

PAULO HENRIQUE DIONIZIO LUIZ

***Trichoderma afroharzianum* PARA O CONTROLE DO NEMATOIDE DAS GALHAS
E SUA COMPATIBILIDADE COM DEFENSIVOS QUÍMICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Leandro Grassi de Freitas

Coorientadora: Thalita S. Avelar Monteiro

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L953t
2021 Luiz, Paulo Henrique Dionizio, 1992-
Trichoderma afroharzianum para o controle do nematoide das galhas e sua compatibilidade com defensivos químicos / Paulo Henrique Dionizio Luiz. – Viçosa, MG, 2021.
1 dissertação eletrônica (26 f.).

Orientador: Leandro Grassi de Freitas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, 2021.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.220>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Nematoide-das-galhas - Controle biológico. 2. Fungos nematófagos. 3. *Pochonia chlamydosporia*. I. Freitas, Leandro Grassi de, 1963-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. III. Título.

CDD 22. ed. 592.57

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB6/2552

PAULO HENRIQUE DIONIZIO LUIZ

***Trichoderma afroharzianum* PARA O CONTROLE DO NEMATOIDE DAS GALHAS
E SUA COMPATIBILIDADE COM DEFENSIVOS QUÍMICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de outubro de 2021.

Assentimento:

Paulo Henrique Dionizio Luiz
Autor

Leandro Grassi de Freitas
Orientador

Aos meus pais e irmãos.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo apoio com bolsas de estudos.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

Ao meu Orientador Leandro Grassi de Freitas, pela atenção, confiança e pelos ensinamentos.

A minha Coorientadora Thalita Suelen Avelar Monteiro, pela colaboração, sugestões, amizade e ensinamentos.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos transmitidos.

A minha namorada Camila, por todo apoio e companheirismo.

Aos amigos do laboratório de nematologia, Huarlen, Angélica, Vitor, Fernanda, Lucas, Júlio, Helena, Gabriela e Cássia, pela amizade e cooperação durante os experimentos.

Aos amigos de turma do mestrado, pelo apoio e momentos vividos.

Aos meus amigos que estiveram comigo nas repúblicas Cachacity e Kero Kero.

À toda minha família pelo apoio.

A todos, meu muito OBRIGADO!!!

RESUMO

LUIZ, Paulo Henrique Dionizio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2021. ***Trichoderma afroharzianum* para o controle do nematoide das galhas e sua compatibilidade com defensivos químicos.** Orientador: Leandro Grassi de Freitas. Coorientadora: Thalita Suelen Avelar Monteiro.

Os fitonematoides são responsáveis por grandes perdas de produtividade nas mais diversas culturas agrícolas e, especialmente na soja cultivada no Cerrado, em solo arenoso e em regime de altas temperaturas, essas perdas são muito significativas. Na soja, a espécie *Meloidogyne javanica* é uma das que mais ocorre, demandando medidas de controle eficazes e que causem baixo impacto ambiental. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade do fungo *Trichoderma afroharzianum* em controlar *M. javanica* e testar a sua compatibilidade com defensivos agrícolas usuais no tratamento de sementes de soja e com o fungo *Pochonia chlamydosporia*. O experimento de controle biológico de *M. javanica* por *T. afroharzianum* e *Pochonia chlamydosporia* foi realizado duas vezes em temperaturas entre 26 ° e 30 °C em casa de vegetação e mostrou compatibilidade entre *T. afroharzianum* e *P. chlamydosporia*, não havendo detrimento da ação nematicida com a utilização de ambos em conjunto quando comparada com a ação nematicida de ambos utilizados em separado. As avaliações da compatibilidade de *T. afroharzianum* com defensivos agrícolas foram realizadas *in vitro*, em placas de Petri de 9 cm de diâmetro e em casa de vegetação. No teste *in vitro*, o crescimento fúngico foi avaliado medindo-se o diâmetro da colônia sobre meio de cultura a cada 24 horas, no período de 3 dias. Foi realizado um teste de compatibilidade em casa de vegetação e as sementes de soja foram tratadas com produtos químicos na dosagem recomendada para 100 kg de sementes, com posterior adição de *T. afroharzianum* em concentração calibrada para o volume de 2 litros de solo. O fungo reduziu a reprodução do nematoide de galhas nos dois experimentos de biocontrole, com o controle variando de 45,2 % a 50,12 % no número de ovos por grama de raiz e de 41 % a 49,5 % no número de galhas por grama de raiz. No teste de compatibilidade *in vitro*, alguns defensivos agrícolas inibiram o crescimento do fungo, sendo que os princípios ativos Carbendazim + Thiram e Metalaxil + Fludioxonil + Tiabendazol causaram as maiores inibições de crescimento. No experimento em casa de vegetação de compatibilidade de *T. afroharzianum* com defensivos no tratamento de sementes, o fungo reduziu a população do nematoide e alguns produtos que *in vitro* haviam inibido crescimento, não interferiram no controle biológico de *M. javanica*. Ao avaliar a quantidade de unidades formadoras de colônia de *Trichoderma afroharzianum* após 45 dias após semeadura,

verificamos que o princípio ativo Captan aumentou duas vezes o número de UFC por grama de raiz em relação ao número inicial de conídios aplicados e não se diferiu do tratamento controle. Nos princípios ativos Difeconazole e Piraclostrobina+ Tiofanato Metílico + Fipronil, a recuperação de UFC foi de cerca da metade da quantidade inicial aplicada, que era de 1×10^4 UFC. g^{-1} solo. O isolado T10 de *T. afroharzianum* controlou *M. javanica* em soja e apresentou compatibilidade com os princípios ativos: Abamectina, Imidacloprido + Tiodicarbe, Tiametoxam e Captan, demonstrando potencial para se tornar ingrediente ativo de produto comercial.

Palavras-chave: Fitonematoides. Controle biológico. Fungo nematófago. *Pochonia chlamydosporia*.

ABSTRACT

LUIZ, Paulo Henrique Dionizio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October 2021. ***Trichoderma afroharzianum* for the control of the root-knot nematode and its compatibility with chemical defensives**. Advisor: Leandro Grassi de Freitas. Co-advisor: Thalita Suelen Avelar Monteiro.

