



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**TIAGO DOS SANTOS PEREIRA**

**POTENCIAL DO EXTRATO AQUOSO OBTIDO DE  
VERMICOMPOSTO ENRIQUECIDO COM *TRICHODERMA*  
COMO ESTIMULANTE DO CRESCIMENTO E CONTROLADOR  
DE NEMATOIDES EM PLANTAS DE TOMATE E PIMENTÃO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA/DF**  
**MARÇO DE 2019**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**POTENCIAL DO EXTRATO AQUOSO OBTIDO DE VERMICOMPOSTO  
ENRIQUECIDO COM *TRICHODERMA* COMO ESTIMULANTE DO  
CRESCIMENTO E CONTROLADOR DE NEMATÓIDES EM PLANTAS DE  
TOMATE E PIMENTÃO**

**TIAGO DOS SANTOS PEREIRA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JADER GALBA BUSATO**

**CO-ORIENTADOR: DR. JUSCIMAR DA SILVA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA/DF**  
**MARÇO DE 2019**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**POTENCIAL DO EXTRATO AQUOSO OBTIDO DE VERMICOMPOSTO  
ENRIQUECIDO COM *TRICHODERMA* COMO ESTIMULANTE DO  
CRESCIMENTO E CONTROLADOR DE NEMATÓIDES EM PLANTAS DE  
TOMATE E PIMENTÃO**

**TIAGO DOS SANTOS PEREIRA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM AGRONOMIA.**

**APROVADA POR:**

---

**PROF. DR. JADER GALBA BUSATO**  
(Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAV-UnB)

---

**PROF. DR. LEONARDO BARROS DOBBS**  
(Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM)

---

**DR. JADIR BORGES PINHEIRO**  
(Embrapa Hortaliças)

**BRASÍLIA, 07 DE MARÇO DE 2019**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo autor

dD724d dos Santos Pereira, Tiago  
POTENCIAL DO EXTRATO AQUOSO OBTIDO DE VERMICOMPOSTO  
ENRIQUECIDO COM *TRICHODERMA* COMO ESTIMULANTE DO CRESCIMENTO E  
CONTROLADOR DE NEMATOIDES EM PLANTAS DE TOMATE E PIMENTÃO/  
Tiago dos Santos Pereira; orientador Jader Galba  
Busato; co-orientador Juscimar da Silva. --  
Brasília, 2019.  
102 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Agronomia)  
-- Universidade de Brasília, 2019.

1. Agronomia. 2. Bioestimulantes. 3. Biofortificação.  
I. Galba Busato, Jader, orient. II. da Silva, Juscimar,  
co orient. III. Título.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

PEREIRA, T.S. **Potencial do extrato aquoso obtido de vermicomposto enriquecido com *Trichoderma* como estimulante do crescimento e controlador de nematoides em plantas de tomate e pimentão.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2019, 102 p. Dissertação de Mestrado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Tiago dos Santos Pereira

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Potencial do extrato aquoso obtido de vermicomposto enriquecido com *Trichoderma* como estimulante do crescimento e controlador de nematoides em plantas de tomate e pimentão.

GRAU: Mestre

ANO: 2019

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

---

Nome: Tiago dos Santos Pereira

CPF: 005.706.511-07

Endereço: QNP 27 Conjunto I Casa 8

Tel: +55 61 992247447

Email: [tiagodosantosp@gmail.com](mailto:tiagodosantosp@gmail.com)

**RESUMO** – A agricultura do século 21 tem exigido cada vez mais que os problemas enfrentados nas lavouras sejam reduzidos empregando-se insumos renováveis e com baixo potencial de contaminação do ambiente. Nesse sentido, o uso de produtos à base de substâncias naturais e microrganismos capazes de estimular o crescimento e/ou proteger os vegetais contra doenças tem sido requerido. O presente trabalho objetivou avaliar o potencial do extrato aquoso obtido de vermicomposto enriquecido com *Trichoderma* spp. como estimulante do crescimento e controlador do nematoide-das-galhas em plantas de tomateiro e pimentão. Para isto, dois experimentos foram instalados, um com tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv. “Santa Cruz”) e pimentão (*Capsicum annuum* L. cv “Magali R”), os quais foram artificialmente inoculados com o nematoide-das-galhas (*Meloidogyne incognita*). Como possível agente indutor de crescimento e tratamento, utilizou-se o extrato aquoso de vermicomposto, aqui descrito como extrato húmico solúvel em água (EHSA). O vermicomposto foi utilizado como fonte de substâncias bioativas e também como possível meio de crescimento da população de duas espécies de *Trichoderma* (*Trichoderma asperellum* e *T. virens*), as quais têm sido reportadas como potenciais agentes de controle biológico do nematoide-das-galhas. Os tratamentos foram: EHSA de vermicomposto (V), EHSA de vermicomposto fortificado com *T. asperellum* (V+TA), EHSA de vermicomposto fortificado com *T. virens* (V+TV), EHSA de vermicomposto fortificado com *T. asperellum* + *T. virens* (V+TA+TV) e o controle, sem adição de EHSA. Foram realizadas medições biométricas, na taxa fotossintética, no conteúdo de nutrientes e na reprodução do nematoide-das-galhas. Observou-se que, para o tomateiro, o tratamento V+TA+TV aumentou a eficiência do uso da água. A produtividade foi aumentada em todos os tratamentos com adição de EHSA, com aumento significativo de 864% para V+TV em relação ao controle. Porém, o antagonismo de *Trichoderma* spp. não foi eficaz na redução da reprodução de *M. incognita* nas condições deste experimento. O acúmulo de nutrientes nas plantas de tomateiro tratadas também foi maior principalmente para N, K, Ca e S. Para o pimentão, observou-se que a eficiência do uso da água foi aumentada em 94% pelo tratamento V+TV e 43% para o tratamento V+TA em relação ao controle. V+TV foi eficiente na promoção do crescimento das plantas que apresentaram maior massa seca de parte aérea e maior massa de raiz. Já as plantas tratadas com EHSA de vermicomposto, apresentaram maior produtividade. Reduções drásticas no número de ovos e eventuais J2 de *M. incognita* também foram observadas para os tratamentos com adição de EHSA, com destaque para os tratamentos V e V+TA+TV. O acúmulo de nutrientes nas plantas de pimentão tratadas

com EHSAs também foi maior principalmente para N, Ca, Mg, B, Fe e Mn. Portanto, a utilização de EHSAs de vermicomposto enriquecido com *Trichoderma* spp. nas condições do presente estudo, induziu mecanismos de tolerância nas plantas de tomateiro e pimentão, que mesmo sob altas infestações do nematoide-das-galhas, conseguiram atingir bom desenvolvimento vegetativo e produtividade.

**Palavras-chave:** Bioinsumo; hortaliças; crescimento vegetal; *Meloidogyne incognita*; controle biológico

**ABSTRACT** - Agriculture in the 21st century has increasingly demanded that the problems faced in agriculture be reduced by using renewable inputs and with low potential for environmental contamination. In this sense, the use of products based on natural substances and microorganisms capable of stimulating growth and / or protecting plants against diseases has been required. The present work aimed to evaluate the potential of the aqueous extract obtained from vermicompost enriched with *Trichoderma* spp. as growth stimulant and control of the root knot nematode in tomato plants and the other with bellpepper. For this, two experiments were installed, one with tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. "Santa Cruz") and bellpepper (*Capsicum annuum* L. cv "Magali R"), which were artificially inoculated with the root knot nematode *Meloidogyne incognita*). As a possible growth-inducing agent and treatment, the aqueous extract of vermicompost, herein described as water-soluble humic extract (EHSA), was used. The vermicompost was used as a source of bioactive substances and also as a possible growth medium for the population of two species of *Trichoderma* (*Trichoderma asperellum* and *T. virens*), which have been reported as potential biological control agents of the root knot nematode. The treatments were: EHSA of vermicompost (V), EHSA of vermicompost fortified with *T. asperellum* (V + TA), EHSA of vermicompost fortified with *T. virens* (V + TV), EHSA of vermicompost fortified with *T. asperellum* + *T. virens* (V + TA + TV) and control, without addition of EHSA. Biometric measurements were performed on the photosynthetic rate, nutrient content and reproduction of the root knot nematode. It was observed that, for the tomato, the V + TA + TV treatment increased the efficiency of water use. Productivity was increased in all treatments with addition of EHSA, with a significant increase of 864% for V + TV in relation to the control. However, the antagonism of *Trichoderma* spp. was not effective in reducing reproduction of *M. incognita* under the conditions of this experiment. The nutrient accumulation in the treated tomato plants was also higher mainly for N, K, Ca and S. For pepper, it was observed that the efficiency of water use was increased by 94% by V + TV treatment and 43% by V + TA treatment in relation to control. V + TV was efficient in the promotion of the growth of the pepper plants, presenting bigger shoot mass and larger root mass. However, the plants treated with vermicompost EHSA showed higher productivity. Dose reductions in the number of eggs and eventual J2 of *M. incognita* were also observed for treatments with addition of EHSA, with emphasis on V and V + TA + TV treatments. The accumulation of nutrients in pepper plants treated with EHSA was also higher mainly

for N, Ca, Mg, B, Fe and Mn. Therefore, the use of EHSA of vermicompost enriched with *Trichoderma* spp. in the conditions of the present study, induced tolerance mechanisms in tomato and pepper plants, that even under high nematode infestations the plants managed to achieve good vegetative growth and satisfactory productivity.

**Keywords:** Humic substances; biostimulant; vegetables; plant growth; nematode; biological control.



# LISTA DE TABELAS

## PRIMEIRA SEÇÃO – CONTEXTUALIZAÇÃO GERAL

<b>Tabela 1.</b> Área cultivada e produção de hortaliças no Distrito Federal no ano de 2017. .....	19
---	----

## SEGUNDA SEÇÃO – ARTIGO I

<b>Tabela 1.</b> Valores de pH, condutividade elétrica e carbono orgânico total em vermicompostos produzidos a base de esterco bovino e enriquecidos com <i>Trichoderma</i> . .....	48
--	----

<b>Tabela 2.</b> Teores médios de macronutrientes na parte aérea de plantas de tomateiro tratadas com EHSA e inoculadas com <i>Meloidogyne incognita</i> . .....	57
--	----

<b>Tabela 3.</b> Teores médios de micronutrientes na parte aérea de plantas de tomateiro tratadas com EHSA e inoculadas com <i>Meloidogyne incognita</i> . .....	57
--	----

## TERCEIRA SEÇÃO – ARTIGO II

<b>Tabela 1.</b> Teores médios de macronutrientes na parte aérea de plantas de pimentão tratadas com EHSA e inoculadas com <i>Meloidogyne incognita</i> . .....	90
---	----

<b>Tabela 2.</b> Teores médios de micronutrientes na parte aérea de plantas de pimentão tratadas com EHSA e inoculadas com <i>Meloidogyne incognita</i> . .....	90
---	----

# LISTA DE FIGURAS

## PRIMEIRA SEÇÃO – CONTEXTUALIZAÇÃO GERAL

**Figura 1.** Hipótese de desenvolvimento do presente trabalho. ....24

## SEGUNDA SEÇÃO – ARTIGO I

**Figura 1.** Assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C), concentração interna de CO<sub>2</sub> (D) e eficiência de uso de água (E) de plantas de tomateiro tratadas com EHSA e inoculadas com *Meloidogyne incognita*. ....50

**Figura 2.** Comprimento da parte aérea (A), massa seca de parte aérea (B), massa fresca de raiz (C) e produtividade (D) de plantas de tomateiro tratadas com EHSA e inoculadas com *Meloidogyne incognita*. ....52

**Figura 3.** Fator de reprodução (A) e número de ovos e eventuais J2 por grama de raízes (B) de plantas de tomateiro tratadas com EHSA e inoculadas com *Meloidogyne incognita*. ....54

## TERCEIRA SEÇÃO – ARTIGO II

**Figura 1.** Assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C), concentração interna de CO<sub>2</sub> (D) e eficiência de uso de água (E) de plantas de pimentão tratadas com EHSA e inoculadas com *Meloidogyne incognita*. ....82

**Figura 2.** Comprimento da parte aérea (A), massa seca de parte aérea (B), massa fresca de raiz (C) e produtividade (D) de plantas de pimentão tratadas com EHSA e inoculadas com *Meloidogyne incognita*. ....85

**Figura 3.** Fator de reprodução (A) e número de ovos e eventuais J2 por grama de raízes de plantas (B) de pimentão tratadas com EHSA e inoculadas com *Meloidogyne incognita*. ....87

**Figura 4.** Índice de Galhas (IG) e Índice de Massas de Ovos (IMO) de plantas de pimentão tratadas com EHSA e inoculadas com *Meloidogyne incognita*. ....89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA – Ácido Abscísico

AF – Ácido Fúlvico

AH – Ácido Húmico

CE – Condutividade Elétrica

COT – Carbono Orgânico Total

DAP – Dias Após o Plantio

DAS – Dias Após a Semeadura

DAT – Dias Após o Transplântio

EHSA – Extrato Húmico Solúvel em Água

EMATER – Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FR – Fator de Reprodução

GA3 – Ácido Giberélico

IAA – Ácido Indolacético

J2 – Juvenil de Segundo Estádio

NOGR – Número de Ovos e J2 por Grama de Raízes

pH - Potencial Hidrogeniônico

SH – Substancias Húmicas

TA – *Trichoderma asperellum*

TV – *Trichoderma virens*

V – Vermicomposto

# SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA SEÇÃO – CONTEXTUALIZAÇÃO GERAL</b> .....	12
1.1 INTRODUÇÃO.....	12
1.2 REVISÃO DE LITERATURA .....	14
1.3 OBJETIVO GERAL.....	24
1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	26
<b>SEGUNDA SEÇÃO – ARTIGO I</b> .....	35
<b>EXTRATO DE VERMICOMPOSTO ENRIQUECIDO COM <i>TRICHODERMA SPP.</i> ESTIMULA O CRESCIMENTO DE TOMATEIRO E AUMENTA A TOLERÂNCIA AO NEMATOIDE-DAS-GALHAS</b> .....	35
2.1. INTRODUÇÃO.....	38
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
2.4. CONCLUSÕES .....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
<b>TERCEIRA SEÇÃO – ARTIGO II</b> .....	69
<b>EXTRATO DE VERMICOMPOSTO ENRIQUECIDO COM <i>TRICHODERMA SPP.</i> REDUZ A INCIDÊNCIA DE <i>MELOIDOGYNE INCOGNITA</i> E ESTIMULA O CRESCIMENTO DE PIMENTÃO</b> .....	69
3.1 INTRODUÇÃO.....	72
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	74
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	81
3.4 CONCLUSÕES .....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	95

## **PRIMEIRA SEÇÃO – CONTEXTUALIZAÇÃO GERAL**

### **1.1 Introdução**

Os sistemas de produção agrícola confrontam um destino imprescindível que é o de garantir a oferta de alimentos para mais de 9 bilhões de pessoas até o ano 2050. Para isto, será preciso melhorar aspectos relacionados à eficiência de colheita, armazenamento e transporte, além de produzir cerca de 68% a mais do que é atualmente obtido (Hunter et al., 2017). Entretanto, a narrativa que ampara o aumento da produção de alimentos especialmente no último século não esteve em consonância com a preservação ambiental, essencial para o desenvolvimento sustentável da agricultura. Fertilizantes de origem não renovável e produtos químicos altamente tóxicos foram desenvolvidos e amplamente empregados, gerando um passivo ambiental negativo de grandes proporções. Em contrapartida, técnicas agrícolas em bases sustentáveis têm sido também desenvolvidas e adotadas visando, entre outros, substituir parte dos fertilizantes solúveis não renováveis e dos agroquímicos com elevado potencial contaminante. Para se tornar efetivas, entretanto, essas técnicas devem garantir a sanidade e a nutrição das culturas, sem interferir negativamente na sua produtividade (Hadar e Papadopoulou, 2012).

A reutilização de resíduos orgânicos tem sido apontada como uma possibilidade viável para mitigar parte dos questionamentos contemporâneos realizados à agricultura. Entretanto, para uma utilização segura, esses resíduos precisam sofrer tratamentos que garantam a sua sanidade e eficiência antes do uso nas lavouras. Práticas como a compostagem e a vermicompostagem não são novidades e, quando adequadamente processadas, podem suprir essa demanda já que os produtos finais, denominados composto ou vermicomposto, respectivamente, apresentam-se estabilizados, sem odor e isentos de patógenos capazes de afetar negativamente os cultivos (Silva, 2016).

A aplicação de compostos e vermicompostos corrobora não somente para aumentar os teores de matéria orgânica do solo, mas também para garantir uma ciclagem eficiente de nutrientes (Arancon et al., 2006; Canellas et al., 2015), melhorar as condições físicas do solo (Sharma e Garg, 2018; Zandonadi e Busato, 2012) e também contribuir para o provimento da energia necessária para a manutenção da diversidade de vida do solo (De Nobili et al., 2016). Outra vantagem observada a partir do uso desse tipo de material é a oferta de compostos capazes de estimular o desenvolvimento vegetal e proteger as plantas frente às adversidades ambientais, tais como a seca e o ataque de patógenos. Por exemplo, Hosseinzadeh e Ahmadpour (2018) observaram que solos e adições de vermicomposto aumentaram a tolerância à seca de plantas de lentilha devido à maior absorção de nutrientes e aumento da taxa fotossintética. Morales-Corts et al. (2018) observaram que a aplicação semanal de extrato aquoso de vermicomposto foi capaz de reduzir as perdas ocasionadas por *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* em tomateiro. Esses resultados ilustram que os resultados do uso agrônomico desses materiais validam a sua eficiência sob diferentes aspectos.

Nas últimas décadas, uma série de inovações aplicadas aos processos convencionais de compostagem e vermicompostagem tem possibilitado torná-los mais eficientes, tanto sob a perspectiva da redução do tempo requerido para sua obtenção quanto no aumento da eficiência agrônomico dos produtos finais obtidos. Uma dessas inovações resulta do enriquecimento microbiano, prática que vem sendo denominada de biofortificação de compostos (Busato et al., 2012, 2017). A maior parte dos esforços de biofortificação está direcionada para acelerar a estabilização do material ou enriquecê-lo em nutrientes vegetais (Olivares et al., 2015; Ros et al., 2017). Há, entretanto, uma carência de informações relacionadas à capacidade de sobrevivência dos microrganismos adicionados frente à população nativa abundante existente nas pilhas de resíduos em compostagem.

Também, informações relacionadas à capacidade dos microrganismos adicionados em aumentar a concentração de substâncias capazes de atuar na indução ao crescimento e no sistema de defesa das plantas contra patógenos são escassas. Essa carência representa um grande espectro de possibilidades para a pesquisa, com potencialidades reais de desenvolvimento de uma nova geração de insumos agrícolas.

## **1.2 Revisão de literatura**

### **1.2.1 Compostagem e vermicompostagem de resíduos orgânicos**

Entre outros aspectos, a adubação convencional não leva em consideração a importância dos microrganismos, ocasionando uma limitação na biodiversidade do solo (Zaborowska et al., 2018). Essa diversidade é responsável por manter o equilíbrio natural da microbiota do solo, proporcionando o balanceamento populacional de microrganismos patogênicos e benéficos (Cai et al., 2017; Cesarano et al., 2017). A superação dessa limitação apresentada pelos fertilizantes químicos convencionais parece poder ser alcançada a partir do uso de compostos e vermicompostos obtidos a partir de resíduos orgânicos (Sinha et al., 2010).

A compostagem, processo aeróbio controlado de decomposição biológica da matéria orgânica em produto estável, sempre esteve presente nos ecossistemas naturais (Stentiford e Sánchez-Monedero, 2016; Pergola et al., 2017). Entretanto, os agricultores e pesquisadores tem se debruçado nos últimos anos sobre o desenvolvimento de estratégias que permitam acelerar o processo e tornar o composto mais enriquecido em substâncias capazes de estimular o crescimento vegetal. Entre essas adaptações está a inclusão de minhocas, dando origem ao vermicomposto, produto final da vermicompostagem (Insam et al., 1996; Arancon et al., 2008; Zandonadi e Busato, 2012). As minhocas atuam contribuindo para melhor as condições físicas e químicas do

substrato, aumentando a área superficial específica e a porosidade, facilitando a infiltração de água e a translocação gasosa (Schon et al., 2017). Elas colonizam naturalmente os resíduos orgânicos, sendo os microrganismos presentes no seu trato digestivo determinantes para acelerar a degradação de partículas sólidas e tornar o produto final mais concentrado em nutrientes e em microrganismos benéficos (Gómez-Brandón e Domínguez, 2014; Hussain et al., 2016).

Uma série de trabalhos tem relatado os efeitos positivos da adição de vermicompostos aos cultivos agrícolas (Arancon et al., 2006; Busato et al., 2016; Edwards et al., 2006; Maji et al., 2017; Zandonadi e Busato, 2012). Gill et al. (2019) observaram aumento da disponibilidade de N, P e K no solo após adição de vermicomposto produzido à base de resíduo orgânico doméstico. A capacidade de retenção de água também foi aumentada quando vermicomposto produzido a partir de esterco ovino foi adicionado em solos cultivados com tomateiro (Gutiérrez-Miceli et al., 2007). Mas além dos aspectos agrônômicos convencionais usualmente reportados, a pesquisa tem relatado a capacidade desse tipo de insumo em oferecer às plantas substâncias bioativas que podem favorecer o crescimento radicular, as taxas de fotossíntese e a absorção de nutrientes pelas plantas (Spaccini e Piccolo, 2007; Canellas et al., 2015; Vaccaro et al., 2015; Monda et al., 2017), resultando em aumento da produtividade. Em geral, esses eventos têm sido associados à presença de substâncias húmicas, uma das classes principais de bioestimulante do crescimento vegetal (du Jardin, 2015).

### **1.2.2 Ação bioestimulante das substâncias húmicas**

Por definição, bioestimulantes são quaisquer substâncias ou microrganismos capazes de aumentar a absorção de nutrientes, estimular o crescimento vegetal e a



tolerância à estresses abióticos mesmo quando aplicados em pequenas quantidades (du Jardin, 2015). Bioestimulantes estão disponíveis à base de formulações e ingredientes variáveis, especialmente a partir de substâncias húmicas, hormônios e/ou aminoácidos (Kauffman et al., 2007; López-Bucio et al., 2015). O termo bioestimulante também inclui produtos à base de microrganismos, os quais contém inóculos vivos que, quando aplicados às sementes, superfícies de plantas ou solo, podem promover o crescimento vegetal mediante vários mecanismos (Calvo et al., 2014).

As substâncias húmicas (SH) são moléculas caracterizadas por grandes diferenças em seu peso molecular e solubilidade (Pinton et al., 1999) e que podem atuar no crescimento vegetal devido ao seu efeito na formação do sistema radicular nas plantas, expressão de mensageiros metabólicos específicos e estímulo da atividade da H<sup>+</sup>-ATPase em membranas (Aguiar et al., 2013; Nardi et al., 2018; Roomi et al., 2018; Zandonadi et al., 2010). Zandonadi et al. (2010) demonstraram que as SH também podem induzir a formação de óxido nítrico nas regiões de emissão de raízes laterais, molécula que está presente em inúmeros processos fisiológicos promotores do desenvolvimento das raízes. Logo, um dos efeitos mais observados referentes à aplicação das SH é o alongamento de raízes, a produção de raízes secundárias e pêlos, principalmente a partir do aumento da proliferação de células no tecido radicular (Zandonadi et al., 2007; Canellas e Olivares, 2014; Olivares et al., 2015).

Os trabalhos que abordam o papel das SH como bioestimulante do crescimento vegetal, em geral, utilizam a fração húmica denominadas ácidos húmicos (AH), obtida após extração com solução alcalina seguida de acidificação do meio até pH 1,0-1,5. Entretanto, muitos efeitos fisiológicos também foram reportados em plantas cultivadas sob aplicação de SH solúveis em água, denominado extrato húmico solúvel em água (EHSA) (Arancon et al., 2003; Atiyeh et al., 2002; Pinton et al., 1997; Vaccaro et al.,

2009; Zandonadi e Busato, 2012; Zanin et al., 2018). Acredita-se que a efetividade do EHSa está relacionada à maior facilidade de seus compostos em acessar células vegetais e produzir estímulos fisiológicos (Zandonadi et al., 2013). Esses extratos também podem conter moléculas similares aos hormônios vegetais que regulam o crescimento como as auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico, que são produzidos pelos microrganismos presentes no vermicomposto (Edwards et al., 2006).

