39). Quanto a redução de J2 isoladamente não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Tabela 8. Médias da massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP 95-5000, em gramas e estimativa do número de ovos e juvenis e população de nematoides totais (NT) de *Meloidogyne incognita* presentes nas raízes das plantas tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp, após 365 dias do ensaio de controle biológico.

Tratamentos	MMSPA	Nº Ovos	Nº J2	NT
Controle Branco	19,08 a	0 b	0	0 b
Testemunha	11,20 b	2119 a	1009 a	3128 a
IB 07/01	13,75 b	423 b	150 a	573 b
IB 18/03	17,83 a	219 b	126 a	345 b
IB 19/17	21,44 a	297 b	49 a	346 b
IB 22/08	8,96 b	195 b	129 a	324 b
IB 38/11	14,60 b	257 b	71 a	328 b
CV%	25,92	37	99	39

Os dados são médias de cinco repetições, e o valores originais foram apresentados. ¹Dados relativos a número de ovos, número de J2 e NT, foram transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$.

Médias seguidas da mesma letra minúscula dentro da coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

No quesito crescimento, os resultados mostram que os isolados IB 18/03 e IB 19/17 protegeram as plantas contra o efeito dos nematoides e apresentaram incremento na massa de matéria seca quando comparadas com as plantas do tratamento testemunha, que receberam apenas o inóculo de nematoides. Os efeitos benéficos dos fungos para as plantas resultaram em aumentos de até 91,4% de crescimento em comparação as plantas do tratamento testemunha (Figura 40).

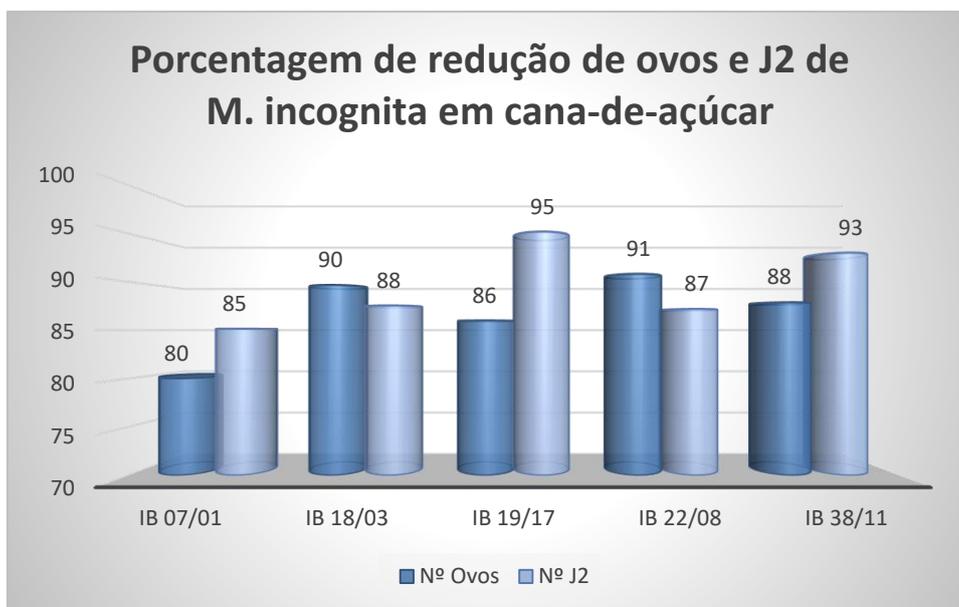


Figura 38. Porcentagem de redução de ovos e de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* extraídos de plantas de cana-de-açúcar tratadas com isolados de *Trichoderma* spp. em relação as plantas do tratamento testemunha (sem adição de antagonistas) após 365 dias de cultivo.

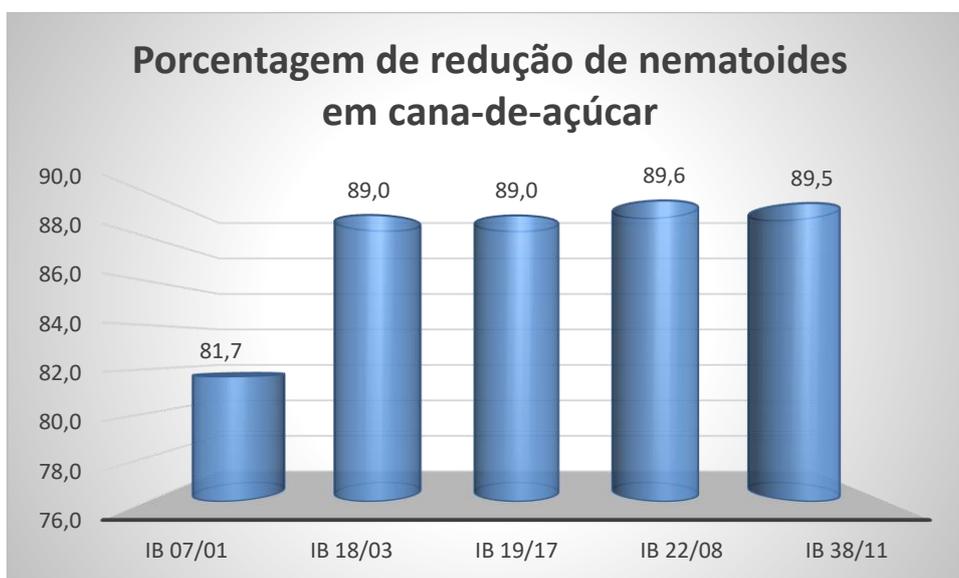


Figura 39. Porcentagem de redução da população total de *Meloidogyne incognita* extraída de plantas de cana-de-açúcar tratadas com isolados de *Trichoderma* spp. em relação as plantas do tratamento testemunha (sem adição de antagonistas) após 365 dias de cultivo.

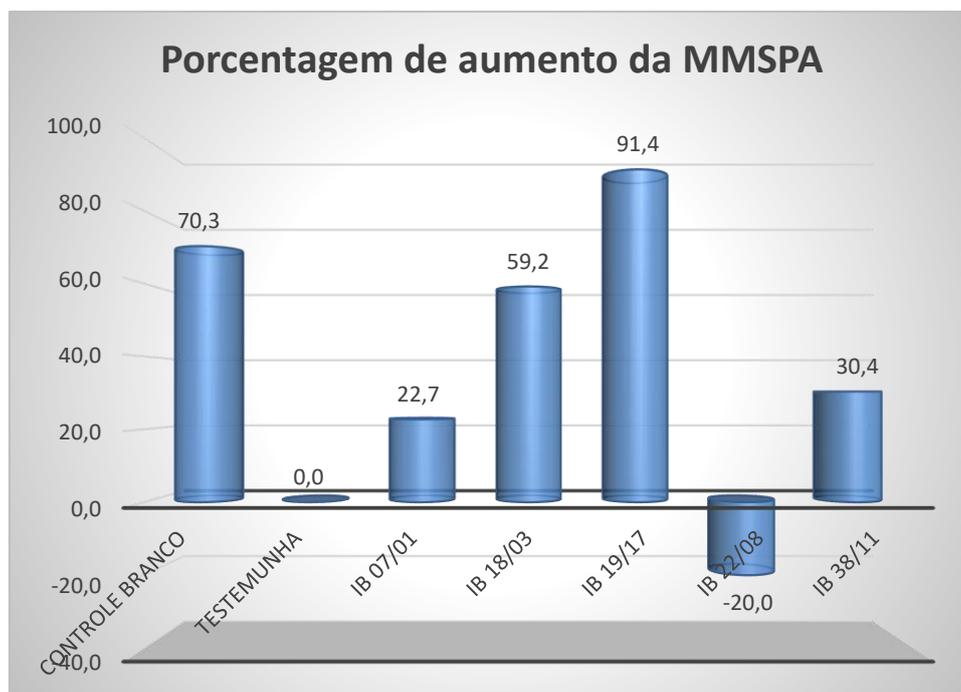


Figura 40. Porcentagem de crescimento da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *Meloidogyne incognita* e tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp. no ensaio de controle biológico II.

Um maior período de experimento certamente influenciou os resultados obtidos. Alguns trabalhos com nematoides de galha em cana-de-açúcar são conduzidos por maior tempo, pois o gênero *Meloidogyne* normalmente não se desenvolve muito bem em condições de vaso (VASCONCELOS; MIRANDA, 2011) e talvez por este motivo seja necessário maior tempo para os parasitos infectarem as raízes e se multiplicarem.

A infecção por fitonematoides provoca diversos efeitos maléficos nas plantas, principalmente em relação ao desenvolvimento pois os fitoparasitos danificam o sistema radicular e desviam a água e os nutrientes para a própria nutrição (OLIVEIRA, 2007).

Os resultados relativos ao controle biológico se mostraram promissores com uma redução da população do fitoparasito que variou entre 81,7 e 89,6%.

Trichoderma pode utilizar diferentes mecanismos de ação para controlar os nematoides nas plantas, dentre eles os de ordem direta como parasitismo de ovos e juvenis (SHARON; CHET; SPIEGEL, 2009), produção de metabólitos tóxicos (ZHANG *et al.*, 2017) e os de ordem indireta como indução de resistência na planta hospedeira (MARTÍNEZ-MEDINA *et al.*, 2017).

No trabalho realizado por Freitas *et al.* (2012), três cepas de *Trichoderma* apresentaram alta capacidade em reduzir o índice de galhas enquanto seis isolados afetaram a multiplicação

dos nematoides reduzindo o fator de reprodução de *M. incognita* em cana-de-açúcar. Os autores atribuíram os resultados a produção de toxinas, modificações dos exsudados radiculares e a indução de resistência.

Nos ensaios anteriores, algumas cepas demonstraram habilidade em parasitar ovos de *M. incognita in vitro*, porém, os isolados avaliados no biocontrole não foram os que apresentaram o maior percentual de parasitismo nos testes em placas de Petri, mas apresentaram resultados expressivos no controle dos nematoides na planta.

Os resultados aqui apresentados sugerem que as cepas de *Trichoderma* podem apresentar comportamentos distintos em condições *in vivo* e *in vitro*, e isto pode ocorrer devido a complexidade do sistema planta-patógeno-antagonista e as interações resultantes dessa tríade. Por isso os testes *in vivo* são tão importantes, pois podem validar ou não os resultados obtidos *in vitro* para a seleção de agentes de controle biológico.

Além da capacidade de controlar os patógenos/parasitas, *Trichoderma* tem a habilidade de promover o crescimento de diversas culturas vegetais como soja, alface, ervilha, tomate, canola e flores ornamentais (DOMENICO *et al.*, 2013; MARRA *et al.*, 2019; OUSLEY; LYNCH; WHIPPS, 1993; VINALE *et al.*, 2008), e essa habilidade foi constatada no presente estudo.

Os resultados da massa da parte aérea das plantas no presente ensaio mostram que os isolados de *Trichoderma* IB 18/03 e IB 19/17 foram capazes de promover o crescimento das plantas. A diferença entre os experimentos de controle biológico e promoção de crescimento foi a duração, então pode-se sugerir que a interação entre *Trichoderma* e essa variedade de cana-de-açúcar dependa de mais tempo para se concretizar e proporcionar os devidos benefícios para a cultura, como a melhora no desenvolvimento.

No trabalho realizado por Singh *et al.* (2010) utilizando-se um isolado de *Trichoderma harzianum* em cana-de-açúcar, após quase um ano de cultivo, as plantas foram colhidas e os resultados demonstraram um aumento de 23% no rendimento da cultura, atribuídos ao aumento da absorção de nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio e alguns micronutrientes como cobre, manganês, ferro e zinco que foram também avaliados.

Algumas cepas de *Trichoderma* podem incrementar o aumento de cana-de-açúcar inclusive em condições de déficit hídrico, como mostrado no trabalho de Scudeletti *et al.* (2021), no qual utilizaram uma cepa comercial de *Trichoderma asperellum* em plantas de cana-de-açúcar e verificaram que o fungo promoveu aumento da taxa fotossintética, maior eficiência no uso da água, mudanças no metabolismo antioxidante das plantas, bem como maior

desenvolvimento radicular e dos colmos. Esses resultados validaram a cepa de *Trichoderma* utilizada como promotora de crescimento e protetora contra estresse abiótico em cana-de-açúcar.

5.2.3.2 Ensaio de avaliação de Trichoderma spp. no controle de M. javanica em cana-de-açúcar, em casa de vegetação - I

Como pode ser observado na Tabela 9, houve diferença estatística quanto a massa seca da parte aérea das plantas de cana-de-açúcar (MMSPA) e na massa de matéria fresca das raízes (MMFR). O isolado de *Trichoderma* IB 07/01 promoveu o crescimento das plantas mesmo na presença do nematoide e estatisticamente se igualou com o tratamento controle branco, no qual não foi inoculado nenhum microrganismo.

Em três tratamentos houve aumento da massa de raízes em comparação ao controle branco. Os tratamentos testemunha (inoculado somente com nematoides), IB 07/01 e IB 28/07 apresentaram maior peso de raízes com aumentos de até 108%.

Em relação ao número de perfilhos (NP), três isolados (IB 07/01, IB 18/03 e IB 49/15) se igualaram ao controle branco favorecendo o aumento do perfilhamento das plantas.

Quanto aos parâmetros número de folhas (NF) e população de nematoides total (NT) não houve diferença estatística entre os tratamentos.

A baixa população de nematoides nas plantas do tratamento testemunha levantou o questionamento sobre uma possível resistência da variedade de cana-de-açúcar utilizada. Mas este resultado confrontava os tratamentos que obtiveram fator de reprodução $>1,00$ (Figura 41), o que indica que as plantas não apresentam resistência ao nematoide inoculado.

Tabela 9. Médias da massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa de matéria fresca das raízes (MMFR) em gramas, número de folhas (NF), número de perfilhos (NP) e população de nematoides presentes em cana-de-açúcar, variedade IAC-SP 95-5000, infestadas ou não com *Meloidogyne javanica* e tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp. no ensaio de controle biológico I.

Tratamentos	MMSPA	MMFR	NF**	NP*	NT**
Controle Branco	15 a	35 b	4 a	3 a	0
Testemunha	14 b	54 a	4 a	1 b	1587 a
IB 07/01	16 a	73 a	4 a	3 a	3603 a
IB 18/03	13 b	46 b	4 a	3 a	5216 a
IB 28/07	13 b	65 a	4 a	1 b	5236 a
IB 43/14	13 b	36 b	4 a	2 b	2961 a
IB 48/06	13 b	41 b	4 a	1 b	3239 a
IB 49/15	11 b	30 b	4 a	2 a	3516 a
CV%	10	27	15	22	121

Os dados são médias de cinco repetições, e o valores originais foram apresentados. *Dados relativos a NP, foram transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$.