Plant-parasitic nematodes are responsible for large yield losses in the most diverse agricultural crops and, especially in soybean cultivated in the Cerrado ecosystem, on sandy soils and under high temperatures, these losses are very significant. In Brazil, the species *Meloidogyne javanica* is one of the most occurrent, demanding control measures that are effective and cause low environmental impact. The objective of this work was to evaluate the ability of the fungus *Trichoderma afroharzianum* to reduce populations of this root-knot nematode and to test its compatibility with agricultural pesticides commonly used in the soybean seed treatment. The experiment of biological control of *M. javanica* by *T. afroharzianum* and *Pochonia chlamydosporia* was carried out twice, at temperatures between 26 ° and 30 °C in a greenhouse and showed compatibility between *T. afroharzianum* and *P. chlamydosporia*, with no detriment to the nematicidal action with the use of both together when compared to the nematicidal action of both used separately. A compatibility test of *T. afroharzianum* with pesticides was carried out *in vitro*, in Petri dishes of 9 cm diameter, with eight products. The fungal growth was evaluated by measuring the colony diameter every 24 hours on the culture medium for a period of 3 days. A compatibility test was carried out in the greenhouse and the seeds were treated with chemicals at the recommended dosage for 100 kg of seeds, with subsequent addition of *T. afroharzianum* in a concentration calibrated for the volume of 2 liters of soil. *T. afroharzianum* reduced the nematode population in the two biocontrol experiments, with the control varying from 45.2% to 50.12% in the number of eggs per gram of roots and from 41% to 49.5% in the number of galls per gram of roots. In the *in vitro* test, some pesticides inhibited the growth of the fungus, and the active principles Carbendazim + Thiram and Metalaxil + Fludioxonil + Thiabendazol caused the greatest growth inhibitions. In the experiment in a greenhouse of compatibility of *T. afroharzianum* with pesticides in seed treatment, the fungus reduced the nematode population and some products that *in vitro* had inhibited growth did not interfere in the biological control of *M. javanica*. When evaluating the number of colony-forming units of *Trichoderma afroharzianum* after 45 days after sowing, we found that the active ingredient Captan increased twice the number of CFU/gram of root in relation to the initial number of applied conidia and did not differ from the control treatment. In the active principles

Difeconazole and Pyrclostrobin + Thiophanate Methyl + Fipronil, the recovery of CFU was half of the initial amount applied, which was 1×10^4 CFU. g^{-1} soil. The isolate T10 of *T. afroharzianum* reduced the population of *M. javanica* in both experiments and showed compatibility with the active principles: Abamectin, Imidacloprid + Thiodicarb, Thiamethoxam and Captan.

Keywords: Plant-parasitic nematodes. Biological control. Nematophagous fungus. *Pochonia chlamydosporia*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	10
MATERIAL E MÉTODOS.....	11
Obtenção do inóculo de <i>Meloidogyne javanica</i>	11
Obtenção e produção de clamidósporos de <i>Pochonia chlamydosporia</i> e conídios de <i>Trichoderma afroharzianum</i>	11
Compatibilidade de <i>Trichoderma afroharzianum</i> com <i>Pochonia chlamydosporia</i> no controle de <i>Meloidogyne javanica</i>	12
Compatibilidade de <i>Trichoderma afroharzianum</i> com defensivos químicos <i>in vitro</i>	13
Compatibilidade de <i>Trichoderma afroharzianum</i> com defensivos químicos em casa de vegetação	13
Análise estatística.....	15
RESULTADOS	16
Compatibilidade de <i>Trichoderma afroharzianum</i> com <i>Pochonia chlamydosporia</i> no controle de <i>Meloidogyne javanica</i>	16
Compatibilidade de <i>Trichoderma afroharzianum</i> com defensivos químicos <i>in vitro</i>	16
Compatibilidade de <i>Trichoderma afroharzianum</i> com defensivos químicos em casa de vegetação	17
DISCUSSÃO.....	20
CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS	23

INTRODUÇÃO

O cultivo da soja tem uma grande importância no agronegócio brasileiro, pois além de ser uma das principais *commodities* de exportação, é responsável pela geração de milhares de empregos nas principais regiões produtoras. Apesar da elevada produção e produtividade, a cultura sofre grandes perdas por pragas e doenças, e entre as doenças se destacam as causadas por nematoides.

Meloidogyne é um gênero de fitonematoides que engloba diferentes espécies com importância econômica para a maioria das culturas, causando perdas consideráveis quando em alta população na área (JONES et al., 2013). Nas áreas agrícolas, as principais espécies de *Meloidogyne* encontradas são *M. incognita* e *M. javanica*. Essas espécies são de difícil controle devido à ampla gama de hospedeiros e ao sistema de produção caracterizado pela sucessão de cultivos que favorecem a manutenção de altas populações nos campos de produção.

Os fitonematoides são organismos de difícil controle e requerem o emprego de um conjunto de técnicas para reduzir seus níveis populacionais nas áreas de cultivo agrícola. Algumas das estratégias usadas no manejo integrado de fitonematoides são rotação de culturas, uso de plantas antagonistas, escolha de cultivares resistentes, remoção de restos culturais, uso de defensivos químicos e biológicos. O controle químico é feito na maioria das vezes via tratamento de sementes. Os produtos de controle biológico têm como compostos ativos fungos e bactérias em diversos tipos de formulações que permitam a eficiência sem comprometer a sobrevivência dos microrganismos (TIMPER, 2011).

Atualmente, muitas pesquisas tem sido feitas para buscar novos agentes de controle biológico de doenças de plantas e em especial para controle de nematoides. Muitos microrganismos foram identificados, estudados e tiveram sua eficácia comprovada no controle de nematoides das galhas, por exemplo, *Pochonia chlamydosporia*, *Purpureocillium lilacinum*, *Pasteuria penetrans*, *Bacillus* spp. e várias espécies de *Trichoderma* (VIGGIANO; FREITAS; LOPES, 2014; DAHLIN, et al., 2019; TIMPER et al., 2016; BHUIYAN et al., 2018; CAO et al., 2019; CHINHEYA; YOBO.; LAING, 2017; MUKHTAR; TARIQ-KHAN; ASLAM, 2021; TONINATO et al., 2019; AL-HAZMI; TARIQJAVEED, 2016).

