





Universidade do Minho

Escola de Ciências

Rui Pedro Fernandes Carvalho

Toxicidade de pesticidas sobre o fungo
nematófago *Pochonia chlamydosporia* e seu efeito
no controlo do nematode *Meloidogyne incognita*

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Ecologia

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Doutora Sofia dos Santos da Rocha Costa

Professora Doutora Maria Teresa da Silva Craveiro Martins
de Almeida

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações CC BY-NC-ND
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Agradecimentos

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo FEDER (Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional) no âmbito do acordo de parceria PT2020 e COMPETE2020 (Programa Operacional Factores de Competitividade) e por fundos nacionais através da FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia)/MCETS no âmbito do projeto COCOON, POCI 01 0145 FEDER 016611 (PTDC/AGR PRO/3438/2014)

Ainda, este trabalho teve o suporte do Projeto EcoAgriFood (NORTE-01-0145-FEDER-000009) financiado pelo Programa Operacional da Região Norte (NORTE 2020), numa parceria com o programa PORTUGAL 2020 através de fundos Europeus para o Desenvolvimento Regional (FEDER)

Agradeço à minha orientadora Doutora Sofia R. Costa por toda a dedicação, paciência e apoio na redação e revisão desta tese, bem como todos os conselhos. À sua incansável contribuição na minha formação profissional. À Doutora Maria Teresa Almeida, minha co-orientadora, pela ajuda na revisão da tese, total disponibilidade e todos os ensinamentos.

À Doutora Clara Vieira dos Santos pela cedência do isolado de *P. chlamydosporia*, e por todas as instruções e orientação, sobretudo na parte prática. À Doutora Ana Martins pelo apoio estatístico, sugestões e ajuda.

Ao Departamento. Biologia e CBMA e seus funcionários, em especial à Dra. Cristina Ribeiro e Dr. Luís Correia, pela ajuda e simplicidade.

Um agradecimento ao Eng^o Davide pela disponibilidade e fornecimento das amostras de pesticidas e de toda a informação a respeito do ensaio de campo e ao Sr. Inácio, produtor comercial, por viabilizar a realização deste ensaio de campo na sua estufa.

Manifesto o meu apreço à minha entidade patronal pela cedência e compreensão ao longo de todo este trabalho

Aos meus colegas de laboratório, em especial ao meu amigo João Sousa, por todo o companheirismo e horas de trabalho.

Um agradecimento especial para todos os meus amigos e família pelo encorajamento e disponibilidade. Por fim, à minha mãe e à mulher, pelo contínuo apoio em todas as dificuldades, ajuda e por serem incansáveis ao longo de toda esta etapa.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Toxicidade de pesticidas sobre o fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* e seu efeito no controle do nematode *Meloidogyne incognita*

Resumo

Em cultura protegida, o tomateiro está sujeito a uma grande diversidade de pragas e doenças, entre elas, os nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR), que causam graves prejuízos. Os nematodocidas têm vindo a ser banidos devido à sua toxicidade, pelo que se torna necessário investigar estratégias sustentáveis para o controle de NGR. Neste trabalho, foi avaliado, num ensaio de campo, o sucesso de duas estratégias: a aplicação do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* e a enxertia num porta-enxerto parcialmente resistente. O ensaio de campo foi realizado numa estufa infestada por *Meloidogyne incognita*, onde foi instalado um desenho de quatro tratamentos (combinações de enxertia e de aplicação do fungo). Paralelamente, foram avaliados *in vitro* os efeitos dos vários pesticidas aplicados no campo em diferentes fases biológicas do fungo. Em campo, o fungo estabeleceu-se no solo apenas após duas aplicações, tendo colonizado o solo e as raízes de plantas dos vários tratamentos de modo semelhante, não sendo ainda encontradas diferenças entre tratamentos na reprodução do nemátode ou no parasitismo dos ovos pelo fungo. Assim, nenhuma das estratégias aplicadas, nem a sua combinação, foram bem-sucedidas no controle de *M. incognita*. Pelos resultados dos testes *in vitro*, os pesticidas aplicados ao longo do ensaio podem ter afetado o estabelecimento do fungo, reduzindo o seu desempenho como agente de controle biológico. Dos 12 pesticidas testados, em geral, apenas os inseticidas Mesurol 200 e Oberon e fungicida Ridomil Gold R não produziram efeito negativo no crescimento do fungo ($p > 0,05$), tendo os fungicidas, de forma geral, provocado um efeito negativo mais pronunciado. Os fungicidas Signum, Scala, Azbany, Cupramax e Melody Cobre e o inseticida Boreal produziram um efeito inibitório dose-resposta no crescimento do fungo com valores de Ec_{50} entre 5 e os 214 ppm. A germinação de clamidósporos em meio com pesticida, a 100 ppm de substância ativa, foi afetada por todos os pesticidas, à exceção de três inseticidas, enquanto a germinação de clamidósporos expostos durante 45 dias aos pesticidas foi, afetada por todas as formulações. Porém, foi possível perceber que alguns pesticidas terão maior compatibilidade com o fungo e que estudos como este serão relevantes para a gestão sustentável de NGR.