Médias seguidas da mesma letra minúscula dentro da coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

**De acordo com o teste F as médias não podem ser consideradas diferentes.

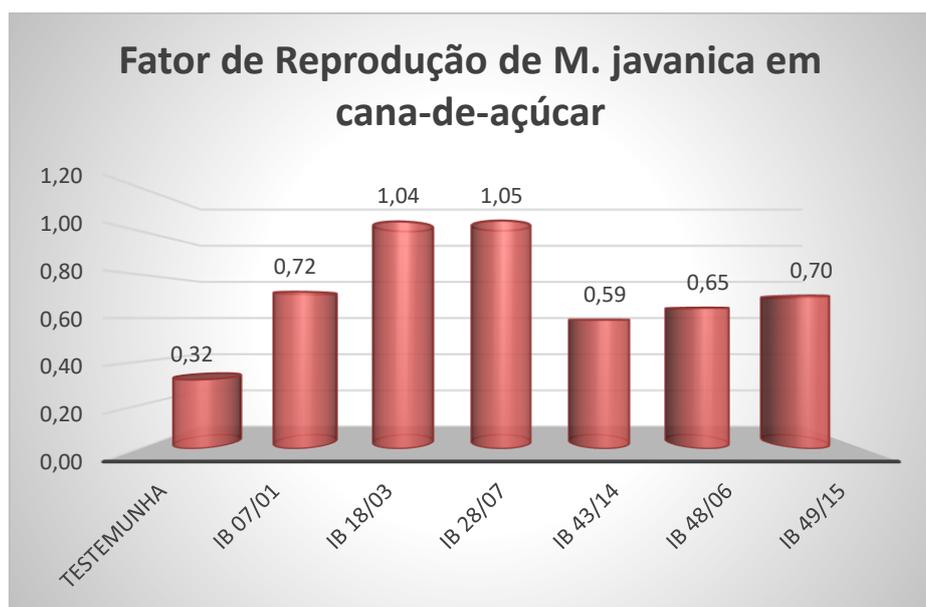


Figura 41. Fator de reprodução de *Meloidogyne javanica* em plantas de cana-de-açúcar variedade IAC-SP-95-5000, tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp.

Outro fato que poderia justificar os resultados obtidos seria a viabilidade do inóculo de *M. javanica* utilizado. Porém o controle positivo de tomateiros da variedade “Rutgers” utilizado como padrão de viabilidade apresentou alta infestação dos parasitos, confirmando a viabilidade do inóculo (Figura 42).

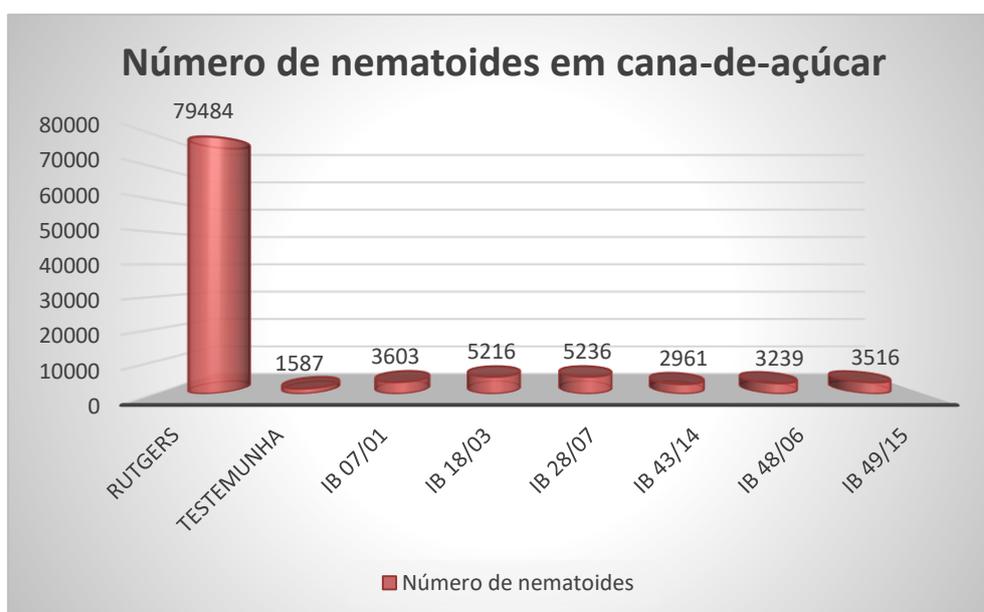


Figura 42. Número total de *Meloidogyne javanica* (ovos e J2) recolhidos de raízes de cana-de-açúcar tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp. e de tomateiros ‘Rutgers’ utilizados como padrão de viabilidade no ensaio de controle biológico I.

5.2.3.3 Ensaio de avaliação de *Trichoderma* spp. no controle de *M. javanica* em cana-de-açúcar, em casa de vegetação - II

Como pode ser observado na Tabela 10, houve diferença estatística quanto a massa seca da parte aérea (MMSPA) das plantas de cana-de-açúcar. Os isolados IB 07/01 e IB 43/14 favoreceram o crescimento da parte aérea mesmo na presença dos fitoparasitos. Esses isolados conferiram 34 e 63% de aumento nas plantas de cana-de-açúcar (Figura 43), respectivamente. O controle químico prejudicou o crescimento das plantas com um déficit de 37% em comparação com o tratamento testemunha inoculado somente com os nematoides. Em relação a massa de matéria fresca das raízes não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Os isolados IB 49/15 e IB 48/06 juntamente com o controle químico apresentaram redução no número de ovos de *M. javanica* no sistema radicular das plantas, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos com valores de 31, 64 e 89% de diminuição em relação ao tratamento testemunha (Figura 44).

Tabela 10. Médias da massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa de matéria fresca das raízes (MMFR) em gramas, número de ovos, número de juvenis de segundo estágio e população de nematoides totais (NT) presentes em cana-de-açúcar, variedade IAC-SP 95-5000, infestadas ou não com *Meloidogyne javanica* e tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp. no ensaio de controle biológico II.

Tratamentos	MMSPA*	MMFR*	Nº Ovos*	Nº J2*	NT*
Controle Branco	34 b	91 a	0	0	0
Testemunha	35 b	100 a	1382 b	2033 a	3414 b
Controle Químico	22 c	80 a	146 c	169 b	315 c
IB 07/01	47 a	129 a	5101 a	1987 a	7088 a
IB 18/03	30 b	100 a	5563 a	2014 a	7576 a
IB 28/07	42 b	114 a	2611 b	2205 a	4817 a
IB 43/14	58 a	100 a	1726 b	1103 a	2829 b
IB 48/06	13 c	59 a	495 c	2048 a	2543 b
IB 49/15	32 b	94 a	950 c	1006 a	1956 b
CV%	19	17	70	42	47

Os dados são médias de sete repetições, e o valores originais foram apresentados. *Os dados foram transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$ para análise estatística.

Médias seguidas da mesma letra minúscula dentro da coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

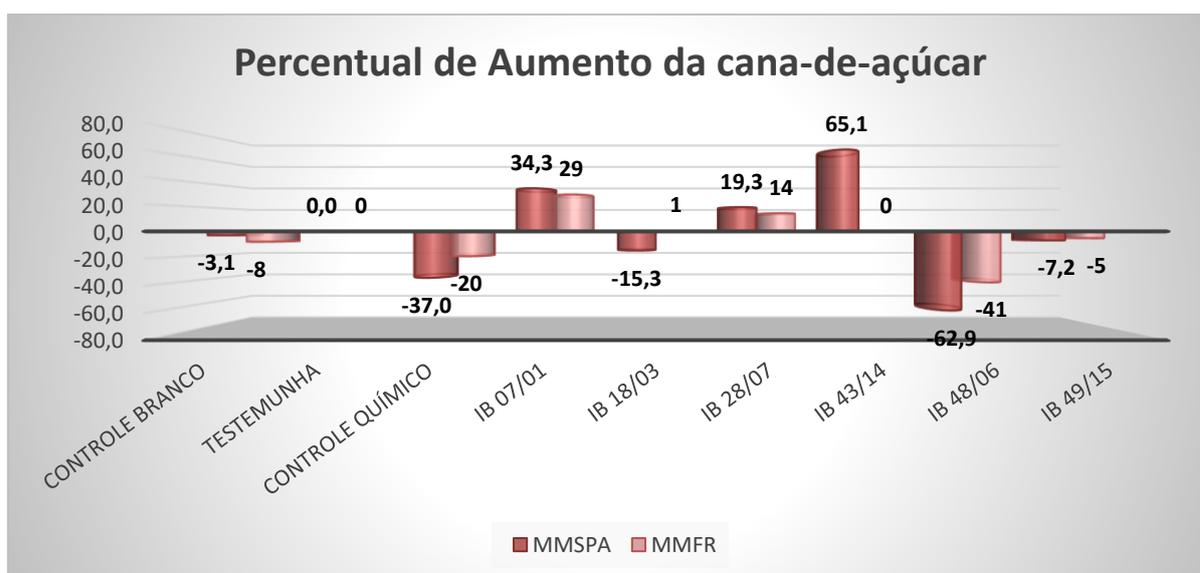


Figura 43. Porcentagem de aumento da massa de matéria seca da parte aérea e massa de matéria fresca de raízes de plantas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000, inoculadas com *Meloidogyne javanica*, tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* ou Carbofuram no ensaio de controle biológico II.

Em relação aos juvenis somente o controle químico reduziu o número de J2 nas plantas conforme dados da Tabela 10. Os outros tratamentos não apresentaram diferenças significativas.

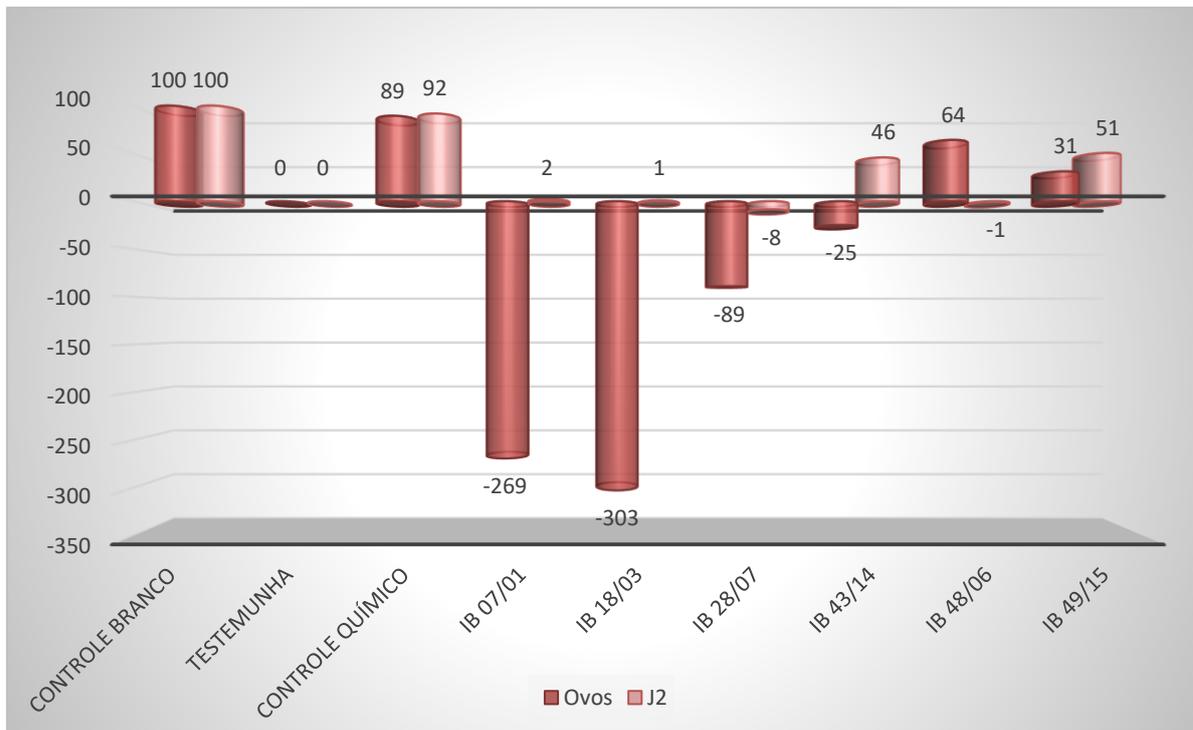


Figura 44. Porcentagem de redução de ovos e juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* extraídos de plantas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000, tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp. ou Carbofuran no ensaio de controle biológico II.

Na análise da população total de nematoides, o tratamento mais significativo foi o controle químico (Carbofuran), com redução de 91% dos fitoparasitos. Os isolados IB 43/14, IB 48/06 e IB 49/15 embora tenham reduzido a população de *M. javanica* não diferiram em relação às plantas do tratamento testemunha, e os para os demais tratamentos houve o favorecimento da multiplicação dos fitonematoides

Figura 45).

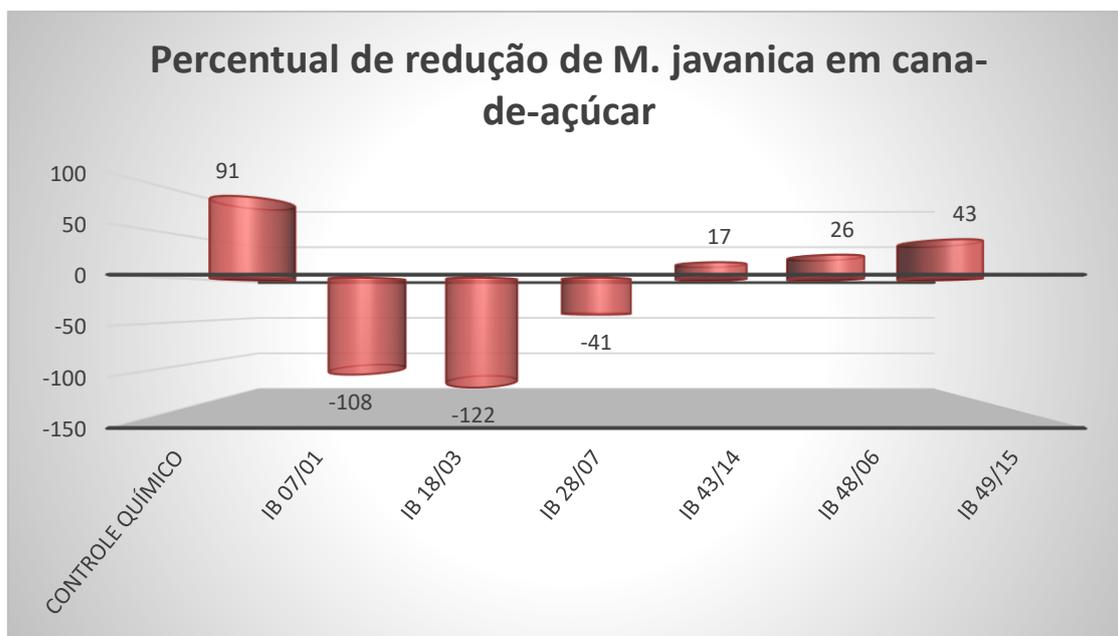


Figura 45. Porcentagem de redução da população total de *Meloidogyne javanica* extraídos de plantas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000, tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp. ou Carbofuram no ensaio de controle biológico II.