Hernandez et al. (2014) observaram que a adição de EHSa em alface encurtou o ciclo da cultura em 21 dias, permitindo a colheita antecipada sem perdas de qualidade e com maior produção de folhas. Ainda, a aplicação de EHSa diminuiu os carboidratos totais, aumentou os teores de proteína e a absorção de nitrato, com a estimulação da enzima nitrito redutase. Busato et al. (2016) relataram que a aplicação de EHSa e Hortbio em mudas de *Callophyllum brasiliense* aumentou os teores de clorofila, macro e micronutrientes nas plantas tratadas. EHSa também foi capaz de estimular a absorção de nitrato em raízes de milho, observando-se ativações em mais de 2000 transcritomas (Zanin et al., 2018).

### **1.2.3 Agentes biológicos de controle de doenças vegetais**

As doenças de plantas estão entre as causas bióticas mais importantes e responsáveis pela redução da produtividade das culturas agrícolas (Pandey et al., 2016). A interferência na fisiologia normal da planta, geralmente com algum tipo de efeito negativo sobre a sobrevivência ou a resistência de algumas espécies vegetais, é conhecida como doença de plantas.

Os agentes causais de doenças de plantas incluem bactérias, fungos, oomicetos, vírus, nematoides e fitoplasmas. Esses patógenos causam doenças por meio da secreção de enzimas, que catalisam a degradação dos tecidos do hospedeiro ou, muitas vezes,

beneficiam-se produzindo toxinas, que matam o tecido antes da degradação enzimática (Millard e Taylor, 1927). As doenças de plantas frequentemente reduzem substancialmente a qualidade e a quantidade de produtos agrícolas e a infestação pós-colheita podendo afetar a saúde humana e animal, especialmente se o organismo contaminante for capaz de produzir resíduos tóxicos em produtos consumíveis.

O conceito de manejo biológico de doenças evoluiu com base nas informações e técnicas desenvolvidas para avaliar a natureza das interações entre os patógenos e outros organismos e as plantas. O termo controle biológico, ou biocontrole, por muito tempo foi aplicado em um sentido estrito para indicar o controle de um organismo por outro organismo (Cook, 1988). Atualmente, controle biológico é definido como a utilização de agentes bióticos e abióticos que atuam por um ou mais mecanismos para reduzir o potencial de dano do patógeno diretamente ou indiretamente, ativando a defesa contra o patógeno (Narayanasamy, 2013). Logo, o sucesso do biocontrole depende das propriedades antagônicas e do mecanismo de ação dos microrganismos utilizados.

#### **1.2.4 Panorama do cultivo de hortaliças**

Apesar da redução produtiva incitada pela crise econômica, a importância social continua alta no setor olerícola, sem falar na relevância nutricional e para a saúde. Nos 32 produtos pesquisados pela Embrapa, o valor da produção em 2015 atingiu R\$ 23,2 bilhões (Embrapa, 2016). Comparado com montante apurado em 2011, houve crescimento de 39,6%, chegando a quase R\$ 31,5 bilhões só na área produtora (Embrapa, 2016). No âmbito dos empregos, há informações de que são gerados de 2 milhões a 3,5 milhões de postos de trabalho diretos, podendo atingir, com os indiretos, perto de 20 milhões de pessoas (Embrapa, 2016).

No Distrito Federal, a produção de hortaliças é uma das mais importantes atividades econômicas do setor rural, gerando mais de 30.000 empregos em toda a cadeia produtiva (Emater, 2017). Cerca de 420.000 hectares do DF estão destinados à área rural (Emater, 2017), com tendências de aumento no cultivo hortaliças. Neste setor, a substituição de insumos agrícolas obtidos em base não sustentável e também aqueles com potencial de contaminação do agricultor, consumidor e do ambiente é uma tendência, o que está coerente com o aumento da demanda por produtos orgânicos (Emater, 2015).

A área plantada e a produção total de hortaliças em 2017 no DF foram de aproximadamente 8.646 hectares e 234.000 toneladas (Emater, 2018), respectivamente (Tabela 1). A alface é a hortaliça mais cultivada, com área de 998 hectares e produção de 25.500 toneladas. Em relação as solanáceas, o tomateiro e pimentão se destacam, com produções de 26.750 e 18.213 toneladas, respectivamente.

**Tabela 1.** Área cultivada e produção de hortaliças no Distrito Federal no ano de 2017.

CULTURA	Ano/Safra 2017			
	Área (hectares)	Participação no DF (%)	Produção (ton)	Participação no DF (%)
	8.646,70	100,0	233.186,26	100,00
Alface	998,33	11,55	20.633,69	8,85
Batata	41,10	0,48	1.235,20	0,53
Beterraba	155,36	1,80	4.084,67	1,74
Cenoura	348,29	4,02	10.985,16	4,71
Milho Verde	455,84	5,27	13.461,70	5,77
Morango	157,95	1,83	5.287,27	2,27
Pimentão	179,81	2,08	14.991,40	6,43
Repolho	141,65	1,64	6.825,10	2,93
Tomateiro	288,93	3,34	22.331,47	9,58
Outras	5.511,24	63,74	120.755,00	51,78

Trata-se, então, de uma vigorosa cadeia produtiva que precisa se manter atualizada, atendendo aos anseios do mercado e que exige o incremento na produção de alimentos,

mas também exige que esses possuam qualidade sanitária, que sejam produzidos em sistemas de produção sustentáveis e que gerem empregos qualificados (Emater, 2017).

### **1.2.5 Importância econômica do nematoide-das-galhas na horticultura**

Apesar da importância econômica e social, o cultivo de hortaliças sofre com uma grande gama de problemas, especialmente aqueles relacionados às doenças. As espécies de *Meloidogyne*, por exemplo, usualmente conhecidas como nematoide-das-galhas, estão incluídas em um dos grupos mais importantes de fitonematoides no mundo (Eisenback e Triantaphyllou, 1991) e ocasionam danos de grandes proporções aos cultivos. Este grupo de fitoparasita biotrófico obrigatório é altamente adaptável às condições do meio, afeta muitos hospedeiros e apresenta comportamento endoparasítico sedentário (De Medeiros et al., 2017). Reduções de 14,6% na produção total de alimentos nos países subtropicais já foram reportadas em função da presença de nematoides desse grupo (Nicol et al., 2011). No Brasil, as espécies mais comuns de *Meloidogyne* são: *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood (raças 1, 2, 3 e 4), *M. javanica* (Treub) Chitwood e *M. arenaria* (Neal) Chitwood (Pereira et al., 2018).

A maioria dos nematoides parasitas de plantas sofre 4 ecdises durante seu desenvolvimento, passando dos estádios juvenis (J1 a J4) até a fase adulta (Escobar et al., 2015). A transição de J1 para J2 acontece dentro do ovo e após essa primeira ecdise, os juvenis eclodem, os quais representam a fase infecciosa da maioria das espécies (Perry e Moens, 2011). Os juvenis (J2) são microscópicos (de 250 µm até 12mm de comprimento) e vivem no solo até encontrarem um hospedeiro suscetível (Escobar et al., 2015). Eles penetram e se alimentam de plantas por meio de um estilete protusível oral que perfura as células (Escobar et al., 2015). Uma vez em contato com o sistema vascular das raízes, altas infestações de *Meloidogyne* spp. promovem o desenvolvimento de células gigantes

para fins de alimentação, causando estresse nutricional e hídrico no hospedeiro e, conseqüentemente, afetando seu crescimento (Dropkin, 1955; Williamson e Hussey, 1996). Essas respostas estão correlacionadas com o número de larvas de segundo estágio (J2) que entram e se estabelecem no sistema radicular da planta (Bird, 1974).

No cultivo de hortaliças, a estratégia de controle mais eficaz adotada é a resistência genética. A maioria das cultivares comerciais de tomateiro, por exemplo, possui resistência a *M. incognita* por meio da introdução do gene Mi (Williamson e Hussey, 1996). Foi relatado que o gene Mi presente em algumas cultivares de tomateiro confere a resistência a *M. incognita* por induzir necrose localizada de tecido alimentador do nematoide logo após a infecção (Barcala et al., 2016). Outro método eficiente é o controle biológico, que consiste em buscar interações bem-sucedidas, geralmente proporcionadas por microrganismos benéficos, que além da predação direta, induzem resistência ou tolerância à espécie vegetal pela ativação dos mecanismos de defesa relacionados com barreiras físicas do tecido vegetal, tais como lignificações da parede celular e síntese compostos antimicrobianos como proteínas PR, peptídeos, fitoalexinas e pela ação de elicitores bióticos e abióticos (Zeilinger et al., 2016).

### **1.2.6 Fungos do gênero *Trichoderma* podem auxiliar no controle do nematoide-das-galhas**

O controle de doenças de plantas vem sendo realizado na agricultura contemporânea principalmente a partir do uso de produtos da indústria agroquímica. Dois grandes problemas são recorrentes com o uso desse tipo de produto: primeiro, são, em geral, tecnologias desenvolvidas por empresas localizadas em outros países. Assim, a importação ou pagamento para autorização e produção encarecem sobremaneira esses produtos, tornando-os inacessíveis a grande parte dos agricultores ou aumentando os custos de produção. Segundo, são produtos tóxicos aos produtores, consumidores,

animais silvestres e domésticos e ao ambiente como um todo. Alternativas eficientes para controlar doenças de plantas cultivadas são, portanto, requeridas e uma série de produtos já é encontrada nos mercados especializados.

Os fungos, inquestionavelmente, exercem funções vitais nos diversos ecossistemas, incluindo o ambiente agrícola, devido à suas interações com as plantas (Zeilinger et al., 2016). Esses microrganismos são importantes na dinâmica de decomposição e reciclagem de materiais orgânicos e interagem, também, positiva ou negativamente, com as raízes das plantas (Lareen et al., 2016; Zeilinger et al., 2016).

De forma geral, a habilidade antagônica e parasítica está presente universalmente em fungos do gênero *Trichoderma*, razão pela qual cientistas e a indústria começaram a testá-los e avaliá-los contra patógenos (Druzhinina et al., 2011). Os fungos filamentosos do filo Ascomycota estão entre os saprófitos mais isolados em laboratório e, dentre esses, o gênero *Trichoderma* têm sido comercialmente explorado por estimular o crescimento vegetal e induzir tolerância a estresses ambientais e patógenos (Druzhinina et al., 2011). Alguns fungos do gênero *Trichoderma* podem penetrar e colonizar raízes de diferentes espécies de plantas, agindo como simbiontes endofíticos e causando mudanças substanciais na fisiologia da planta e em seus mecanismos de defesa (Fiorini et al., 2016). O controle de um amplo espectro de patógenos de plantas por *Trichoderma* spp., incluindo o nematoide-das-galhas, pode acontecer também através da resistência sistêmica adquirida ou resistência localizada (Harman et al., 2004).

Um dos primeiros relatos científicos do uso de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas foi feito por Wells (1972), em experimento de campo testando *T. harzianum* no controle *Sclerotium rolfsii*. Particularmente, a eficiência de algumas espécies de *Trichoderma* contra o nematoide-das-galhas já foi comprovada (Siddiqui e Akhtar, 2008; Bokhari, 2009; Singh e Mathur, 2010; Mascarin et al., 2012;

On et al., 2015; Olabiyi et al., 2016). Por exemplo, em casa de vegetação, Al-Hazmi e TariqJaveed (2016) observaram que a inoculação de *T. harzianum* foi capaz de suprimir a reprodução de *M. javanica* em tomateiro, reduzindo o número de galhas e estimulando o crescimento das plantas. Sharon et al. (2001) observaram que *T. harzianum* teve a habilidade de infectar ovos e juvenis de *M. javanica* em laboratório. Além da sua ação direta de parasitismo, os mecanismos referentes à resistência das plantas contra nematoides ocorre pela indução de proteínas relacionadas com a defesa da planta (Sahebani e Hadavi, 2008).

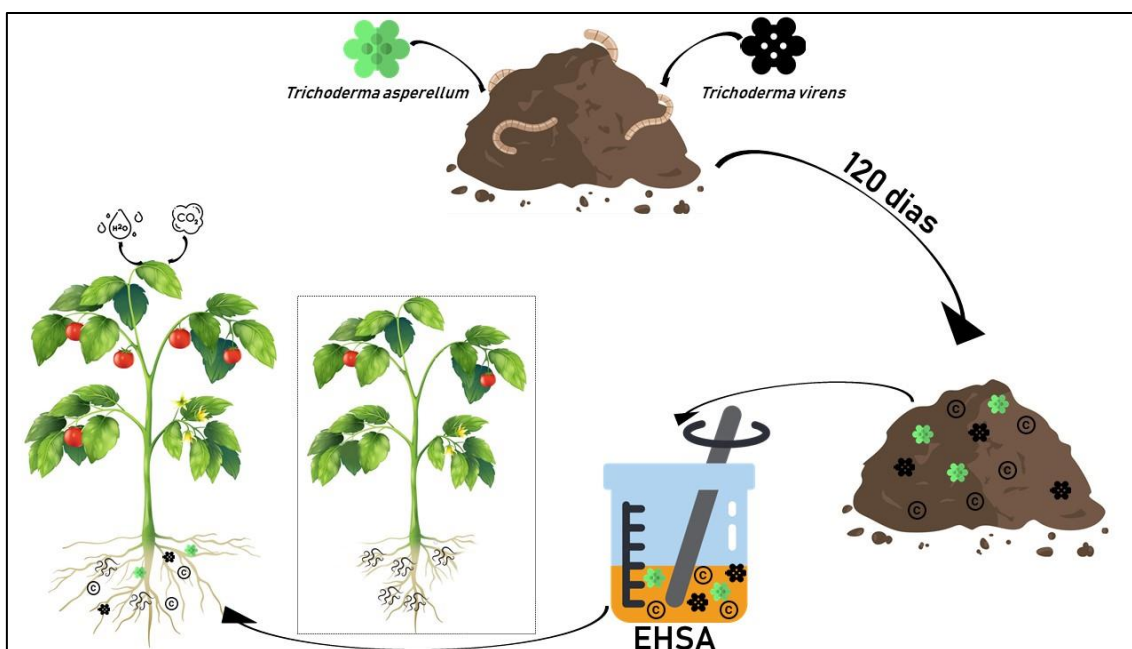
Atualmente, mais de 60% dos produtos biológicos com ação bioestimulante e pesticida contém fungos do gênero *Trichoderma* (López-Bucio et al., 2015). *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. virens* e *T. viride* estão entre as espécies que apresentaram maior capacidade como estimulantes no cultivo de hortaliças (López-Bucio et al., 2015).

Entretanto, a densidade populacional de organismos de controle biológico presente naturalmente nos solos é relativamente baixa, sendo necessário aporte artificial dessas espécies para que se obtenha controles mais efetivos (Jambhulkar et al., 2016). Assim, tecnologias que permitam ao produtor reproduzir esse tipo de fungo em escala, a partir de estoques, de maneira simples e com pouco investimento financeiro são bem-vindas. Os processos de compostagem e vermicompostagem dispõem, em geral, de grande quantidade de compostos de carbono, que seriam um substrato interessante para o cultivo do fungo. A população nativa da biomassa empregada pode ser um fator impeditivo ao desenvolvimento do fungo, mas também é possível que esses microrganismos adicionados ao processo apresentem habilidade para sobreviver. Parte desta inferência a condução deste trabalho. Além disso, o EHSa deste material seria eficiente em reduzir a infestação de plantas de tomateiro e pimentão artificialmente inoculadas com nematoide-



das-galhas e auxiliar o crescimento dessas plantas em função da presença de moléculas bioativas?

A hipótese contida neste trabalho é que o vermicomposto é um bom meio para o desenvolvimento da população de *Trichoderma* spp. e que a adição do EHSa desse vermicomposto enriquecido é capaz de controlar a infestação do nematoide-das-galhas e fornecer substâncias húmicas bioativas capazes de favorecer o desenvolvimento, a nutrição, a produtividade e as trocas gasosas de plantas de tomateiro e pimentão (Figura 1).



**Figura 1.** Hipótese de desenvolvimento do presente trabalho.

### 1.3 Objetivo geral

Desenvolver um insumo biológico de baixo custo, atóxico, à base de resíduos orgânicos vermicompostados com enriquecimento de fungos do gênero *Trichoderma* (*T. asperellum* e *T. virens*), adicionados isoladamente ou em conjunto, que seja eficiente, quando aplicada a sua fração solúvel em água, em estimular o crescimento de plantas de tomateiro e pimentão e induzir resistência contra *M. incognita*.

#### **1.4 Objetivos específicos**

- I. Determinar se o EHSa desse vermicomposto (relação 1:5), aplicado em tomateiro e pimentão, é capaz de favorecer o crescimento das plantas, analisado a partir do comprimento, massa seca de parte aérea, massa fresca de raiz e produtividade;
- II. Verificar se o extrato é capaz de afetar o conteúdo de nutrientes e as trocas gasosas das plantas;
- III. Determinar se o extrato é capaz de induzir tolerância e/ou suprimir o desenvolvimento de *M. incognita*, artificialmente inoculado às plantas.

## Referências Bibliográficas

- Aguiar, N.O., Olivares, F.L., Novotny, E.H., Dobbss, L.B., Balmori, D.M., Santos-Júnior, L.G., Chagas, J.G., Façanha, A.R., Canellas, L.P., 2013. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. *Plant Soil* 362, 161–174. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1277-5>
- Al-Hazmi, A.S., TariqJaveed, M., 2016. Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato. *Saudi J. Biol. Sci.* 23, 288–292. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.007>
- Arancon, N., Lee, S., Edwards, C., Atiyeh, R., 2003. Effects of humic acids derived from cattle, food and paper-waste vermicomposts on growth of greenhouse plants. The 7th international symposium on earthworm ecology. Cardiff-Wales, 2002. *Pedobiologia.* 47, 741–744. [https://doi.org/10.1016/S0031-4056\(04\)70262-0](https://doi.org/10.1016/S0031-4056(04)70262-0)
- Arancon, N.Q., Edwards, C.A., Babenko, A., Cannon, J., Galvis, P., Metzger, J.D., 2008. Influences of vermicomposts, produced by earthworms and microorganisms from cattle manure, food waste and paper waste, on the germination, growth and flowering of petunias in the greenhouse. *Appl. Soil Ecol.* 39, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.11.010>
- Arancon, N.Q., Edwards, C.A., Bierman, P., 2006. Influences of vermicomposts on field strawberries: Part 2. Effects on soil microbiological and chemical properties. *Bioresour. Technol.* 97, 831–840. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.016>
- Atiyeh, R.M., Edwards, C. a., Arancon, N.Q., Merzger, J.D., 2002. The influence of humic acids derived from earthworm processes organic wastes on plant growth. *Bioresour. Technol.* 84, 7–14.
- Barcala, M., Cabrera, J., Fenoll, C., Escobar, C., 2016. Belowground defence strategies against sedentary nematodes. *Signaling and communication in plants – Springer*, pp. 221–251. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-42319-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-42319-7_10)
- Bird, A.F., 1974. Plant response to root-knot nematode. *Annu. Rev. Phytopathol.* 12, 69–85. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.12.090174.000441>
- Bokhari, F.M., 2009. Efficacy of some *Trichoderma* species in the control of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 42, 361–369. <https://doi.org/10.1080/03235400601070520>

- Busato, J.G., Lima, L.S., Aguiar, N.O., Canellas, L.P., Olivares, F.L., 2012. Changes in labile phosphorus forms during maturation of vermicompost enriched with phosphorus-solubilizing and diazotrophic bacteria. *Bioresour. Technol.* 110, 390–395. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.126>
- Busato, J.G., Zandonadi, D.B., Mól, A.R., Souza, R.S., Aguiar, K.P., Júnior, F.B.R., Olivares, F.L., 2017b. Compost biofortification with diazotrophic and P-solubilizing bacteria improves maturation process and P availability. *J. Sci. Food Agric.* 97, 949–955. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7819>
- Busato, J.G., Zandonadi, D.B., Sousa, I.M. de, Marinho, E.B., Dobbss, L.B., Mól, A.R., 2016. Efeito do extrato húmico solúvel em água e biofertilizante sobre o desenvolvimento de mudas de *Callophyllum brasiliense*. *Pesqui. Florest. Bras.* 36, 161. <https://doi.org/10.4336/2016.pfb.36.86.1024>
- Cai, F., Pang, G., Li, R.X., Li, R., Gu, X.L., Shen, Q.R., Chen, W., 2017. Bioorganic fertilizer maintains a more stable soil microbiome than chemical fertilizer for monocropping. *Biol. Fertil. Soils* 53, 861–872. <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1216-y>
- Calvo, P., Nelson, L., Kloepper, J.W., 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil* 383, 3–41. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Jones, D.L., Nebbioso, A., Mazzei, P., Piccolo, A., 2015. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>
- Cesarano, G., Zotti, M., Antignani, V., Marra, R., Scala, F., Bonanomi, G., 2017. Soil sickness and negative plant-soil feedback: A reappraisal of hypotheses. *J. Plant Pathol.* 99, 545–570. <https://doi.org/10.4454/jpp.v99i3.3960>
- Chu, P., Waterhouse, P.M., Martin, R.R., Gerlach, W.L., 1989. New Approaches to The Detection of Microbial Plant Pathogens. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 7, 45–111. <https://doi.org/10.1080/02648725.1989.10647856>
- Cook, R.J., 1988. Biological control and holistic plant-health care in agriculture. *Am. J. Altern. Agric.* 3, 51–62. <https://doi.org/10.1017/S0889189300002186>
- De Medeiros, H.A., De Araújo Filho, J.V., De Freitas, L.G., Castillo, P., Rubio, M.B., Hermosa, R., Monte, E., 2017. Tomato progeny inherit resistance to the nematode

- Meloidogyne javanica* linked to plant growth induced by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *Sci. Rep.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep40216>
- De Nobili, M., Brookes, P.C., Sánchez-Monedero, M.A., Contin, M., 2016. The complexity of soil biological sustainability. *Acta Hortic.* 1146, 69–78. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1146.9>
- Dropkin, V.H., 1955. The relations between nematodes and plants. *Exp. Parasitol.* 4, 282–322. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(55\)90032-1](https://doi.org/10.1016/0014-4894(55)90032-1)
- Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. a, Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V, Kubicek, C.P., 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 749–59. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2637>
- du Jardin, P., 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic.* 196, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Edwards, C., Arancon, N., Greytak, S., 2006. Effects of vermcompost teas on plant growth and disease. *Biocycle* 47, 28–31.
- EMATER-DF. 2017. Informações agropecuárias do DF. Disponível em: <http://www.emater.df.gov.br/>.
- EMATER-DF. 2018. Informações agropecuárias do DF. Disponível em: <http://www.emater.df.gov.br/>.
- Eisenback, J.D., Triantaphyllou, H.H., 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. *Manual of Agricultural Nematology*, W. R. Nickle. (Ed). Marcel Dekker, New York. pp 281 – 286.
- Escobar, C., Barcala, M., Cabrera, J., Fenoll, C., 2015. Overview of root-knot nematodes and giant cells. *Advances in Botanical Research*, pp. 1–32. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2015.01.001>
- Fiorini, L., Guglielminetti, L., Mariotti, L., Curadi, M., Picciarelli, P., Scartazza, A., Sarrocco, S., Vannacci, G., 2016. *Trichoderma harzianum* T6776 modulates a complex metabolic network to stimulate tomato cv. Micro-Tom growth. *Plant Soil* 400, 351–366. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2736-6>
- Gill, P., Singh, D., Gupta, R.K., Urmila, Lata, H., 2019. Comparative chemical evaluation

- of vermicompost produced by using different organic wastes, em: Waste Valorisation and Recycling. Springer Singapore, Singapore, pp. 219–224. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-2784-1\\_20](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2784-1_20)
- Gómez-Brandón, M., Domínguez, J., 2014. Recycling of solid organic wastes through vermicomposting: Microbial community changes throughout the process and use of vermicompost as a soil amendment. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 44, 1289–1312. <https://doi.org/10.1080/10643389.2013.763588>
- Gutiérrez-Miceli, F.A., Santiago-Borraz, J., Montes Molina, J.A., Nafate, C.C., Abud-Archila, M., Oliva Llaven, M.A., Rincón-Rosales, R., Dendooven, L., 2007. Vermicompost as a soil supplement to improve growth, yield and fruit quality of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Bioresour. Technol.* 98, 2781–2786. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.032>
- Hadar, Y., Papadopoulou, K.K., 2012. Suppressive composts: microbial ecology links between abiotic environments and healthy plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* Vol. 50, 133–153. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172914>
- Hernandez, O.L., Calderín, A., Huelva, R., Martínez-Balmori, D., Guridi, F., Aguiar, N.O., Olivares, F.L., Canellas, L.P., 2014. Humic substances from vermicompost enhance urban lettuce production. *Agron. Sustain. Dev.* 35, 225–232. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0221-x>
- Hosseinzadeh, S.R., Ahmadpour, R., 2018. Evaluation of vermicompost fertilizer application on growth, nutrient uptake and photosynthetic pigments of lentil (*Lens culinaris* Medik.) under moisture deficiency conditions. *J. Plant Nutr.* 41, 1276–1284. <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1450419>
- Hunter, M.C., Smith, R.G., Schipanski, M.E., Atwood, L.W., Mortensen, D.A., 2017. Agriculture in 2050: recalibrating targets for sustainable intensification. *Bioscience* 67, 386–391. <https://doi.org/10.1093/biosci/bix010>
- Hussain, N., Abbasi, T., Abbasi, S.A., 2016. Vermicomposting transforms allelopathic parthenium into a benign organic fertilizer. *J. Environ. Manage.* 180, 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.05.013>
- Insam, H., Amor, K., Renner, M., Crepaz, C., 1996. Changes in functional abilities of the microbial community during composting of manure. *Microb. Ecol.* 31, 77–87.