Palavras-chave: agricultura; cultura protegida; nemátodes-das-galhas-radiculares; tomateiro

Toxicity of pesticides on the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* and their effect on the control of the nematode *Meloidogyne incognita*

Abstract

In a protected cultivation, tomato plants are susceptible to a great diversity of pests and diseases, among them, root-knot nematodes (RKN), which cause serious damage. Nematicides are being banned due to their toxicity, so it is necessary to investigate sustainable strategies for NGR control. In this work, the success of two strategies was evaluated in a field trial: the application of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* and grafting onto a partially resistant rootstock. The field trial was carried out in a greenhouse infested by *Meloidogyne incognita*, where a design of four treatments (combinations of grafting and application of the fungus) was installed. The effects of the various pesticides, applied in the field, were evaluated *in vitro* on different biological phases of the fungus. In the field, the fungus was established in the soil only after two applications, having colonized the soil and plant roots of the various treatments in a similar way, with no differences found between treatments in the nematode reproduction or in the parasitism of eggs by the fungus. Thus, none of the applied strategies, or their combination, were successful in controlling *M. incognita*. From the results of *in vitro* tests, the pesticides applied throughout the test may have affected the establishment of the fungus, reducing its performance as a biological control agent. Of the 12 pesticides tested, in general, only the insecticides Mesurol 200 and Oberon and fungicide Ridomil Gold R did not produce a negative effect on the growth of the fungus ($p > 0.05$), with the fungicides, in general, causing a more pronounced negative effect. The fungicides Signum, Scala, Azbany, Cupramax and Melody Cobre and the insecticide Boreal produced a dose-response inhibitory effect on the growth of the fungus with EC_{50} values between 5 and 214 ppm. The germination of chlamydospores in a pesticide medium, at 100 ppm active substance, was affected by all pesticides, with the exception of three insecticides, while the germination of chlamydospores exposed for 45 days to pesticides was affected by all formulations. However, it was possible to realize that some pesticides are more compatible with the fungus and that studies like the present study will be relevant for the sustainable management of RKN.