Os fungos do gênero *Trichoderma* são encontrados em diversos ecossistemas e se destacam pela ampla gama de hospedeiros, distintos mecanismos de controle, facilidade de cultivo *in vitro* e eficiência no campo (SOOD et al., 2020). O controle de nematoides por *Trichoderma* se dá pelo parasitismo de ovos e de J2, produção de metabólitos tóxicos aos nematoides, indução de resistência local e sistêmica, além da solubilização de nutrientes do solo

que favorecem o desenvolvimento da planta tornando as mais tolerantes a alta incidência de nematoides (SHARON et al., 2007; Khan et al.,2020; POCURULL et al.,2020; YANG et al.,2010).

O isolado T10 (*Trichoderma afroharzianum*), obtido a partir de um indivíduo morto de *Pratylenchus brachyurus*, demonstrou resultados satisfatórios no controle do nematoide das lesões radiculares em soja, sendo observada uma redução na reprodução de até aproximadamente 57% (PACHECO et al.,2020). O sucesso do isolado no controle de *P. brachyurus* nos encorajou a investigar seu potencial no controle de *Meloidogyne javanica* na soja, uma vez que os fungos do gênero *Trichoderma* geralmente não possuem alta especificidade em relação aos hospedeiros e o mesmo isolado poderia ser capaz de agir contra diferentes gêneros de nematoides.

O objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade de *Trichoderma afroharzianum* em controlar *M. javanica* em soja e compatibilidade deste fungo com produtos químicos geralmente utilizados no tratamento de sementes de soja.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do inóculo de *Meloidogyne javanica*

Inicialmente, vasos de 2 litros de capacidade contendo substrato esterilizado via autoclavagem, composto de solo de barranco e areia na proporção 1:1 (V: V), receberam mudas de tomateiro cv. Santa Clara com 21 dias de idade. Após 7 dias do transplântio, o substrato de cada vaso recebeu uma suspensão calibrada de ovos de *M. javanica*. Passados 60 dias da inoculação dos ovos, as plantas de tomate foram retiradas dos vasos e a extração de ovos seguiu a metodologia descrita por de Hussey e Barker (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981) para a montagem dos ensaios. Posteriormente, a calibração dos ovos aconteceu com o auxílio de uma câmara de Peters.

Obtenção e produção de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* e conídios de *Trichoderma afroharzianum*

O fungo *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10), utilizado nos estudos é o componente ativo do produto Rizotec[®], desenvolvido pela empresa Rizoflora Biotecnologia. O produto é formulado em pó e a dose aplicada foi calculada de forma a gerar uma concentração de 5×10^3 clamidósporos/g de substrato no vaso.

O isolado de *T. afroharzianum* (T10) utilizado nos estudos pertence ao Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides da Universidade Federal de Viçosa. Para a produção dos conídios de *T. afroharzianum*, 100 gramas de arroz beneficiado e 30 mL de água foram depositados em sacos plástico com filtro biológico e, posteriormente, os sacos passaram por autoclavagem durante 20 minutos a 120 °C. Cada saco plástico, após atingir a temperatura ambiente, recebeu cinco discos de meio de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA) contendo micélio de *T. afroharzianum* e permaneceu em câmara de crescimento por 21 dias no escuro, a 28 °C. Passando este período, os grumos de arroz com o micélio fúngico de *T. afroharzianum* foram colocados em Erlernmeyer com água esterilizada e, em seguida, agitados em incubadora por 30 minutos a 180 rpm para a liberação dos conídios aderidos aos grãos. Por fim, a suspensão foi filtrada em camadas de gaze de algodão e a suspensão de conídios foi calibrada utilizando-se câmara de Neubauer para a que quando aplicada resultasse em concentração de 1×10^4 conídios/g de substrato.

Compatibilidade de *Trichoderma afroharzianum* com *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica*

Substrato composto de solo de barranco (latossolo vermelho-amarelo do horizonte C) e areia lavada de granulometria média na proporção 1:1 (V:V) foi desinfestado via autoclavagem em temperatura de 121 °C e pressão de 1 atmosfera, durante 2 horas, e após 7 dias o substrato foi destampado para a liberação de eventuais gases tóxicos. Após 3 dias, realizou-se a transferência do substrato para vasos plásticos de 2 litros de capacidade e duas sementes de soja cv. 57HO123 IPRO, tratadas com *Bradyrhizobium japonicum*, foram semeadas por vaso. Após a emergência, apenas uma plântula permaneceu em cada vaso e recebeu suspensão de conídios do fungo *T. afroharzianum* ou de clamidósporos do fungo *P. chlamydosporia*, aplicada ao substrato ao redor da plântula, na concentração de 10.000 conídios. g⁻¹ de substrato ou de 5.000 clamidósporos. g⁻¹ de substrato, respectivamente. Os tratamentos foram: 1) solo infestado com clamidósporos de *P. chlamydosporia*; 2) solo infestados por conídios de *T. afroharzianum* e 3) solo com os dois fungos e 4) solo não infestado por fungos, que recebeu apenas água ao invés de suspensão aquosa de conídios ou clamidósporos. Cada parcela recebeu 3.000 ovos de *Meloidogyne javanica*, em suspensão aquosa, depositada em dois buracos de 1 cm de profundidade feitos ao redor da planta, equidistantes e a 1 cm de distância da planta. Os ensaios permaneceram em casa de vegetação com temperatura média de 28°C por 60 dias e após esse período, foram avaliados os números de galhas e de ovos. g⁻¹ de raiz e o fator de reprodução do

nematoide foi calculado. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e dez repetições.

Compatibilidade de *Trichoderma afroharzianum* com defensivos químicos *in vitro*

Discos de 4 mm de diâmetro do isolado *Trichoderma afroharzianum* (T-10) foram removidos das bordas das colônias cultivadas em meio batata-dextrose-água (BDA), e transferidos cada um para o centro de cada placa de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo BDA + agroquímicos nas concentrações finais de 0, 10, 100, 500, 1000 ou 1500 µL/L. Os produtos químicos testados estão descritos na Tabela 1. Os produtos foram incorporados ao meio de cultura fundente ($\pm 45^{\circ}\text{C}$), e o disco com o fungo foi colocado sobre o meio em temperatura ambiente e incubado em fotoperíodo de 12 horas, a 28°C por 3 dias. A avaliação do crescimento micelial foi realizada por meio de medições dos diâmetros (cm) das colônias em dois sentidos perpendiculares entre si, fazendo-se a média das duas medidas. As medições foram realizadas em 3 dias consecutivos em intervalos de 24 horas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 10 x 5 (tratamentos x concentrações), com quatro repetições por tratamento. Cada placa de Petri representou uma unidade experimental.