<https://doi.org/10.1007/BF00175077>

- Jambhulkar, P.P., Sharma, P., Yadav, R., 2016. Delivery systems for introduction of microbial inoculants in the field, em: Singh, D.P., Singh, H.B., Prabha, R. (Eds.), *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 2: Functional Applications*. Springer India, New Delhi, pp. 199–218. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4\\_13](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4_13)
- Kauffman, G.L., Kneivel, D.P., Watschke, T.L., 2007. Effects of a biostimulant on the heat tolerance associated with photosynthetic capacity, membrane thermostability, and polyphenol production of perennial ryegrass. *Crop Sci.* 47, 261–267. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.03.0171>
- Lareen, A., Burton, F., Schäfer, P., 2016. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant Mol. Biol.* 90, 575–587. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0417-8>
- López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R., Herrera-Estrella, A., 2015. *Trichoderma* as biostimulant: Exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Sci. Hortic.* 196, 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.043>
- Maji, D., Misra, P., Singh, S., Kalra, A., 2017. Humic acid rich vermicompost promotes plant growth by improving microbial community structure of soil as well as root nodulation and mycorrhizal colonization in the roots of *Pisum sativum*. *Appl. Soil Ecol.* 110, 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.10.008>
- Mascarin, G.M., Ferreira, M., Vieira de Araújo, J., 2012. *Trichoderma harzianum* reduces population of *Meloidogyne incognita* in cucumber plants under greenhouse conditions. *J. Entomol. Nematol.* 4, 54–57. <https://doi.org/10.5897/JEN12.007>
- Millard, W.A., Taylor, C.B., 1927. Antagonism of micro-organisms as the controlling factor in the inhibition of scab by green-manuring. *Ann. Appl. Biol.* 14, 202–216. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1927.tb07076.x>
- Monda, H., Cozzolino, V., Vinci, G., Spaccini, R., Piccolo, A., 2017. Molecular characteristics of water-extractable organic matter from different composted biomasses and their effects on seed germination and early growth of maize. *Sci. Total Environ.* 590–591, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.026>
- Morales-Corts, M.R., Pérez-Sánchez, R., Gómez-Sánchez, M.Á., 2018. Efficiency of

- garden waste compost teas on tomato growth and its suppressiveness against soilborne pathogens. *Sci. Agric.* 75, 400–409. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2016-0439>
- Narayanasamy, P., 2013. *Biological management of diseases of crops*. Springer Netherlands, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6377-7>
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Ertani, A., 2018. Hormone-like activity of the soil organic matter. *Appl. Soil Ecol.* 123, 517–520. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.04.020>
- Nicol, J.M., Turner, S.J., Coyne, D.L., Nijs, L. Den, Hockland, S., 2011. *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions*. Springer Netherlands, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-0434-3>
- Olabiya, T.I., Ojo, O.J., Adewuyi, B.O., 2016. Impact assessment of neem compost and *Trichoderma harzianum* solution in the control of root-knot nematode disease on cowpea. *Cogent Food Agric.* 2, 2–7. <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1207843>
- Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Rosa, R.C.C., Canellas, L.P., 2015. Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. *Sci. Hortic.* 183, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.012>
- On, A., Wong, F., Ko, Q., Tweddell, R.J., Antoun, H., Avis, T.J., 2015. Antifungal effects of compost tea microorganisms on tomato pathogens. *Biol. Control* 80, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.09.017>
- Pandey, V., Shukla, A., Kumar, J., 2016. Physiological and molecular signalling involved in disease management through *Trichoderma*: an effective biocontrol paradigm. pp. 317–346. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27312-9\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27312-9_14)
- Pereira, R.B., Pinheiro, J.B., de Mendonça, J.L., Guimarães, J.A., Lucas, G.C., 2018. Evaluation of resistance of *Solanum scuticum* accessions to soil-borne pathogens in tomato crops in Brazil. *Acta Hortic.* 55–62. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1207.7>
- Pergola, M., Persiani, A., Palese, A.M., Di Meo, V., Pastore, V., D’Adamo, C., Celano, G., 2017. Composting: The way for a sustainable agriculture. *Appl. Soil Ecol.* <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.10.016>



- Pinton, R., Cesco, S., De Nobili, M., Santi, S., Varanini, Z., 1997. Water- and pyrophosphate-extractable humic substances fractions as a source of iron for Fe-deficient cucumber plants. *Biol. Fertil. Soils* 26, 23–27. <https://doi.org/10.1007/s003740050337>
- Pinton, R., Cesco, S., Iacoletti, G., Astolfi, S., Varanini, Z., 1999. Modulation of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake by water-extractable humic substances: Involvement of root plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase. *Plant Soil* 215, 155–161. <https://doi.org/10.1023/A:1004752531903>
- Pugliese, M., Liu, B., Gullino, M.L., Garibaldi, A., 2011. Microbial enrichment of compost with biological control agents to enhance suppressiveness to four soil-borne diseases in greenhouse. *J. Plant Dis. Prot.* 118, 45–50.
- Roomi, S., Masi, A., Conselvan, G.B., Trevisan, S., Quaggiotti, S., Pivato, M., Arrigoni, G., Yasmin, T., Carletti, P., 2018. Protein profiling of arabidopsis roots treated with humic substances: insights into the metabolic and interactome networks. *Front. Plant Sci.* 9, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01812>
- Ros, M., Raut, I., Santísima-Trinidad, A.B., Pascual, J.A., 2017. Relationship of microbial communities and suppressiveness of *Trichoderma* fortified composts for pepper seedlings infected by *Phytophthora nicotianae*. *PLoS One* 12, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174069>
- Sahebani, N., Hadavi, N., 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2016–2020. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.03.011>
- Schon, N.L., Mackay, A.D., Gray, R.A., van Koten, C., Dodd, M.B., 2017. Influence of earthworm abundance and diversity on soil structure and the implications for soil services throughout the season. *Pedobiologia (Jena)*. 62, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2017.05.001>
- Sharma, K., Garg, V.K., 2018. Solid-state fermentation for vermicomposting, in: current developments in biotechnology and bioengineering. Elsevier, pp. 373–413. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00017-7>
- Sharon, E., Bar-Eyal, M., Chet, I., Herrera-Estrella, A., Kleifeld, O., Spiegel, Y., 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma*

*harzianum*. Phytopathology 91, 687–693.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.7.687>

- Siddiqui, Z.A., Akhtar, M.S., 2008. Synergistic effects of antagonistic fungi and a plant growth promoting rhizobacterium, an arbuscular mycorrhizal fungus, or composted cow manure on populations of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Biocontrol Sci. Technol.* 18, 279–290. <https://doi.org/10.1080/09583150801896043>
- Silva, C.A., 2016. Recycling of organic wastes in Brazil: Composting, substrate and fertilizer manufacture. *Acta Hortic.* 1146, 129–136. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1146.17>
- Singh, S., Mathur, N., 2010. *In vitro* studies of antagonistic fungi against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Biocontrol Sci. Technol.* 20, 275–282. <https://doi.org/10.1080/09583150903484318>
- Sinha, R.K., Agarwal, S., Chauhan, K., Valani, D., 2010. The wonders of earthworms & its vermicompost in farm production: Charles Darwin's 'friends of farmers', with potential to replace destructive chemical fertilizers from agriculture. *Agric. Sci.* 01, 76–94. <https://doi.org/10.4236/as.2010.12011>
- Spaccini, R., Piccolo, A., 2007. Molecular characterization of compost at increasing stages of spectroscopy. *J. Agric. food Chem.* 55, 2303–2311. <https://doi.org/10.1021/jf0625407>
- Spiegel, Y., Chet, I., 1998. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. *Integr. Pest Manag. Rev.* 3, 169–175. <https://doi.org/10.1023/A:1009625831128>
- Stentiford, E., Sánchez-Monedero, M.A., 2016. Past, present and future of composting research. *Acta Hortic.* 1146, 1–10. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1146.1>
- Vaccaro, S., Ertani, A., Nebbioso, A., Muscolo, A., Quaggiotti, S., Piccolo, A., Nardi, S., 2015. Humic substances stimulate maize nitrogen assimilation and amino acid metabolism at physiological and molecular level. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 2, 5. <https://doi.org/10.1186/s40538-015-0033-5>
- Vaccaro, S., Muscolo, A., Pizzeghello, D., Spaccini, R., Piccolo, A., Nardi, S., 2009. Effect of a compost and its water-soluble fractions on key enzymes of nitrogen metabolism in maize seedlings. *J. Agric. Food Chem.* 57, 11267–11276.

<https://doi.org/10.1021/jf901808s>

- Williamson, V.M., Hussey, R.S., 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell* 8, 1735. <https://doi.org/10.2307/3870226>
- Zaborowska, M., Woźny, G., Wyszowska, J., Kucharski, J., 2018. Biostimulation of the activity of microorganisms and soil enzymes through fertilisation with composts. *Soil Res.* 56, 737. <https://doi.org/10.1071/SR18057>
- Zandonadi, D.B., Busato, J.G., 2012. Vermicompost humic substances: technology for converting pollution into plant growth regulators. *Int. J. Environ. Sci. Eng. Res.* 3, 73–84.
- Zandonadi, D.B., Santos, M.P., Busato, J.G., Eustáquio, L., Peres, P., Façanha, A.R., 2013. Plant physiology as affected by humified organic matter. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 25, 12–25. <https://doi.org/10.1590/s2197-00252013000100003>
- Zandonadi, D.B., Santos, M.P., Dobbss, L.B., Olivares, F.L., Canellas, L.P., Binzel, M.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R., 2010. Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activation. *Planta* 231, 1025–1036. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1106-0>
- Zanin, L., Tomasi, N., Zamboni, A., Segal, D., Varanini, Z., Pinton, R., 2018. Water-extractable humic substances speed up transcriptional response of maize roots to nitrate. *Environ. Exp. Bot.* 147, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.12.014>
- Zeilinger, S., Gupta, V.K., Dahms, T.E.S., Silva, R.N., Singh, H.B., Upadhyay, R.S., Gomes, E.V., Tsui, C.K.M., Chandra Nayak, S., 2016. Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 182–207. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv045>

## SEGUNDA SEÇÃO – ARTIGO I

### **Extrato de vermicomposto enriquecido com *Trichoderma* spp. estimula o crescimento de tomateiro e aumenta a tolerância ao nematoide-das-galhas**

Tiago dos Santos Pereira<sup>a,\*</sup>, Juscimar da Silva<sup>b</sup>, Jadir Borges Pinheiro<sup>b</sup>, Sabrina Magaly Navas Cajamarca<sup>a</sup>, Luís Henrique Ferrari<sup>a</sup>, Alessandra Monteiro de Paula<sup>a</sup>, Jader Galba Busato<sup>a</sup>

*<sup>a</sup>Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Caixa Postal 4508, CEP 70910-970, Brasília/DF, Brasil.*

*<sup>b</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças. Rodovia BR-060, Km 09. Caixa Postal 218, CEP 70351-970, Brasília/DF, Brasil.*

*\*Autor para correspondência: tiagodosantosp@gmail.com*

## Resumo

A agricultura moderna tem seu foco na manutenção da qualidade do solo e da sanidade vegetal por meio da racionalização do uso de agroquímicos. O uso de bioestimulantes na agricultura para o fornecimento de substâncias bioativas que atuam no crescimento vegetal e com potencial de supressão de doenças de solo é uma possibilidade em ascensão. Porém, formulações de bioestimulantes que ofereçam autonomia prática para o produtor rural e, ao mesmo tempo, atue na maquinaria da planta no que tange a defesa contra fatores abióticos e a melhor eficiência do uso de nutrientes e água ainda são escassas. Um experimento em casa-de-vegetação foi conduzido com tomateiro inoculado artificialmente com *M. incognita* e tratadas semanalmente com quatro diferentes extratos húmicos solúveis em água (EHSA): EHSA de vermicomposto (V), EHSA de vermicomposto fortificado com *T. asperellum* (V+TA), EHSA de vermicomposto fortificado com *T. virens* (V+TV), EHSA de vermicomposto fortificado com *T. asperellum*+*T. virens* (V+TA+TV). Um controle, sem a adição de EHSA, também foi incluído para comparação. Avaliações biométricas, de trocas gasosas e do potencial de controle biológico de *Trichoderma* spp. foram feitas. Observou-se que a produtividade foi maior para todos os EHSA, com aumento significativo de 864% para V+TV em relação ao controle. O acúmulo de nutrientes nas plantas de tomateiro tratadas também foi maior principalmente para N, K, Ca e S. Para as trocas gasosas, destaca-se o efeito de V+TA+TV no aumento da eficiência do uso da água. Porém, o antagonismo de *Trichoderma* spp. não foi eficaz na redução da reprodução de *M. incognita* nas condições deste experimento, mas induziu mecanismos de tolerância nas plantas para que seu desenvolvimento não fosse afetado.

**Palavras-chave:** Bioestimulantes; *Solanum lycopersicum* L.; crescimento vegetal; *Meloidogyne incognita*; controle biológico.

## **Abstract**

Modern agriculture has its focus on maintaining soil quality and plant health by rationalizing the use of agrochemicals. The use of biostimulants in agriculture for the supply of bioactive substances that act on plant growth and with potential suppression of soil diseases is a rising possibility. However, formulations of biostimulants that offer practical autonomy for the rural producer and, at the same time, work on the plant machinery in relation to the defense against abiotic factors and the better efficiency of the use of nutrients and water are still scarce. A greenhouse experiment was conducted with tomato inoculated artificially with *M. incognita* and treated weekly with four different water soluble humic extracts (EHSA): vermicompost EHSA (V), vermicompost EHSA fortified with *T. asperellum* (V + TA), vermicompost EHSA fortified with *T. virens* (V + TV), vermicompost EHSA fortified with *T. asperellum* + *T. virens* (V + TA + TV). A control, without the addition of EHSA, was also included for comparison. Biometric, gas exchange, and biological control potential of *Trichoderma* spp. were made. It was observed that the productivity was higher for all EHSA, with a significant increase of 864% for V + TV in relation to the control. The nutrient accumulation in the treated tomato plants was also higher mainly for N, K, Ca and S. For the gas exchanges, the effect of V + TA + TV on the increase of water use efficiency is highlighted. However, the antagonism of *Trichoderma* spp. was not effective in reducing infestation of *M. incognita* under the conditions of this experiment.

**Keywords:** Humic substances; bioestimulants; *Solanum lycopersicum* L.; plant growth; *Meloidogyne incognita*; biological control.

## 2.1. Introdução

Bioestimulantes do crescimento vegetal são substâncias e/ou microrganismos aplicados às plantas em baixas quantidades com objetivo de aumentar a eficiência nutricional, atenuar estresses ambientais e melhorar a qualidade dos cultivos (du Jardin, 2015). As substâncias húmicas (SH) resultam da transformação de biomoléculas como proteínas, ligninas, carboidratos e polímeros alifáticos originados de restos de plantas, animais e microrganismos e constituem uma das categorias de bioestimulantes.

Operacionalmente, as diferentes frações das SH são extraídas de materiais orgânicos ou minerais com base na sua solubilidade, sendo os ácidos húmicos (AH), solúvel em meio alcalino e insolúvel em meio ácido, os ácidos fúlvicos (AF), solúvel em qualquer valor de pH e as huminas (H) a porção insolúvel em qualquer pH (Hayes e Clapp, 2001). Em geral, testes de bioestimulação vegetal envolvendo SH empregam a fração AH, com resultados marcantes especialmente em relação ao desenvolvimento radicular, aumento da absorção de nutrientes, taxas fotossintéticas e eficiência de uso da água em diferentes tipos de plantas (Aguilar et al., 2013; Busato et al., 2010; Canellas et al., 2002; Dobbss et al., 2010; Maji et al., 2017; Martinez-Balmori et al., 2014; Zandonadi et al., 2007).

Entretanto, incentivos ao crescimento vegetal também já foram reportados a partir do uso de SH solúveis em água, fração denominada extrato húmico solúvel em água (EHSA) (Busato et al., 2016; Pinton et al., 1997; Schmidt et al., 2007; Zandonadi e Busato, 2012). Acredita-se que a efetividade desta fração possa estar relacionada à maior facilidade de seus compostos em acessar células vegetais e produzir estímulos fisiológicos (Zandonadi et al., 2013). Recentemente, Zanin et al. (2018) demonstraram a eficiência do EHSA no aumento da absorção de nitrato por plantas de milho. Os autores observaram que o extrato foi capaz de regular transportadores de nitrato, proteínas

accessórias e enzimas que regulam a assimilação de nitrato, com potencial para aumentar a eficiência de uso do nitrogênio por cultivos agrícolas. Mas independente da fração empregada, os vermicompostos obtidos a partir de resíduos orgânicos constituem fonte importante e efetiva de SH bioativas (Spaccini et al., 2019).

De maneira semelhante aos bioestimulantes, agentes biológicos de controle de doenças vegetais constituem uma possibilidade importante para a agricultura. Uma série de fungos tem sido testada com o propósito de reduzir a incidência de agentes patógenos, diminuindo a necessidade de aplicação de produtos químicos nas lavouras. A atividade de biocontrole desses fungos pode ocorrer devido à competição por espaço e nutrientes com os patógenos, pela produção de antibióticos, inativação de enzimas ou mesmo micoparasitismo (Almeida et al., 2007; Lombardi et al., 2018). Particular atenção tem sido dada aos fungos do gênero *Trichoderma* em função da sua habilidade em estimular o crescimento vegetal e controlar a ação de patógenos (Druzhinina et al., 2011). Algumas espécies desse gênero podem penetrar e colonizar raízes das plantas, agindo como simbiontes endofíticos e causando mudanças substanciais na fisiologia da planta e em seus mecanismos de defesa (Fiorini et al., 2016). Também podem produzir metabólitos secundários, os quais apresentam amplo espectro de ação antimicrobiana (Vieira et al., 2018).

Atualmente, mais de 60% dos biocontroladores comerciais de doenças vegetais registrados possuem isolados simples ou misturas de espécies de *Trichoderma* (López-Bucio et al., 2015). Huang et al. (2016) observaram reduções na população de *Rhizoctonia solani* em mudas de pepino tratadas com *T. harzianum* T37. Já Al-Hazmi e TariqJaveed (2016) observaram grande redução e atividade de *Meloidogyne javanica* em plantas de tomateiro com a adição de diferentes densidades ( $10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^8$  e  $10^{10}$  esporos/g de solo) de *T. harzianum* e *T. viride*. A eficiência de *Trichoderma* spp. contra nematoides-das-



galhas foi comprovada também por outros autores (Sharon et al., 2001; Sahebani e Hadavi, 2008; Siddiqui e Akhtar, 2008; Bokhari, 2009; Singh e Mathur, 2010; Mascarin et al., 2012; On et al., 2015; Olabiyi et al., 2016).

A hipótese contida neste trabalho é que o vermicomposto é um bom meio para o desenvolvimento da população de *Trichoderma* spp. e que a adição EHSa desse vermicomposto enriquecido é capaz de controlar a infestação do nematoide-das-galhas e fornecer SH bioativas capazes de favorecer o desenvolvimento, a nutrição, a produtividade e as trocas gasosas de plantas de tomateiro.

## **2.2. Material e métodos**

### **2.2.1. Vermicompostagem**

Inicialmente, realizou-se um processo de vermicompostagem em caixas de polietileno com capacidade para 310 dm<sup>3</sup> empregando-se esterco bovino e minhocas vermelhas da Califórnia (*Eisenia foetida*). Para isto, o esterco foi acondicionado nas caixas para um período inicial de compostagem de 30 dias, com revolvimento e umidificação semanal. Para evitar o acúmulo de líquido no fundo das caixas, foi adicionada uma torneira para coleta e recirculação do líquido coletado. Após 30 dias, o material em compostagem recebeu a adição de minhocas na proporção de 80 indivíduos para cada dm<sup>3</sup> de composto. O material permaneceu mais 120 dias sob ação das minhocas, totalizando 120 dias para obtenção do vermicomposto.

### **2.2.2. Obtenção e confirmação da identidade dos isolados de *Trichoderma* spp. através do sequenciamento Sanger de regiões específicas (ITS)**

Os inóculos de *Trichoderma* spp. (*T. asperellum* e *T. virens*) foram obtidos da coleção do Laboratório de Agromicrobiologia Aplicada da Universidade Federal do Tocantins.

Para a confirmação das espécies, o DNA total das amostras dos dois isolados de *Trichoderma* spp. foi extraído através do Kit ZR Fungal/Bacterial DNA MicroPrep™ (D6007) de acordo com protocolo do fabricante. A qualidade do DNA extraído foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 2% e quantificados por fluorescência (Qubit). O DNA extraído foi mantido à temperatura de -20°C até o momento do uso.

As reações de PCR foram feitas em um volume final de 20µL, contendo 10µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL), 0.6µM de oligonucleotídeo forward e 0.6µM de oligonucleotídeo reverse, 40ng de DNA genômico e água ultrapura estéril suficiente para 20µL. Para a amplificação da região ITS foram utilizados os primers ITS4 e ITS5. O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 seg., anelamento a 56°C por 40seg; extensão a 72°C por 1 min e uma extensão final a 72°C por 5 min. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems).

As amostras de PCR foram avaliadas e gel de agarose 2% corados com UniSafe Dye, visualizado sob luz UV e após purificadas com Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.). A quantificação dos produtos purificados realizada por fluorescência em aparelho Qubit (ThermoFischer).

Para realização do sequenciamento foram utilizados os primers ITS4 e ITS5. A reação de sequenciamento foi feita em BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

(Applied) e reação de precipitação por Etanol/EDTA/Acetato de Sódio. O sequenciamento automático foi realizado por eletroforese capilar no equipamento ABI3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Após o sequenciamento, foi realizada a análise dos eletroferogramas utilizando os programas EMBOSS/Merger, Chromas Lite, Geneious 4.8.3 para obtenção da sequência consenso. Após a edição, a sequência obtida foi utilizada na busca de sequências de referência similares depositadas no GenBank, através da ferramenta BLAST.

### **2.2.3. Crescimento e aplicação de *Trichoderma* spp.**

Após repicagem dos isolados de *Trichoderma* spp. em placas de Petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Agar), o material permaneceu em câmara do tipo BOD (Lucadema, São Paulo, Brasil), a  $28 \pm 0,2$  °C, por 15 dias. Foram então obtidas suspensões de conídios em água destilada pela raspagem das hifas crescidas nas placas, padronizando a concentração em  $1 \times 10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio ótico (Primo Star, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com aumento de 400 vezes (Ortiz e Orduz, 2001).

A aplicação das suspensões dos fungos ocorreu em dois momentos: após 15 e 30 dias do início da compostagem. Em cada aplicação, foram adicionados 2 L de suspensão contendo  $1 \times 10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  em cada caixa contendo  $300 \text{ dm}^3$  de vermicomposto. As aplicações foram feitas distribuindo-se uniformemente a suspensão na superfície do vermicomposto, sendo definidos cinco tratamentos: vermicomposto sem adição de *Trichoderma* spp. (V); vermicomposto com adição de *T. asperellum* (V+TA); vermicomposto com adição de *T. virens* (V+TV); vermicomposto com adição de *T. asperellum* e *T. virens* (V+TA+TV) e o controle (água). Para o tratamento com inoculação conjunta, utilizou-se metade do volume de cada espécie para que o total aplicado fosse

equivalente ao dos tratamentos com inoculação isolada. Ao final do processo, amostras do vermicomposto foram obtidas para realização da caracterização analítica, extração do EHSa e teste com plantas.