Keywords: agriculture; protected cultivation; root-knot nematodes; tomato

Índice

Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xi
I. INTRODUÇÃO	2
1. Considerações gerais	2
2. Cultura de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	4
3. Nemátodes-das-galhas-radiculares	7
3.1 Ciclo de vida de NGR.....	7
4. Estratégias de proteção de culturas contra NGR.....	9
4.1 Controlo físico e alteração do solo.....	9
4.2 Controlo cultural	10
4.3 Controlo biológico.....	11
5. <i>Pochonia chlamydosporia</i> como agente de controlo biológico.....	12
6. Efeitos de pesticidas sobre <i>Pochonia chlamydosporia</i>	14
7. Objetivos.....	15
8. Hipóteses.....	16
II. MATERIAIS E MÉTODOS	17
1. Ensaio de campo	18
1.1 Descrição da área de estudo.....	18
1.2 Inoculação com <i>P. chlamydosporia</i>	20
1.3 Amostragem.....	21
1.4 Determinação da população do fungo no solo	21
1.5 Determinação da colonização da raiz e parasitismo dos ovos	22
1.6 Aplicação de fatores de produção	24
2. Ensaio laboratoriais	27
2.1 Obtenção e manutenção do isolado de <i>P. chlamydosporia</i>	27
2.2 Crescimento radial	27
2.3 Germinação de clamidósporos de <i>P. chlamydosporia</i> em meio com pesticidas	28
3. Análise estatística.....	30
3.1 Resultados do ensaio de campo.....	30
3.2 Resultados dos ensaios <i>in vitro</i>	30
III. RESULTADOS	32
1. Ensaio de campo	33
1.1 Densidade de <i>P. chlamydosporia</i> no solo	33

1.2	Densidade de <i>P. chlamydosporia</i> nas raízes.....	34
1.3	Parasitismo dos ovos.....	35
2.	Efeito dos pesticidas no crescimento radial de <i>P. chlamydosporia</i>	36
2.1	Fungicidas.....	37
2.2	Inseticidas.....	39
2.3	Inibição do crescimento radial do fungo	41
3.	Efeito de pesticidas na germinação de clamidósporos de <i>P. chlamydosporia</i>	42
3.1	Germinação de clamidósporos - Ensaio I.....	42
3.2	Germinação de clamidósporos - Ensaio II.....	43
II.	DISCUSSÃO	46
1.	Densidade, distribuição e atividade parasítica de <i>P. chlamydosporia</i> em condições de campo.....	47
2.	Efeito ecotoxicológico de pesticidas sobre <i>P. chlamydosporia</i>	52
3.	Considerações finais	58
V.	Referências Bibliográficas	59
VI.	Anexos	70

Lista de figuras

- Figura 1.** Esquema do ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. (retirado de Abrantes et al., 2007).....8
- Figura 2.** Esquema do desenho experimental do ensaio conduzido na estufa de tomateiros, ao longo de três linhas, cada uma com com 12 talhões. As cores correspondem aos tratamentos B, BF, E e EF, indicados na Tabela 3..... 19
- Figura 3.** Aspeto geral dos tomateiros, na estufa do ensaio, um mês após a plantação. A - tomateiro enxertado em porta-enxerto Embajador; B - cv. Coração de boi plantada em duplicado. 20
- Figura 4.** Calendarização das aplicações dos diferentes pesticidas, inoculações com *Pochonia chlamydosporia* e indicação dos períodos de nutrição vegetal ao longo do ensaio de campo na estufa de tomateiro onde decorrer o ensaio..... 26
- Figura 5.** Número de UFC/g de solo nos diferentes tratamentos inoculados com *Pochonia chlamydosporia* (BF – tomateiro cv. Coração de Boi não-enxertado; EF – tomateiro cv. Coração de Boi enxertado em porta-enxerto cv. Embajador) no decorrer do ensaio. Os valores são média de 6 repetições e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas na densidade do fungo nos diferentes meses do ensaio ($p < 0,05$) 33
- Figura 6.** Número de UFC/g de raiz de *Pochonia chlamydosporia*, das raízes de plantas retiradas no final do ensaio, dos diferentes tratamentos nos talhões em que foi aplicado o fungo (BF – tomateiro cv. Coração de Boi não-enxertado; EF – tomateiro cv. Coração de Boi enxertado em porta-enxerto cv. Embajador). Os valores são a média de 6 repetições e as barras representam o respetivo erro padrão..... 34
- Figura 7.** Percentagem de parasitismo de ovos de nemátodes-das-galhas-radiculares *Meloidogyne* pelo fungo *Pochonia chlamydosporia* nos diferentes tratamentos do ensaio B, E, EF e BF (B - tomateiro cv. Coração de Boi não-enxertado; E - tomateiro cv. Coração de Boi enxertado em porta-enxerto cv. Embajador ; BF – tomateiro cv. Coração de Boi não-enxertado aplicado com *P. chlamydosporia*; EF – tomateiro cv. Coração de Boi enxertado em porta-enxerto cv. Embajador). Os valores são a média de 6 repetições e as barras representam o respetivo erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$)..... 35
- Figura 8.** Percentagem de parasitismo de ovos de *Meloidogyne incognita* pelo fungo *P. chlamydosporia* nos tratamentos com o fungo (BF – tomateiro cv. Coração de Boi não-enxertado; EF – tomateiro cv. Coração de Boi enxertado em porta-enxerto cv. Embajador) nas diferentes linhas de plantação do ensaio. Os valores são a média de 2 repetições por talhão e as