Compatibilidade de *Trichoderma afroharzianum* com defensivos químicos em casa de vegetação

Para verificar a compatibilidade *T. afroharzianum* com produtos químicos (Tabela 1), foi realizado o tratamento das sementes de soja com os defensivos. Em cada tubo plástico do tipo Falcon de 50 mL, foram adicionados 5 mL da solução de cada produto químico na dose recomendada e 100 sementes de soja. Os tubos foram agitados cuidadosamente até que as suspensões fossem homogêneas. Logo após, as sementes foram colocadas sobre um papel filtro para secagem, e permaneceram em temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida, as sementes foram acondicionadas novamente nos tubos tipo Falcon e a quantidade de 2×10^7 conídios de *T. afroharzianum* por semente de soja foi adicionada em cada tubo. Os tubos foram novamente agitados até que os conídios de *T. afroharzianum* pudessem aderir às sementes. Sementes de soja tratadas somente com *T. afroharzianum* foram utilizadas como testemunha positiva, enquanto que, sementes de soja sem tratamento com fungo ou produto químico, foram tratadas apenas com água esterilizada e usadas no tratamento testemunha negativa.

Vasos de 2 L de capacidade foram preenchidos com o substrato composto de mistura terra horizonte C de latossolo vermelho-amarelo e areia, na proporção 1:1 (v:v), previamente autoclavada. A seguir, cada vaso recebeu uma suspensão com 3.000 ovos de *M. javanica*, que foi pipetada em dois buracos de 1 cm de profundidade feitos ao redor da planta, equidistantes e a 1 cm de distância da planta. Cada vaso, previamente infestado com *M. javanica*, recebeu uma semente de soja tratada com um dos produtos químicos e *T. afroharzianum* (T10). O experimento foi conduzido por 45 dias e o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento. Quarenta e cinco dias após a inoculação e semeio das sementes de soja para os vasos, as plantas foram avaliadas quanto às seguintes variáveis: massa fresca da parte aérea, massa fresca da raiz, número de galhas por sistema radicular e por grama de raiz, número de ovos por sistema radicular e por grama de raiz.

A contagem do número de galhas foi realizada em microscópio estereoscópio com fonte de luz acessória. Os ovos foram extraídos pela técnica de Hussey & Barker (1973) e o número de ovos foi estimado em microscópio óptico com o auxílio de uma lâmina de Peters. Ao final do experimento, o substrato foi homogeneizado e 1g de solo foi coletado de cada vaso para determinação da concentração do fungo no solo pelo método de diluição seriada, através da quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC). Foi feito o plaqueamento em meio *Trichoderma*-selective medium (TSM) proposto por Elad; Chet; Henis, (1981), totalizando seis repetições por tratamento.

Análise estatística

Para análises estatísticas foram calculadas as médias e desvios-padrão dos resultados. Quando indicado, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), teste de Tukey, teste LSD, teste Scott-knott, e análise de regressão com significância de 5%, utilizando o programa estatístico SISVAR®.

Tabela 1: Defensivos agrícolas utilizados no tratamento de sementes na soja.

Produto	Ingrediente ativo	Dosagem recomendada
Avicta 500 FS®	Abamectina	125 mL/ 100 kg de sementes
Captan® SC	Captan	250 mL/ 100 kg de sementes
Cropstar®	Imidacloprido + Tiodicarbe	0,7 L/ 100 kg de sementes
Cruiser® 350 FS	Tiametoxam	300 mL/ 100 kg de sementes
Derosal Plus®	Carbendazim + Tiram	200 mL/ 100kg de sementes
Maxim® advanced	Metalaxil + Fludioxonil + Tiabendazol	500 mL/ 100 kg de sementes
Standak®Top	Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil	200 mL/ 100 kg de sementes
Spectro®	Difenoconazol	33.4 mL/ 100 kg de sementes

RESULTADOS

Compatibilidade de *Trichoderma afroharzianum* com *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica*

A aplicação de *T. afroharzianum* reduziu significativamente o número de ovos do nematoide por grama de raiz nos dois experimentos (45,27% e 50,12%, respectivamente) em relação ao tratamento testemunha e não diferiu estatisticamente dos tratamentos com *P. chlamydosporia* (Rizotec) e com a mistura *T. afroharzianum* e *P. chlamydosporia* (Figura 1). *T. afroharzianum* reduziu significativamente o número de galhas por grama de raiz, em relação à testemunha, no primeiro e no segundo experimentos (Figura 1).