#### **2.2.4. Caracterização química dos vermicompostos**

Parte das amostras dos vermicompostos foi seca a 105°C até massa constante em estufa de circulação forçada (Q317M-12, Quimis, São Paulo, Brasil) visando a caracterização química. Os valores de pH e condutividade elétrica foram determinados em água destilada (relação 1:5), após agitação em mesa orbital (MA 420/8-125, Marconi, São Paulo, Brasil) (150 rpm), por 30 minutos, sendo as leituras realizadas em pHmetro (PG2000, Gehaka, São Paulo, Brasil) e condutivímetro (Q485M, Quimis, São Paulo, Brasil), respectivamente. O teor de carbono orgânico total (COT) foi determinado empregando-se o método de (Walkley e Black, 1934) com modificações (Yeomans e Bremner, 1988), utilizando-se  $K_2Cr_2O_7$  0,166 mol L<sup>-1</sup>, como agente oxidante, e  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$  0,5 mol L<sup>-1</sup> como titulante do excesso de  $K_2Cr_2O_7$ , em presença de indicador difenilamina 0,16%.

#### **2.2.5. Produção das mudas de tomateiro, inoculação com *M. incognita*, obtenção e aplicação do extrato húmico solúvel em água**

Sementes de tomateiro cv. “Santa Cruz” foram germinadas em bandejas plásticas preenchidas com substrato comercial (Carolina Soil, São Paulo, Brasil). Aos 15 dias após semeadura (DAS), as mudas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade para 5,0 dm<sup>3</sup> preenchidos com solo (Latosolo Vermelho) e palha de arroz carbonizada, na proporção de 2:1 (v:v). Previamente, o solo foi autoclavado e corrigido para fins de acidez e calagem de acordo com os procedimentos descritos em Souza e Lobato (2004).

Adubações de cobertura foram realizadas durante o experimento conforme o preconizado para a cultura (Gomes et al., 1999). Os vasos foram alocados em bancadas suspensas higienizadas com NaClO, em casa-de-vegetação. Um sistema de gotejamento foi implementado para o experimento, aplicando água conforme necessidade medida por sensores de umidade solo (Irrigas, Hidrosense, São Paulo, Brasil).

A espécie de nematoide-das-galhas inoculada foi obtida do laboratório de Nematologia da Embrapa Hortaliças, Brasília – DF. A identificação da espécie *M. incognita* raça 1 foi previamente realizada mediante corte da região perineal de fêmeas adultas (Yang e Eisenback, 1983; Rammah e Hirschmann, 1988; Eisenback e Triantaphyllou, 1991). A análise do fenótipo da isoenzima esterase foi realizada para confirmar a espécie desejada, de acordo com Carneiro e Almeida (2001). A inoculação das plantas com *M. incognita* foi realizada após o transplantio das mudas (15 DAS), com a deposição, nas raízes ao redor do coleto das plantas, de 5,0 mL de suspensão em água contendo 5.000 ovos e eventuais J2.

A obtenção do EHSA seguiu uma adaptação do método original proposto por Pinton et al. (1998), utilizando-se amostras dos vermicompostos e água destilada, na relação 1:5 (v:v). Os materiais foram agitados por 4 horas, com posterior decantação da fração insolúvel e sifonação do extrato para imediata aplicação. Para avaliar o efeito dos tratamentos, foram realizadas 10 aplicações de 250 mL/vaso ao redor do coleto das plantas, sendo a primeira após a deposição dos ovos e J2 de *M. incognita* e as posteriores em intervalos de 7 dias até o período de 70 dias. O tratamento controle recebeu o mesmo volume de água destilada.

### **2.2.6. Trocas gasosas e eficiência de uso da água**

As plantas foram avaliadas com 50 dias após o transplântio (DAT), período provável da resposta inicial à infecção por nematoides (Mioranza et al., 2018), quanto à assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, taxa de transpiração, condutância estomática e concentração interna de CO<sub>2</sub>, empregando-se um analisador portátil de fotossíntese por radiação infravermelha (IRGA - Li-6400XT, LICOR, Nebraska, EUA). A eficiência de uso de água foi obtida a partir da relação entre assimilação líquida de CO<sub>2</sub> e a condutância estomática. As medições foram feitas em folhas adultas e sadias escolhidas no terço mediano das plantas, no período entre 08 e 10 h da manhã. A concentração de CO<sub>2</sub> injetada artificialmente na câmara de assimilação do IRGA foi fixada em 400 µmol mol<sup>-1</sup>. As avaliações foram feitas sob 300 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de densidade de fluxo fotossinteticamente ativos (de Oliveira Silva et al., 2018).

### **2.2.7. Avaliações biométricas das plantas e eficiência do biocontrole sobre *M. incognita***

Setenta DAT, foram analisados os seguintes parâmetros relacionados à biometria das plantas: comprimento da parte aérea, com auxílio de régua graduada, da base do vaso (substrato) até a última ramificação foliar; massa úmida de raízes e massa fresca da parte aérea, em balança analítica (S303, BEL, São Paulo, Brasil). Em seguida, as plantas foram secas em estufa de circulação de ar (TE 394/3, Tecnal, São Paulo, Brasil) a 60° C, por 48, horas para determinações de massa seca da parte aérea, também em balança analítica.

Os índices de galhas (IG) e de massas de ovos (IMO), o número de nematoides por grama de raiz (NOGR) e o fator de reprodução (FR) foram também determinados aos 70 DAT. Para isto, as raízes das plantas foram lavadas em água e as massas de ovos dos

nematoides foram coloridas segundo Dickson e Struble (1965). Em seguida, a contagem do número de galhas e de massa de ovos dos nematoides-das-galhas presentes no sistema radicular foi realizada em microscópio estereoscópico (Primo Star, Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

O IMO foi obtido conforme preconizado por Huang et al. (1986), utilizando escala de notas de 1 a 5 (1= raízes sem massa de ovos; 2= raízes com 1 a 5 massas de ovos; 3= raízes com 6 a 15 massas de ovos; 4= raízes com 16 a 30 massas de ovos e; 5= raízes com mais de 30 massas de ovos). Para avaliação do IG, o número de galhas presentes nas raízes das plantas foi determinado pela escala de 1 a 5 (1= raiz sem galhas; 2= raiz com até 10 galhas pequenas; 3= raiz com até 50 galhas pequenas; 4= raiz com mais de 50 galhas pequenas e até 10 galhas grandes; e 5=raiz com mais de 50 galhas pequenas e mais de 10 galhas grandes (Charchar et al., 2003).

Para avaliação do NOGR, as raízes foram lavadas, secas em temperatura ambiente e pesadas antes de serem processadas de acordo com a técnica de Hussey e Barker (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981). Já o FR dos nematoides foi obtido pela divisão entre as densidades populacionais finais e iniciais ( $FR = Pf/Pi$ ) (Oostenbrink, 1966), sendo Pf a população final de ovos e eventuais J2 determinados após o experimento e Pi a população inicial aplicada (5000 ovos e eventuais J2 de *M. incognita*).

#### **2.2.8. Conteúdo de nutrientes na parte aérea das plantas**

O material seco então foi passado em moinho de facas (Solab, São Paulo, Brasil) e sofreu processo de digestão em forno de micro-ondas modelo Mars Xpress (CEM, NC, EUA), utilizando-se 0,5 g de amostra, 8 mL de HNO<sub>3</sub> e 2 mL de HCl. As condições de digestão em micro-ondas foram: 10 minutos de rampa (aquecimento), manutenção da temperatura em 170 °C (por 15 minutos) com potência de 1600 W e resfriamento por 20

minutos até temperatura ambiente. Após, as amostras foram transferidas para tubos de polipropileno, completando o volume final de 50 mL com água deionizada para quantificação dos nutrientes por espectrometria de emissão atômica por plasma (ICPE-9000 OES, Shimadzu, Quioto, Japão). Os teores de N-total foram obtidos mediante digestão sulfúrica e o extrato analisado pelo método Kjeldahl (Tedesco et al., 1995).

### **2.2.9. Análises estatísticas**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições. As médias das diferentes variáveis analisadas foram testadas por análise de variância (ANOVA), após teste de Shapiro-Wilk para verificação da distribuição normal dos dados. A significância das diferenças quando existente entre as médias foram avaliadas com teste *post hoc* de Fisher LSD utilizando-se o programa estatístico R versão 3.3.3.

## **2.3. Resultados e discussão**

### **2.3.1. Caracterização química dos vermicompostos**

Os valores de pH em água dos vermicompostos variaram entre 6,9, nos tratamentos V e V+TA, e 6,7, em V+TV e V+TA+TV (Tabela 1). É reconhecido que a produção de  $H_2CO_3$  através da dissolução do  $CO_2$  oriundo da respiração microbiana pode influenciar o pH de compostos, da mesma forma que a liberação de ácidos orgânicos (Busato et al., 2017; Bustamante et al., 2016; Moharana e Biswas, 2016). De maneira indireta, portanto, é possível sugerir que *T. virens* apresentou habilidade de crescimento populacional no vermicomposto, resultando em maior produção desses compostos capazes de reduzir o pH do meio. Pode também ter colaborado a maior produção de AH no vermicomposto



inoculado com *T. virens*, já que os grupamentos carboxílicos e fenólicos presentes nessa fração húmica são também responsáveis pela acidificação do meio.

**Tabela 1.** Valores de pH, condutividade elétrica (CE) e carbono orgânico total (COT) em vermicompostos produzidos a base de esterco bovino e enriquecidos com *Trichoderma*.

Tratamento	pH	CE	COT
	-	$\mu\text{s cm}^{-1}$	$\text{g kg}^{-1}$
V	6,93 ( $\pm 0,11$ ) a	4070,00 ( $\pm 233,93$ ) b	125,94 ( $\pm 2,56$ ) a
V+TA	6,92 ( $\pm 0,08$ ) a	3362,33 ( $\pm 165,19$ ) c	118,24 ( $\pm 6,01$ ) a
V+TV	6,70 ( $\pm 0,17$ ) b	3206,01 ( $\pm 224,32$ ) c	122,01 ( $\pm 6,02$ ) a
V+TA+TV	6,71 ( $\pm 0,04$ ) b	4496,33 ( $\pm 79,25$ ) a	102,72 ( $\pm 0,74$ ) b

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste LSD. Valores entre parênteses referem-se ao desvio padrão.

A condutividade elétrica (CE) pode ser empregada como indicador de qualidade para uso seguro do composto e valores acima de  $4000 \mu\text{s cm}^{-1}$  tem sido considerados prejudiciais para a germinação e sementes e crescimento de plantas (Chowdhury et al., 2015; Gao et al., 2010; Lazcano et al., 2008; Onwosi et al., 2017). Os tratamentos V+TA e V+TV apresentaram valores de condutividade elétrica 3362 e 3206  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , respectivamente, enquanto para V e V+TA+TV esses valores foram de 4070 e 4496  $\mu\text{S cm}^{-1}$  (Tabela 1). Valores mais elevados e inadequados de condutividade elétrica podem ter ocorrido devido à liberação de amônio a partir da degradação da matéria orgânica, aumentando os níveis de salinidade no material. Nesse sentido, a adição isolada de cada *Trichoderma* pode ter resultado no controle da liberação do amônio ou incorporação deste às células microbianas, ajustando os valores de condutividade elétrica para níveis considerados não adequados para as plantas.

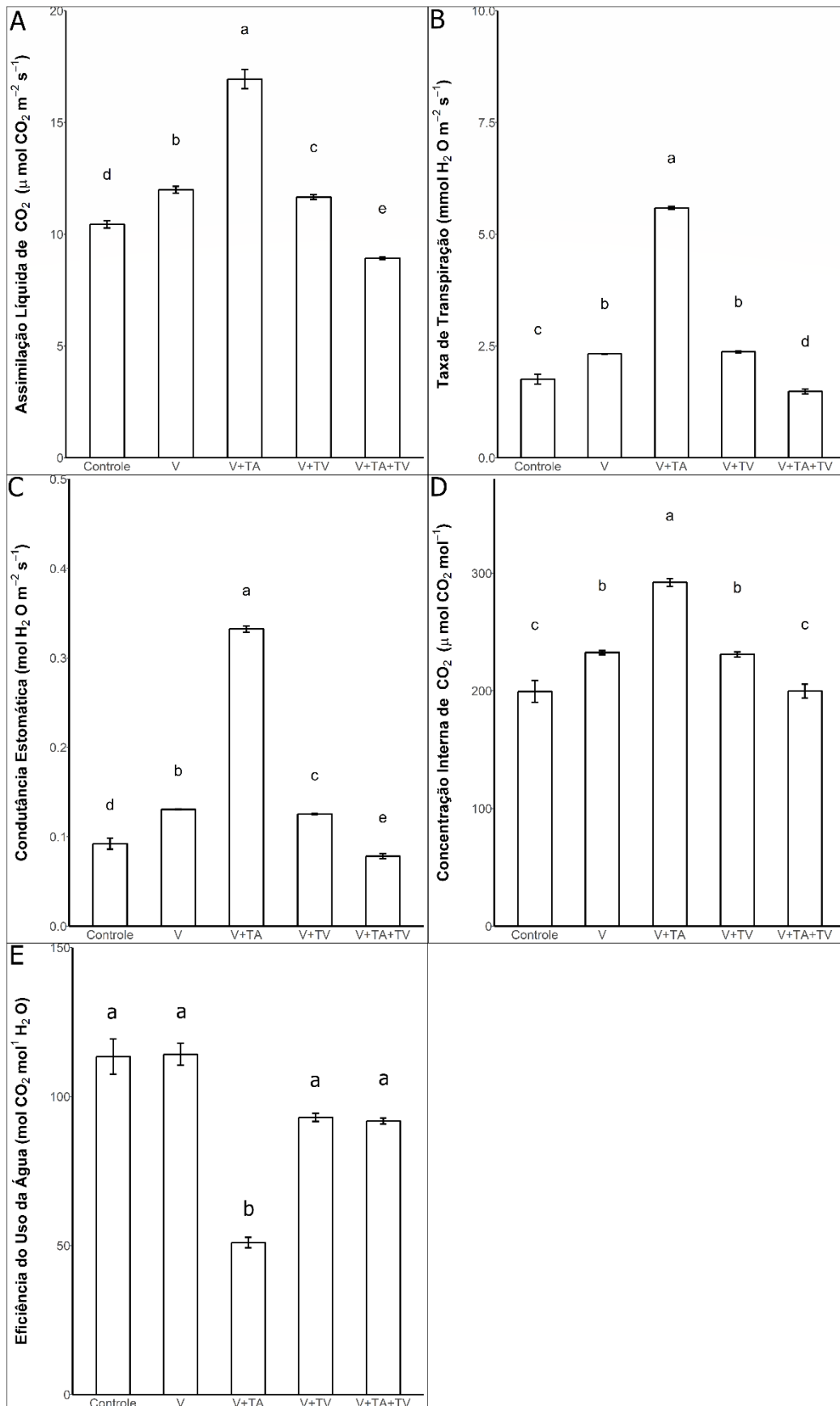
Após 120 dias de vermicompostagem, o tratamento com inoculação conjunta das duas espécies de *Trichoderma* resultou em menor valor de carbono orgânico total (COT) (Tabela 1), sugerindo que este tratamento apresentou maior conversão das formas de

carbono presentes no material em degradação a CO<sub>2</sub>. O teor de COT em V+TA+TV ao final do experimento foi da ordem de 102,72 g kg<sup>-1</sup>, enquanto os demais tratamentos apresentaram valores de 125,94, 118,24 e 122,01 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente para V, V+TA e V+TV.

### 2.3.2. Trocas gasosas e eficiência de uso da água

A taxa de fotossíntese nas plantas sob os diferentes tratamentos seguiu a ordem V+TA > V > V+TV > controle > V+TA+TV (Figura 1A). Para o tratamento V+TA, o valor da taxa de fotossíntese foi de 16,9 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, maior valor absoluto entre os tratamentos e 63% maior que o controle. Já V+TA+TV aparentemente inibiu a taxa de fotossíntese, que apresentou valor 90% menor que V+TA (8,9 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>). Em relação à taxa de transpiração (Figura 1B), V+TA apresentou o maior valor entre os tratamentos, que foi 218% maior que o controle. O menor valor encontrado foi para V+TA+TV, que foi 18% menor que o controle (1,75 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>).

V+TA foi capaz de estimular a condutância estomática e V+TA+TV inibiu, sendo de 90% essa diferença (Figura 1C). V+TA aumentou em 46% a concentração interna de CO<sub>2</sub> em relação ao controle enquanto V e V+TV aumentaram em 16% em comparação ao controle (Figura 1D). A eficiência do uso da água apresentou resposta oposta, diminuindo em plantas tratadas com V+TA, V+TV e V e aumentando para V+TA+TV. Como é obtida pela razão entre a assimilação líquida de CO<sub>2</sub> e condutância estomática, V+TA+TV apresentou baixa condutância estomática e assim resultando em uma alta eficiência no uso da água (Figura 1D).



**Figura 1.** Assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C), concentração interna de CO<sub>2</sub> (D), eficiência de uso de água (E) de plantas de tomateiro tratadas com EHSA e inoculadas com *Meloidogyne incognita*.

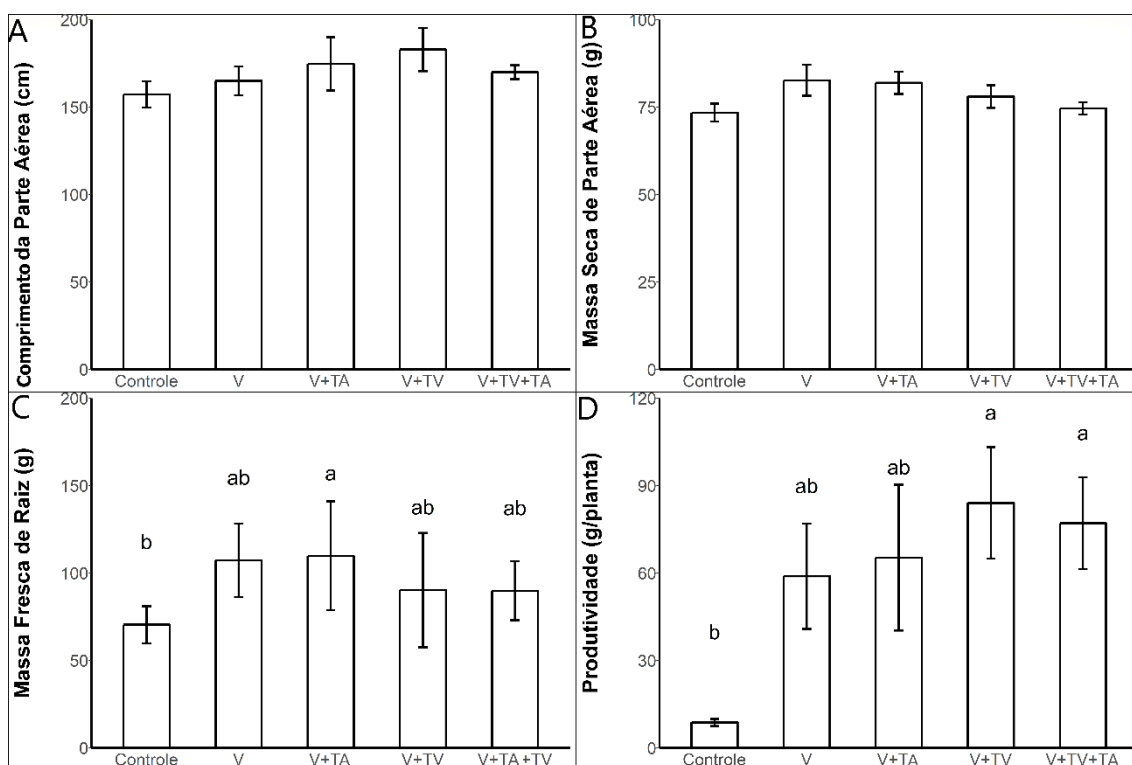
As plantas podem responder ao parasitismo do nematoide-das-galhas modificando seu metabolismo e diminuindo sua taxa fotossintética (Abrão e Mazzafera, 2001). A infecção causa obstrução do xilema e, portanto, diminui a transpiração da planta e a absorção de água, conseqüentemente, reduzindo a absorção de nutrientes (Asif et al., 2017). Como uma adaptação ao estresse dos agentes patogênicos, as plantas ajustam a relação entre água, transpiração, fotossíntese e uso da água por meio de mudanças estomáticas, a fim de maximizar a assimilação de CO<sub>2</sub> (Xu e Zhou, 2008). Ainda, o dano causado pelos nematoides pode ocasionar estresse hídrico na planta e o fechamento parcial dos estômatos, resultando na diminuição na fixação de CO<sub>2</sub> (Loveys e Bird, 1973).

Trabalhos anteriores mostraram uma taxa fotossintética aumentada como resultado da colonização de raízes de milho por *T. virens*, associada ao aumento dos níveis de mRNA no estado estacionário para a subunidade pequena de Rubisco e o potenciador de oxigênio 3-1 (Vargas et al., 2009). *T. harzianum* T-22 também aumentou a expressão de genes relacionados à fotossíntese, como a subunidade grande de Rubisco e a proteína complexa PSII de desenvolvimento de oxigênio, no milho (Shoresh e Harman, 2008). A promessa de bioestimulantes para aumentar a eficiência do uso da água possui grande potencial para regiões propensas a estresse, onde as culturas hortícolas são agronomicamente importantes (Van Oosten et al., 2017). Quando a planta é submetida a condições de estresse, umas das respostas é a produção de compostos que podem incitar o fechamento estomático, como o ácido abscísico (ABA) e espécies reativas de oxigênio para induzir aumento de Ca<sup>2+</sup> concentração no citosol das células mantidas, levando a fechamento estomático (Klusener, 2002). Evidências apontam que o ABA participa de um papel importante no mecanismo de resposta de defesa da planta à patógenos, agindo positiva ou negativamente na regulação de resistência a doenças interferindo em diferentes níveis na sinalização do estresse (Asselbergh et al., 2008). *Trichoderma* spp.

também é relatado por induzir esse tipo de resistência sistêmica, provavelmente pelo resultado da modulação da rede de sinalização de defesa da planta que traduz os eventos da sinalização precoce induzida em uma ativação mais eficiente das respostas de defesa da planta, envolvendo os fitohormônios ácido jasmônico, ácido salicílico e ácido abscísico como sinais primários dominantes na regulação das respostas locais e sistêmicas de defesa em plantas.

### 2.3.3. Avaliações biométricas das plantas e eficiência dos EHSAs em relação ao controle de *M. incognita*

Não houve diferença entre os tratamentos para comprimento de parte aérea e massa seca das plantas em função da aplicação de EHSAs (Figura 2).



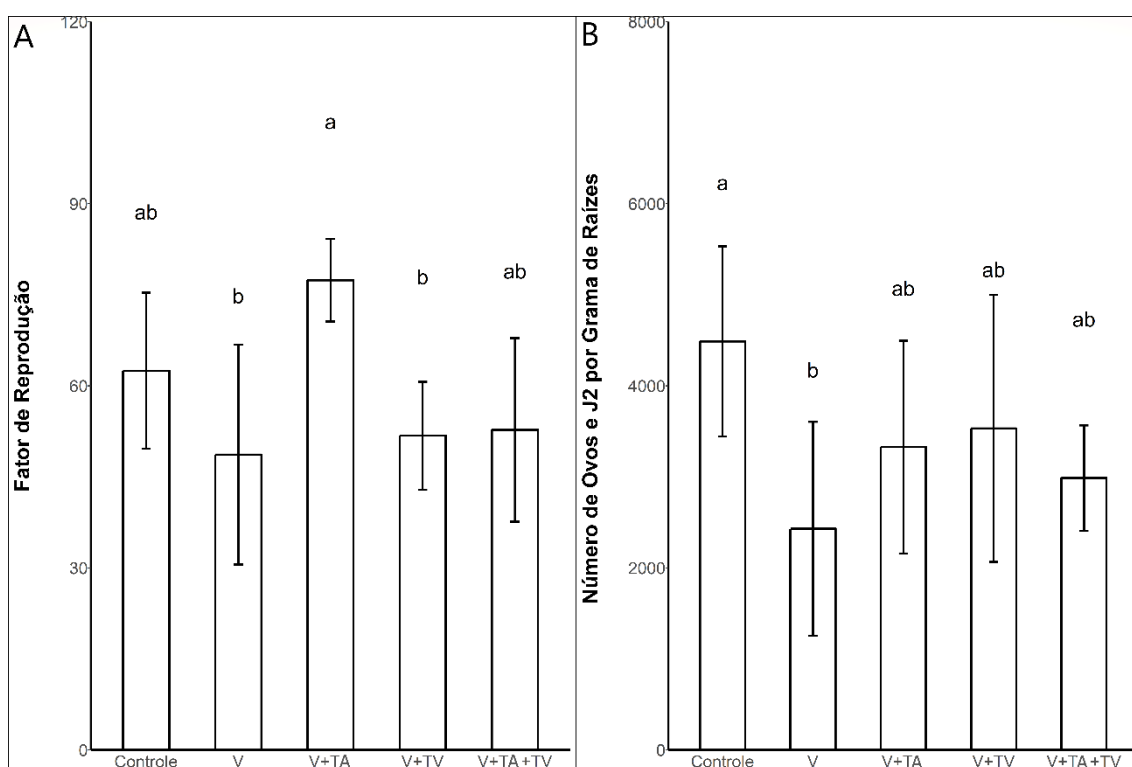
**Figura 2.** Comprimento da parte aérea (A), massa seca de parte aérea (B), massa fresca de raiz (C) e produtividade (D) de plantas de tomateiro tratadas com EHSAs e inoculadas com *Meloidogyne incognita*.