barras representam o respectivo erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). 36

Figura 9. Efeito dos diversos fungicidas testados no crescimento radial de *Pochonia chlamydosporia* nas concentrações de 1, 10 e 100 ppm de substância ativa. Os valores apresentados são a média de 5 repetições. Pesticidas com * representam diferenças significativas relativamente à testemunha ($p < 0,05$). 38

Figura 10. Efeito dos diversos inseticidas testados e um nematodocida (Vydate 10L) no crescimento radial de *Pochonia chlamydosporia* nas concentrações de 1, 10 e 100 ppm de substância ativa. Os valores apresentados são a média de 5 repetições. Pesticidas com * representam diferenças significativas relativamente à testemunha ($p < 0,05$). 40

Lista de tabelas

Tabela 1. Principais pragas da cultura do tomate (adaptado de Abrantes et al., 2007)	6
Tabela 2. Principais doenças da cultura do tomate (adaptado de Abrantes et al., 2007)	7
Tabela 3. Designações atribuídas aos diferentes tratamentos dos ensaios realizados.	20
Tabela 4. Nome comercial, designação e teor da substância ativa, função, data e modo de aplicação e dose recomendada dos pesticidas aplicados no ensaio conduzido numa estufa de tomateiros, na Apúlia.	25
Tabela 5. Valores de inibição do crescimento radial das colónias de <i>Pochonia chlamydosporia</i> sob o efeito de cada pesticida a 1, 10 e 100 ppm de concentração de substância ativa, ao fim de 22 dias de exposição, e valores de Ec_{50} dos pesticidas com efeito inibitório dose-resposta.....	41
Tabela 6. Efeito de pesticidas a uma concentração de 100 ppm de substância ativa, e de uma testemunha, nos valores percentuais de germinação de clamidósporos de <i>Pochonia- chlamydosporia</i>	43
Tabela 7. Estimativa da densidade de clamidósporos de <i>Pochonia chlamydosporia</i> mantido em meio de cultura com pesticidas a uma concentração de 100 ppm de substância ativa durante 45 dias, em suspensões obtidas de três placas de CMA (Corn Meal Agar).	44
Tabela 8. Taxa de germinação de clamidósporos de <i>Pochonia chlamydosporia</i> formados em meio de cultura com pesticidas a uma concentração de 100 ppm de substância ativa durante 45 dias.	45

I. INTRODUÇÃO

1. Considerações gerais

Os nemátodes são um grupo de invertebrados pertencentes ao filo Nematoda, com elevada abundância e diversidade taxonômica e funcional. Sendo os animais mais abundantes no planeta, estão presentes em todos os níveis tróficos na cadeia alimentar no solo (van den Hoogen et al., 2019). Apesar da informação sobre a abundância deste grupo, sabe-se que muitas espécies estão ainda por conhecer (De Ley, 2002; Ettema, 1998). É estimado que estes tenham divergido da linhagem de um ancestral comum que resultaria nos filos Arthropoda e Chordata há cerca de 1177 ± 79 milhões de anos (Wang et al., 1999). Além de serem organismos simples sem segmentação e com uma forma geralmente cilíndrica, são na sua maioria de dimensão microscópica.