5.2.3.4 Ensaio de avaliação de *Trichoderma* spp. no controle de *M. javanica* em cana-de-açúcar, em casa de vegetação - III

Houve perda de muitas parcelas neste experimento. As plantas foram transportadas de São Paulo até Campinas para a montagem do ensaio, e isso ocasionou certo estresse às plantas e algumas não se recuperaram ao longo do ensaio. Portanto, a análise estatística foi realizada com diferentes números de repetições em cada tratamento.

Na Tabela 11 podem ser observados os resultados do experimento. Os tratamentos diferiram em relação a MMSPA das plantas. Nenhum isolado promoveu crescimento maior do que os observados nos tratamentos controle branco e testemunha, embora as cepas de *Trichoderma* IB 18/03, IB 28/07 e IB 49/15 tenham favorecido as plantas em 35, 21 e 26% de aumento em relação a testemunha, respectivamente (Figura 46).

No parâmetro MMFR os isolados citados acima se destacaram com aumentos significativos no peso do sistema radicular das plantas alcançando percentuais de 35, 27 e 19% quando comparados ao tratamento testemunha, inoculado somente com nematoides.

Tabela 11. Médias da massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa de matéria fresca das raízes (MMFR) em gramas, número de ovos, número de juvenis de segundo estágio e população de nematoides totais (NT) presentes em cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000, infestadas ou não com *Meloidogyne javanica* e tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp. no ensaio de controle biológico III.

Tratamentos	MMSPA*	MMFR*	Nº Ovos*	Nº J2*	NT*
Controle Branco	17,5 b	71,5 a	0	0	0
Testemunha	18,5 b	79,0 a	2245 b	269 a	2514 a
IB 07/01	9,77 a	38,6 a	4510 b	122 a	4632 a
IB 18/03	24,8 b	106,3 b	2269 b	237 a	2506 a
IB 28/07	22,3 b	100,2 b	2406 b	358 a	2764 a
IB 43/14	15,3 a	62,6 a	323 a	211 a	534 a
IB 48/06	20,3 b	78,5 a	4926 b	1085 b	6011 a
IB 49/15	23,3 b	93,9 b	5580 b	149 a	5729 a
CV%	12	28	77	56	73

Os valores originais foram apresentados. *Os dados foram transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$ para análise estatística.

Médias seguidas da mesma letra minúscula dentro da coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

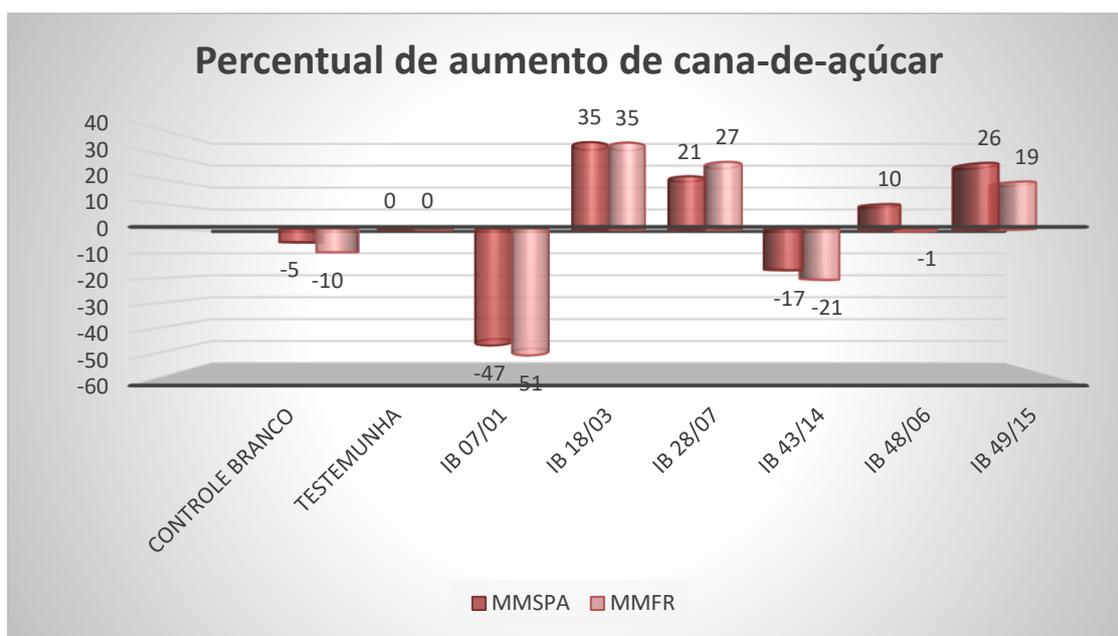


Figura 46. Percentagem de aumento da massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) e massa de matéria fresca de raízes (MMFR) de plantas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000, inoculadas com *Meloidogyne javanica*, e tratadas ou não com *Trichoderma* spp. no ensaio de controle biológico III.

Na análise dos parâmetros de controle biológico, o isolado IB 43/14 diferiu dos demais tratamentos reduzindo o número de ovos de *M. javanica* nas raízes das plantas de cana-de-açúcar em 86% (Figura 47).

Conforme a análise estatística não houve diferenças em relação ao número de J2 e população de nematoides total encontrados nas plantas. Observa-se que os valores percentuais

apresentaram diferenças expressivas, como redução de J2 de 55 e 45% pelos isolados IB 07/01 e IB 49/15 e redução de 72% (Figura 48) dos nematoides totais pelo isolado IB 43/14, quando comparados a testemunha. Possivelmente a alta variância dos dados dentro dos tratamentos seja a responsável pela falta de diferença significativa.

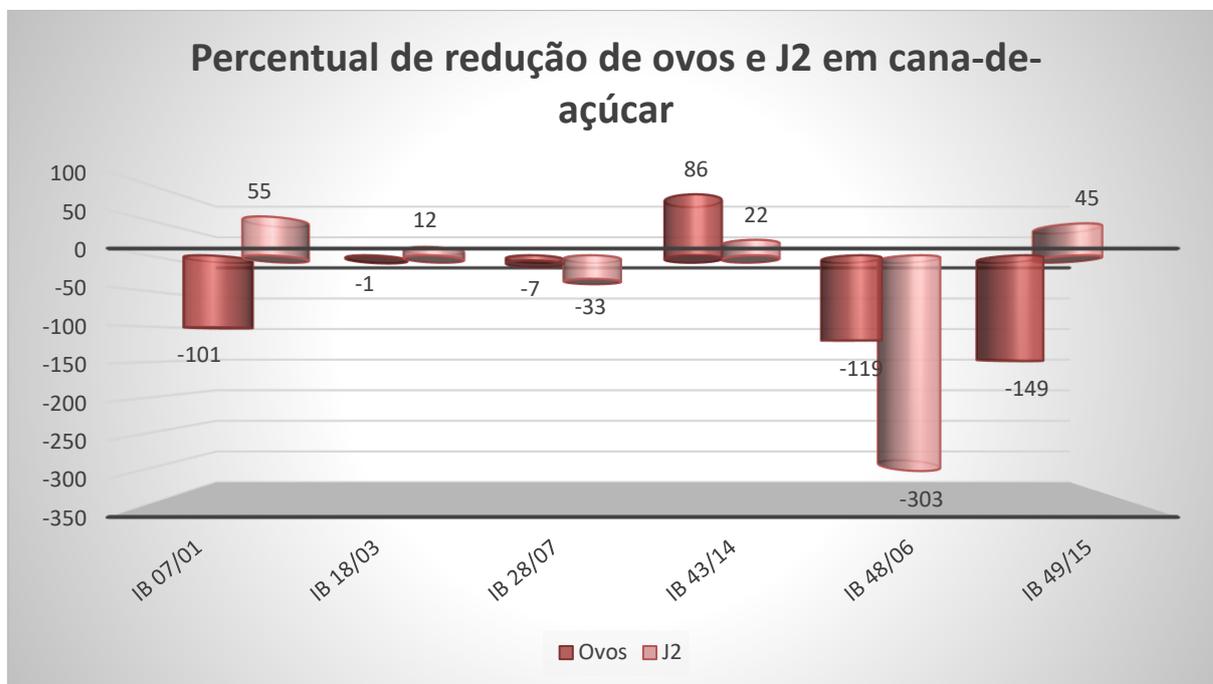


Figura 47. Porcentagem de redução de ovos e juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* extraídos de plantas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000, tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp. no ensaio de controle biológico III.

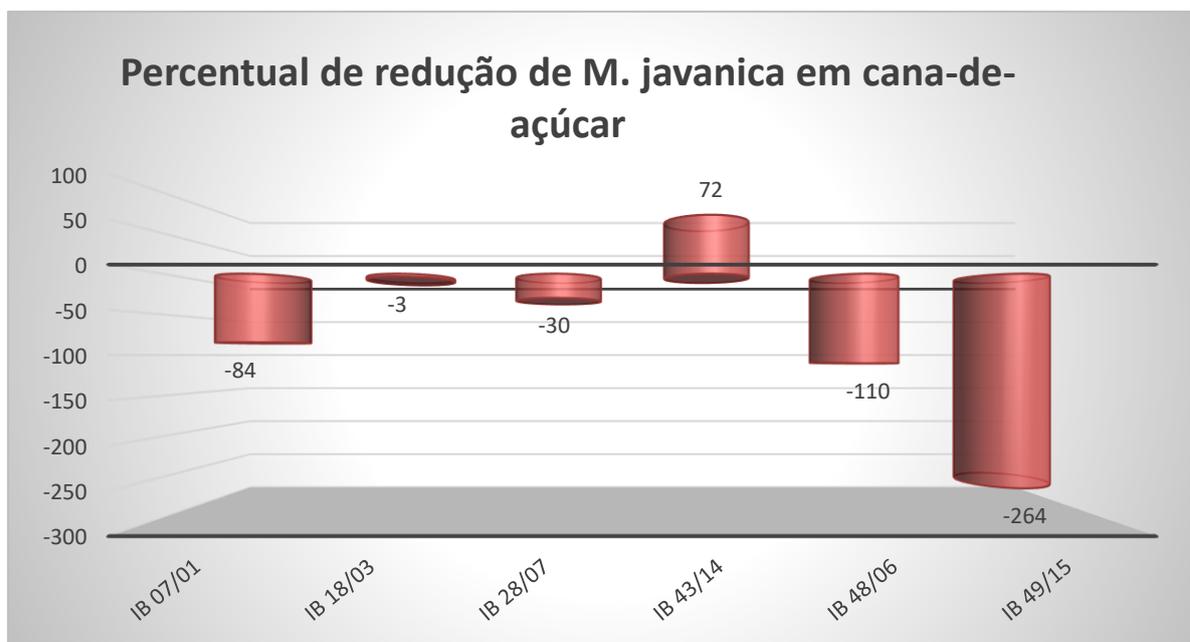


Figura 48. Porcentagem de redução da população total de *Meloidogyne javanica* extraídos de plantas de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000, tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp. no ensaio de controle biológico III.

Segundo os resultados dos ensaios de controle biológico apresentados, nenhum isolado de *Trichoderma* conseguiu reduzir a população de *M. javanica* das raízes das plantas de cana-de-açúcar. O tempo de permanência do primeiro experimento de 60 dias pode ter sido relativamente curto. E por essa razão os nematoides se multiplicaram pouco nas plantas. Outros estudos utilizando cana-de-açúcar em avaliações de suscetibilidade ou controle de nematoides permaneceram pelo menos 110 dias antes da colheita e avaliação (BARBOSA *et al.*, 2009; BELLÉ *et al.*, 2017). Por esta razão os demais experimentos foram conduzidos por um período maior.

O isolado IB 07/01 conseguiu auxiliar na promoção de crescimento em dois dos três ensaios realizados, demonstrando capacidade mesmo frente aos fitoparasitos. Essa característica de *Trichoderma* pode não ser de importância primária no biocontrole de doenças, mas juntamente com outras como aumento do crescimento da raiz, da resistência a estresses bióticos e abióticos e mudanças no estado nutricional da planta podem contribuir para tornar a planta mais resistente ou tolerante as doenças (HOWELL, 2003).

Nos ensaios realizados, o isolado IB 28/07 incrementou o peso das raízes em dois experimentos. Esse aumento pode ajudar a planta ao mesmo tempo que pode favorecer a multiplicação dos nematoides, visto que a oferta de sítios de alimentação se torna maior. Embora na prática, durante uma intensa presença de nematoides, o maior peso das raízes pode

ser devido a própria infestação, pois as plantas emitem raízes laterais para tentar melhorar a absorção de água e nutrientes (FREITAS *et al.*, 2012). Da mesma forma, como *Trichoderma* pode favorecer o aumento radicular das plantas, modificando a arquitetura do sistema com crescimento de raízes laterais (RAMÍREZ-VALDESPINO; CASAS-FLORES; OLMEDO-MONFIL, 2019), processo que pode ser mediado por auxinas e etileno (CONTRERAS-CORNEJO *et al.*, 2009).

Como já citado, nenhum isolado conseguiu reduzir a população de nematoides nas raízes de cana-de-açúcar nos três ensaios de controle biológico de *M. javanica* realizados. Porém, nos experimentos II e III pode-se observar redução no número de ovos. No entanto, no valor total (soma de ovos e J2) não houve controle do fitoparasito por parte das cepas avaliadas.

A reaplicação dos isolados poderia ter sido considerada, mas a duração dos experimentos não justificaria a incorporação de mais uma carga microbiana. No cultivo da cana-de-açúcar em campo, a aplicação de *Trichoderma* é feita no sulco de plantio, e após o primeiro corte é feita a reaplicação do fungo na chamada cana soca. Normalmente essas duas aplicações durante a safra são suficientes para incrementar o crescimento e proteger contra patógenos (SINGH *et al.*, 2010; SRIVASTAVA; SINGH; AWASTHI, 2006).