Já para matéria fresca de raiz, o tratamento V+TA apresentou média 55,8% maior que o tratamento controle (109,83 e 70,46 g, respectivamente) (Figura 2C). Já é bastante reconhecido o efeito que as SH desempenham sobre o sistema radicular das plantas. Rose et al. (2014) estimaram que, em média, essas substâncias aumentam em cerca de 20% o sistema radicular das plantas. Esse estímulo tem sido atribuído à presença de compostos com características semelhante ao das auxinas (Nardi et al., 2017; Olaetxea et al., 2018; Scaglia et al., 2016), ou mesmo à presença de ácido indolacético (AIA) na estrutura húmica. O aumento da atividade da H<sup>+</sup>-ATPase na membrana plasmática de células radiculares também tem sido utilizado para explicar o maior desenvolvimento das raízes (Canellas et al., 2002; Zandonadi et al., 2007). Para EHSA, esse estímulo ao crescimento pode estar associado à maior capacidade das plantas tratadas em aumentar a aquisição de nitrato pelas raízes, em função da modulação de genes envolvidos nesta tarefa (Zanin et al., 2018). As SH melhoram o crescimento de raízes e brotos através de uma ação interconectada em vias de sinalização relacionadas a auxina e ABA nas raízes e citocininas na parte aérea (Nardi et al., 2017). Esta ação também pode envolver outros sinais moleculares, como espécies reativas de oxigênio, e mensageiros secundários, como o Ca<sup>2+</sup>, e é SH com as paredes celulares na superfície da raiz (Olaetxea et al., 2018).

As produtividades das plantas dos tratamentos V+TV e V+TA+TV foram 846% e 94% maiores que o tratamento controle, respectivamente. Já as plantas tratadas com V+TA e V foram 80% e 63% mais produtivas que o controle (Figura 2D). O aumento do crescimento das plantas e a produtividade podem envolver vários processos biológicos e químicos na rizosfera que podem ser atribuídos aos mecanismos de ação de *Trichoderma* spp., como por exemplo, a modificação da disponibilidade de nutrientes no solo ou a modulação do crescimento das raízes (Fiorentino et al., 2018). Outros mecanismos que *Trichoderma* spp. possuem e que produzem efeitos positivos no crescimento das plantas

incluem a resistência induzida ao nematoide-das-galhas, a modulação da arquitetura do sistema radicular (comprimento total da raiz e densidade e ramificação) para aumentar a área e capacidade de absorção de água e nutrientes.

Em relação ao potencial de controle dos nematoides-das-galhas, foram registradas reduções na ordem de 10% e 4% no fator de reprodução quando o V e V+TV foram aplicados (Figura 3), respectivamente. Por outro lado, os nematoides reproduziram 40% mais no tratamento V+TA. Quando as espécies de *Trichoderma* foram combinadas, o fator de reprodução foi igual ao controle (Figura 3). O extrato de vermicomposto também foi responsável por uma redução de 40% na quantidade de ovos e eventuais J2 por grama de raízes.



**Figura 3.** Fator de reprodução (A) e número de ovos e eventuais J2 por grama de raízes de plantas de tomateiro tratadas com EHSa e inoculadas com *Meloidogyne incognita*.

Considerando que as fêmeas adultas permanecem sedentárias e depositam massas de ovos diretamente na rizosfera, a massa das raízes aumenta proporcionalmente com a reprodução dos nematoides. Dessa forma, a capacidade de colonizar de raízes das plantas

por *Trichoderma* spp. depende fortemente da especificidade de cada espécie vegetal para tolerá-las. Caso haja compatibilidade, essa tolerância é associada à presença de sistemas de transporte ABC (ATP Binding Cassete), que são fatores-chave nas múltiplas interações estabelecidas por *Trichoderma* spp. com outros microrganismos em um ambiente potencialmente antagônico. Dessa forma, o tratamento V+TV apresentaram a segunda maior massa de raízes e a maior incidência de galhas, como demonstrado anteriormente. Apesar disso, plantas tratadas com V mostraram massa radicular maior, porém menor infecção com nematoide-das-galhas. Independentemente dos tratamentos, não foram observadas diferenças no IG e IMO. O mecanismo por meio do manejo bem-sucedido do nematoide-das-galhas depende da promoção do crescimento vegetal e por meio de subprodutos metabólicos, enzimas e toxinas produzidas pelos agentes de biocontrole (Tiwari et al., 2017). Trabalhos anteriores sobre metabólitos e toxinas microbianas mostraram que eles têm impacto direto nas populações de nematoides, interferindo na reprodução, na eclosão dos juvenis ou matando diretamente os nematoides (Herrera-Parra et al., 2017; Huang et al., 2016; Sharon et al., 2001; Udo et al., 2014).

Os extratos de vermicomposto que foram inoculados com *Trichoderma* não apresentaram diferença no antagonismo de *M. incognita*. *T. asperellum* e *T. virens* também foram relatados por Siddiqui e Akhtar (2008) como pouco eficientes no controle de *M. incognita* em tomateiro, provavelmente porque foram re-isolados de um número muito menor de ovos e eventuais J2, demonstrando pouca capacidade de antagonismo ao nematoide-das-galhas. A combinação de dois agentes de biocontrole também foi relatado como ineficiente por Meyer et al. (2001), sendo um dos motivos pela baixa capacidade em suprimir *M. incognita*. Porém, não está bem elucidado na literatura por que algumas combinações não reduziram as populações de nematoides-das-galhas, embora os agentes individuais tenham sido eficazes. É possível que as estirpes testadas fossem antagônicas



entre si sob as condições usadas para os experimentos, ou que as combinações testadas suprimissem a produção de compostos antagonistas de nematoides (Meyer et al., 2001; Zhang et al., 1996). Nenhuma diferença no IG e IMO foi encontrada, similar ao que foi encontrado por Spiegel e Chet (1998), apesar de reduções significativas na infecção por *M. incognita* em tomateiro. Pode-se presumir que a inoculação de *Trichoderma* spp. na fase inicial do ciclo do nematoide-das-galhas pode paralisar e atrasar o acesso dos nematoides as raízes nesta fase inicial de exposição, assim permitindo que as raízes escapem o ataque inicial e se invistam nos mecanismos de defesa e crescimento (Spiegel e Chet, 1998). Diferenças na contagem do número de ovos e eventuais juvenis podem acontecer em curto prazo, onde a presença do *Trichoderma* inibe a explosão populacional inicial, sendo que ao passar dos ciclos, essa diferença inicial desaparece até não houver diferença nos IG e IMO (Spiegel e Chet, 1998).

#### **2.3.4. Conteúdo de nutrientes na parte aérea das plantas**

Um dos sintomas clássicos observados a partir infecção do nematoide-das-galhas em plantas cultivadas é o aparecimento de deficiência nutricional (Bird, 1974). O maior teor de nitrogênio total foi encontrado para o tratamento V, seguido de V+TA, V+TV, V+TA+TV e o controle (Tabela 2). Nas concentrações de potássio, V+TA apresentou acúmulo 70% maior que o controle, enquanto V+TV, V e V+TA+TV, 60%, 46% e 30%, respectivamente. Tanto para cálcio e magnésio, a ordem decrescente de absorção foi  $V > V+TV > V+TA > V+TA+TV > \text{controle}$ . Aumentos nos teores de cálcio foram de 33%, 18%, 9% e 7% em relação ao controle, respectivamente. Para magnésio, as concentrações médias foram 244% maiores com V ( $0,45 \text{ dag.kg}^{-1}$ ) e 92% maiores para V+TV ( $0,28 \text{ dag.kg}^{-1}$ ) em relação ao controle.

**Tabela 2.** Teores médios de macronutrientes na parte aérea de plantas de tomateiro tratadas com EHSA e inoculadas com *M. incognita*.

Tratamento	N	P	K	Ca	Mg	S
	-----dag kg <sup>-1</sup> -----					
Controle	12,47 (±2,26) c	0,30 (±0,03)	1,73 (±0,12) d	6,44 (±0,62) b	0,13 (±0,03) b	0,32 (±0,07) b
V	18,29 (±1,63) a	0,37 (±0,15)	2,53 (±0,23) bc	8,55 (±0,23) a	0,48 (±0,42) a	0,46 (±0,01) ab
V+TA	17,13 (±1,70) ab	0,45 (±0,04)	2,93 (±0,25) a	7,03 (±0,92) ab	0,16 (±0,04) b	0,43 (±0,01) ab
V+TV	16,93 (±0,80) ab	0,39 (±0,04)	2,76 (±0,20) ab	7,72 (±0,98) ab	0,25 (±0,03) b	0,50 (±0,15) a
V+TA+TV	14,07 (±0,92) bc	0,36 (±0,11)	2,26 (±0,20) c	6,91 (±0,24) ab	0,16 (±0,05) b	0,40 (±0,06) ab

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste LSD.

**Tabela 3.** Teores médios de micronutrientes na parte aérea de plantas de tomateiro tratadas com EHSA e inoculadas com *M. incognita*.

Tratamento	B	Cu	Fe	Mn	Mo	Zn
	-----mg kg <sup>-1</sup> -----					
Controle	36,45 (±6,37) b	10,29 (±1,31)	109,35 (±5,65) b	65,45 (±4,43) b	11,95 (±0,63)	4,79 (±0,86)
V	16,55 (±5,16) b	11,45 (±1,06)	203,00 (±4,13) ab	54,75 (±2,22) b	09,71 (±0,99)	4,11 (±0,49)
V+TA	71,65 (±8,55) a	10,32 (±0,66)	225,66 (±5,40) ab	124,80 (±4,12) ab	12,90 (±0,28)	4,90 (±0,16)
V+TV	97,45 (±6,43) a	10,83 (±0,63)	269,33 (±8,49) a	176,00 (±2,55) a	12,46 (±1,28)	5,52 (±1,02)
V+TA+TV	13,61 (±6,62) b	09,20 (±0,88)	172,50 (±6,87) ab	54,80 (±2,39) b	11,10 (±0,63)	4,56 (±0,70)

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste LSD.

As concentrações de enxofre também foram aumentadas com a aplicação dos EHSA, sendo o aumento mais expressivo com V+TV (aumento de 56%) em relação ao controle. Plantas de tomateiro e pepino modificadas com o gene *qid74* produzido por *T. harzianum* foram capazes de absorver mais NPK do que plantas não tratadas devido às modificações na arquitetura das raízes e conseqüentemente o aumento da superfície de absorção assim facilitando a absorção de nutrientes e a translocação de nutrientes na parte aérea, resultando no aumento da biomassa das plantas através do uso eficiente de NPK e micronutrientes (Samolski et al., 2012).

A adição de EHSA também teve efeitos na dinâmica de absorção de micronutrientes (Tabela 3). Em relação ao boro, o tratamento V+TV apresentou 67% a mais que o controle, enquanto o tratamento V+TA, 96% a mais que o controle. A diminuição da concentração de ferro com o tratamento V+TA+TV, em relação aos outros tratamentos contendo *Trichoderma* spp., revelou que, provavelmente, os microrganismos competiram com a planta por esse nutriente, o que é consistente com trabalhos anteriores (Borrero et al., 2012; de Santiago et al., 2009). Já a aplicação de T+TV, foi 56% maior que o tratamento V+TA+TV e 146% maior que o controle.

Dessa forma, EHSA melhora a nutrição mineral e o crescimento de plantas por meio de ambas as ações no solo (ou no substrato em crescimento), principalmente relacionadas à sua capacidade de formar complexos estáveis com metais e à ativação da rede molecular e enzimática envolvida na aquisição de raízes de nutrientes. Esta ação é especialmente relevante para alguns nutrientes como Fe, N e P (Olaetxea et al., 2018b), maior assimilação/solubilização de macronutrientes (P) e micronutrientes (Fe, Mn e Zn), possivelmente influenciada por alterações de pH da rizosfera (Fiorentino et al., 2018).

## 2.4. Conclusões

O uso de EHSAs inoculadas com *Trichoderma* spp. foi capaz de estimular as trocas gasosas, aumentar a produtividade e a nutrição das plantas de tomateiro em ambiente controlado. O tratamento V+TA aumentou a assimilação líquida de CO<sub>2</sub> em 63% e a transpiração em 218%, em relação ao controle. A produtividade foi aumentada em todos os tratamentos com adição de EHSAs, com aumento de 864% para o tratamento V+TV em relação ao controle. O antagonismo de *Trichoderma* spp. não foi eficaz na redução da reprodução de *M. incognita* nas condições deste experimento, mas foi capaz de induzir tolerância ao nematoide-das-galhas nas plantas com adição de EHSAs. O acúmulo de nutrientes nas plantas de tomateiro tratadas também foi maior principalmente para N, K, Ca e S.

## Agradecimentos

Agradecimentos à FAP-DF, pelo auxílio financeiro do processo nº 0193.001226/2016.

Agradecimentos à Capes, pela bolsa de mestrado concedida ao autor desta dissertação, crucial para o desenvolvimento desta pesquisa.

## Referências Bibliográficas

- Abbasi, P.A., Miller, S.A., Meulia, T., Hoitink, H.A.J., Kim, J.M., 1999. Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost- amended potting mixes by using molecular markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5421–5426.
- Aguiar, N.O., Olivares, F.L., Novotny, E.H., Dobbss, L.B., Balmori, D.M., Santos-Júnior, L.G., Chagas, J.G., Façanha, A.R., Canellas, L.P., 2013. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. *Plant Soil* 362, 161–174. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1277-5>
- Al-Hazmi, A.S., TariqJaveed, M., 2016. Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato. *Saudi J. Biol. Sci.* 23, 288–292. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.007>
- Almeida, F.B.D.R., Cerqueira, F.M., Silva, R.D.N., Ulhoa, C.J., Lima, A.L., 2007. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: Evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnol. Lett.* 29, 1189–1193. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9372-z>
- Asif, M., Khan, A., Siddiqui, M., 2017. Sustainable management of *root knot nematode Meloidogyne incognita* through organic amendment on *Solanum lycopersicum* L. *Asian J. Biol.* 1, 1–8. <https://doi.org/10.9734/ajob/2016/30739>
- Asselbergh, B., De Vleeschauwer, D., Höfte, M., 2008. Global switches and fine-tuning—ABA modulates plant pathogen defense. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21, 709–719. <https://doi.org/10.1094/mpmi-21-6-0709>
- Bird, A.F., 1974. Plant response to root-knot nematode. *Annu. Rev. Phytopathol.* 12, 69–85. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.12.090174.000441>
- Bokhari, F.M., 2009. Efficacy of some *Trichoderma* species in the control of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 42, 361–369. <https://doi.org/10.1080/03235400601070520>
- Borrero, C., Trillas, M.I., Delgado, A., Avilés, M., 2012. Effect of ammonium/nitrate ratio in nutrient solution on control of Fusarium wilt of tomato by *Trichoderma asperellum* T34. *Plant Pathol.* 61, 132–139. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

- Busato, J.G., Zandonadi, D.B., Dobbss, L.B., Façanha, A.R., Canellas, L.P., 2010. Humic substances isolated from residues of sugar cane industry as root growth promoter. *Sci. Agric.* 67, 206–212. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162010000200012>
- Busato, J.G., Zandonadi, D.B., Mól, A.R., Souza, R.S., Aguiar, K.P., Júnior, F.B.R., Olivares, F.L., 2017. Compost biofortification with diazotrophic and P-solubilizing bacteria improves maturation process and P availability. *J. Sci. Food Agric.* 97, 949–955. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7819>
- Busato, J.G., Zandonadi, D.B., Sousa, I.M. de, Marinho, E.B., Dobbss, L.B., Mól, A.R., 2016. Efeito do extrato húmico solúvel em água e biofertilizante sobre o desenvolvimento de mudas de *Callophyllum brasiliense*. *Pesqui. Florest. Bras.* 36, 161. <https://doi.org/10.4336/2016.pfb.36.86.1024>
- Bustamante, M.A., Ceglie, F.G., Aly, A., Mihreteab, H.T., Ciaccia, C., Tittarelli, F., 2016. Phosphorus availability from rock phosphate: Combined effect of green waste composting and sulfur addition. *J. Environ. Manage.* 182, 557–563. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.08.016>
- Canellas, L.P., 2002. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol.* 130, 1951–1957. <https://doi.org/10.1104/pp.007088>
- Carneiro, R.M.D.G., Almeida, M.R.A., 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas de nematóides de galhas para identificação de espécies. *Nematol. Bras., Brasília, DF*, v. 25, n. 1, p. 35-44
- Chowdhury, A.K.M.M.B., Konstantinou, F., Damati, A., Akrotos, C.S., Vlastos, D., Tekerlekopoulou, A.G., Vayenas, D. V., 2015. Is physicochemical evaluation enough to characterize olive mill waste compost as soil amendment? The case of genotoxicity and cytotoxicity evaluation. *J. Clean. Prod.* 93, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.01.029>
- de Oliveira Silva, F.M., Lichtenstein, G., Alseekh, S., Rosado-Souza, L., Conte, M., Suguiyama, V.F., Lira, B.S., Fanourakis, D., Usadel, B., Bhering, L.L., DaMatta, F.M., Sulpice, R., Araújo, W.L., Rossi, M., de Setta, N., Nunes-Nesi, A., 2018. The genetic architecture of photosynthesis and plant growth-related traits in tomato.

- Plant Cell Environ. 41, 327–341. <https://doi.org/10.1111/pce.13084>
- de Santiago, A., Quintero, J.M., Avilés, M., Delgado, A., 2009. Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on iron nutrition in white lupin. Soil Biol. Biochem. 41, 2453–2459. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.07.033>
- Dobbss, L.B., Canellas, L.P., Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Peres, L.E.P., Azevedo, M., Spaccini, R., Piccolo, A., Façanha, A.R., 2010. Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. J. Agric. Food Chem. 58, 3681–3688. <https://doi.org/10.1021/jf904385c>
- Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. a, Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V, Kubicek, C.P., 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. Nat. Rev. Microbiol. 9, 749–59. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2637>
- du Jardin, P., 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. Sci. Hortic. 196, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Eisenback, J.D., Triantaphyllou, H.H., 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. Man. Agric. Nematol. 281 – 286.
- Fiorentino, N., Ventorino, V., Woo, S.L., Pepe, O., De Rosa, A., Gioia, L., Romano, I., Lombardi, N., Napolitano, M., Colla, G., Roupael, Y., 2018. *Trichoderma*-based biostimulants modulate rhizosphere microbial populations and improve N uptake efficiency, yield, and nutritional quality of leafy vegetables. Front. Plant Sci. 9, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00743>
- Fiorini, L., Guglielminetti, L., Mariotti, L., Curadi, M., Picciarelli, P., Scartazza, A., Sarrocco, S., Vannacci, G., 2016. *Trichoderma harzianum* T6776 modulates a complex metabolic network to stimulate tomato cv. Micro-Tom growth. Plant Soil 400, 351–366. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2736-6>
- Gao, M., Li, B., Yu, A., Liang, F., Yang, L., Sun, Y., 2010. The effect of aeration rate on forced-aeration composting of chicken manure and sawdust. Bioresour. Technol. 101, 1899–1903. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.027>
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol. 2, 43–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>

- Hayes, M.H.B., Clapp, C.E., 2001. Humic substances: considerations of compositions, aspects of structure, and environmental influences. *Soil Sci.* 166, 723–737. <https://doi.org/10.1021/jf504629c>
- Herrera-Parra, E., Cristóbal-Alejo, J., Ramos-Zapata, J.A., 2017. *Trichoderma* strains as growth promoters in *Capsicum annuum* and as biocontrol agents in *Meloidogyne incognita*. *Chil. J. Agric. Res.* 77, 318–324. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392017000400318>
- Huang, X., Liu, L., Wen, T., Zhang, J., Shen, Q., Cai, Z., 2016. Reductive soil disinfections combined or not with *Trichoderma* for the treatment of a degraded and *Rhizoctonia solani* infested greenhouse soil. *Sci. Hortic.* 206, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.04.033>
- Hussey RS; Barker KS. 1973. A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57: 1025-1028.
- Jambhulkar, P.P., Sharma, P., Yadav, R., 2016. Delivery systems for introduction of microbial inoculants in the field, em: Singh, D.P., Singh, H.B., Prabha, R. (Eds.), *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 2: Functional Applications*. Springer India, New Delhi, pp. 199–218. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4\\_13](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4_13)
- Klusener, B., 2002. Convergence of calcium signaling pathways of pathogenic elicitors and abscisic acid in arabidopsis guard cells. *Plant Physiol.* 130, 2152–2163. <https://doi.org/10.1104/pp.012187>
- Lazcano, C., Gómez-Brandón, M., Domínguez, J., 2008. Comparison of the effectiveness of composting and vermicomposting for the biological stabilization of cattle manure. *Chemosphere* 72, 1013–1019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.016>
- Lombardi, N., Vitale, S., Turrà, D., Reverberi, M., Fanelli, C., Vinale, F., Marra, R., Ruocco, M., Pascale, A., D’Errico, G., Woo, S.L., Lorito, M., 2018. Root exudates of stressed plants stimulate and attract *Trichoderma* soil fungi. *Mol. Plant-Microbe Interact.* MPMI-12-17-0310-R. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-17-0310-R>
- López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R., Herrera-Estrella, A., 2015. *Trichoderma* as biostimulant: Exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Sci.*



- Hortic. 196, 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.043>
- Loveys, B.R., Bird, A.F., 1973. The influence of nematodes on photosynthesis in tomato plants. *Physiol. Plant Pathol.* 3, 525–529. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(73\)90063-5](https://doi.org/10.1016/0048-4059(73)90063-5)
- Maji, D., Misra, P., Singh, S., Kalra, A., 2017. Humic acid rich vermicompost promotes plant growth by improving microbial community structure of soil as well as root nodulation and mycorrhizal colonization in the roots of *Pisum sativum*. *Appl. Soil Ecol.* 110, 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.10.008>
- Martinez-Balmori, D., Spaccini, R., Aguiar, N.O., Novotny, E.H., Olivares, F.L., Canellas, L.P., 2014. Molecular characteristics of humic acids isolated from vermicomposts and their relationship to bioactivity. *J. Agric. Food Chem.* 62, 11412–11419. <https://doi.org/10.1021/jf504629c>
- Mascarin, G.M., Ferreira, M., Vieira de Araújo, J., 2012. *Trichoderma harzianum* reduces population of *Meloidogyne incognita* in cucumber plants under greenhouse conditions. *J. Entomol. Nematol.* 4, 54–57. <https://doi.org/10.5897/JEN12.007>
- Meyer, S.L.F., Roberts, D.P., Chitwood, D.J., Carta, L.K., Lumsden, R.D., Mao, W.L., 2001. Application of *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma virens*, alone and in combinations, against *Meloidogyne incognita* on bell pepper. *Nematropica* 31, 75–86.
- Mioranza, T.M., Inagaki, A.M., Müller, M.A., Stangarlin, J.R., Guimarães, V.F., Klein, J., Kuhn, O.J., 2018. Gas exchange and photosynthetic light response curves in nematode-infected tomato plants treated with *Thuja occidentalis*. *Aust. J. Crop Sci.* 12, 583–591. <https://doi.org/10.21475/ajcs.18.12.04.pne861>
- Moharana, P.C., Biswas, D.R., 2016. Assessment of maturity indices of rock phosphate enriched composts using variable crop residues. *Bioresour. Technol.* 222, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.097>
- Nardi, S., Ertani, A., Francioso, O., 2017. Soil–root cross-talking: The role of humic substances. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 180, 5–13. <https://doi.org/10.1002/jpln.201600348>
- Olabiyyi, T.I., Ojo, O.J., Adewuyi, B.O., 2016. Impact assessment of neem compost and *Trichoderma harzianum* solution in the control of root knot nematode disease on

cowpea. Cogent Food Agric. 2, 2–7.  
<https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1207843>