A sua estrutura, fisiologia e adaptabilidade permite o seu estabelecimento nos mais variados habitats em comparação com qualquer outro grupo multicelular. As comunidades de nemátodes estão envolvidas em vários processos que ocorrem no solo como o ciclo de nutrientes e decomposição da matéria orgânica, podendo atuar como bioindicadores das condições do solo (Cortet et al., 1999; Sochová et al., 2006). No solo a estrutura destas comunidades é refletida pelos diferentes grupos tróficos que a compõem. Uma classificação amplamente utilizada é baseada no grupo trófico dos diferentes nemátodes (Yeates et al., 1993) entre nemátodes de vida livre e os nemátodes fitoparasitas. Entre os diferentes tipos de nemátodes fitoparasitas destacam-se os nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR), *Meloidogyne* spp., parasitas obrigatórios que necessitam de plantas vivas para se alimentarem e reproduzirem. Estas espécies de nemátodes têm uma distribuição global e parasitam uma grande variedade de plantas e cultivares criando interações através destas com outros organismos patogénicos (Loewenberg et al., 1959; Mai & Abawi, 1987b; Manzanilla-López & Hunt, 2008; Taylor & Brown, 1997). O dano causado à planta pela atividade das espécies de NGR proporciona a criação de complexos de doença, atuando sinergicamente com outros agentes patogénicos. Por exemplo, essa situação já foi observada com fungos. Os danos causados pelo fungo *Fusarium oxysporum* são maiores quando na presença destes nemátodes (Mai & Abawi, 1987a; Powell, 1971; Taylor, 1990). Entre NGR e a bactéria fitopatogénica *Pseudomonas solanacearum*, ocorre uma sinergia similar, uma vez que os danos provocados pela bactéria são maiores em raízes infetadas pelos nemátodes (Taylor, 1990). Consequentemente, os NGR são responsáveis por grandes impactos económicos anuais na agricultura mundial (Sasser & Freckman, 1987), embora o dano causado não seja sempre

reconhecido pelo seu habitat ser no solo e as plantas não apresentarem sintomas específicos na parte aérea. Os NGR dificultam a absorção de nutrientes e água por parte da planta, levando à sua murchidão, sendo comum ocorrerem zonas de fraco crescimento da cultura em campos de cultivo (Nicol et al., 2011; Oka et al., 2000). É estimado que sejam responsáveis por aproximadamente 5% da perda agrícola global (Karszen, 2002).

A proteção das culturas contra o ataque de nemátodes tem assentado tradicionalmente na aplicação de nematodocidas mas, devido à retirada do mercado de muitos pesticidas de síntese, incluindo nematodocidas (UNEP, 2000), a necessidade de controlar doenças provocadas por nemátodes usando estratégias alternativas passou a ser vista com mais atenção. A agricultura intensiva convencional continua a depender amplamente da aplicação de fatores de produção de síntese química, porém, o uso deste tipo de compostos continua em declínio à medida que as preocupações ambientais impõem legislação mais restritiva. Por exemplo, o nematodocida dibromocloropropano (DBCP) foi descontinuado por volta dos anos 1970 após evidências de provocarem esterilidade masculina. Mais recentemente, outros nematodocidas têm tido as suas licenças revogadas; o brometo de metilo, amplamente utilizado até 2005, era o mais eficiente meio de combate a nemátodes fitoparasitas e outras doenças e pragas de origem edáfica. Essencialmente, na União Europeia, mais nematodocidas têm vindo a ser banidos do mercado, como é o caso dos compostos com aldicarbe e dicloropropeno, estando outros em avaliação, como é o caso do oxamil, um dos nematodocidas mais utilizados atualmente (Lilley et al., 2011).