No controle biológico de nematoides nem sempre há resultados promissores como ocorrido em um ensaio realizado com cana-de-açúcar em condições de campo, na África do Sul. Os autores testaram diversos produtos biológicos a base de diferentes agentes como *Trichoderma*, *Bacillus* e *Paecilomyces* no controle de nematoides e promoção de crescimento das plantas. Foi verificado que nenhum dos produtos aplicados teve efeito consistente na abundância dos diferentes gêneros de nematoides e nem nos parâmetros de crescimento das plantas. O resultado foi atribuído ao tamponamento do ambiente solo, o qual é difícil de modificar e a fatores como condições ambientais, tipo de solo e interações com a microflora do solo residente, que promovem falta de consistência nos resultados dos agentes de controle de base biológica (BERRY; SPAULL; CADET, 2009).

Embora os resultados da presente pesquisa não tenham apresentado alta eficiência no controle de nematoides das galhas em cana-de-açúcar, a literatura nacional e internacional registra que alguns trabalhos com *Trichoderma* no controle de nematoides tem demonstrado bons resultados em outras culturas. Por exemplo, plantas de pepino tratadas com *Trichoderma harzianum* apresentaram redução de 48,9% na infecção por *M. incognita* após três aplicações durante o período de 60 dias (MASCARIN; FERREIRA; VIEIRA DE ARAÚJO, 2012).

Em um estudo para avaliar diferentes concentrações de *Trichoderma longibrachiatum* no controle de *M. incognita* em pepino, os autores obtiveram redução de até 78% do índice de galhas, até 76% menos J2 nas raízes e até 84% de diminuição nas massas de ovos (ZHANG; GAN; XU, 2015).

Trichoderma, *Azotobacter chroococcum* e *Bacillus subtilis* foram testados contra *M. incognita* em berinjela. Os resultados mostram que *Trichoderma* reduziu em 63,2% a população de nematoides após seis semanas de ensaio (FARFOUR; EL-ANSARY, 2013).

Em cultura de abacaxi, um isolado de *Trichoderma asperellum* reduziu a população de *M. javanica* diminuindo o índice de galhas em 81,8% e a quantidade de massa de ovos em 78,5%, mas outro isolado, *Trichoderma atroviride* não apresentou resultados de controle se igualando com o tratamento testemunha (KIRIGA *et al.*, 2018), assim como ocorreu com algumas cepas no segundo ensaio do presente estudo.

Interessante notar que alguns isolados obtiveram bom desempenho nos ensaios *in vitro*, mas os resultados não se repetiram quando a avaliação foi *in vivo*. Isso pode acontecer, pois o comportamento de uma espécie em cultura pura em laboratório pode não ter as mesmas características que a sua conduta em ambientes naturais (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

Outra peculiaridade está no fato de todos os isolados terem colonizado as raízes das plantas. Inicialmente, esta habilidade deveria conferir maior capacidade de atuação no controle biológico devido a competência rizosférica, porém nem todo bom colonizador radicular demonstra alta atividade de biocontrole (HOWELL, 2003).

Sendo assim, é natural que os resultados do presente estudo não tenham corroborado com maior parte das pesquisas de natureza semelhante. As várias cepas existentes podem apresentar diferenças quanto a variabilidade genética, capacidades antagônicas e até origem dos isolados pode influenciar no comportamento desses microrganismos. E a compatibilidade entre o isolado fúngico, a cultivar hospedeira, o alvo e o solo, vão desempenhar importante papel na proliferação e persistência do agente no sistema e na resposta desta interação (AL-HAZMI; TARIQJAVEED, 2016).

Vale ressaltar que, experimentos em casa de vegetação com solo autoclavado não refletem as condições encontradas no campo, onde o solo natural desempenha uma importante função na eficácia de qualquer agente de controle biológico (AL-HAZMI; TARIQJAVEED, 2016), portanto, deve-se analisar cautelosamente se o bioagente deve ser ou não descartado de um futuro ensaio de campo.

5.2.3.5 Ensaio de avaliação de *Trichoderma* spp. no controle de *M. javanica* em tomateiro, em casa de vegetação

Neste ensaio foram perdidos alguns tratamentos como o controle químico e o IB 07/01, além de perda de algumas repetições nos demais tratamentos. Portanto, a análise estatística foi realizada com número menor de repetições em alguns tratamentos.

Conforme os dados apresentados na Tabela 12 nenhum isolado de *Trichoderma* aumentou o crescimento dos tomateiros ‘Rutgers’ nos parâmetros MMSPA e MMFR.

Nas variáveis referentes ao controle biológico nenhum isolado reduziu o número de ovos ou de J2 nas raízes das plantas, pelo contrário, as cepas IB 18/03, IB 48/06 e IB 49/15 favoreceram a multiplicação dos nematoides nas raízes.

Nos demais parâmetros, como número total de nematoides, fator de reprodução, índice de galhas e índice de massa de ovos não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Tabela 12. Médias da massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa de matéria fresca das raízes (MMFR) em gramas, número de ovos, número de juvenis de segundo estágio, população de nematoides totais (NT), fator de reprodução (FR), índice de galhas (IG) e índice de massas de ovos (IMO) presentes em tomateiros ‘Rutgers’, no ensaio de controle biológico de *Meloidogyne javanica*.

Tratamentos	MMSPA	MMFR	Nº ovos	Nº J2	NT	FR	IG	IMO
Controle Branco	5,77 a	16,49 a	0	0	0	0	0,0	0,0
Testemunha	3,66 b	15,16 a	172.833 b	13.397 b	186.230 a	93 a	5,0 a	4,8 a
IB18/03	2,73 b	11,07 b	368.614 a	20.433 b	389.047 a	195 a	5,0 a	4,5 a
IB 28/07	3,11 b	16,43 a	194.525 b	19.842 b	214.367 a	107 a	4,8 a	4,8 a
IB 43/14	2,94 b	11,33 b	137.326 b	14.628 b	151.954 a	76 a	5,0 a	4,5 a
IB 48/06	3,61 b	18,67 a	521.606 a	49.445 a	571.051 a	286 a	4,7 a	4,0 a
IB 49/15	2,50 b	16,44 a	559.365 a	41.255 a	600.620 a	300 a	5,0 a	4,5 a
CV%	8,8	10,8	38	28,4	39,2	42,6	3,08	8,3

Os valores originais foram apresentados. *Os dados foram transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$ para análise estatística.

Médias seguidas da mesma letra minúscula dentro da coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Todos os tratamentos avaliados neste experimento apresentaram crescimento de parte aérea semelhante ao das plantas testemunhas, inoculadas somente com *M. javanica*, ou seja, os fungos não foram capazes de ajudar no desenvolvimento vegetal na presença do patógeno. Para a variável peso radicular, além de não promover aumento em relação a testemunha, os isolados IB 18/03 e IB 43/14 ainda resultaram em redução do peso das raízes.

No trabalho realizado por Tucci et al. (2011) cinco variedades distintas de tomateiro foram inoculadas com duas linhagens comerciais de *Trichoderma*. Os autores avaliaram o crescimento e a indução de resistência ao patógeno *Botrytis cinerea*, separadamente, além da expressão de genes relacionados com a defesa da planta. Os resultados demonstraram que tanto a promoção de crescimento quanto a indução de resistência estavam relacionadas com a variedade de tomate utilizada, ou seja, que a extensão da estimulação de crescimento é amplamente dependente do genótipo do tomate, sugerindo que a resposta a *Trichoderma* está sob controle genético.

Assim como não houve incremento nos parâmetros físicos das plantas, não houve redução da população de nematoides. Estes resultados podem indicar que os fungos não conseguiram colonizar a rizosfera, não produziram compostos antagônicos em quantidade suficiente para afetar os fitoparasitos ou não produziram compostos supressivos em condições de casa de vegetação (MEYER *et al.*, 2000).

Diferentes cepas de *Trichoderma* podem apresentar diferentes comportamentos na mesma cultura, incrementando ou reduzindo os aspectos físicos das plantas e o nível de infestação de nematoides (RADWAN *et al.*, 2012).

Na pesquisa desenvolvida por Almeida (2020) foram avaliados quatorze cepas de *Trichoderma* para o controle de *M. enterolobii* em tomate. Nenhum isolado conseguiu promover o crescimento das plantas, e não houve controle dos fitoparasitos. A autora notou que alguns isolados favoreceram a multiplicação dos nematoides nas plantas.

Em contrapartida, os resultados relatados por Leonetti et al. (2017) se mostraram bem promissores no controle de *M. incognita* em tomate. As duas cepas de *T. harzianum* avaliadas colonizaram o sistema radicular, promoveram o crescimento das plantas e inibiram o desenvolvimento e a reprodução dos nematoides.

De acordo com os resultados exibidos pode-se sugerir que não houve uma boa interação entre os isolados de *Trichoderma* utilizadas e o tomateiro 'Rutgers', por isso não foi observado nenhum benefício para as plantas em nenhuma das variáveis consideradas para a avaliação.

5.2.3.6 Avaliação da viabilidade de ovos de *M. javanica* provenientes de raízes de cana-de-açúcar tratadas ou não com *Trichoderma* spp.

Durante a avaliação do terceiro ensaio de controle biológico de *M. javanica* em cana-de-açúcar foi observado que muitos ovos provenientes de plantas tratadas com os isolados de

Trichoderma estavam com aparência incomum, com coloração amarronzada (Figura 49). O aspecto estava totalmente diferente dos ovos extraídos das plantas não tratadas. Portanto, foi decidido que o inóculo extraído das plantas do experimento de controle biológico III em cana-de-açúcar seria inoculado em plantas de tomate ‘Rutgers’ (altamente suscetíveis a *M. javanica*), no intuito de avaliar *in vivo* a viabilidade dos ovos e juvenis.

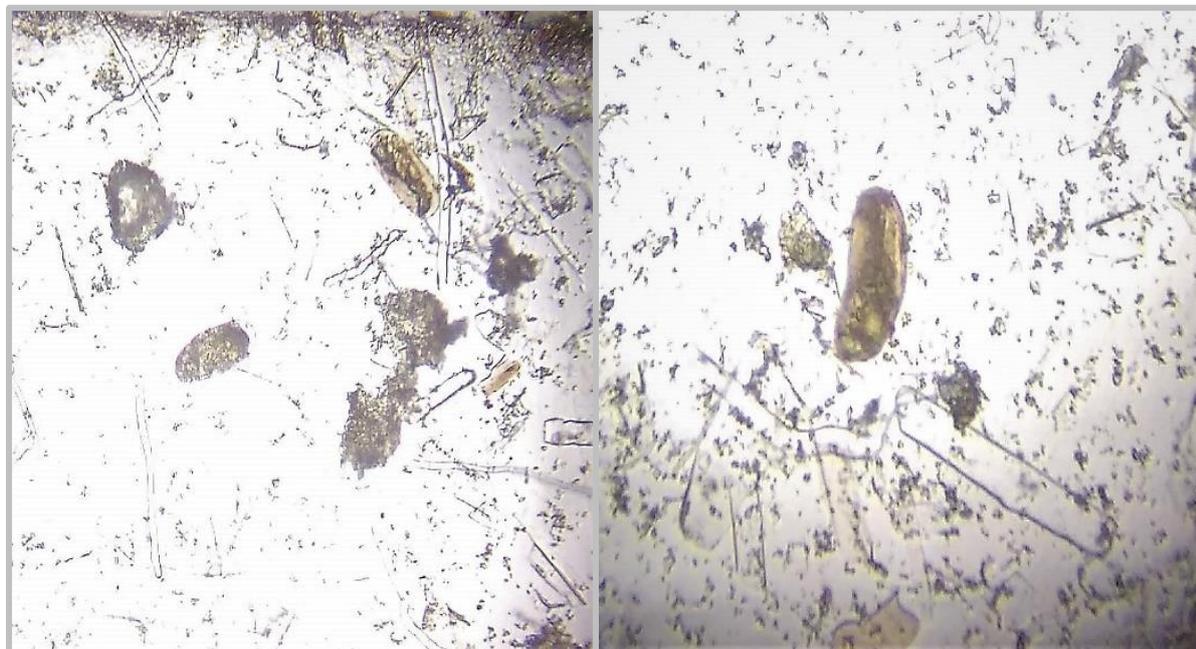


Figura 49. Aparência dos ovos de *Meloidogyne javanica* extraídos de plantas de cana-de-açúcar do ensaio de controle biológico III. (Fonte: A autora)

Os resultados mostram diferenças expressivas nos valores observados em todos os parâmetros avaliados, e de acordo com a análise estatística as diferenças entre as médias foram consideradas significativas para fatores avaliados.

Em relação a massa seca da parte aérea e massa fresca das raízes dos tomateiros não houve diferença entre os tratamentos.

As parcelas que receberam o tratamento com os isolados IB 07/01 e IB 43/14 apresentaram estimativa de redução populacional de *M. javanica* de 95,6 e 92,0%, respectivamente. Ainda, esses dois isolados foram os que proporcionaram os menores fatores de reprodução (respectivamente $FR=0,2$ e $0,4$), 13 a 26 vezes menor do que a testemunha e menor índice de galhas, indicando controle dos nematoides (Tabela 13). Os tratamentos IB 28/07, IB 48/06 e IB 49/15 também reduziram o número de nematoides quando comparados com a testemunha, com percentuais de 76,9, 56,8 e 65,3%, respectivamente.

Quanto ao índice de massa de ovos não houve diferença entre os tratamentos. Já para o índice de galhas houve redução em cinco dos seis tratamentos com *Trichoderma* avaliados quando comparados a testemunha.

Tabela 13. Médias da massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa de matéria fresca das raízes (MMFR) em gramas, número de ovos, número de juvenis de segundo estágio, população de nematoides totais (NT), eficiência de controle (E%), índice de galhas (IG), índice de massas de ovos (IMO) e fator de reprodução (FR) de *Meloidogyne javanica*, presentes em tomateiros 'Rutgers', inoculados com uma população de nematoides proveniente de cana-de-açúcar tratada ou não com *Trichoderma* spp.