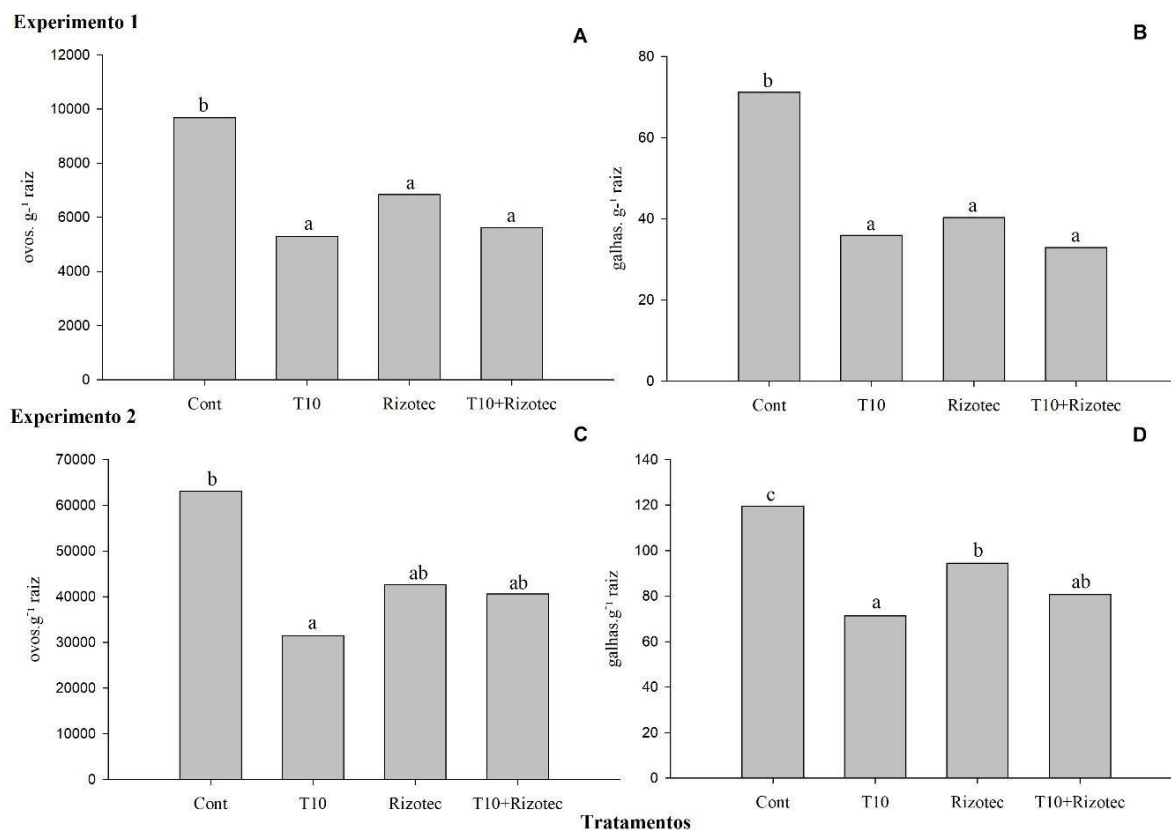


Figura 1. Número de ovos, número de galhas, número de ovos e de galhas de *M. javanica*. g⁻¹ raiz de soja após 45 dias da aplicação de T10 = *Trichoderma afroharzianum* e/ou Rizotec. Cont = Controle. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Compatibilidade de *Trichoderma afroharzianum* com defensivos químicos *in vitro*

A análise de variância revelou que o modelo linear foi significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$) para os princípios ativos Abamectina (Avicta), Tiametoxam (Cruiser) e Imidacloprido + Tiodicarbe (Cropstar), isto é, não inibiram o crescimento de *T. afroharzianum*

em função da concentração (Figura 2). Apenas Captan apresentou efeito de dose sobre o crescimento fúngico, sendo que o aumento da inibição foi diretamente proporcional ao aumento da dose, sendo que reduções significativas ocorreram a partir da dose de 500 ppm. Os ingredientes ativos Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil (Standak Top), Difenconazol (Spectro), Metalaxil + Fludioxonil + Tiabendazol (Maxim advanced) e Carbendazim + Tiram (Derosal Plus), inibiram totalmente o crescimento de *T. afroharzianum* em meio de cultura, mesmo na menor dose.

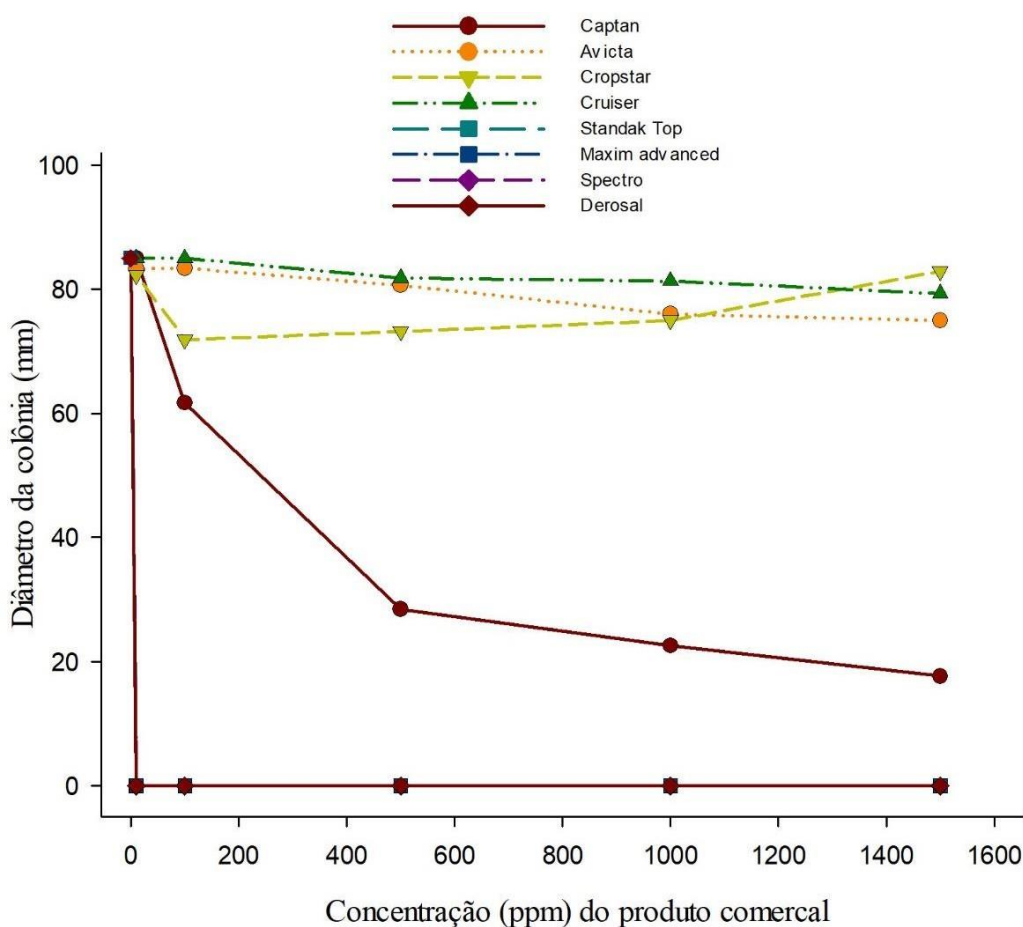


Figura 2. Efeito das diferentes concentrações de defensivos agrícolas no crescimento micelial de *Trichoderma afroharzianum* em meio de cultura BDA. Captan (Captan), Cropstar (Imidacloprido + Tiodicarbe), Avicta (Abamectina), Cruiser (Tiametoxam), Maxim Advanced (Metalaxil + Fludioxonil + Tiabendazol), Derosal (Carbendazim+tiram), Spectro (Difeconazol) e Standak Top (Piraclostrobina + Tiofanato Metílico + Fipronil).