- Olaetxea, M., De Hita, D., Garcia, C.A., Fuentes, M., Baigorri, R., Mora, V., Garnica, M., Urrutia, O., Erro, J., Zamarreño, A.M., Berbara, R.L., Garcia-Mina, J.M., 2018. Hypothetical framework integrating the main mechanisms involved in the promoting action of rhizospheric humic substances on plant root- and shoot- growth. *Appl. Soil Ecol.* 123, 521–537. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.06.007>
- On, A., Wong, F., Ko, Q., Tweddell, R.J., Antoun, H., Avis, T.J., 2015. Antifungal effects of compost tea microorganisms on tomato pathogens. *Biol. Control* 80, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.09.017>
- Onwosi, C.O., Igbokwe, V.C., Odimba, J.N., Eke, I.E., Nwankwoala, M.O., Iroh, I.N., Ezeogu, L.I., 2017. Composting technology in waste stabilization: On the methods, challenges and future prospects. *J. Environ. Manage.* 190, 140–157. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.12.051>
- Oostenbrink, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mendelingen Landbouwhogeschool Wageningen* 66:1- 46.
- Ortiz, A., Orduz, S., 2001. In vitro evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Mycopathologia* 150, 53–60. <https://doi.org/10.1023/A:1010843413085>
- Pinton, R., Cesco, S., De Nobili, M., Santi, S., Varanini, Z., 1997. Water- and pyrophosphate-extractable humic substances fractions as a source of iron for Fe-deficient cucumber plants. *Biol. Fertil. Soils* 26, 23–27. <https://doi.org/10.1007/s003740050337>
- Porras, M., Barrau, C., Romero, F., 2007. Effects of soil solarization and *Trichoderma* on strawberry production. *Crop Prot.* <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.07.005>
- Rammah, a, Hirschmann, H., 1988. *Meloidogyne mayaguensis* n. sp. (Meloidogynidae), a Root-knot Nematode from Puerto Rico. *J. Nematol.* 20, 58–69.
- Rose, M.T., Patti, A.F., Little, K.R., Brown, A.L., Jackson, W.R., Cavagnaro, T.R., 2014. A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. *Adv. Agron.* Volume 110, 1–75.
- Sahebani, N., Hadavi, N., 2008. Biological control of the root-knot nematode

- Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2016–2020. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.03.011>
- Samolski, I., Rincón, A.M., Pinzón, L.M., Viterbo, A., Monte, E., 2012. The *qid74* gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology* 158, 129–138. <https://doi.org/10.1099/mic.0.053140-0>
- Scaglia, B., Nunes, R.R., Rezende, M.O.O., Tambone, F., Adani, F., 2016. Investigating organic molecules responsible of auxin-like activity of humic acid fraction extracted from vermicompost. *Sci. Total Environ.* 562, 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.212>
- Schmidt, W., Santi, S., Pinton, R., Varanini, Z., 2007. Water-extractable humic substances alter root development and epidermal cell pattern in *Arabidopsis*. *Plant Soil* 300, 259–267. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9411-5>
- Sharon, E., Bar-Eyal, M., Chet, I., Herrera-Estrella, A., Kleifeld, O., Spiegel, Y., 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 91, 687–693. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.7.687>
- Shoresh, M., Harman, G.E., 2008. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. *Plant Physiol.* 147, 2147–2163. <https://doi.org/10.1104/pp.108.123810>
- Siddiqui, Z.A., Akhtar, M.S., 2008. Synergistic effects of antagonistic fungi and a plant growth promoting rhizobacterium, an arbuscular mycorrhizal fungus, or composted cow manure on populations of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Biocontrol Sci. Technol.* 18, 279–290. <https://doi.org/10.1080/09583150801896043>
- Singh, S., Mathur, N., 2010. *In vitro* studies of antagonistic fungi against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Biocontrol Sci. Technol.* 20, 275–282. <https://doi.org/10.1080/09583150903484318>
- Sousa, D.M.G. e Lobato, E., eds. *Cerrado: Correção do solo e adubação*. Planaltina, Embrapa Cerrados, 2004. 416p
- Spaccini, R., Cozzolino, V., Di Meo, V., Savy, D., Drosos, M., Piccolo, A., 2019. Bioactivity of humic substances and water extracts from compost made by ligno-

- cellulose wastes from biorefinery. *Sci. Total Environ.* 646, 792–800. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.334>
- Spiegel, Y., Chet, I., 1998. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. *Integr. Pest Manag. Rev.* 3, 169–175. <https://doi.org/10.1023/A:1009625831128>
- Stark, C.H., Hill, R.A., Cummings, N.J., Li, J.H., 2018. Amendment with biocontrol strains increases *Trichoderma* numbers in mature kiwifruit (*Actinidia chinensis*) orchard soils for up to six months after application. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 51, 54–69. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1438818>
- Tiwari, S., Pandey, S., Singh Chauhan, P., Pandey, R., 2017. Biocontrol agents in co-inoculation manages root knot nematode [*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood] and enhances essential oil content in *Ocimum basilicum* L. *Ind. Crops Prod.* 97, 292–301. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.030>
- Udo, I.A., Osai, E.O., Ukeh, D.A., 2014. Management of root-knot disease on tomato with bioformulated *Paecilomyces lilacinus* and leaf extract of *Lantana camara*. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 57, 486–492. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132014005000022>
- Van Oosten, M.J., Pepe, O., De Pascale, S., Silletti, S., Maggio, A., 2017. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 4, 5. <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>
- Vargas, W.A., Mandawe, J.C., Kenerley, C.M., 2009. Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiol.* 151, 792–808. <https://doi.org/10.1104/pp.109.141291>
- Vieira, P.M., Zeilinger, S., Brandão, R.S., Vianna, G.R., Georg, R.C., Gruber, S., Aragão, F.J.L., Ulhoa, C.J., 2018. Overexpression of an aquaglyceroporin gene in *Trichoderma harzianum* affects stress tolerance, pathogen antagonism and *Phaseolus vulgaris* development. *Biol. Control* 126, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.012>
- Walkley, A., Black, I.A., 1934. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37, 29–38. <https://doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003>

- Williams, J., Clarkson, J.M., Mills, P.R., Cooper, R.M., 2003. A selective medium for quantitative reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* compost. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4190–4191. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4190-4191.2003>
- Xu, Z., Zhou, G., 2008. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *J. Exp. Bot.* 59, 3317–3325. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern185>
- Yang, B., Eisenback, J.D., 1983. *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing *Pacara earpod* tree in china. *J. Nematol.* 15, 381–391.
- Yeomans, J.C., Bremner, J.M., 1988. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil 1. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 19, 1467–1476. <https://doi.org/10.1080/00103628809368027>
- Zandonadi, D.B., Busato, J.G., 2012. Vermicompost humic substances: technology for converting pollution into plant growth regulators. *Int. J. Environ. Sci. Eng. Res.* 3, 73–84.
- Zandonadi, D.B., Canellas, L.P., Façanha, A.R., 2007. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H<sup>+</sup>pumps activation. *Planta* 225, 1583–1595. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0454-2>
- Zandonadi, D.B., Santos, M.P., Busato, J.G., Eustáquio, L., Peres, P., Façanha, A.R., 2013. Plant physiology as affected by humified organic matter. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 25, 12–25. <https://doi.org/10.1590/s2197-00252013000100003>
- Zanin, L., Tomasi, N., Zamboni, A., Segal, D., Varanini, Z., Pinton, R., 2018. Water-extractable humic substances speed up transcriptional response of maize roots to nitrate. *Environ. Exp. Bot.* 147, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.12.014>
- Zhang, J., Howell, C.R., Starr, J.L., 1996. Suppression of *Fusarium* colonization of cotton roots and fusarium wilt by seed treatments with *Gliocladium virens* and *Bacillus subtilis*. *Biocontrol Sci. Technol.* 6, 175–188. <https://doi.org/10.1080/09583159650039377>

## TERCEIRA SEÇÃO – ARTIGO II

### **Extrato de vermicomposto enriquecido com *Trichoderma* spp. reduz a incidência de *Meloidogyne incognita* e estimula o crescimento de pimentão**

Tiago dos Santos Pereira<sup>a,\*</sup>, Juscimar da Silva<sup>b</sup>, Jadir Borges Pinheiro<sup>b</sup>, Sabrina Magaly Navas Cajamarca<sup>a</sup>, Alessandra Monteiro de Paula<sup>a</sup>, Jader Galba Busato<sup>a</sup>

*<sup>a</sup>Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Caixa Postal 4508, CEP 70910-970, Brasília/DF, Brasil.*

*<sup>b</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças. Rodovia BR-060, Km 09. Caixa Postal 218, CEP 70351-970, Brasília/DF, Brasil.*

*\*Autor para correspondência: tiagodosantosp@gmail.com*

## Resumo

Os extratos húmicos solúveis em água (EHSA) obtidos de vermicompostos têm sido estudados em função da sua capacidade em estimular o crescimento vegetal. Uma possibilidade ainda pouco explorada se refere à fortificação de vermicomposto com microrganismos capazes de promover o crescimento vegetal e de atuar no sistema de defesa das plantas contra patógenos. Nesse sentido, os fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os microrganismos mais estudados principalmente por suas características colonizadoras e competidoras. Um experimento em casa-de-vegetação foi conduzido com plantas de pimentão inoculadas artificialmente com *Meloidogyne incognita*, as quais receberam semanalmente quatro diferentes extratos húmicos solúveis em água (EHSA): EHSA de vermicomposto (V), EHSA de vermicomposto fortificado com *T. asperellum* (V+TA), EHSA de vermicomposto fortificado com *T. virens* (V+TV), EHSA de vermicomposto fortificado com *T. asperellum* + *T. virens* (V+TA+TV). Um controle, sem a adição de EHSA, também foi incluído para fins de comparação. Avaliações biométricas, de trocas gasosas e do potencial de controle biológico dos extratos foram feitas. Foi observado que a eficiência do uso da água das plantas foi aumentada em 94% pelo tratamento V+TV e em 53% na adição de V+TA em relação ao controle. V+TV foi eficiente na promoção do crescimento das plantas de pimentão, apresentando maior massa seca de parte aérea e maior massa de raiz. Já as plantas tratadas com V apresentaram maior produtividade. Reduções drásticas no número de ovos e J2 de *M. incognita* também foram observadas para todos os tratamentos, com destaque para V (56%) e V+TA+TV (38%). O acúmulo de nutrientes nas plantas de pimentão tratadas com EHSA também foi maior principalmente para N, Ca, Mg, B, Fe e Mn. Portanto, a utilização de EHSA de vermicomposto enriquecido com *Trichoderma* spp. permitiu reduções na reprodução do nematoide-das-galhas, bem como favoreceu a indução de resistência contra o patógeno nas condições testadas, aumentando a produtividade, o desenvolvimento e a nutrição das plantas.

**Palavras-chave:** Bioestimulantes; *Capsicum anuum* L.; crescimento vegetal; nematoide-das-galhas; controle biológico.

## Abstract

The water-soluble humic extracts (EHSA) obtained from vermicompost processes have been studied in function of their capacity to stimulate plant growth. A possibility that has not yet been explored concerns the fortification of vermicompost with microorganisms capable of promoting plant growth and acting in the plant defense system against pathogens. In this sense, the fungi of the genus *Trichoderma* are among the microorganisms more studied mainly because of their colonizing and competing characteristics. A greenhouse experiment was conducted with artificially inoculated bellpepper plants with *M. incognita*, which received four different water soluble humic extracts (EHSA) weekly: vermicompost EHSA (V), vermicompost EHSA fortified with *T. asperellum* (V + TA), vermicompost EHSA fortified with *T. virens* (V + TV), vermicompost EHSA fortified with *T. asperellum* + *T. virens* (V + TA + TV). A control, without the addition of EHSA, was also included for comparison purposes. Biometric, gas exchange, and biological control potential of *Trichoderma* spp. were made. It was observed that the water use efficiency was increased by 94% by the V + TV treatment and by 53% by the addition of V + TA in relation to the control. V + TV was efficient in the promotion of the growth of the pepper plants, presenting bigger shoot mass and larger root mass. However, the plants treated with V showed higher productivity. Diffuse reductions in the number of eggs and J2 of *M. incognita* were also observed for all treatments, especially V (56%) and V + TA + TV (38%). The accumulation of nutrients in pepper plants treated with EHSA was also higher mainly for N, Ca, Mg, B, Fe and Mn. Therefore, the use of EHSA of vermicompost enriched with *Trichoderma* spp. allowed for reductions in the reproduction of the root knot nematode, as well as favored the induction of resistance against the pathogen under the conditions tested, increasing the productivity, development and nutrition of the plants.

**Keywords:** Biostimulants; *Capsicum annuum* L.; plant growth; root-knot-nematode; biological control.



### 3.1 Introdução

É recente a abundância de formulações contendo substâncias ou compostos bioativos e microrganismos que são aplicados em plantas cultivadas visando melhorar a nutrição, a tolerância ao estresse abiótico e os atributos de qualidade das plantas cultivadas. Essas substâncias e microrganismos são geralmente referidas como bioestimulantes de plantas (du Jardin, 2015). Sua aplicação visa ativar uma série de mecanismos fisiológicos e moleculares nas plantas, tais como aqueles responsáveis por aumentar a fotossíntese, a absorção e a translocação de nutrientes e a ativação do metabolismo secundário, estimulando, assim, a produção de fitoquímicos e o desenvolvimento do vegetal (Rouphael et al., 2018).

As substâncias húmicas (SH), umas das classes de bioestimulantes de plantas, são misturas de compostos orgânicos complexos que são separadas em três frações com base na sua solubilidade aquosa: ácidos fúlvicos (AF), solúveis em água sob todas as condições de pH; ácidos húmicos (AH), insolúveis em pH <2 mas solúveis em valores de pH mais elevados; e huminas, insolúvel em água a qualquer valor de pH (Hayes e Clapp, 2001). A fração AH, em particular, é a mais aplicada em bioensaios, com resultados expressivos principalmente no aumento da densidade de raízes e o consequente aumento da absorção de água e nutrientes (Nardi et al., 2017; Pinton et al., 1997; Roomi et al., 2018; Trevisan et al., 2011).

A obtenção da fração denominada extrato húmico solúvel em água (EHSA) a partir do uso de SH solúveis em água tem sido reportada como promotora do crescimento vegetal dado à sua facilidade de seus compostos em acessar células vegetais e produzir estímulos fisiológicos (Zandonadi et al., 2013). Avanços recentes mostram evidências moleculares e fisiológicas que a adição de EHSA nas plantas podem aumentar o metabolismo de N promovendo uma assimilação mais eficiente de nitrogênio (Pinton et

al., 2016). Neste contexto, Zanin et al. (2018) demonstraram a eficiência do EHSA no aumento e eficiência da absorção de nitrato por plantas de milho, atuando em níveis transcricionais no metabolismo e mobilização de N pela regulação de transportadores de nitrato e proteínas acessórias. Independentemente da fração empregada, os vermicompostos obtidos a partir de resíduos orgânicos constituem fonte abundante de SH bioativas (Vaccaro et al., 2009).

Também, recente importância tem sido dada aos microrganismos bioestimulantes de plantas. Os fungos do gênero *Trichoderma* são mundialmente reconhecidos como agentes de controle biológico e promotores do crescimento vegetal, uma vez que são capazes de colonizar as raízes da maioria das espécies, com efeitos sinérgicos para o crescimento das plantas e resistência a doenças de solo (Gomes et al., 2017; Vieira et al., 2013). Sua ação contra microrganismos patogênicos inclui seu efeito antagonista, micoparasitismo, antibiose pela produção de enzimas e metabólitos secundários e indução dos mecanismos de defesa das plantas (Freitas et al., 2016; Hussain et al., 2017; Vieira et al., 2018).

Os nematoides parasitas de plantas estão associados à maioria das culturas hortícolas e causam danos econômicos consideráveis, necessitando de alternativas de controle sustentáveis. Redução de 50% no número de nematoide-das-galhas em raízes de pepino tratadas com *Trichoderma asperellum* foi observada por Mascarin et al. (2012). Pascual et al. (2017) relataram que a aplicação de composto enriquecido com *T. harzianum* T-78 aumentou o crescimento de plantas de melão e reduziu a incidência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*.

A diversidade da biota do solo é altamente influenciada pelas técnicas de produção modernas, fazendo com que a presença de bioagentes de controle seja limitada frente à alta população de microrganismos patogênicos, fazendo-se necessário o aporte de

populações de microrganismos benéficos (Altieri, 1999; Sala et al., 2019). Os substratos empregados nos processos de vermicompostagem são em geral ricos em carbono, celulose e lignocelulose, podendo servir como meio de multiplicação de fungos do gênero *Trichoderma*, que são decompositores especializados desses tipos de compostos e antagonistas de um grande espectro de patógenos de solo (Parkash e Saikia, 2015).

Este trabalho hipotetiza que o vermicomposto é um bom meio para o desenvolvimento de *Trichoderma* spp. e que a aplicação de EHSA obtido desse vermicomposto biofortificado é capaz de controlar o desenvolvimento e a reprodução do nematoide-das-galhas, além de fornecer substâncias bioativas capazes de favorecer o desenvolvimento, a produtividade e as trocas gasosas de plantas de pimentão.

## **3.2 Material e métodos**

### **3.2.1. Vermicompostagem**

Inicialmente, realizou-se um processo de vermicompostagem em caixas de polietileno com capacidade para 310 dm<sup>3</sup> empregando-se esterco bovino e minhocas vermelhas da Califórnia (*Eisenia foetida*). Para isto, o esterco foi acondicionado nas caixas para um período inicial de compostagem de 30 dias, com revolvimento e umidificação semanal. Para evitar o acúmulo de líquido no fundo das caixas, foi adicionada uma torneira para coleta e recirculação do líquido coletado. Após 30 dias, o material em compostagem recebeu a adição de minhocas na proporção de 80 indivíduos para cada dm<sup>3</sup> de composto. O material permaneceu mais 120 dias sob ação das minhocas, totalizando 120 dias para obtenção do vermicomposto.

### **3.2.2. Obtenção e confirmação da identidade dos isolados de *Trichoderma* spp. através do sequenciamento Sanger de regiões específicas (ITS)**

Os inóculos de *Trichoderma* spp. (*T. asperellum* e *T. virens*) foram obtidos da coleção do Laboratório de Agromicrobiologia Aplicada da Universidade Federal do Tocantins.

Para a confirmação das espécies, o DNA total das amostras dos dois isolados de *Trichoderma*, o DNA total das amostras dos dois isolados de foi extraído através do Kit ZR Fungal/Bacterial DNA MicroPrep™ (D6007) de acordo com protocolo do fabricante. A qualidade do DNA extraído foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 2% e quantificados por fluorescência (Qubit). O DNA extraído foi mantido à temperatura de -20°C até o momento do uso.

As reações de PCR foram feitas em um volume final de 20µL, contendo 10µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL), 0.6µM de oligonucleotideo foward e 0.6µM de oligonucleotideo reverse, 40ng de DNA genômico e água ultrapura estéril suficiente para 20uL. Para a amplificação da região ITS foram utilizados os primers ITS4 e ITS5. O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 seg., anelamento a 56°C por 40seg; extensão a 72°C por 1 min e uma extensão final a 72°C por 5 min. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems).

As amostras de PCR foram avaliadas e gel de agarose 2% corados com UniSafe Dye, visualizado sob luz UV e após purificadas com Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.). A quantificação dos produtos purificados realizada por fluorescência em aparelho Qubit (ThermoFischer).

Para realização do sequenciamento foram utilizados os primers ITS4 e ITS5. A reação de sequenciamento foi feita em BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied) e reação de precipitação por Etanol/EDTA/Acetato de Sódio. O sequenciamento automático foi realizado por eletroforese capilar no equipamento ABI3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Após o sequenciamento, foi realizada a análise dos eletroferogramas utilizando os programas EMBOSS/Merger, Chromas Lite, Geneious 4.8.3 para obtenção da sequência consenso. Após a edição, a sequência obtida foi utilizada na busca de sequências de referência similares depositadas no GenBank, através da ferramenta BLAST.

### **3.2.3. Crescimento e aplicação de *Trichoderma* spp.**

Após repicagem dos isolados de *Trichoderma* spp. em placas de Petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Agar), o material permaneceu em câmara do tipo BOD (Lucadema, São Paulo, Brasil), a  $28 \pm 0,2$  °C, por 15 dias. Foram então obtidas suspensões de conídios em água destilada pela raspagem das hifas crescidas nas placas, padronizando a concentração em  $1 \times 10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio ótico (Primo Star, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com aumento de 400 vezes (Ortiz e Orduz, 2001).

A aplicação das suspensões dos fungos ocorreu em dois momentos: após 15 e 30 dias do início da compostagem. Em cada aplicação, foram adicionados 2 L de suspensão contendo  $1 \times 10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  em cada caixa contendo  $300 \text{ dm}^3$  de vermicomposto. As aplicações foram feitas distribuindo-se uniformemente a suspensão na superfície do vermicomposto, sendo definidos cinco tratamentos: vermicomposto sem adição de *Trichoderma* spp. (V); vermicomposto com adição de *T. asperellum* (V+TA); vermicomposto com adição de *T. virens* (V+TV); vermicomposto com adição de *T.*

*asperellum* e *T. virens* (V+TA+TV) e o controle (água). Para o tratamento com inoculação conjunta, utilizou-se metade do volume de cada espécie para que o total aplicado fosse equivalente ao dos tratamentos com inoculação isolada. Ao final do processo, amostras do vermicomposto foram obtidas para realização da caracterização analítica, extração do EHSa e teste com plantas.

#### **3.2.4. Caracterização química dos vermicompostos**

Parte das amostras dos vermicompostos foram secas a 105°C até massa constante em estufa de circulação forçada (Q317M-12, Quimis, São Paulo, Brasil) visando a caracterização química. Os valores de pH e condutividade elétrica foram determinados em água destilada (relação 1:5), após agitação em mesa orbital (MA 420/8-125, Marconi, São Paulo, Brasil) (150 rpm), por 30 minutos, sendo as leituras realizadas em pHmetro (PG2000, Gehaka, São Paulo, Brasil) e condutivímetro (Q485M, Quimis, São Paulo, Brasil), respectivamente. O teor de carbono orgânico total (COT) foi determinado empregando-se o método de Walkley e Black (1934) com modificações (Yeomans e Bremner, 1988), utilizando-se solução de  $K_2Cr_2O_7$  0,166 mol L<sup>-1</sup>, como agente oxidante, e  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$  0,5 mol L<sup>-1</sup> como titulante do excesso de  $K_2Cr_2O_7$ , em presença de indicador difenilamina 0,16%.

#### **3.2.5. Produção das mudas de pimentão, inoculação com *M. incognita* e aplicação do extrato húmico solúvel em água**

Sementes de pimentão cv. “Magali R” foram germinadas em bandejas plásticas preenchidas com substrato comercial (Carolina Soil, São Paulo, Brasil). Aos 15 DAS, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade para 5,0 dm<sup>3</sup> preenchidos com solo (Latosolo Vermelho) e palha de arroz carbonizada, na proporção

de 2:1 (v:v). Previamente, o solo foi autoclavado e corrigido para fins de acidez e calagem de acordo com os procedimentos descritos em Souza e Lobato (2004). Adubações de cobertura foram realizadas durante o experimento conforme o preconizado para a cultura (Gomes et al., 1999). Os vasos foram alocados em bancadas suspensas higienizadas com NaClO, em casa-de-vegetação. Um sistema de gotejamento foi implementado para o experimento, aplicando água conforme necessidade medida por sensores de umidade solo (Irrigas, Hidrosense, São Paulo, Brasil).

A espécie de nematoide-das-galhas inoculada foi obtida do laboratório de Nematologia da Embrapa Hortaliças, Brasília – DF. A identificação da espécie *M. incognita* raça 1 foi previamente realizada mediante corte da região perineal de fêmeas adultas (Yang e Eisenback, 1983; Rammah e Hirschmann, 1988; Eisenback e Triantaphyllou, 1991). A análise do fenótipo da isoenzima esterase foi realizada para confirmar a espécie desejada, de acordo com Carneiro e Almeida (2001). A inoculação das plantas com *M. incognita* foi realizada após o transplantio das mudas (15 DAS), com a deposição, nas raízes ao redor do coleto das plantas, de 5,0 mL de suspensão em água contendo 5.000 ovos e eventuais J2.