Tratamentos	MMSPA*	MMFR*	Nº Ovos*	Nº J2*	NT*	E%	IG*	IMO*	FR*
Testemunha	3,0 a	3,3 a	5890 a	337 a	6227 a	0	2,3 a	2,0 a	5,2 a
IB 07/01	1,7 a	3,6 a	260 c	13 c	273 c	95,6	0,7 c	0,7 a	0,2 c
IB 18/03	2,0 a	3,9 a	6120 a	117 b	6237 a	-0,2	2,0 a	1,7 a	5,2 a
IB 28/07	1,8 a	4,2 a	1333 b	103 b	1437 b	76,9	1,0 b	1,0 a	1,2 b
IB 43/14	1,8 a	4,1 a	487 c	13 c	500 c	92	0,7 c	0,7 a	0,4 c
IB 48/06	1,6 a	3,2 a	2440 b	250 b	2690 b	56,8	1,3 b	1,3 a	2,2 b
IB 49/15	1,9 a	5,4 a	2047 b	117 b	2163 b	65,3	1,7 b	1,7 a	1,8 b
CV%	19	17,6	75	76	75		24,3	26	46,7

Os valores originais foram apresentados. *Os dados foram transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$ para análise estatística.

Médias seguidas da mesma letra minúscula dentro da coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste t (LSD) a 5% de probabilidade.

Observando os dados percentuais do peso fresco das raízes nota-se que dentre os seis tratamentos avaliados, cinco apresentaram aumento nas raízes de tomate quando comparados com o tratamento testemunha, chegando até 60% de incremento pelo isolado IB 49/15 embora a análise estatística não tenha apontado diferença (Figura 50).

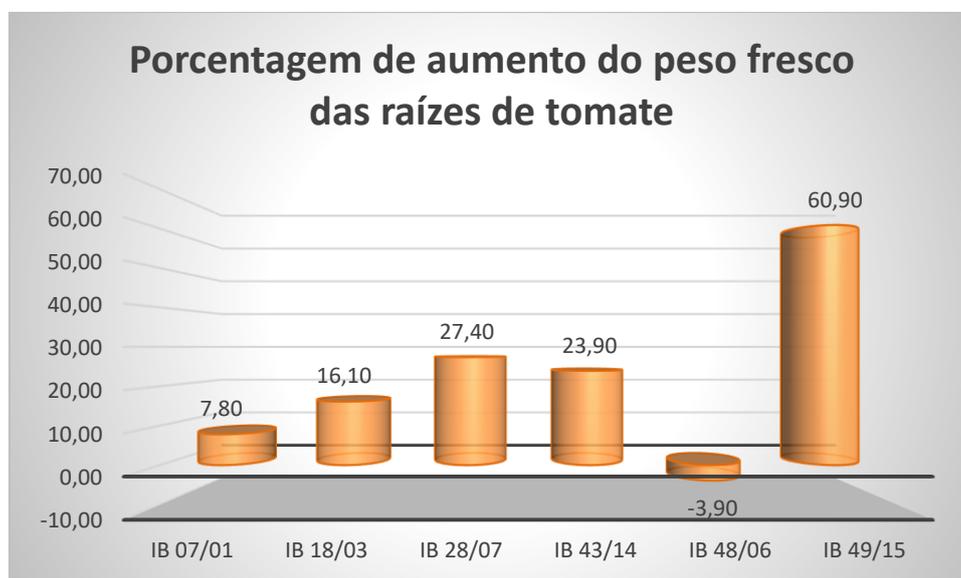


Figura 50. Porcentagem de aumento da massa de matéria fresca de raízes (MMFR) de tomateiro ‘Rutgers’ inoculados com *Meloidogyne javanica* proveniente de raízes de cana-de-açúcar tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp.

Quanto a multiplicação dos ovos produzidos em plantas de cana-de-açúcar tratadas com *Trichoderma* quando inoculados em tomateiro, os resultados mostram que houve redução do número de nematoides em até 95,6% (IB07/01). Com exceção de um tratamento, os demais apresentaram no mínimo 56,8% de redução da população do fitoparasito nas raízes de tomate (Figura 51).

Na Figura 52 podemos observar que os valores referentes ao número de ovos e J2 também se mostram expressivos, com percentuais de até 96% de redução (IB 07/01). Como os dados se mostram muito promissores novos experimentos devem ser conduzidos para verificar e validar esses resultados.

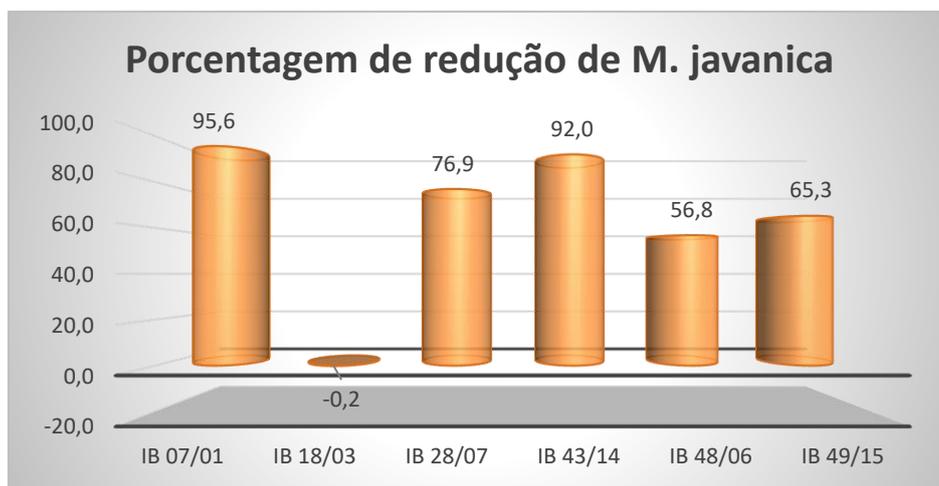


Figura 51. Porcentagem de redução da população de *Meloidogyne javanica* em tomateiro ‘Rutgers’ inoculados com suspensão de ovos e J2 proveniente de raízes de cana-de-açúcar tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp.

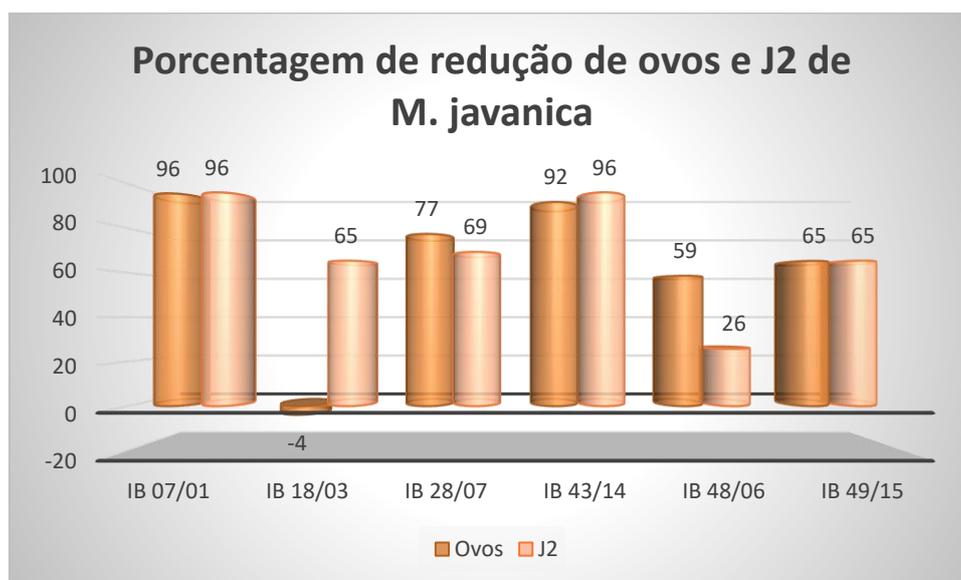


Figura 52. Porcentagem de redução de ovos e juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* em tomateiro ‘Rutgers’ infectados com inóculo proveniente de raízes de cana-de-açúcar tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp.

Alguns trabalhos têm demonstrado a capacidade de *Trichoderma* no controle de nematoides em tomateiro. Por exemplo, nos estudos realizados por Medeiros *et al.* (2017) foi verificado que *Trichoderma atroviride* consegue induzir resistência contra *M. javanica* em tomate. E que a proteção conferida pelo fungo é transferida para as futuras gerações da planta, afetando a infectividade e a reprodução do nematoide.

De forma semelhante, foi conduzida uma pesquisa que mostrou que um isolado de *Trichoderma harzianum* induziu resistência contra *M. incognita* em tomateiro, e que a colonização das raízes do tomate pelo fungo, impediu o desempenho do nematoide, prejudicando a invasão, a formação de galhas e a reprodução. O estudo demonstrou que *Trichoderma* inicia defesas dependentes de ácido salicílico e ácido jasmônico nas raízes da planta, e que a resposta a esses hormônios no ataque do nematoide é adaptativa ao estágio de parasitismo (MARTÍNEZ-MEDINA *et al.*, 2017).

Parece improvável que os isolados de *Trichoderma* tenham induzido resistência nas plantas de cana-de-açúcar previamente inoculadas no ensaio de controle de *M. javanica* 3, pois não houve redução da população nas raízes da cana, como mostram os dados da Tabela 11. O que foi observado foi um efeito deletério na viabilidade dos ovos produzidos dentro dessas raízes, o que gerou uma baixa infectividade dos nematoides quando inoculados em tomateiros suscetíveis.

De acordo com os resultados obtidos, esses dados sugerem que os isolados de *Trichoderma* conseguem de alguma forma afetar as gerações futuras de *M. javanica*. Nos ensaios anteriores não foi constatado controle biológico imediato nas plantas de cana-de-açúcar, mas os valores do presente ensaio levantam o questionamento sobre a influência dos antagonistas diretamente sobre as fêmeas ou ovos, que levaram a uma redução na futura população dos nematoides. E este é o primeiro relato de uma ocorrência dessa natureza com o uso de *Trichoderma* em cana-de-açúcar.

Essa influência na viabilidade de ovos pode ser atribuída a danos fisiológicos nos nematoides que podem ser causados por exposição a compostos voláteis emitidos pelos antagonistas, podendo ser verificados pela infectividade e reprodução dos fitoparasitos, que fica seriamente prejudicada (PIMENTA *et al.*, 2017).

Em ensaios conduzidos com tomateiros inoculados com *M. incognita* e tratados com *Trichoderma*, foi verificado que a infecção pelos J2 da segunda geração de origem “natural”, ou seja, provenientes da reprodução dentro do vaso e não da inoculação, foi restrita. Isso indicaria que o tratamento com os isolados de *Trichoderma* promove uma proteção duradoura contra o ataque dos nematoides (LEONETTI *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que *Trichoderma* pode ser uma boa ferramenta no controle de *M. incognita* e *M. javanica* em cana-de-açúcar, não pela mortalidade imediata, mas por baixar o nível populacional das futuras gerações, reduzindo os danos a cultura. A utilização dos isolados certos pode ser uma estratégia a ser utilizada na rotação de

culturas dentro do manejo integrado, por exemplo. A multiplicação dos nematoides em uma cultura menos suscetível tratada com *Trichoderma* pode ser reduzida a um nível que não provoque tantos danos na cultura de interesse.

Ao longo de toda a pesquisa foi possível observar o comportamento dos isolados nos ensaios realizados (Anexo) onde é notável que algumas linhagens entregaram algum benefício para a planta na ausência dos nematoides enquanto outras se mostraram eficazes durante a interação com a planta e os fitoparasitos. Dessa forma, pode-se sugerir que o emprego das melhores linhagens em consórcio poderia resultar em maiores ganhos para a planta devido a maior bioatividade (STEWART; HILL, 2014).

Alguns estudos revelam que a utilização de misturas de isolados de *Trichoderma* podem favorecer as plantas inoculadas com diversos incrementos biométricos. Em uma pesquisa com a cultura do grão de bico foi empregada uma mistura de três isolados de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride* e *T. virens*) que resultou em aumento na altura e número de ramos da planta, aumento na absorção de nitrogênio e absorção máxima de fósforo (RUDRESH; SHIVAPRAKASH; PRASAD, 2005).

Outra forma de utilização visando maiores benefícios para a cultura alvo seria a mistura de *Trichoderma* com outros microrganismos antagonistas. Esse tipo de consórcio busca um efeito sinérgico entre os antagonistas de forma a fornecer um nível mais consistente de promoção de crescimento e maior espectro de atividade aumentando assim o potencial de sucesso na interação com a planta (STEWART; HILL, 2014).

Porém, a compatibilidade entre os isolados deve ser avaliada pois há casos em que o consórcio de isolados de *Trichoderma* não alcança o resultado esperado gerando efeitos maléficis para a planta ou menor controle dos patógenos alvo. No trabalho realizado por Lucon e colaboradores (2009) para o controle de *Rhizoctonia solani* em pepineiro foram aplicadas várias combinações de cinco isolados de *Trichoderma* e somente duas combinações resultaram em maior controle da doença.

Ensaio com consórcio de *Trichoderma* com outras espécies fúngicas não demonstraram melhoria nos parâmetros biométricos da cana-de-açúcar, embora tenha refletido efeitos benéficos em milho e soja quanto a massa seca das raízes (FARIAS *et al.*, 2018). Isso reforça a importância da boa interação entre a planta e fungo para que as melhorias no desenvolvimento vegetal possam ser observadas.

Os resultados obtidos no presente estudo reforçam que a utilização de *Trichoderma* é uma alternativa ecologicamente consciente ao uso de nematicidas químicos, pois além de causar

redução populacional dos nematoides ainda proporciona outros benefícios para as plantas, tornando o cultivo mais protegido e produtivo.

Por esta razão é tão importante selecionar de forma correta os bioagentes que serão utilizados em campo. A interação com a planta hospedeira e o patógeno/parasito alvo pode ser completamente diferente dependendo da cepa empregada, visto que cada isolado é um indivíduo com características e comportamentos únicos, que além dos traços intrínsecos estão sob a influência do ambiente externo.

6 CONCLUSÕES

- Os isolados de *Trichoderma* IB 01/13, IB 43/14, IB 48/06 (*T. asperelloides*), IB 37/01 (*T. orientale*), IB 30/07 (*T. lentiforme*), IB 28/15 (*T. endophyticum*), IB 28/07 (*T. strigosum*), IB 22/08 (*T. endophyticum*) e IB 18/03 (*T. koningiopsis*) conseguem parasitar ovos de *M. incognita in vitro*;

- Nenhum filtrado fúngico apresentou potencial na mortalidade de ovos de *M. incognita* e *M. javanica*;

- Os metabólitos voláteis emitidos por todos os isolados de *Trichoderma* avaliados reduzem a taxa de eclosão de J2 de *M. incognita in vitro* e os metabólitos das cepas IB 07/01, IB 18/03, IB 19/17, IB 22/08, IB 28/07, IB 43/14, IB 48/06, IB 51/09 e IB 32/03 causam mortalidade nos J2 dos nematoides em condições *in vitro*;

- Todos os isolados de *Trichoderma*, exceto o IB 37/01, podem degradar quitina em meio sólido;

- Os isolados de *Trichoderma* IB 28/15, IB 37/01, IB 38/11, IB 43/14, IB 48/06, IB 49/15 e IB 51/09 apresentam atividade enzimática de quitinase;

- Os isolados de *Trichoderma* IB 18/03 e IB 19/17 promovem o crescimento da variedade de cana-de-açúcar IAC-SP-95-5000 em condições de casa de vegetação;

- Todos os isolados avaliados conseguem colonizar o sistema radicular da variedade de cana-de-açúcar IAC-SP-95-5000;

- As cepas IB 07/01, IB 18/03, IB 19/17, IB 22/08 e IB 38/11 reduzem a população de *M. incognita* em raízes de cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000.