Compatibilidade de *Trichoderma afroharzianum* com defensivos químicos em casa de vegetação

Trichoderma afroharzianum foi capaz de controlar *M. javanica* quando aplicado com a maioria dos produtos químicos para tratamento de sementes de soja (Tabela 3). Em geral, a aplicação de *T. afroharzianum* com os produtos que continham os princípios ativos Abamectina

e Imidacloprido + Tiodicarbe não resultou em incremento adicional significativo no controle do nematoide, além do efeito que cada químico apresenta sobre os nematoides por si só. Já a aplicação do fungo com os produtos que continham os princípios ativos Carbendazim + Tiram e Captan resultou em maior eficiência no controle de *M. javanica* em relação à aplicação dos químicos sem o fungo. A aplicação do fungo *Trichoderma afroharzianum* em TS juntamente com os princípios ativos Difenconazole e Metalaxil + Fludioxonil + Tiabendazol não resultou diferença significativa no controle do nematoide, mas o nível de controle foi baixo.

Tabela 3. Efeito do tratamento de sementes com *Trichoderma afroharzianum* isolado T10 e agroquímicos no número de ovos, número de galhas, número de ovos e de galhas de *M. javanica*. g⁻¹ raiz de soja após 45 dias em casa de vegetação.

Tratamento	Ovos	Controle (%)	Galhas	Controle (%)
Controle	58000 c		438 c	
T10	35125 b	39	186 a	57,53
Abamectina	19250 a	66,8	148 a	66,21
Abamectina + T10	17333 a	70,11	125 a	71,46
Imida+Tiodicarbe	27250 a	53,01	196 a	55,25
Imida+Tiodicarbe+ T10	27333 a	52,87	154 a	64,84
Tiametoxam	44166 c	23,85	295 b	32,64
Tiametoxam + T10	36166 b	37,64	263 b	39,95
Captan	44750 c	22,84	271 b	38,12
Captan + T10	31666 b	45,40	216 a	50,68
Pirac+TioMet+Fip	43791 c	24,49	263 b	39,95
Pirac+TioMet+Fip+T10	32125 b	44,61	191 a	56,39
Carbendazin	51000 c	12,06	338 b	22,83
Carbendazin + T10	35916 b	38,07	213 a	51,36
Difenoconazole	38083 b	34,33	289 b	34,01
Difenoconazole + T10	34083 b	41,23	214 a	51,14
Meta+Flu+Tiaben	46708 c	19,46	337 b	23,05
Meta+Flu+Tiaben + T10	43791 c	24,49	247 a	43,60
CV (%)	26,84		32,25	

Imida = Imidacloprido, Pira = Piraclostrobina, TioMeT = Tiofanato Metálico, Fip = Fipronil, Meta = Metalaxyl, Flu = Fludioxonil, Tiaben = Tiabendazol. Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Scott-knott a 5 % de probabilidade.

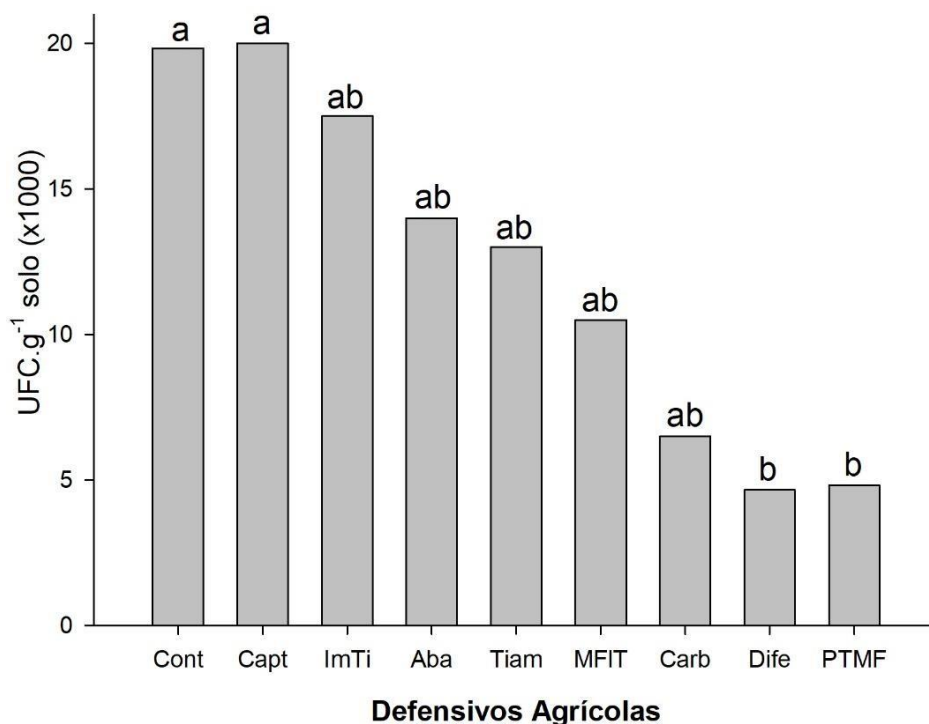


Figura 3. Unidades formadoras de colônia (UFC) de *Trichoderma afroharzianum* no solo após 45 dias da infestação. O fungo *T. afroharzianum* foi aplicado na dosagem de 10000 conídios / cm³ de solo para todos tratamentos e os defensivos agrícolas foram aplicados na dosagem recomendada para 100 kg de sementes de soja. Cont = *T. afroharzianum*, Capt = Captan, ImTi = Imidacloprido + Tiodicarbe, Aba = Abamectina, Tiam = Tiametoxam, MFiT = Metalaxyl+Fludioxonil+Tiabendazol, Carb = Carbendazim, Dife = Difeconazole e PTMF = Piraclostrobrina + Tiofanato Metílico + Fipronil. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste LSD a 5 % de probabilidade.

O isolado de *T. afroharzianum* apresentou a capacidade de sobreviver no solo, mesmo após o contato com os defensivos agrícolas. Em todos os tratamentos, foi possível recuperar colônias de *T. afroharzianum* do solo, porém quando aplicado junto com Carbendazim + Tiram, Difenconazol e Piraclostrobrina + Tiofanato metílico + Fipronil foram observadas menores quantidades de unidades formadoras de colônia. Nos tratamentos com os princípios ativos Abamectina e Imidacloprido + Tiodicarbe, Tiametoxam e Captan o número de colônias de T-10 no solo não diferiu estatisticamente do tratamento testemunha, porém, quando T-10 foi aplicado em conjunto com Difenconazol ou Piraclostrobrina + Tiofanato metílico + Fipronil observou-se menor número UFC, o que indica que esses princípios ativos interferem na sobrevivência do fungo.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos experimentos reforçam a possibilidade de uso de agentes de controle biológico no manejo integrado de doenças em conjunto com agroquímicos. Alguns microrganismos quando usados em conjunto com outros microrganismos ou produtos químicos podem ter efeitos aditivos contra patógenos, promovendo maior controle, além de que a combinação de estratégias favorece o controle de maior quantidade de fitopatógenos, porém a utilização conjunta pode comprometer a eficiência do agente de controle biológico.