A obtenção do EHSA seguiu uma adaptação do método original proposto por Pinton et al. (1998), utilizando-se amostras dos vermicompostos e água destilada, na relação 1:5 (v:v). Os materiais foram agitados por 4 horas, com posterior decantação da fração insolúvel e sifonação do extrato para imediata aplicação. Para avaliar o efeito dos tratamentos, foram realizadas 10 aplicações de 250 mL/vaso ao redor do coleto das plantas, sendo a primeira após a deposição dos ovos e J2 de *M. incognita* e as posteriores em intervalos de 7 dias até o período de 70 dias. O tratamento controle recebeu o mesmo volume de água destilada.

### **3.2.6. Trocas gasosas e eficiência de uso da água**

As plantas foram avaliadas com 50 DAT, período provável da resposta inicial à infecção por nematoides (Mioranza et al., 2018), quanto à assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, taxa de transpiração, condutância estomática e concentração interna de CO<sub>2</sub>, empregando-se um analisador portátil de fotossíntese por radiação infravermelha (IRGA - Li-6400XT, LICOR, Nebraska, EUA). A eficiência de uso de água foi obtida a partir da relação entre assimilação líquida de CO<sub>2</sub> e a condutância estomática. As medições foram feitas em folhas adultas e sadias escolhidas no terço mediano das plantas, no período entre 08 e 10 h da manhã. A concentração de CO<sub>2</sub> injetada artificialmente na câmara de assimilação do IRGA foi fixada em 400 µmol mol<sup>-1</sup>. As avaliações foram feitas sob 300 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de densidade de fluxo fotossinteticamente ativos (de Oliveira Silva et al., 2018).

### **3.2.7. Avaliações biométricas das plantas e eficiência do biocontrole sobre *M. incognita***

Setenta DAT foram analisados os seguintes parâmetros relacionados à biometria das plantas: comprimento da parte aérea das plantas, com auxílio de régua graduada, da base do vaso (substrato) até a última ramificação foliar; massa fresca de raízes e massa parte aérea, em balança analítica (S303, BEL, São Paulo, Brasil). Em seguida, as plantas foram secas em estufa de circulação de ar (TE 394/3, Tecnal, São Paulo, Brasil) a 60° C, por 48 horas, para determinações de massa seca da parte aérea, também em balança analítica.

Os índices de galhas (IG) e de massas de ovos (IMO), o número de nematoides por grama de raiz (NOGR) e o fator de reprodução (FR) foram também determinados aos 70 DAT. Para isto, as raízes das plantas foram lavadas em água e as massas de ovos dos



nematoides foram coloridas segundo Dickson e Struble (1965). Em seguida, a contagem do número de galhas e de massas de ovos dos nematoides presentes no sistema radicular foi realizada em microscópio estereoscópico (Primo Star, Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

O IMO foi obtido conforme preconizado por Huang et al. (1986), utilizando escala de notas de 1 a 5 (1= raízes sem massa de ovos; 2= raízes com 1 a 5 massas de ovos; 3= raízes com 6 a 15 massas de ovos; 4= raízes com 16 a 30 massas de ovos e; 5= raízes com mais de 30 massas de ovos). Para avaliação do IG, o número de galhas presentes nas raízes das plantas foi determinado pela escala de 1 a 5 (1= raiz sem galhas; 2= raiz com até 10 galhas pequenas; 3= raiz com até 50 galhas pequenas; 4= raiz com mais de 50 galhas pequenas e até 10 galhas grandes; e 5=raiz com mais de 50 galhas pequenas e mais de 10 galhas grandes (Charchar et al., 2003).

Para avaliação do NOGR, as raízes foram lavadas, secas em temperatura ambiente e pesadas antes de serem processadas de acordo com a técnica de Hussey e Barker (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981). Já o FR dos nematoides foi obtido pela divisão entre as densidades populacionais finais e iniciais ( $FR = Pf/Pi$ ) (Oostenbrink, 1966), sendo Pf a população final de ovos e eventuais J2 determinados nos sistemas radiculares após o experimento e Pi a população inicial aplicada (5000 ovos e eventuais J2 de *M. incognita*).

### **3.2.8. Conteúdo de nutrientes na parte aérea das plantas**

O material seco então foi passado em moinho de facas (Solab, São Paulo, Brasil) e sofreu processo de digestão em forno de micro-ondas modelo Mars Xpress (CEM, NC, EUA), utilizando-se 0,5 g de amostra, 8 mL de HNO<sub>3</sub> e 2 mL de HCl. As condições de digestão em micro-ondas foram: 10 minutos de rampa (aquecimento), manutenção da temperatura em 170 °C (por 15 minutos) com potência de 1600 W e resfriamento por 20

minutos até temperatura ambiente. Após, as amostras foram transferidas para tubos de polipropileno, completando o volume final de 50 mL com água deionizada para quantificação dos nutrientes por espectrometria de emissão atômica por plasma (ICPE-9000 OES, Shimadzu, Quioto, Japão). Os teores de N-total foram obtidos mediante digestão sulfúrica e o extrato analisado pelo método Kjeldahl (Tedesco et al., 1995).

### **3.2.9. Análises estatísticas**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições. As médias das diferentes variáveis analisadas foram testadas por análise de variância (ANOVA), após teste de Shapiro-Wilk para verificação da distribuição normal dos dados. A significância das diferenças quando existente entre as médias foram avaliadas com teste *post hoc* de Fisher LSD utilizando-se o programa estatístico R versão 3.3.3.

## **3.3 Resultados e discussão**

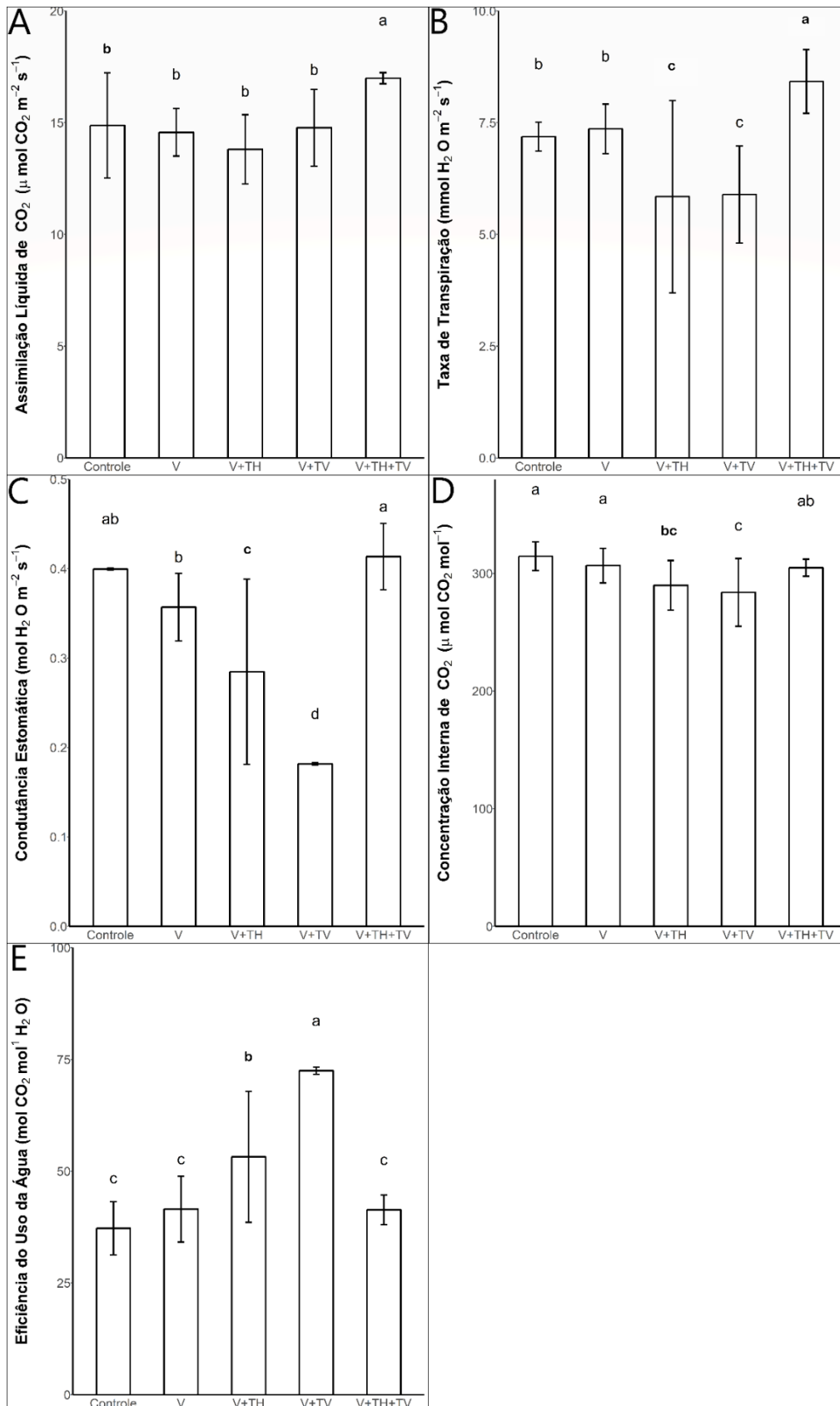
### **3.3.1 Caracterização química dos vermicompostos**

A caracterização química dos vermicompostos foi apresentada em Pereira et al. (2019), artigo submetido.

### **3.3.2 Trocas gasosas e eficiência de uso da água**

Houve diferença entre as variáveis relativas às trocas gasosas (Figura 1). Em relação à assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, V+TA+TV foi o tratamento mais responsivo, alcançando uma taxa de 17  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , valor 19% maior que o observado para o tratamento V+TA (Figura 1A), que apresentou menor valor absoluto entre os tratamentos. A taxa de transpiração também foi aumentada com V+TA+TV e reduzida com V+TA

(Figura 1B), sendo a diferença entre estes dois tratamentos de 44%. A taxa fotossintética da folha é responsiva ao estresse hídrico moderado, que pode ser causado por fatores bióticos ou abióticos (Doni et al., 2014).



**Figura 1.** Assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C), concentração interna de CO<sub>2</sub> (D), eficiência de uso de água (E) de plantas de pimentão tratadas com EHSa e inoculadas com *Meloidogyne incognita*.

Neste sentido, o estresse hídrico geralmente afeta tanto a fotossíntese foliar quanto a condutância estomática, principalmente pela limitação da difusão de CO<sub>2</sub> dos sítios de carboxilação para o estroma do cloroplasto (Chaves et al., 2009). A conservação de altas taxas de transpiração constitui um mecanismo vital que garante um fluxo contínuo de CO<sub>2</sub> e, conseqüentemente, de nutrientes, reduzindo a temperatura da planta e promovendo o crescimento vegetativo (Matimati et al., 2014).

Apesar da ausência de diferença em relação ao controle, observou-se maior valor absoluto para condutância estomática no tratamento V+TA+TV (0,41 mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), seguido pelo controle (0,39 mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>). O tratamento V+TV, entretanto, resultou no menor valor de condutância estomática, provavelmente devido ao suprimento insuficiente de CO<sub>2</sub> pela inibição da fotossíntese (Li et al., 2017) (Figura 1C).

Nenhum tratamento aumentou consistentemente a concentração interna de CO<sub>2</sub> em comparação ao controle, sendo que reduções significativas de 8 e 10% foram registradas para V+TA e V+TV, respectivamente (Figura 1D). O maior acúmulo de CO<sub>2</sub> sugere que existe uma limitação no processo de assimilação de CO<sub>2</sub> provavelmente devido a danos no aparato fotossintético da planta, diminuindo a concentração e a atividade da enzima Rubisco (Lawlor, 2002).

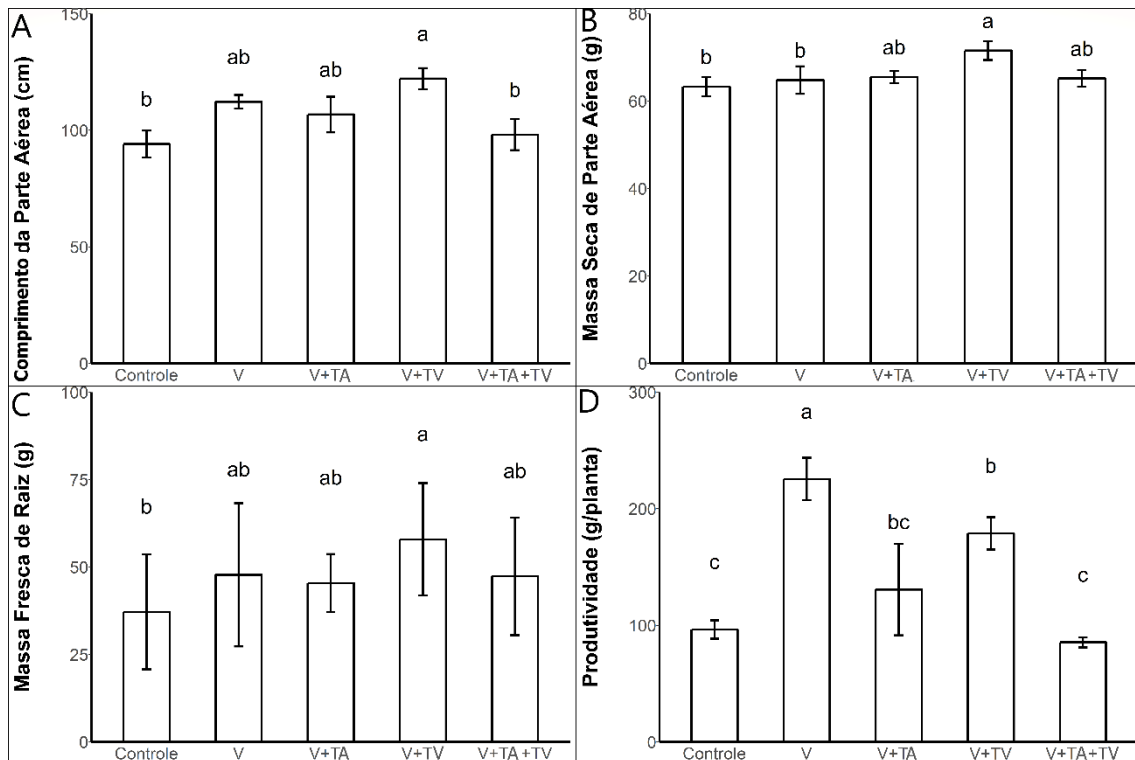
A eficiência do uso da água foi aumentada em 94% por V+TV e em 53% com a adição de V+TA em relação ao controle (Figura 1E). À medida que os estômatos fecham durante os estágios iniciais do estresse hídrico, a eficiência do uso da água pode aumentar (isto é, mais CO<sub>2</sub> pode ser absorvido por unidade de água transpirada) pois o fechamento estomático inibe mais a transpiração do que diminui as concentrações intercelulares de CO<sub>2</sub> (Sussmilch et al., 2019), como observado nas plantas tratadas com V+TV e V+TA. Dessa forma, a redução da condutância estomática incitada pelo fechamento dos estômatos reduz o uso de água pelos mecanismos de transpiração da planta (Marquez et

al., 2017). Contreras-Cornejo et al. (2015) observaram que sementes de mutantes de *Arabidopsis* cultivadas juntamente com *T. virens* ou *T. atroviride* diminuíram a abertura dos estômatos e reduziram a perda de água em comparação às sementes não inoculadas, conforme encontrado nesta pesquisa. Porém, este efeito não foi observado para os mutantes insensíveis à ABA (*abl-1* e *ab2-1*), sugerindo que esses fungos estimularam o marcador induzível *abi4:uidA* do ácido abscísico, produzindo ABA sob condições normais e salinas de crescimento (Contreras-Cornejo et al., 2015).

Certos genes de *Trichoderma* spp., como as aquagliceporinas, foram identificados como importantes na tolerância a estresses bióticos e abióticos (Vieira et al., 2018, 2017). Análises funcionais desses genes comprovam sua importância nos processos fisiológicos e respostas relacionada a adaptação em condições ambientais adversas (Martinez-Ballesta e Carvajal, 2014).

### **3.3.3 Avaliações biométricas das plantas e eficiência dos EHSAs em relação ao controle de *M. incognita***

De forma geral, o desenvolvimento da parte aérea foi afetado positivamente pela adição de EHSAs (Figura 2). O tratamento V+TV aumentou em 33% o comprimento e em 10% a massa seca da parte aérea das plantas tratadas em relação ao controle (Figura 2B). Ainda que os tratamentos V e V+TA+TV aumentaram em 28% o comprimento das plantas, isto não foi refletido em aumentos em maior massa seca de parte aérea, e assim, não se diferenciando do controle em ambas variáveis, assim como o tratamento V+TA+TV (Figura 2B). O crescimento de raízes também foi estimulado em relação ao controle pela aplicação de EHSAs contendo *Trichoderma* spp., na ordem de 56% no tratamento V+TV, 28% no tratamento V+TA+TV e 22% com a aplicação de V+TA (Figura 2C). Em relação à produtividade, as plantas de pimentão tratadas com V, V+TV e V+TA produziram 163, 110 e 53% mais que o controle, respectivamente (Figura 2D).



**Figura 2.** Comprimento da parte aérea (A), massa seca de parte aérea (B), massa fresca de raiz (C) e produtividade (D) de plantas de pimentão tratadas com EHAS e inoculadas com *Meloidogyne incognita*.

Os efeitos de estímulo ao crescimento decorrentes da adição do EHAS podem estar relacionados com a presença de auxinas, um dos hormônios vegetais mais importantes que formam a arquitetura da planta. Uma auxina natural bem conhecida é o ácido indol-3-acético (IAA), que pode induzir o crescimento de raízes secundárias, principalmente na fase inicial do ciclo das plantas (Canellas e Olivares, 2014; Zandonadi et al., 2007). Os metabólitos secundários produzidos por *Trichoderma* spp. podem possivelmente atuar como compostos semelhantes à auxina (López-Bucio et al., 2015; Vinale et al., 2008; Zeilinger et al., 2016) que tipicamente têm uma atividade ótima em baixas concentrações. Herrera-Parra et al. (2017) encontraram resultados semelhantes, onde em experimento com aplicações de suspensões de *T. atroviride*, *T. virens* e *T. harzianum*-C2 em pimentão, observaram que *T. virens* aumentou a comprimento das plantas tratadas. Ainda, o mesmo estudo reporta que os tratamentos com linhagens de *Trichoderma* spp. produziram mudas semelhantes às obtidas com a adubação química:

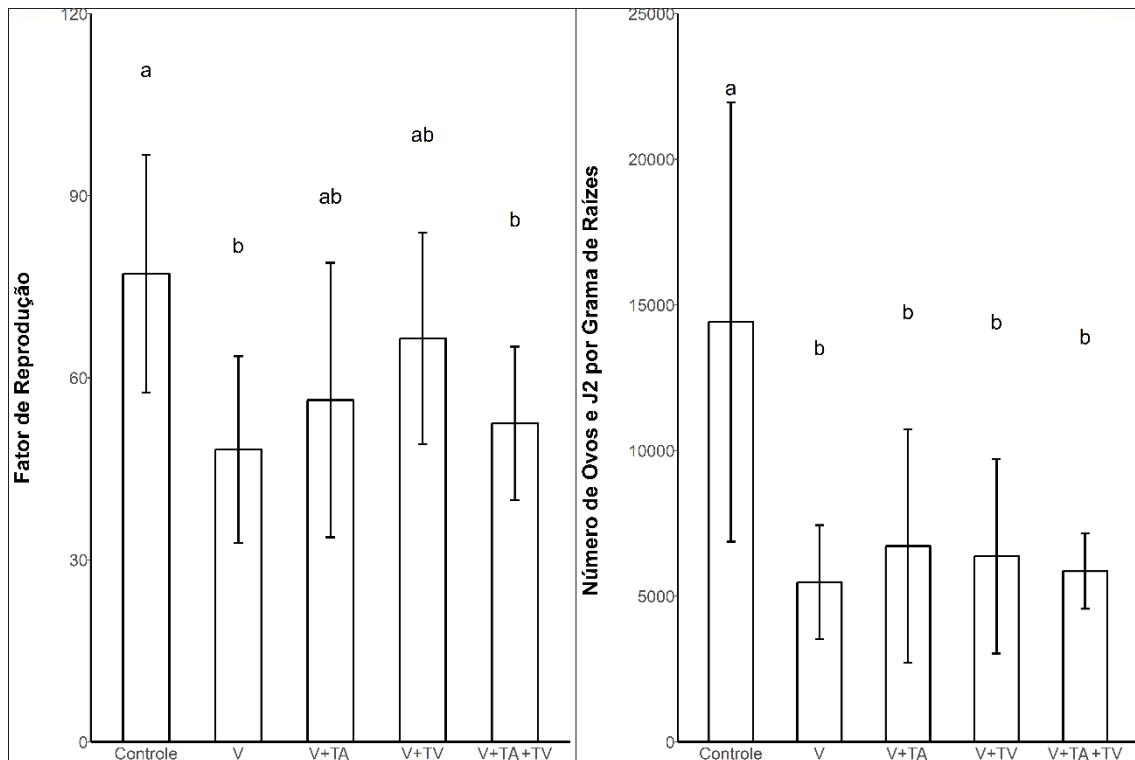
saudáveis, vigorosas e com bom desenvolvimento de raízes, características desejáveis que permitem maior probabilidade de sobrevivência sob as condições adversas.

O aumento no desenvolvimento das plantas e a produtividade podem envolver vários processos biológicos e químicos na rizosfera que são atribuíveis aos mecanismos de ação de *Trichoderma* spp., como por exemplo, a modificação da disponibilidade de nutrientes no solo ou a modulação do crescimento das raízes (Fiorentino et al., 2018). Outros mecanismos que podem produzir maior crescimento vegetal por *Trichoderma* spp. incluem a resistência induzida a ataques de patógenos, a modulação da arquitetura do sistema radicular (comprimento total da raiz e densidade e ramificação) para aumentar a área e capacidade de absorção de água e nutrientes e a maior assimilação/solubilização de macronutrientes (P) e micronutrientes (Fe, Mn e Zn), possivelmente influenciada por alterações de pH da rizosfera (Fiorentino et al., 2018).

Desta forma, a inoculação de *Trichoderma* spp. pode ser um fator determinante que afeta a comunidade microbiana na rizosfera para aumentar ou mesmo inibir o crescimento das plantas e, ocasionalmente, estabelecer uma interação positiva dentro das raízes das plantas como um endófito (Hoyos-Carvajal et al., 2009). O aumento do crescimento de plantas por *Trichoderma* spp. pode ser correlacionado com sua competência de colonização de rizosfera (Harman et al., 2004). No entanto, o *Trichoderma* spp. também pode existir de forma saprofítica, e a interação *Trichoderma*-planta parece não ser específica da espécie, reduzindo algumas das vantagens citadas (de Pascale et al., 2017).

A reprodução de *M. incognita* também foi afetado com a aplicação dos EHSA. *T. asperellum* e *T. virens* quando aplicados em conjunto proporcionaram uma diminuição no NOGR de 53% e o segundo menor fator de reprodução (Figura 3).





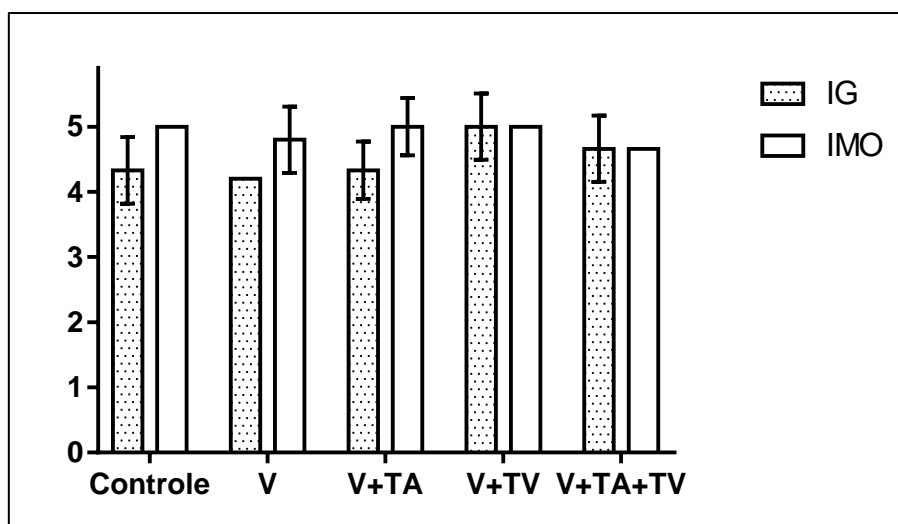
**Figura 3.** Fator de Reprodução (FR) (A) e Número de Ovos e J2 por Grama de Raízes (NOGR) (B) de plantas de pimentão tratadas com EHSAs e inoculadas com *Meloidogyne incognita*.