- Nenhum isolado de *Trichoderma* foi capaz de reduzir a população de *M. javanica* em cana-de-açúcar, variedade IAC-SP-95-5000 e tomateiro 'Rutgers'.

- Os isolados IB 07/01 e IB 43/14 podem afetar a reprodução de *M. javanica* reduzindo o nível de infestação das futuras gerações, provando serem excelente ferramenta a ser utilizada no manejo integrado de nematoides de galha.

REFERÊNCIAS

- ABAD, P. *et al.* Invasion, feeding and development. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (org.). **Root-Knot Nematodes**. Oxfordshire: CABI, 2009. p. 163–181.
- ABD-ELGAWAD, M. M. M.; ASKARY, T. H. Fungal and bacterial nematicides in integrated nematode management strategies. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, [s. l.], v. 28, n. 1, 2018.
- AFFOKPON, A. *et al.* Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. **Soil Biology and Biochemistry**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 600–608, 2011. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S00380717110004505>. Acesso em: 21 ago. 2013.
- AGRAWAL, T.; KOTASTHANE, A. S. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. **SpringerPlus**, [s. l.], v. 1, n. 73, p. 10, 2012.
- AGROSTAT. **Estatísticas de Comercio Exterior do Agronegócio Brasileiro**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/AGROSTAT.html>. Acesso em: 25 fev. 2021.
- 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**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 288–292, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.007>.
- ALFANO, G. *et al.* Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. **Phytopathology®**, [s. l.], v. 97, n. 4, p. 429–437, 2007. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-97-4-0429>.
- ALMEIDA, S. F. de. **Avaliação de linhagens de *Trichoderma* na promoção de crescimento de raízes de tomateiro e no controle de *Meloidogyne enterolobii***. 2020. 104 f. - Dissertação de mestrado em fitopatologia. Universidade de Brasília, Brasília. 104 p., [s. l.], 2020.
- ALTOMARE, C. *et al.* Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 65, n. 7, p. 2926–2933, 1999. Disponível em: <http://aem.asm.org/content/65/7/2926>.
- BAE, H. *et al.* Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 336–351, 2011.
- BAILEY, B. A. *et al.* Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. **Planta**, [s. l.], v. 224, n. 6, p. 1449–1464, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-006-0314-0>.
- BARBOSA, B. F. F. *et al.* Avaliação comparativa da agressividade de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* à variedade SP 911049 de cana-de-açúcar. **Nematologia Brasileira**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 243–247, 2009.
- BARROS, A. C. B.; MOURA, R. M. de; PEDROSA, E. M. R. Aplicação de terbufos no controle de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *Pratylenchus zae* em cinco variedades de cana-de-açúcar no Nordeste. Parte 1 - Efeitos na cana planta. **Nematologia Brasileira**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 73–78, 2000.

- BARROS, A. C. B.; MOURA, R. M. de; PEDROSA, E. M. R. Influência da aplicação conjunta de nematicida com calcário, cupinicida ou torta de filtro na eficiência do nematicida em cana-de-açúcar. *In: ANAIS DO XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA*. Petrolina: Embrapa, 2003. p. 236.
- BELLÉ, C. *et al.* Reaction of sugarcane genotypes to parasitism of *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus zaeae*. **Revista Caatinga**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 530–535, 2017.
- BENÍTEZ, T. *et al.* Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 249–260, 2004.
- BERNARD, G. C.; EGNIN, M.; BONSI, C. The impact of plant-parasitic nematodes on agriculture and methods of control. *In: MOHAMMAD MANJUR SHAH (org.). Nematology - Concepts, Diagnosis and Control*. [S. l.]: Intech, 2017. p. 122–151.
- BERRY, S. D.; CADET, P.; SPAULL, V. W. Nematode Pests of Sugarcane. *In: AL., H. F. et (org.). Nematology in South Africa: A View from the 21st Century*. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 261–284. *E-book*. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-44210-5_11.
- BERRY, S. D.; SPAULL, V. W.; CADET, P. Field assessment of biologically-based control products against nematodes on sugarcane in South Africa. **African Plant Protection**, [s. l.], v. 15, p. 1–12, 2009.
- BIOSEV S. A. **Formulário de referência**. [S. l.]: BIOSEV - A Louis Dreyfus Commodities Company, 2013. Disponível em: http://ri.biosev.com/biosev/web/conteudo_pt.asp?tipo=30903&id=0&idioma=0&conta=28&submenu=0&img=0&ano=2013. Acesso em: 13 fev. 2015.
- BIOSEV S.A. **Formulário de referência**. [S. l.]: BIOSEV - A Louis Dreyfus Commodities Company, 2021.
- BIRD, A. F.; MCCLURE, M. A. The tylenchid (Nematoda) egg shell: Structure, composition and permeability. **Parasitology**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 19–28, 1976.
- BONONI, L. *et al.* Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.
- BUI, H. X.; DESAEGER, J. A. Volatile compounds as potential bio-fumigants against plant-parasitic nematodes – a mini review. **Journal of nematology**, [s. l.], v. 53, p. 1–12, 2021. Disponível em: https://www.exeley.com/journal_of_nematology/doi/10.21307/jofnem-2021-014. Acesso em: 28 jan. 2022.
- CAMPOS, V. P.; PINHO, R. S. C. de; FREIRE, E. S. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. **Ciênc. agrotec.**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 525–535, 2010.
- CARNEIRO, R. M. D. G. Princípios e tendências do controle biológico de nematóides com fungos nematófagos. **Pesq. Agropec. bras.**, [s. l.], v. 27, p. 113–121, 1992.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; GOMES, C. B. Metodologia e testes de patogenicidade de *Paecilomyces lilacinus* e *P. fumosoroseus* em ovos de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 66–75, 1993.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Brasília: [s. n.], 2014. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/>.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Brasília: [s. n.], 2021.

Disponível em: <https://www.conab.gov.br/>.

CONAB. Comercialização no Mercado Mundial, Tomate:. **Compêndio de estudos Conab**, [s. l.], v. 21, p. 23–38, 2019.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A. *et al.* Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. **FEMS Microbiology Ecology**, [s. l.], v. 92, n. 4, p. 1–17, 2016. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1093/femsec/fiw036>.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A. *et al.* The root endophytic fungus *Trichoderma atroviride* induces foliar herbivory resistance in maize plants. **Applied Soil Ecology**, [s. l.], v. 124, n. April, p. 45–53, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.10.004>.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A. *et al.* *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant physiology**, [s. l.], v. 149, n. 3, p. 1579–1592, 2009.

Disponível em:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2649400&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 12 ago. 2013.

COOLEN, W. A.; D´HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. [S. l.]: State Nematology and Entomology Research Station, 1972.

CUMAGUN, C. J. R.; MOOSAVI, M. R. Significance of biocontrol agents of phytonematodes. *In*: ASKARY, T. H.; MARINELLI, P. R. P. (org.). **Biocontrol agents of phytonematodes**. [S. l.]: CAB International, 2015. p. 50–78.

DE LEY, P.; BLAXTER, M. Systematic position and phylogeny. *In*: LEE, D. L. (org.). **The Biology of Nematodes**. London: CRC Press, 2002. p. 1–49.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. **Transactions of the British Mycological Society**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 41-IN4, 1971. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80078-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80078-5).

DIAS-ARIEIRA, C. R. *et al.* Reação de variedades de cana-de-açúcar aos nematoides-das-galhas*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 34, n. 4, p. 198–203, 2010.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Aplicação de nematicidas em soqueiras em função da época de corte do canavial. *In*: VASCONCELOS, A. C. M. de; DINARDO-MIRANDA, L. L. (org.). **Dinâmica do desenvolvimento radicular da cana-de-açúcar e implicações no controle de nematoides**. 2. ed. Americana: Adonis, 2011. p. 56.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Nematóides e pragas de solo em cana-de-açúcar. **Encarte do Informações Agrônomicas**, [s. l.], n. 110, p. 25–32, 2005.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; MIRANDA, I. D. Nematóides. *In*: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (org.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: IAC, 2008. p. 405–435.

DJAIN, C. *et al.* Acetic acid: A selective nematicidal metabolite from culture filtrates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson and *Trichoderma longibrachiatum* Rifai. **Nematologica**, [s. l.], v. 37, p. 101–112, 1991.

DOMENICO, P. *et al.* Endophytic ability of *Trichoderma* spp. as inoculants for ornamental plants innovative substrates. **Biocontrol of plant pathogens in sustainable agriculture**, [s. l.], v. 86, p. 169–174, 2013.

- EAPEN, S. J.; BEENA, B.; RAMANA, K. V. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. **Journal of invertebrate pathology**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 218–225, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15955340>. Acesso em: 21 ago. 2013.
- EISENBACK, J. D. *et al.* **A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* Spp.), with a pictorial key**. Raleigh: The Departments of Plant Pathology and Genetics North Carolina State University and The United States Agency for International Development, 1981.
- EL-SAPPAH, A. H. *et al.* Tomato natural resistance genes in controlling the root-knot nematode. **Genes**, [s. l.], v. 10, n. 11, 2019.
- ELAD, Y.; KIRSHNER, B. Survival in the phylloplane of an introduced biocontrol agent (*Trichoderma harzianum*) and populations of the plant pathogen *Botrytis cinerea* as modified by abiotic conditions. **Phytoparasitica**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 303–313, 1993. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF02981048>. Acesso em: 17 set. 2013.
- ESBENSHADE, P. R.; TRIANTAPHYLLOU, C. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. **Journal of nematology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 10–15, 1990. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2619005&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 2 abr. 2014.
- ESCUADERO, N. *et al.* Chitosan increases tomato root colonization by *Pochonia chlamydosporia* and their combination reduces root-knot nematode damage. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 8, n. September, p. 1–10, 2017.
- FARFOUR, S. A.; EL-ANSARY, M. S. M. Suppression of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on eggplant by applying some biofertilizers and biocontrol agents. **Egypt. J. Agroematol.**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 63–72, 2013.
- FARIAS, C. P. *et al.* Consortium of five fungal isolates conditioning root growth and arbuscular mycorrhiza in soybean, corn, and sugarcane. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 90, n. 4, p. 3649–3660, 2018.
- FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematóides. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. Al. M.; BERGAMIN FILHO, A. (org.). **Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. p. 277–305. *E-book*. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/agrofitossan/AGR04002/nematoda.htm>.
- FERRAZ, S.; SANTOS, M. A. dos. Controle biológico de fitonematóides pelo uso de fungos. **Revisão Anual de Proteção de Plantas**, [s. l.], v. 3, p. 283–314, 1995.
- FERREIRA, P. A. *et al.* Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. **Rev. Trópica - Cien. Agr. e Biol.**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 15–21, 2008.
- FIALHO, M. B. *et al.* Nematicidal effect of volatile organic compounds (VOCs) on the plant-parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. **Summa Phytopathologica**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 152–154, 2012.
- FILHO, J. U. T. B.; DOMINGUES, M. C. S. Morfologia, condução e fisiologia do tomateiro. In: PAPA, G.; FURIATTI, R. S.; SPADER, V. (org.). **Tomate : desafios fitossanitários e manejo sustentável**. Jaboticabal: Maria de Lourdes Brandel - ME, 2014. p. 11–38.
- FONTENELLE, A. D. B. *et al.* Growth promotion and induction of resistance in tomato plant

- against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, [s. l.], v. 30, n. 11, p. 1492–1500, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219411002559>.
- FREIRE, E. S. *et al.* Volatile substances produced by *Fusarium oxysporum* from coffee rhizosphere and other microbes affect *Meloidogyne incognita* and *Arthrobotrys conoides*. **Journal of nematology**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 321–328, 2012. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3592370&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- FREITAS, M. A. *et al.* Seleção de *Trichoderma* spp. como potenciais agentes para biocontrole de *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar. **Nematropica**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 115–122, 2012.
- GARCÍA-LÓPEZ, A. M.; AVILÉS, M.; DELGADO, A. Plant uptake of phosphorus from sparingly available P- sources as affected by *Trichoderma asperellum* T34. **Agricultural and Food Science**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 249–260, 2015.
- GUO, Y. *et al.* *Trichoderma* species differ in their volatile profiles and in antagonism toward ectomycorrhiza *Laccaria bicolor*. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. APR, p. 1–15, 2019.
- 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. 84 f. - Dissertação de Mestrado em Sanidade Vegetal, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Instituto Biológico. São Paulo, 2014., [s. l.], 2014.
- HADDAD, P. E. *et al.* Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s. l.], v. 52, n. 12, p. 1140–1148, 2017.
- HALBRENT, J. M.; LAMONDIA, J. A. Crop rotation and other cultural practices. *In*: CHEN, Z.X.; CHEN, S.Y.; DICK, W. (org.). **Nematology advances and perspectives – nematode management and utilization**. Beijing: CABI Publishing, 2003. p. 909–930.
- HARMAN, G. E. *et al.* Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. **Outlooks on Pest Management**, [s. l.], p. 1–6, 2008.
- HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, [s. l.], v. 84, n. 4, p. 377–393, 2000.
- HARMAN, G. E. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, [s. l.], v. 96, n. 2, p. 190–194, 2006.
- HARMAN, G. E. *et al.* *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**. **Microbiology**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 43–56, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro797>. Acesso em: 8 ago. 2013.
- HARMAN, G. E.; BJÖRKMAN, T. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. *In*: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. (org.). ***Trichoderma and Gliocladium***. 2. ed. London: Taylor & Francis, 1998. p. 229–265.
- HARMAN, G. E.; LORITO, M.; LYNCH, J. M. Uses of *Trichoderma* spp. to alleviate or remediate soil and water pollution. **Advances in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 56, p. 313–330, 2004.