Várias espécies de *Trichoderma* já foram relatadas controlando o nematoide de galhas, a exemplo de *T. harzianum* e *Trichoderma citrinoviride* (FAN et al., 2020, Khan et al., 2018). A aplicação dos dois fungos se torna uma alternativa no controle de nematoides, uma vez que os fungos tem distintos mecanismos de controle. Muthulakshmi et al (2012), ao combinar *P. chlamydosporia*, *Pseudomonas fluorescens* e *Trichoderma viride*, encontrou maiores reduções nos números de cistos e de ovos de *Globodera* spp. Arieira et al (2018), avaliando a aplicação de *P. lilacinum* + *T. harzianum* + Bioativador, verificou que maiores porcentagens de redução de espécimes de *Pratylenchus brachyurus*. Resultado semelhante foi encontrado por Pacheco e colaboradores (2020) ao avaliar combinação de *P. chlamydosporia*, *T. afroharzianum* e *Duddingtonia flagrans* no controle de *P. brachyurus* em soja. Em nosso estudo em casa de vegetação, houve compatibilidade entre *T. afroharzianum* e *P. chlamydosporia*, não havendo detrimento da ação nematicida com a utilização de ambos em conjunto quando comparada com a ação nematicida de ambos utilizados em separado. Apesar de não ter havido incompatibilidade do uso conjunto dos fungos, também não houve efeito aditivo ou sinérgico, pois o nível de efeito foi similar ao da utilização de ambos em separado (Figura 1).

O controle de nematoides por espécies de *Trichoderma* é associado a diferentes mecanismos utilizados pelo fungo. Os mecanismos mais investigados são o parasitismo de ovos e de juvenis de segundo estágio, a degradação da cutícula do nematoides pela ação de quitinases, de metabólitos e de proteases e a indução de resistência sistêmica na planta hospedeira (ZHANG et al. 2015). Metabólitos secundários produzidos tem papel importante na eclosão e mortalidade de juvenis de *Meloidogyne* (Khan et al.2020). Vários estudos investigaram a ativação de respostas de defesas das plantas ocasionadas pela ação de *Trichoderma*, que aumenta a expressão de genes associados à resistência contra estresses abióticos e bióticos (LEONETTI et al.,2017). O isolado T10 de *T. afroharzianum* já foi observado colonizando ovos e J2 de *P. brachyurus* (PACHECO et al.,2020) e neste trabalho constatou-se a redução da

população de *M. javanica* que no campo pode refletir positivamente na produtividade dos cultivos.

O estudo da compatibilidade *in vitro* de T10 com defensivos agrícolas mostrou a sensibilidade do isolado a alguns princípios ativos e a compatibilidade com outros. Bagwan (2010) observou que *T. harzianum* e *T. viride* eram incompatíveis com Captan, o mesmo resultado foi encontrado por Maheshwary et al. (2020) ao avaliar diferentes fungicidas no crescimento de *T. asperellum*, resultados diferentes do que foi encontrado nesse trabalho, no qual Captan, até a dosagem de 100 ppm, foi compatível com T10.

O efeito aditivo de controle do nematoide de galhas por T10, quando aplicados junto com Captan, Tiametoxam, Carbendazin + Thiram e Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, pode ser explicado pela metabolização de algum composto dos princípios ativos que tenha proporcionado maior agressividade ao isolado, ocasionando maiores efeitos no controle (PAPAVIZAS, 1985). O mesmo não observado quando foi aplicado com *Difenoconazol* e com Metalaxil + Fludioxonil + Tiabendazol. Widmer (2019), ao estudar a compatibilidade de diferentes isolados a alguns fungicidas, observou que *Trichoderma asperellum* e *T. koningiopsis* sofreram significativas reduções de suas populações no solo com clorotalonil quando comparado com solo tratado com outros fungicidas.

O princípio ativo Carbendazim pertence ao grupo dos benzimidazóis, que atua inibindo o desenvolvimento do tubo germinativo, crescimento micelial e formação do apressório. Essa ação do Carbendazim explica que tanto *in vitro* quanto no tratamento de sementes ele compromete o desenvolvimento de T10. Difenoconazol é um triazol que atua como inibidor do transporte de elétrons nas mitocôndrias das células dos fungos, inibindo a formação de ATP, essencial nos processos metabólicos dos fungos. O Tiofanato metílico atua na interferindo na síntese de DNA e processos de divisão celular (SOUZA & DUTRA, 2003). Essa ação pode ter interferido no crescimento e sobrevivência de T10 *in vitro*, mas nem sempre o efeito observado *in vitro* pode ser traduzido para o campo, quando o químico e o fungo são aplicados em tratamento de sementes, pois fatores do solo, como adsorção de moléculas em partículas de argila ou metabolização de compostos químicos pela microbiota da rizosfera podem alterar a ação de químicos sobre os agentes de controle biológico. Isto coloca em evidência a necessidade de realização de testes de compatibilidade *in vivo*, com utilização de solo e planta, quando se deseja saber com maior segurança a possibilidade de utilização de um defensivo químico em conjunto com um agente de controle biológico no campo.

CONCLUSÃO

O isolado T10 de *Trichoderma afroharzianum* reduz a população de *M. javanica* e apresenta compatibilidade com *Pochonia chlamydosporia* e com os químicos Abamectina e Imidacloprido + Tiodicarbe, Tiametoxam e Captan no tratamento de semente de soja.