Uma redução ainda maior foi observada com a aplicação de V (56%), apresentando o menor FR, que foi 38% menor que o controle (Figura 3). Estes resultados indicam que as populações finais de *M. incognita* foram menores quando os diferentes EHSAs foram aplicados, diminuindo a taxa de multiplicação dos nematoides, o que significa que para o controle a multiplicação dos nematoides foi maior, ou seja, que esta foi mais agressiva.

As plantas sobrevivem a diversos estresses bióticos e abióticos desenvolvendo e aprimorando seus mecanismos de defesa. Para superar as adversidades bióticas causadas pelo ataque de patógenos, foi necessário durante o processo de evolução o desenvolvimento de mecanismos de resistência mais específicos e direcionados (Pieterse et al., 2009). Lee et al. (2012) sugeriram que, em resposta ao ataque de patógenos ou herbívoros, as plantas são capazes de sinalizar e recrutar microrganismos benéficos e que essas simbioses resultam em uma reprogramação benéfica do hospedeiro. Também é

provável que esses microrganismos recrutados competem com outros micróbios do solo potencialmente patogênicos (Lee et al., 2012). Os números de ovos + eventuais juvenis de segundo estágio (J2) por grama de raiz foram significativamente menores com a aplicação dos EHSAs em relação ao controle. Isso indica que os extratos continham esporos viáveis que suprimiram *M. incognita*, assim como encontrado por Meyer et al. (2001). A disparidade encontrada entre os diferentes EHSAs podem estar correlacionadas com a mudança na comunidade microbiana natural do vermicomposto e do solo quando inoculados. Fiorentino et al. (2018) constataram que a inoculação de *Trichoderma* spp. em alface influenciou a população eucariótica da rizosfera, diminuindo a biodiversidade fúngica. Em resultado similar, Gupta et al. (2016) observaram mudanças significativas no perfil qualitativo de comunidades microbianas em amostras de rizosfera, indicando um impacto notável de inóculos bacterianos e fúngicos em populações microbianas nativas. O argumento que diz que a probabilidade de se observar estes efeitos positivos pode ser aumentada pela combinação de pelo menos dois agentes de biocontrole é bem conhecida (Fraceto et al., 2018; Spiegel e Chet, 1998). Isto foi confirmado em ensaios que testaram diferentes cepas de *Trichoderma* spp. na produção de hortaliças, principalmente pela produção de metabólitos secundários (Etebarian et al., 2000; Mohammad et al., 2011). Da mesma forma que a combinação de dois microrganismos pode somar em benefícios desejáveis, também existe a possibilidade de incompatibilidade, como o antagonismo entre os agentes de controle biológico através de competição e antibiose, levando à redução do desempenho no controle biológico (Meyer et al., 2001).

Para as variáveis IG e IMO, não houve diferença entre os tratamentos (Figura 4). Isto é provavelmente devido ao híbrido Magali R ser considerado como suscetível a *M. incognita*, dificultando a classificação visual minuciosa desses parâmetros.



**Figura 4.** Índice de Galhas (IG) e Índice de Massas de Ovos (IMO) de plantas de pimentão tratadas com EHSa e inoculadas com *Meloidogyne incognita*.

### 3.3.4 Conteúdo de nutrientes na parte aérea das plantas

O uso de microrganismos benéficos na rizosfera pode facilitar a solubilidade, aumentar a disponibilidade de nutrientes para as plantas e proteger contra o estresse biótico (Altomare et al., 1999). A adição de EHSa foi capaz de estimular uma maior absorção de N, Ca e Mg pelas plantas (Tabela 1). Os tratamentos V+TA+TV e V foram mais eficientes em acumular N na parte aérea sendo 65% e 57% maiores que o controle, respectivamente. Os mesmos tratamentos também apresentaram maior acúmulo de Mg em relação aos demais tratamentos numa ordem de 61% e 50% superiores ao controle, respectivamente. Em relação ao Ca, V+TV foi o tratamento que apresentou menor absorção deste macronutriente pelas plantas, sendo 25% menor que o tratamento que mais estimulou a absorção, V+TA.

**Tabela 1.** Teores médios de macronutrientes na parte aérea de plantas de pimentão tratadas com EHSA e inoculadas com *M. incognita*.

Tratamento	N	P	K	Ca	Mg	S
-----dag kg <sup>-1</sup> -----						
Controle	19,40 (±1,67) b	0,88 (±0,22)	5,12 (±0,06)	5,05 (±0,57) ab	0,65 (±0,15) b	0,34 (±0,04)
V	30,44 (±8,14) a	0,93 (±0,23)	5,42 (±0,11)	5,61 (±0,35) ab	0,98 (±0,24) ab	0,33 (±0,03)
V+TA	22,68 (±0,60) ab	0,95 (±0,19)	5,35 (±0,39)	5,90 (±1,20) a	0,77 (±0,11) ab	0,37 (±0,03)
V+TV	28,70 (±8,47) ab	1,01 (±0,10)	5,05 (±0,55)	4,39 (±0,41) b	0,68 (±0,18) b	0,32 (±0,04)
V+TA+TV	32,04 (±5,98) a	0,93 (±0,04)	5,01 (±0,17)	5,08 (±1,32) ab	1,05 (±0,24) a	0,32 (±0,04)

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste LSD.

**Tabela 2.** Teores médios de micronutrientes na parte aérea de plantas de pimentão tratadas com EHSA e inoculadas com *M. incognita*.

Tratamento	B	Cu	Fe	Mn	Mo	Zn
-----mg kg <sup>-1</sup> -----						
Controle	63,30 (±9,89) b	11,96 (±0,55)	428,50 (±8,38) b	363,50 (±14,84) b	12,80 (±2,05)	5,37 (±0,21)
V	74,70 (±4,24) a	14,10 (±2,68)	715,00 (±5,91) a	574,50 (±15,55) a	15,16 (±2,30)	5,77 (±1,36)
V+TA	74,06 (±2,58) a	13,33 (±2,22)	695,00 (±3,35) a	550,00 (±08,27) a	14,46 (±0,57)	5,82 (±0,72)
V+TV	67,53 (±0,51) ab	11,66 (±0,37)	669,33 (±8,30) a	444,00 (±03,46) ab	14,33 (±1,28)	5,64 (±0,59)
V+TA+TV	74,13 (±1,61) a	12,20 (±3,38)	550,66 (±4,65) ab	385,50 (±09,83) b	13,30 (±0,60)	5,66 (±0,25)

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste LSD.

Algumas espécies de *Trichoderma* podem mineralizar nutrientes orgânicos produzindo grandes quantidades de enzimas extracelulares que lhes permitem utilizar resíduos vegetais como fonte de nutrientes; sua abundância no solo sob condições climáticas diversificadas é principalmente devido à sua capacidade de degradar uma variedade de substratos orgânicos no solo, versatilidade metabólica e melhor capacidade saprófita competitiva (Mbarki et al., 2017).

A maior absorção de nutrientes pelas plantas tratadas pode ser explicada pela capacidade solubilizadora de *Trichoderma* spp. Em ensaio realizado para testar o potencial solubilizador utilizando *Trichoderma harzianum* T22, foi encontrado que esta estirpe foi capaz de solubilizar MnO<sub>2</sub>, zinco metálico e fosfato de rocha (principalmente fosfato de cálcio) em sacarose, determinado por espectroscopia de emissão de plasma indutivamente acoplada (Altomare et al., 1999). Tal capacidade pode ter influência na capacidade de promoção de crescimento de plantas por essa estirpe de *Trichoderma* (Altomare et al., 1999), a qual corrobora com os resultados deste estudo.

Em relação aos micronutrientes, foi encontrada diferença nos acúmulos de Cu, Fe e Mn (Tabela 2). Os tratamentos V, V+TA e V+TA+TV apresentaram teores de B na parte aérea das plantas 17% maior que o controle. 67, 62 e 56% de aumento em comparação ao controle foram observados para os teores de Fe nas plantas tratadas com V, V+TA e V+TV, respectivamente. Ainda, 58 e 51% de aumento na absorção de Mn foram registrados em plantas tratadas com V e V+TA em comparação ao controle, respectivamente. Fernández et al., (2014) relataram que a característica mais relevante das plantas de tomateiro cultivadas com *T. harzianum* T34 foi o maior investimento na área foliar. Isso poderia explicar o maior acúmulo da maioria dos elementos, principalmente Mg, P, B e Cu nas folhas.

### 3.4 Conclusões

O uso de EHSA obtido a partir de vermicomposto inoculado com *Trichoderma* spp. foi capaz de aumentar a produtividade, as trocas gasosas e a nutrição das plantas de pimentão em ambiente controlado. Observou-se que a eficiência do uso da água foi aumentada em 94% pelo tratamento V+TV e 43% para o tratamento V+TA, em relação ao controle. V+TV foi eficiente na promoção do crescimento das plantas de pimentão, apresentando maior massa seca de parte aérea e maior massa de raiz. Já as plantas tratadas com EHSA de vermicomposto, apresentaram maior produtividade. Reduções drásticas no número de ovos e eventuais J2 de *M. incognita* também foram observadas para os tratamentos com adição de EHSA, com destaque para os tratamentos V e V+TA+TV. O acúmulo de nutrientes nas plantas de pimentão tratadas com EHSA também foi maior principalmente para N, Ca, Mg, B, Fe e Mn.

## **Agradecimentos**

Agradecimentos à FAP-DF, pelo auxílio financeiro do processo nº 0193.001226/2016.

Agradecimentos à Capes, pela bolsa de mestrado concedida ao autor desta dissertação, crucial para o desenvolvimento desta pesquisa.

## Referências Bibliográficas

- Abbasi, P.A., Miller, S.A., Meulia, T., Hoitink, H.A.J., Kim, J.M., 1999. Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost- amended potting mixes by using molecular markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5421–5426.
- Altieri, M.A., 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystems, *Agriculture, Ecosystems and Environment*. Elsevier Science B.V. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(99\)00028-6](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(99)00028-6)
- Altomare, C., Norvell, W.A., Björkman, T., Harman, G.E., 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth- promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2926–2933.
- Busato, J.G., Zandonadi, D.B., Mól, A.R., Souza, R.S., Aguiar, K.P., Júnior, F.B.R., Olivares, F.L., 2017. Compost biofortification with diazotrophic and P-solubilizing bacteria improves maturation process and P availability. *J. Sci. Food Agric.* 97, 949–955. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7819>
- Bustamante, M.A., Ceglie, F.G., Aly, A., Mihreteab, H.T., Ciaccia, C., Tittarelli, F., 2016. Phosphorus availability from rock phosphate: Combined effect of green waste composting and sulfur addition. *J. Environ. Manage.* 182, 557–563. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.08.016>
- Carneiro, R.M.D.G., Almeida, M.R.A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas de nematóides de galhas para identificação de espécies. *Nematol. Bras.* Brasília, DF, v. 25, n. 1, p. 35-44
- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C., 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* 103, 551–560. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>
- Chowdhury, A.K.M.M.B., Konstantinou, F., Damati, A., Akrotos, C.S., Vlastos, D., Tekerlekopoulou, A.G., Vayenas, D. V., 2015. Is physicochemical evaluation enough to characterize olive mill waste compost as soil amendment? The case of genotoxicity and cytotoxicity evaluation. *J. Clean. Prod.* 93, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.01.029>



- Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Vergara, A.G., López-Bucio, J., 2015. *Trichoderma* modulates stomatal aperture and leaf transpiration through an abscisic acid-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *J. Plant Growth Regul.* 34, 425–432. <https://doi.org/10.1007/s00344-014-9471-8>
- de Oliveira Silva, F.M., Lichtenstein, G., Alseekh, S., Rosado-Souza, L., Conte, M., Suguiyama, V.F., Lira, B.S., Fanourakis, D., Usadel, B., Bhering, L.L., DaMatta, F.M., Sulpice, R., Araújo, W.L., Rossi, M., de Setta, N., Fernie, A.R., Carrari, F., Nunes-Nesi, A., 2018. The genetic architecture of photosynthesis and plant growth-related traits in tomato. *Plant Cell Environ.* 41, 327–341. <https://doi.org/10.1111/pce.13084>
- de Pascale, S., Costa, L.D., Vallone, S., Barbieri, G., Maggio, A., 2011. Increasing water use efficiency in vegetable crop production: From plant to irrigation systems efficiency. *Horttechnology* 21, 301–308.
- Doni, F., Isahak, A., Che Mohd Zain, C.R., Wan Yusoff, W.M., 2014. Physiological and growth response of rice plants (*Oryza sativa* L.) to *Trichoderma* spp. inoculants. *AMB Express* 4, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0045-8>
- du Jardin, P., 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic.* 196, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Eisenback, J.D., Triantaphyllou, H.H., 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. *Man. Agric. Nematol.* 281 – 286.
- Fernández, E., Segarra, G., Trillas, M.I., 2014. Physiological effects of the induction of resistance by compost or *Trichoderma asperellum* strain T34 against *Botrytis cinerea* in tomato. *Biol. Control* 78, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.06.012>
- Fiorentino, N., Ventrino, V., Woo, S.L., Pepe, O., De Rosa, A., Gioia, L., Romano, I., Lombardi, N., Napolitano, M., Colla, G., Roupael, Y., 2018. *Trichoderma*-based biostimulants modulate rhizosphere microbial populations and improve N uptake efficiency, yield, and nutritional quality of leafy vegetables. *Front. Plant Sci.* 9, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00743>
- Freitas, S.M. de, Georg, R. de C., Souza, A.A., Ulhôa, C.J., Mehdad, A., Ramada, M.H., Leitão, V.O., 2016. *Trichoderma harzianum* produces a new thermally stable acid

- phosphatase, with potential for biotechnological application. PLoS One 11, e0150455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150455>
- Gao, M., Li, B., Yu, A., Liang, F., Yang, L., Sun, Y., 2010. The effect of aeration rate on forced-aeration composting of chicken manure and sawdust. Bioresour. Technol. 101, 1899–1903. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.027>
- Gomes, E. V., Ulhoa, C.J., Cardoza, R.E., Silva, R.N., Gutiérrez, S., 2017. Involvement of *Trichoderma harzianum* Epl-1 Protein in the regulation of *Botrytis* virulence- and tomato defense-related genes. Front. Plant Sci. 8, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00880>
- Gupta, R., Bisaria, V.S., Sharma, S., 2016. Response of rhizospheric bacterial communities of *Cajanus cajan* to application of bioinoculants and chemical fertilizers: A comparative study. Eur. J. Soil Biol. 75, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2016.02.008>
- Hayes, M.H.B., Clapp, C.E., 2001. Humic substances: considerations of compositions, aspects of structure, and environmental influences. Soil Sci. 166, 723–737. <https://doi.org/10.1021/jf504629c>
- Herrera-Parra, E., Cristóbal-Alejo, J., Ramos-Zapata, J.A., 2017. *Trichoderma* strains as growth promoters in *Capsicum annuum* and as biocontrol agents in *Meloidogyne incognita*. Chil. J. Agric. Res. 77, 318–324. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392017000400318>
- Hussain, M., Zouhar, M., Ryšánek, P., 2017. Effects of nematophagous fungi on viability of eggs and juveniles of *Meloidogyne incognita*. J. Anim. Plant Sci. 27, 252–258.
- Hussey RS; Barker KS. 1973. A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter 57: 1025-1028.
- Lawlor, D.W., 2002. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: Stomata vs. Metabolism and the role of ATP. Ann. Bot. 89, 871–885. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf110>
- Lazcano, C., Gómez-Brandón, M., Domínguez, J., 2008. Comparison of the effectiveness of composting and vermicomposting for the biological stabilization of cattle manure. Chemosphere 72, 1013–1019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.016>

- Lee, B., Lee, S., Ryu, C.-M., 2012. Foliar aphid feeding recruits rhizosphere bacteria and primes plant immunity against pathogenic and non-pathogenic bacteria in pepper. *Ann. Bot.* 281–290. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs055>
- Marquez, G.R., Fraga Júnior, E.F., Machado Júnior, C.S., Borba, M.E.A., Maciel, G.M., Silva, I.G., Almeida, R.S., 2017. Gas exchanges and water use efficiency in the selection of tomato genotypes tolerant to water stress. *Genet. Mol. Res.* 16. <https://doi.org/10.4238/gmr16029685>
- Martinez-Ballesta, M. del C., Carvajal, M., 2014. New challenges in plant aquaporin biotechnology. *Plant Sci.* 217–218, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.12.006>
- Mascarin, G.M., Ferreira, M., Vieira de Araújo, J., 2012. *Trichoderma harzianum* reduces population of *Meloidogyne incognita* in cucumber plants under greenhouse conditions. *J. Entomol. Nematol.* 4, 54–57. <https://doi.org/10.5897/JEN12.007>
- Matimati, I., Verboom, G.A., Cramer, M.D., 2014. Nitrogen regulation of transpiration controls mass-flow acquisition of nutrients. *J. Exp. Bot.* 65, 159–168. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert367>
- Mbarki, S., Cerdà, A., Brestic, M., Mahendra, R., Abdelly, C., Pascual, J.A., 2017. Vineyard compost supplemented with *Trichoderma harzianum* T78 improve saline soil quality. *L. Degrad. Dev.* 28, 1028–1037. <https://doi.org/10.1002/ldr.2554>
- Meyer, S.L.F., Roberts, D.P., Chitwood, D.J., Carta, L.K., Lumsden, R.D., Mao, W.L., 2001. Application of *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma virens*, alone and in combinations, against *Meloidogyne incognita* on bell pepper. *Nematropica* 31, 75–86.
- Mioranza, T.M., Inagaki, A.M., Müller, M.A., Stangarlin, J.R., Guimarães, V.F., Klein, J., Kuhn, O.J., 2018. Gas exchange and photosynthetic light response curves in nematode-infected tomato plants treated with *Thuya occidentalis*. *Aust. J. Crop Sci.* 12, 583–591. <https://doi.org/10.21475/ajcs.18.12.04.pne861>
- Moharana, P.C., Biswas, D.R., 2016. Assessment of maturity indices of rock phosphate enriched composts using variable crop residues. *Bioresour. Technol.* 222, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.097>
- Nardi, S., Ertani, A., Francioso, O., 2017. Soil–root cross-talking: The role of humic

- substances. J. Plant Nutr. Soil Sci. 180, 5–13.  
<https://doi.org/10.1002/jpln.201600348>
- Onwosi, C.O., Igbokwe, V.C., Odimba, J.N., Eke, I.E., Nwankwoala, M.O., Iroh, I.N., Ezeogu, L.I., 2017. Composting technology in waste stabilization: On the methods, challenges and future prospects. J. Environ. Manage. 190, 140–157.  
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.12.051>
- Oostenbrink, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Mendelingen Landbouwhogeschool Wageningen 66:1- 46.
- Ortiz, A., Orduz, S., 2001. In vitro evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. Mycopathologia 150, 53–60. <https://doi.org/10.1023/A:1010843413085>
- Parkash, V., Saikia, A.J., 2015. Production and multiplication of native compost fungal activator by using different substrates and its influence on growth and development of *Capsicum chinensis* Jacq. “Bhut Jolokia.” Biotechnol. Res. Int. 2015, 1–7.  
<https://doi.org/10.1155/2015/481363>
- Pascual, J.A., Bernal-Vicente, A., Martinez-Medina, A., Ros, M., Sánchez, C., 2017. Biostimulant and suppressive effect of *Trichoderma harzianum* enriched compost for melon cultivation from greenhouse nursery to field production. Acta Hort. 1164, 225–231. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1164.29>
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van Der Ent, S., Van Wees, S.C.M., 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. Nat. Chem. Biol. 5, 308–316.  
<https://doi.org/10.1038/nchembio.164>
- Pinton, R., Cesco, S., De Nobili, M., Santi, S., Varanini, Z., 1997. Water- and pyrophosphate-extractable humic substances fractions as a source of iron for Fe-deficient cucumber plants. Biol. Fertil. Soils 26, 23–27.  
<https://doi.org/10.1007/s003740050337>
- Pinton, R., Tomasi, N., Zanin, L., 2016. Molecular and physiological interactions of urea and nitrate uptake in plants. Plant Signal. Behav. 11.  
<https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1076603>
- Porras, M., Barrau, C., Romero, F., 2007. Effects of soil solarization and *Trichoderma* on strawberry production. Crop Prot. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.07.005>

- Rammah, A., Hirschmann, H., 1988. *Meloidogyne mayaguensis* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode from Puerto Rico. *J. Nematol.* 20, 58–69.
- Roomi, S., Masi, A., Conselvan, G.B., Trevisan, S., Quaggiotti, S., Pivato, M., Arrigoni, G., Yasmin, T., Carletti, P., 2018. Protein profiling of *Arabidopsis* roots treated with humic substances: insights into the metabolic and interactome networks. *Front. Plant Sci.* 9, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01812>
- Rouphael, Y., Kyriacou, M.C., Petropoulos, S.A., De Pascale, S., Colla, G., 2018. Improving vegetable quality in controlled environments. *Sci. Hortic.* 234, 275–289. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.033>
- Sala, A., Barrena, R., Artola, A., Sánchez, A., 2019. Current developments in the production of fungal biological control agents by solid-state fermentation using organic solid waste. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 0, 1–40. <https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1557497>
- Sousa, D.M.G. & Lobato, E., eds. *Cerrado: Correção do solo e adubação*. Planaltina, Embrapa Cerrados, 2004. 416p.
- Stark, C.H., Hill, R.A., Cummings, N.J., Li, J.H., 2018. Amendment with biocontrol strains increases *Trichoderma* numbers in mature kiwifruit (*Actinidia chinensis*) orchard soils for up to six months after application. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 51, 54–69. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1438818>
- Sussmilch, F.C., Schultz, J., Hedrich, R., Roelfsema, M.R.G., 2019. Acquiring control: the evolution of stomatal signalling pathways. *Trends Plant Sci.* 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.01.002>
- Trevisan, S., Botton, A., Vaccaro, S., Vezzaro, A., Quaggiotti, S., Nardi, S., 2011. Humic substances affect *Arabidopsis* physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. *Environ. Exp. Bot.* 74, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.04.017>
- Vaccaro, S., Muscolo, A., Pizzeghello, D., Spaccini, R., Piccolo, A., Nardi, S., 2009. Effect of a compost and its water-soluble fractions on key enzymes of nitrogen metabolism in maize seedlings. *J. Agric. Food Chem.* 57, 11267–11276. <https://doi.org/10.1021/jf901808s>
- Vieira, P.M., Coelho, A.S.G., Steindorff, A.S., de Siqueira, S.J.L., Silva, R. do N., Ulhoa,

- C.J., 2013. Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma harzianum* during growth on cell wall of *Fusarium solani* as a tool for biotechnological application. *BMC Genomics* 14, 177. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-177>
- Vieira, P.M., Santos, M.P., Andrade, C.M., Souza-Neto, O.A., Ulhoa, C.J., Aragão, F.J.L., 2017. Overexpression of an aquaglyceroporin gene from *Trichoderma harzianum* improves water-use efficiency and drought tolerance in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol. Biochem.* 121, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.10.012>
- Vieira, P.M., Zeilinger, S., Brandão, R.S., Vianna, G.R., Georg, R.C., Gruber, S., Aragão, F.J.L., Ulhoa, C.J., 2018. Overexpression of an aquaglyceroporin gene in *Trichoderma harzianum* affects stress tolerance, pathogen antagonism and *Phaseolus vulgaris* development. *Biol. Control* 126, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.012>
- Walkley, A., Black, I.A., 1934. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37, 29–38. <https://doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003>
- Williams, J., Clarkson, J.M., Mills, P.R., Cooper, R.M., 2003. A selective medium for quantitative reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* compost. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4190–4191. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4190-4191.2003>
- Yang, B., Eisenback, J.D., 1983. *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing pacara earpod tree in china. *J. Nematol.* 15, 381–391.
- Yeomans, J.C., Bremner, J.M., 1988. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil 1. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 19, 1467–1476. <https://doi.org/10.1080/00103628809368027>
- Zandonadi, D.B., Santos, M.P., Busato, J.G., Eustáquio, L., Peres, P., Façanha, A.R., 2013. Plant physiology as affected by humified organic matter. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 25, 12–25. <https://doi.org/10.1590/s2197-00252013000100003>
- Zanin, L., Tomasi, N., Zamboni, A., Segal, D., Varanini, Z., Pinton, R., 2018. Water-

extractable humic substances speed up transcriptional response of maize roots to  
nitrate. Environ. Exp. Bot. 147, 167–178.  
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.12.014>