- HARMAN, G. E.; SHORESH, M. The mechanisms and applications of symbiotic opportunistic plant symbionts. *In*: VURRO, M.; GRESSEL, J. (org.). **Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management SE - 7**. [S. l.]: Springer Netherlands, 2007. p. 131–155. *E-book*. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-5799-1_7.
- HARTMAN, R. M.; SASSER, J. N. Identification of Meloidogyne species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. *In*: BARKER, K. R.; CARTER, C. C.; SASSER, J. N. (org.). **An advanced treatise on Meloidogyne**. 2 Methodoed. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. p. 69–77.
- HERRERA ESTRELLA, A.; CHET, I. Biocontrol of bacteria and phytopathogenic fungi. *In*: ALTMAN, A. (org.). **Agricultural Biotechnology**. New York: Marcel Dekker Inc., 1998. p. 263–282.
- HIDANGMAYUM, A.; DWIVEDI, P.; PADMANABH DWIVEDI, C. Plant Responses to *Trichoderma* spp. and their Tolerance to Abiotic Stresses: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 758–766, 2018.
- HOWELL, C. R. Effect of seed quality and combination fungicide *Trichoderma* spp. seed treatments on pre- and postemergence damping-off in cotton. **Phytopathology**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 66–71, 2007.
- HOWELL, C. R. *et al.* Field Control of Cotton Seedling Diseases with *Trichoderma virens* in Combination with Fungicide Seed Treatments. **Journal Of Cotton Science**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 15–20, 1997.
- HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 4–10, 2003.
- HUNG, R.; LEE, S.; BENNETT, J. W. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. **Fungal Ecology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 19–26, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2012.09.005>.
- HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, [s. l.], v. 57, n. 12, p. 1025–1028, 1973.
- IAG/USP. **Boletim climatológico anual da estação metereologica do IAG/USP**. São Paulo: IAG/USP, 2016.
- IAG/USP. **Boletim climatológico anual da estação meterológica do IAG/USP**. São Paulo: IAG/USP, 2017.
- IBGE. Indicadores IBGE - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Estatística da Produção Agrícola. **IBGE**, [s. l.], p. 148, 2019. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=72415>.
- IBRAHIM, H. M. M. *et al.* Effective approaches to study the plant-root knot nematode interaction. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 141, n. June, p. 332–342, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.06.009>.
- JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, [s. l.], v. 24, n. 17, p. 453–489, 1986.
- KARSSSEN, G.; MOENS, M. Root-knot nematodes. *In*: PERRY, R. N.; MOENS, M. (org.). **Plant Nematology**. Wallingford,UK: CAB International, 2006. p. 59–90.

- KERRY, Brian Robert. Biological control. In: BROWN, R. H.; KERRY, B.R. (org.). **Principles and practice of nematode control in crops**. London: Academic Press, 1987. p. 233–263.
- KHAN, R. A. A. *et al.* Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic bacteria and root-knot nematode. **Microorganisms**, [s. l.], v. 8, n. 3, 2020.
- KHATRI, D. K.; TIWARI, D. N.; BARIYA, H. S. Chitinolytic efficacy and secretion of cell wall degrading enzymes from *Trichoderma* spp. in response to phytopathological fungi. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 1–8, 2017. Disponível em: http://jabonline.in/abstract.php?article_id=240.
- KIMATI, H. *et al.* (org.). **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997.
- KIMPINSKI, J.; STURZ, A. V. Managing crop root zone ecosystems for prevention of harmful and encouragement of beneficial nematodes. **Soil and Tillage Research**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 213–221, 2003. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167198703000904>. Acesso em: 25 set. 2013.
- KIRIGA, A. W. *et al.* Effect of *Trichoderma* spp. and *Purpureocillium lilacinum* on *Meloidogyne javanica* in commercial pineapple production in Kenya. **Biological Control**, [s. l.], v. 119, p. 27–32, 2018. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1049964418300136>.
- KIRWA, H. K. *et al.* Elicitation of differential responses in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* to tomato root exudate cytokinin, flavonoids, and alkaloids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 66, n. 43, p. 11291–11300, 2018.
- KOTTB, M. *et al.* *Trichoderma* volatiles effecting Arabidopsis: From inhibition to protection against phytopathogenic fungi. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 6, n. SEP, p. 1–14, 2015.
- LEE, S. *et al.* Effects of fungal volatile organic compounds on *Arabidopsis thaliana* growth and gene expression. **Fungal Ecology**, [s. l.], v. 37, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.08.004>.
- 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**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 621–631, 2017.
- LI, J. *et al.* Molecular mechanisms of nematode-nematophagous microbe interactions: Basis for biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 67–95, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120336>.
- LI, N.; ISLAM, M. T.; KANG, S. Secreted metabolite-mediated interactions between rhizosphere bacteria and *Trichoderma* biocontrol agents. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 1–18, 2019.
- LIANG, L. M. *et al.* Signal pathways involved in microbe-nematode interactions provide new insights into the biocontrol of plant-parasitic nematodes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 374, n. 1767, 2019.
- LIPKA, V.; PANSTRUGA, R. Dynamic cellular responses in plant–microbe interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 625–631, 2005. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369526605001299>.

- LOPES, F. A. C. *et al.* Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, [s. l.], v. 116, n. 7, p. 815–824, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22749168>.
- LÓPEZ, A. C. *et al.* *Trichoderma* spp. from Misiones, Argentina: effective fungi to promote plant growth of the regional crop *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Mycology**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 210–221, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1606860>.
- LORDELLO, L. G. E. **Nematoides das plantas cultivadas**. 6^aed. São Paulo: Livraria Nobel S.A. Brasil, 1981.
- LORDELLO, L. G. E. **Nematoides das plantas cultivadas**. 8. ed. São Paulo: Livraria Nobel S.A. Brasil, 1984.
- LUAMBANO, N. D. *et al.* Integrated management of root-knot nematodes in a tomato-maize crop system using the biocontrol fungus *Pochonia clamydosporia*. **Crop Protection**, [s. l.], v. 71, p. 45–50, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2015.01.013>.
- LUCON, C. M. M. *et al.* Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 225–232, 2009.
- LUIZ, P.; SOARES, M.; MAIA, J. **Reação de cultivares de soja a uma população de *Meloidogyne javanica***. 2009. 33–36 f. [s. l.], 2009.
- LUO, T. *et al.* Nematodes avoid and are killed by *Bacillus mycoides*-produced styrene. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], v. 159, p. 129–136, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.09.006>.
- MALMIERCA, M. G. *et al.* Production of trichodiene by *Trichoderma harzianum* alters the perception of this biocontrol strain by plants and antagonized fungi. **Environmental microbiology**, [s. l.], 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24813508>. Acesso em: 18 jul. 2014.
- MANKAU, R. Biocontrol: fungi as nematode control agents. **Journal of Nematology**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 244–252, 1980.
- MARAFON, A. C. Análise quantitativa de crescimento em cana-de-açúcar: Uma introducao ao procedimento práctico. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, [s. l.], v. 168, n. 1, p. 31, 2012.
- MARIN, F. R.; JONES, J. W. Process-based simple model for simulating sugarcane growth and production. **Scientia Agricola**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 1–16, 2014.
- MARRA, R. *et al.* Application of *Trichoderma* strains and metabolites enhances soybean productivity and nutrient content. research-article. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 67, n. 7, p. 1814–1822, 2019.
- 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**, [s. l.], v. 213, n. 3, p. 1363–1377, 2017.
- MARTÍNEZ-MEDINA, A.; VAN WEES, S. C. M.; PIETERSE, C. M. J. Airborne signals from *Trichoderma* fungi stimulate iron uptake responses in roots resulting in priming of jasmonic aciddependent defences in shoots of *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum*. **Plant Cell and Environment**, [s. l.], v. 40, n. 11, p. 2691–2705, 2017.
- MASCARIN, G. M.; FERREIRA, M.; VIEIRA DE ARAÚJO, J. *Trichoderma harzianum*

reduces population of *Meloidogyne incognita* in cucumber plants under greenhouse conditions. **Journal of Entomology and Nematology**, [s. l.], v. 4, n. December, p. 54–57, 2012.

MAZZUCHELLI, R. de C. L.; MAZZUCHELLI, E. H. L.; DE ARAUJO, F. F. Efficiency of *Bacillus subtilis* for root-knot and lesion nematodes management in sugarcane. **Biological Control**, [s. l.], v. 143, p. 104185, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104185>.

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**, [s. l.], v. 7, n. July 2016, p. 40216, 2017. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep40216>.

MELO, I. S. de. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (org.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa, 1998. p. 17–66.

MELO, I. S. de. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1991. p. 135–156.

MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-DNPMA, 1998.

MENEZES, M.; SOUZA, E. E. B. Avaliação de isolados de *Trichoderma* através da análise eletroforética em gel de poliacrilamida. **Suplemento da Fitopatologia Brasileira** 20, [s. l.], 1995.

MEYER, S. L. F. *et al.* Evaluation of *Trichoderma virens* and *Burkholderia cepacia* for antagonistic activity against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, [s. l.], v. 2, n. 8, p. 871–879, 2000.

MOENS, M.; PERRY, R. N.; STARR, J. L. *Meloidogyne* species: a diverse group of novel and important plants parasites. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (org.). **Root-Knot Nematodes**. Oxfordshire: CABI, 2009. p. 1–17.

MOENS, M.; PERRY, R. N.; STARR, J. L. *Meloidogyne* species - a diverse group of novel and important plant parasites. **Root-knot Nematodes**, Oxfordshire, n. October 2009, p. 1–17, 2009.

MONTE, E.; BETTIOL, W.; HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da (org.). **Trichoderma: Uso na Agricultura**. [S. l.: s. n.], 2019. p. 181–199.

MOORE, P. H.; PATERSON, A. H.; TEW, T. Sugarcane: The crop, the plant, and domestication. In: MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. (org.). **Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology**. Firsted. [S. l.]: John Wiley & Sons, Inc., 2013. p. 17.

MOURA, R. M. de. **Controle integrado de nematóides da cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil.XXII Congresso Brasileiro de Nematologia**. Uberlândia: Anais, 2000.

MOURA, R. M. de; MACEDO, M. E. A. Efeito da aplicação de carbofuran em populações de nematóides da cana-de-açúcar e no desenvolvimento de cana-planta. **Nematologia Brasileira**, Gramado-RS, v. 21, n. 1, p. 14–15, 1997.

MOURA, R. M. de; RÉGIS, E. M. O.; MOURA, A. M. Espécies e raças de *Meloidogyne* assinaladas em cana-de-açúcar no Estado do Rio Grande do Norte. **Nematologia Brasileira**, [s. l.], v. 14, p. 34–38, 1990.

- MWAHEB, M. A. M. A. *et al.* Synergetic suppression of soybean cyst nematodes by chitosan and *Hirsutella minnesotensis* via the assembly of the soybean rhizosphere microbial communities. **Biological Control**, [s. l.], v. 115, p. 85–94, 2017. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1049964417302050>.
- NAIKA, S. *et al.* **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização**. [S. l.: s. n.], 2006.
- NIETO-JACOBO, M. F. *et al.* Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 8, n. February, p. 1–18, 2017.
- NITAO, J. K.; MEYER, S. L. F.; CHITWOOD, D. J. In-vitro assays of *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines* for detection of nematode-antagonistic fungal compounds. **Journal of Nematology**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 172–183, 1999.
- NORDLUND, D. A. Biological control, integrated pest management and conceptual models. **Biocontrol News and Information (United Kingdom)**, [s. l.], 1996.
- NOVARETTI, W. R. T.; TÉRAN, F. O. Controle de nematóides parasitos da cana-de-açúcar. **REUNIÃO TÉCNICA AGRONÔMICA**, [s. l.], v. 1, p. 16–24, 1983.
- OJAGHIAN, M. R. Potential of *Trichoderma* spp. and *Talaromyces flavus* for biological control of potato stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytoparasitica**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 185–193, 2011. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s12600-011-0153-9#page-1>.
- OLIVEIRA, M. K. R. dos S. *et al.* Controle biológico de fitonematóides do gênero *Pratylenchus* através de inoculante natural em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 203–207, 2011.
- OLIVEIRA, C. M. G. Panorama das doenças e pragas em horticultura: doenças causadas por nematoides. **O Biológico**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 85–86, 2007.
- OLIVEIRA, C. M. G. *et al.* Técnicas moleculares e taxonomia clássica na diagnose de nematoides parasitos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, [s. l.], v. 19, p. 309–336, 2011.
- OLIVEIRA, C. M. G.; ROSA, J. M. O. Nematoides que atacam a cultura do tomate no Brasil. *In*: PAPA, G.; FURIATTI, R. S.; SPADER, V. (org.). **Tomate : desafios fitossanitários e manejo sustentável**. Jaboticabal: Maria de Lourdes Brandel - ME, 2014. p. 231–244.
- OUSLEY, M. A.; LYNCH, J. M.; WHIPPS, J. M. Effect of *Trichoderma* on plant growth: A balance between inhibition and growth promotion. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 26, p. 277–285, 1993.
- PALOMARES-RIUS, J. E. *et al.* Anatomical alterations in plant tissues induced by plant-parasitic nematodes. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 8, n. November, p. 1–16, 2017.
- PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potencial for biocontrol. **Annual Review Phytopathology**, [s. l.], v. 53, 1985.
- PARVEEN, G.; ALAM, M. M. Reaction of tomato cultivars to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* in presence of lead. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 67–72, 2001.
- PEDRO, E. A. de S. *et al.* Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma* spp. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, [s. l.], v. 47, n. 11, p. 1589–1595,

2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2012001100005&script=sci_abstract&tlng=pt.

PELCZAR, J. M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia Conceitos e aplicações**. 1. ed. São Paulo: Makron books, 1996.

PERRY, R. N.; MOENS, M. **Plant Nematology**. Wallingford: CABI, 2006. *E-book*. Disponível em: <http://www.cabdirect.org/abstracts/20063106974.html>. Acesso em: 25 set. 2013.

PIMENTA, L. *et al.* Wood-associated fungi produce volatile organic compounds toxic to root-knot nematode. **Scientia Agricola**, [s. l.], v. 74, n. 4, p. 303–310, 2017.

POVEDA, J.; ABRIL-URIAS, P.; ESCOBAR, C. Biological control of plant-parasitic nematodes by filamentous fungi inducers of resistance: *Trichoderma*, mycorrhizal and endophytic fungi. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. May, p. 1–14, 2020.

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

RAJINIKANTH, R. *et al.* Molecular characterization of chitinase (chi18-5) and its expression in *Trichoderma viride*: Role on nematode egg parasitism. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, [s. l.], v. 5, n. 12, p. 56–64, 2016. Disponível em: <http://www.ijcmas.com/abstractview.php?ID=1167&vol=5-12-2016&SNo=6>.

RAMÍREZ-VALDESPINO, C. A.; CASAS-FLORES, S.; OLMEDO-MONFIL, V. *Trichoderma* as a model to study effector-like molecules. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. MAY, p. 1–14, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.01030/full>.