REFERÊNCIAS

- Arieira, C. R.d., de Araújo, F. G., Kaneko, L., & Santiago, D. C. Biological control of *Pratylenchus brachyurus* in soya bean crops. **Journal of Phytopathology**, v. 166, n. 10, p. 722-728, 2018.
- Al-Hazmi, A. S., Tariqjaveed, M. Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 2, p. 288-292, 2016.
- Bagwan, N. B. Evaluation of *Trichoderma* compatibility with fungicides, pesticides, organic cakes and botanicals for integrated management of soil borne disease of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **International Journal of Plant Protection**, v. 3, n. 2, p. 206-209, 2010.
- Boneti, J. I. S.; Ferraz, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, p.553, 1981.
- Bhuiyan, S. A., Garlick, K., Anderson, J. M., Wickramasinghe, P., & Stirling, G. R. Biological control of root-knot nematode on sugarcane in soil naturally or artificially infested with *Pasteuria penetrans*. **Australasian Plant Pathology**, v. 47, n. 1, p. 45-52, 2018.
- Cao, H., Jiao, Y., Yin, N., Li, Y., Ling, J., Mao, Z., Yang, Y., Xie, B. Analysis of the activity and biological control efficacy of the *Bacillus subtilis* strain Bs-1 against *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**, v. 122, p. 125-135, 2019.
- Chinheya, C. C., Yobo, K. S., Laing, M. D. Biological control of the rootknot nematode, *Meloidogyne javanica* (Chitwood) using *Bacillus* isolates, on soybean. **Biological control**, v. 109, p. 37-41, 2017.
- Dahlin, P., Eder, R., Consoli, E., Krauss, J., & Kiewnick, S. Integrated control of *Meloidogyne incognita* in tomatoes using fluopyram and *Purpureocillium lilacinum* strain 251. **Crop Protection**, v. 124, p. 104874, 2019.
- Elad, Y., Chet, I., Henis, Y. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma spp.* from soil. **Phytoparasitica**, v. 9, n. 1, p. 59-67, 1981.

Fan, H., Yao, M., Wang, H., Zhao, D., Zhu, X., Wang, Y., Xiu, L., Duan, Y., Chen, L. Isolation and effect of *Trichoderma citrinoviride* Sneh1910 for the biological control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **BMC microbiology**, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2020.

Hussey, R.S., Barker, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne spp.*, including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v.57, p.1025-1028, 1973.

Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G., Kikuchi, T., Lopez, R. M., Rius, J. E. P., Wasemael, L. W. M. L., Perry, R. N. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, v. 14, n. 9, p. 946-961, 2013.

Khan, R. A. A., Najeeb, S., Mao, Z., Ling, J., Yang, Y., Li, Y., Xie, B. Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic bacteria and Root-knot nematode. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 401, 2020.

Khan, M. R., Ahmad, I., Ahmad, F. Effect of pure culture and culture filtrates of *Trichoderma* species on root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infesting tomato. **Indian Phytopathology**, v. 71, n. 2, p. 265-274, 2018.

Leonetti, P., Zonno, M. C., Molinari, S., & Altomare, C. Induction of SA-signaling pathway and ethylene biosynthesis in *Trichoderma harzianum*-treated tomato plants after infection of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Plant cell reports**, v. 36, n. 4, p. 621-631, 2017.

Maheshwary, N., Gangadhara Naik, B., Amoghavarsha Chittaragi, M., Naik, S. K., & Nandish, M. Compatibility of *Trichoderma asperellum* with fungicides. **Pharma Innov. J**, v. 9, p. 136-140, 2020.

Mukhtar, T., Tariq-Khan, M., Aslam, M. N. Bioefficacy of *Trichoderma* Species Against Javanese Root-Knot Nematode, *Meloidogyne javanica*, in Green Gram. **Gesunde Pflanzen**, p. 1-8, 2021.

Muthulakshmi, M., Kumar, S., Subramanian, S., Anita, B. Compatibility of *Pochonia chlamydosporia* with other biocontrol agents and carbofuran. **Journal of Biopesticides**, v. 5, p. 243, 2012.

Pacheco, P. V., Monteiro, T. S., Coutinho, R. R., Balbino, H. M., Freitas, L. G. Fungal biocontrol reduces the populations of the lesion nematode, *Pratylenchus brachyurus*, in soybean and corn. **Nematology**, v. 1, n. aop, p. 1-8, 2020.

Papazivas, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual review of phytopathology**, v. 23, n. 1, p. 23-54, 1985.

Pocurull, M., Fullana, A. M., Ferro, M., Valero, P., Escudero, N., Saus, E., Galbadón, T., Sorribas, F. J. Commercial formulates of *Trichoderma* induce systemic plant resistance to *Meloidogyne incognita* in tomato and the effect is additive to that of the Mi-1.2 resistance gene. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 3042, 2020.

Sahebani, N.; Hadavi, N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil biology and biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2016-2020, 2008.

Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiwy, M. S., Ramakrishnan, M., Landi, M., Araniti, F., Sharma, A. *Trichoderma*: the “secrets” of a multitasking biocontrol agent. **Plants**, v. 9, n. 6, p. 762, 2020.

Sharon, E., Chet, I., Viterbo, A., Bar-Eyal, M., Nagan, H., Samuels, G. J., & Spiegel, Y. Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. **European journal of plant pathology**, v. 118, n. 3, p. 247-258, 2007.

Souza, P, E. **Fungicidas no controle e manejo de doenças de plantas**. UFLA, 2003.

Timper, P., Liu, C., Davis, R. F., Wu, T. Influence of crop production practices on *Pasteuria penetrans* and suppression of *Meloidogyne incognita*. **Biological control**, v. 99, p. 64-71, 2016.

Toninato, B. O., Souza, D. H., Pontalti, P. R., Lopes, A. P. M., & Dias-Arieira, C. R. *Meloidogyne javanica* control in lettuce with fertilizers applied isolated or associated with biological product. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 384-389, 2019.

Viggiano, J, R.; Freitas, L, G.; Lopes, E, A. Use of *Pochonia chlamydosporia* to control *Meloidogyne javanica* in cucumber. **Biological control**, v. 69, p. 72-77, 2014

Widmer, T, L. Compatibility of *Trichoderma asperellum* isolates to selected soil fungicides. **Crop Protection**, v. 120, p. 91-96, 2019.

Yang, Z. S., Li, G. H., Zhao, P. J., Zheng, X., Luo, S. L., Li, L., Niu, X. M., Zhang, K. Q. Nematicidal activity of *Trichoderma* spp. and isolation of an active compound. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 2297-2302, 2010.

YI, Xiong et al. Understanding the pathogenicity of *Pochonia chlamydosporia* to root knot nematode through omics approaches and action mechanism. **Biological Control**, v. 162, p. 104726, 2021.

Zhang, S., Gan, Y., Xu, B. Biocontrol potential of a native species of *Trichoderma longibrachiatum* against *Meloidogyne incognita*. **Applied Soil Ecology**, v. 94, p. 21-29, 2015.