RAMÍREZ, M. G. *et al.* Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. **Journal of Microbiological**, [s. l.], v. 56, p. 213–219, 2004.

RIBEIRO, A. P. dos S. **Produção de quitinasas por fermentação por *Trichoderma* sp.** 2000. 63 f. - Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química. Unicamp, Campinas. 63p., [s. l.], 2000.

RIGA, E.; LACEY, L. A.; GUERRA, N. *Muscodor albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. **Biological Control**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 380–385, 2008.

ROMÃO-DUMARESQ, A. S. *et al.* Diversity of cultivated fungi associated with conventional and transgenic sugarcane and the interaction between endophytic *Trichoderma virens* and the host plant. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 1–28, 2016.

ROSA, J. M. O.; WESTERICH, J. N.; WILCKEN, S. R. S. Reação de genótipos e híbridos de tomateiro à *Meloidogyne enterolobii*. **Ciencia Rural**, [s. l.], v. 44, n. 7, p. 1166–1171, 2014.

RUDRESH, D. L.; SHIVAPRAKASH, M. K.; PRASAD, R. D. Effect of combined application of *Rhizobium*, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.). **Applied Soil Ecology**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 139–146, 2005.

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

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071708001193>. Acesso em: 21 ago. 2013.

SANKARANARAYANAN, C.; HUSSAINI, S. S. Nematicidal effect of fungal filtrates against root-knot nematodes. [s. l.], p. 37–41, 1997.

SCHMIDT, R. *et al.* Volatile affairs in microbial interactions. **ISME Journal**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 2329–2335, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2015.42>.

SCHOUTEN, A. Mechanisms involved in nematode control by endophytic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 121–142, 2016.

SCUDELETTI, D. *et al.* *Trichoderma asperellum* inoculation as a tool for attenuating drought stress in sugarcane. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 12, n. April, p. 1–13, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.645542/full>.

SERNA-COCK, L.; ARIAS-GARCIA, C.; HERNANDEZ, L. J. V. Efecto de la biofertilización sobre el crecimiento en maceta de plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 85–95, 2011.

SHARON, E. *et al.* Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, [s. l.], v. 91, n. 7, p. 687–693, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18942999>.

SHARON, E. *et al.* Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. **European Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 118, n. 3, p. 247–258, 2007. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10658-007-9140-x>. Acesso em: 21 ago. 2013.

SHARON, E.; CHET, I.; SPIEGEL, Y. Improved attachment and parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* *in vitro*. **European Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 123, n. 3, p. 291–299, 2009.

SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum*. **Phytopathology**, [s. l.], v. 95, n. 95, p. 76–84, 2005.

SIDDIQUEE, S. Recent advancements on the role and analysis of volatile compounds (VOCs) from *Trichoderma*. In: GUPTA, V. K. *et al.* (org.). **Biotechnology and Biology of Trichoderma**. [S. l.]: Elsevier, 2014. p. 137–173.

SILVA, M. S. *et al.* Comportamento de genótipos RB de cana-de-açúcar ao parasitismo dos nematoides das galhas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 73–79, 2016. Disponível em: [http://www.agraria.pro.br/ojs-2.4.6/index.php?journal=agraria&page=article&op=view&path\[\]=agraria_v11i2a5368](http://www.agraria.pro.br/ojs-2.4.6/index.php?journal=agraria&page=article&op=view&path[]=agraria_v11i2a5368).

SILVA, V. N. da *et al.* Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s. l.], v. 46, n. 12, p. 1609–1618, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2011001200005&script=sci_arttext.

SILVA, A. P. *et al.* Reação de variedades de cana-de-açúcar ao parasitismo de *Meloidogyne incognita* e *M. enterolobii*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, [s. l.], v. 7, n. suppl., p. 814–819, 2012. Disponível em: [http://www.agraria.pro.br/sistema/index.php?journal=agraria&page=article&op=view&path\[\]=agraria_v7isa2276](http://www.agraria.pro.br/sistema/index.php?journal=agraria&page=article&op=view&path[]=agraria_v7isa2276).

- SINGH, V. *et al.* Increasing the efficacy of *Trichoderma harzianum* for nutrient uptake and control of red rot in sugarcane. [s. l.], v. 2, n. April, p. 66–71, 2010.
- SINUCO LEÓN, D. C. *et al.* Evaluación de la actividad fungicida e identificación de compuestos orgánicos volátiles liberados por *Trichoderma viride*. **Revista Colombiana de Biotecnología**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 63, 2017. Disponible em: <http://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/65969>.
- SOARES, F. E. de F.; SUFIATE, B. L.; DE QUEIROZ, J. H. Nematophagous fungi: Far beyond the endoparasite, predator and ovicidal groups. **Agriculture and Natural Resources**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 1–8, 2018. Disponible em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452316X17302223>.
- SOOD, M. *et al.* *Trichoderma*: The “secrets” of a multitasking biocontrol agent. **Plants**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 1–25, 2020.
- SPIEGEL, Y.; CHET, I. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. **Integrated Pest Management Reviews**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 169–175, 1998.
- SPIEGEL, Y.; SHARON, E.; CHET, I. Mechanisms and improved biocontrol of the root-knot nematodes by *Trichoderma* spp. **Acta Horticulturae**, [s. l.], v. 698, p. 225–228, 2005.
- SRIVASTAVA, S. N.; SINGH, V.; AWASTHI, S. K. *Trichoderma* induced improvement in growth, yield and quality of sugarcane. **Sugar Tech**, [s. l.], v. 8, n. 2–3, p. 166–169, 2006.
- STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of Fermentation Technology**. 2. ed. Bodmin: MPG Bok, 1995.
- STEWART, A.; HILL, R. Applications of *Trichoderma* in plant growth promotion. In: GUPTA, V. K. *et al.* (org.). **Biotechnology and Biology of Trichoderma**. [S. l.]: Elsevier, 2014. p. 415–428.
- STIRLING, G. R. **Biological control of plant parasitic nematodes**. Wallingford: CAB International, 1991.
- STIRLING, G. R.; MANKAU, R. Parasitism of Meloidogyne eggs by a new fungal parasite. **Journal of nematology**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 236–23640, 1978.
- 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**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 46–55, 2004.
- SUNPAPAO, A.; CHAIRIN, T.; ITO, S. ichi. The biocontrol by *Streptomyces* and *Trichoderma* of leaf spot disease caused by *Curvularia oryzae* in oil palm seedlings. **Biological Control**, [s. l.], v. 123, p. 36–42, 2018. Disponible em: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.017>.
- 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**, [s. l.], v. 63, n. 2, p. 121–128, 2012. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.06.013>.
- SZCZECHE, M. *et al.* *Trichoderma atroviride* TRS25 isolate reduces downy mildew and induces systemic defence responses in cucumber in field conditions. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 224, n. June, p. 17–26, 2017. Disponible em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423817303278>.

- TAYLOR, D. P.; NETSCHER, C. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Nematologica**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 268–269, 1974.
- TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (Meloidogyne species)**. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1978. (International Meloidogyne Project). *E-book*. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=5G1mPQAACAAJ>.
- TERRA, W. C. *et al.* Volatile molecules of *Fusarium oxysporum* strain 21 are retained in water and control *Meloidogyne incognita*. **Biological Control**, [s. l.], v. 112, p. 34–40, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.06.004>.
- TERRA, W. C. *et al.* Volatile organic molecules from *Fusarium oxysporum* strain 21 with nematocidal activity against *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**, [s. l.], v. 106, n. December 2017, p. 125–131, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.12.022>.
- THOMAZELLI, G. S. *et al.* Immunity of sugarcane cultivars to *Meloidogyne enterolobii*. **Bioscience Journal**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 1984–1989, 2020.
- TOPPA, E. V. B. *et al.* Aspectos da fisiologia de produção da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). **Pesquisa aplicada & Agrotecnologia**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 215–222, 2010.
- TRANIER, M. S. *et al.* Commercial biological control agents targeted against plant-parasitic root-knot nematodes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l.], v. 57, n. 6, p. 831–841, 2014.
- TUCCI, M. *et al.* The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 341–354, 2011.
- TWEDDELL, R. J. *et al.* Production of chitinases and 13-1, 3-glucanases by *Stachybotrys elegans*, a mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 489–495, 1994.
- UDAY, K.; BHAGAWATI, B.; NEOG, P. P. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Trichoderma harzianum*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, [s. l.], v. 8, n. 02, p. 2176–2188, 2019.
- UNICA. **Balço de atividade 2012/13 a 2018/19**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <https://unica.com.br/wp-content/uploads/2019/06/Relatorio-Atividades-201213-a-201819.pdf>.
- UNICA. **Histórico do setor sucroalcooleiro**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/historico-do-setor/>. Acesso em: 15 fev. 2015.
- UNICAMP. **Cepagri-Unicamp**. [S. l.], 2015. Disponível em: <https://www.cpa.unicamp.br/graficos>.
- VASCONCELOS, A. C. M. De; DINARDO-MIRANDA, L. L. **Dinâmica do desenvolvimento radicular da cana-de-açúcar e implicações no controle de nematóides**. 2. ed. Campinas: Adonis, 2011.
- VILJOEN, J. J. F. *et al.* Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomatoes and carrots by plant growth-promoting rhizobacteria. **Tropical Plant Pathology**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 284–291, 2019.
- VINALE, F. *et al.* A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 72, n. 1–3, p. 80–86, 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0885576508000568>.

- VITERBO, A. *et al.* Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (T. harzianum T-203). **Current Genetics**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 114–122, 2002. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00294-002-0345-4>.
- VITERBO, A. *et al.* Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 81, n. 1–4, p. 549–556, 2002.
- WEISCHER, B.; BROWN, D. J. F. **An Introduction to Nematodes: General Nematology : a Student's Textbook**. Sofia: Pensoft Publishers, 2000. *E-book*. Disponível em: <http://books.google.com/books?id=HTbIhnz7FuwC&pgis=1>. Acesso em: 26 set. 2013.
- WERNER, S.; POLLE, A.; BRINKMANN, N. Belowground communication: impacts of volatile organic compounds (VOCs) from soil fungi on other soil-inhabiting organisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 100, n. 20, p. 8651–8665, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7792-1>.
- WONGLOM, P.; ITO, S. ichi; SUNPAPAO, A. Volatile organic compounds emitted from endophytic fungus *Trichoderma asperellum* T1 mediate antifungal activity, defense response and promote plant growth in lettuce (*Lactuca sativa*). **Fungal Ecology**, [s. l.], v. 43, p. 100867, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.100867>.
- XIA, X. *et al.* Species diversity, distribution, and genetic structure of endophytic and epiphytic *Trichoderma* associated with banana roots. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 619–625, 2011.
- YADAV, R. L. *et al.* *Trichoderma* inoculation and trash management effects on soil microbial biomass, soil respiration, nutrient uptake and yield of ratoon sugarcane under subtropical conditions. **Biol Fertil Soils**, [s. l.], v. 45, p. 461–468, 2009.
- YANG, Z. *et al.* Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma* sp. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 647–650, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aspen.2012.08.002>.
- YEDIDIA, I. *et al.* Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 69, n. 12, p. 7343–7353, 2003.
- YEDIDIA, I. *et al.* Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, [s. l.], v. 235, p. 235–242, 2001.
- YEDIDIA, I. *et al.* Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 38, n. 11, p. 863–873, 2000.
- YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; CHET, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 65, n. 3, p. 1061–1070, 1999.
- ZHANG, S. *et al.* Mechanisms and characterization of *Trichoderma longibrachiatum* T6 in suppressing nematodes (*Heterodera avenae*) in wheat. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 8, n. September, p. 1–20, 2017.
- ZHANG, S. *et al.* The parasitic and lethal effects of *Trichoderma longibrachiatum* against *Heterodera avenae*. **Biological Control**, [s. l.], v. 72, p. 1–8, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.01.009>.

ZHANG, C. L. *et al.* *Trichoderma taxi* sp. nov., an endophytic fungus from Chinese yew *Taxus mairei*. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 270, n. 1, p. 90–96, 2007.

ZHANG, S.; GAN, Y.; XU, B. Biocontrol potential of a native species of *Trichoderma longibrachiatum* against *Meloidogyne incognita*. **Applied Soil Ecology**, [s. l.], v. 94, p. 21–29, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.04.010>.

ANEXO – Listagem dos isolados utilizados e os ensaios executados durante o trabalho. A marcação (X) nas linhas indica que o isolado obteve resultado significativo na variável avaliada (coluna).

Isolados	Parasitismo de ovos de <i>M. incognita</i>	Filtrados fúngicos tóxicos a <i>M. incognita</i>	Produção de metabólitos voláteis tóxicos a <i>M. incognita</i>	Atividade de quitinase em meio sólido	Atividade de quitinase em meio líquido	*Promoção de crescimento de cana-de-açúcar	Colonização radicular de cana-de-açúcar
IB 01/13	X			X			X
IB 04/05				X			X
IB 07/01				X			X
IB 15/06				X			X
IB 18/03	X		X	X		X	X
IB 19/17	X		X	X		X	X
IB 22/08	X		X	X			X
IB 28/07	X		X	X			X
IB 28/15	X			X	X		X
IB 30/07	X			X			X
IB 37/01	X				X		X
IB 38/11				X	X	X	X
IB 43/14	X		X	X	X		X
IB 48/06	X		X	X	X	X	X
IB 49/15				X	X		X
IB 51/09				X	X		X
CMMA1169							
CMMA1170							

*Em relação ao aumento da massa de matéria seca da parte aérea

ANEXO – (Continuação) Listagem dos isolados utilizados e os ensaios executados durante o trabalho. A marcação (X) nas linhas indica que o isolado obteve resultado significativo na variável avaliada (coluna).

Isolados	**CB de <i>M. incognita</i> em cana-de-açúcar	*Promoção de Crescimento de cana-de-açúcar na presença de <i>M. incognita</i>	**CB de <i>M. javanica</i> em cana-de-açúcar	*Promoção de crescimento de cana-de-açúcar na presença de <i>M. javanica</i>	**CB de <i>M. javanica</i> em tomateiro	**CB de futuras gerações de <i>M. javanica</i> em tomateiro
IB 01/13						
IB 04/05						
IB 07/01	X			X		X
IB 15/06						
IB 18/03	X	X				
IB 19/17	X					
IB 22/08	X	X				
IB 28/07						X
IB 28/15						
IB 30/07						
IB 37/01						
IB 38/11	X					
IB 43/14						X
IB 48/06						
IB 49/15						X
IB 51/09						
CMMA1169						
CMMA1170						

**Controle biológico

**Em relação ao aumento da massa de matéria seca da parte aérea