Estes produtos de proteção das plantas consistem numa formulação de vários compostos químicos associados a uma ou mais substâncias ativas, sendo estas responsáveis pela atividade biológica do pesticida. Atualmente, o uso de qualquer tipo de formulação é fortemente regulado pela Comissão Europeia, seguindo um conjunto rigoroso de diretrizes como consta no regulamento de execução (EU) No 844/2012. De modo a garantir a segurança da saúde humana e ambiental, incluindo os resíduos nos alimentos e efeitos na saúde animal não-alvo e no ambiente, todas as substâncias ativas têm de ser revistas até um máximo de 10 anos. Ao mesmo tempo, é promovido um sistema de produção agrícola – Proteção Integrada - cujos princípios sustentam uma abordagem que passe por uma redução de pesticidas para níveis que sejam económica e ecologicamente sustentáveis promovendo a substituição dos métodos tradicionais por alternativas mais sustentáveis (European Commission, 2016). Face a todas estas medidas, houve um aumento substancial da investigação que visa encontrar métodos alternativos mais sustentáveis como agentes de controlo biológico (Jatala, 1986; Stirling, 2014). Estes ocorrem naturalmente em

ecossistemas com baixo impacto humano e podem ser, por exemplo, bactérias ou fungos. O fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* é um dos agentes mais estudados, sobretudo quando se compreendeu que existia um equilíbrio entre as populações de nemátodes e dos seus parasitas em solos supressivos a nemátodes (Kerry et al., 1980). Para os agentes de controlo biológico serem considerados viáveis há que entender primeiramente a eficiência destes quando conjugados com métodos tradicionais da proteção de culturas em agroecossistemas convencionais, tendo igualmente em consideração o fator económico e reduzido impacto nocivo no ambiente.

No entanto, apesar dos NGR constituírem um problema recorrente em culturas hortícolas, outras doenças e pragas podem ter grande impacto económico. Entre as que causam maiores prejuízos na cultura do tomate, destacam-se o oomicete mildio do tomateiro - *Phytophthora infestans* – e a traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Urbaneja et al., 2012).

O mildio do tomateiro é considerado uma das doenças mais temidas pelos produtores. Responsável pelas maiores quebras de produção e de maior área territorial afetada no passado em Portugal, o mildio afeta toda a parte aérea da planta (Abrantes et al., 2007; Lopes & Simões, 2006). A traça-do-tomateiro é atualmente uma das maiores pragas em Espanha, tendo já sido encontrada amplamente distribuída em Portugal na cultura de tomate. Nativa da América do Sul com um enorme potencial de expansão relativamente à zona nativa aliado à falta de inimigos naturais (Luna et al., 2007), o inseto pode atacar uma cultura de tomate em qualquer fase de desenvolvimento da planta com prejuízos até 100% (Cely et al., 2010; Cuthbertson et al., 2013; Desneux et al., 2010).

Por estas razões, uma vez que a cultura do tomateiro é sensível a inúmeras outras doenças e pragas, os produtores convencionais não estão limitados à utilização de nematodocidas. Face a outros agentes patogénicos, vêem-se na obrigação de utilizar diferentes pesticidas como fungicidas e inseticidas. Consequentemente, a cultura do tomate é sujeita à aplicação de uma multiplicidade de pesticidas sintéticos correntemente utilizados.

2. Cultura de tomate (*Solanum lycopersicum*)

O tomateiro, *Solanum lycopersicum* (syn. *Lycopersicon esculentum*), pertence à família Solanaceae, a que pertencem ainda outras culturas hortícolas como a batateira e o pimenteiro. Inicialmente classificado por Lineu no género *Solanum* em 1753 sob o nome de *S. lycopersicum*, a designação da espécie foi durante muito tempo um tema de discussão segundo vários autores (Foolad, 2007; Peralta & Spooner, 2006). Nativo da América do Sul (Bergougnoux, 2014; Jenkins,

1948), de onde foi importado por volta do século XVI, o tomateiro encontra no clima temperado da bacia mediterrânea condições ideais para o seu cultivo. Recentemente tem sido mais cultivado em estufa devido ao aumento populacional, o que gerou uma maior procura do fruto, tendo em conta as suas propriedades nutricionais como o licopeno e a vitamina C. O aumento de vírus e doenças nas plantas de tomateiro e conseqüente perda de produção é outra das razões que levou à sua produção ser realizada em estufas (Hanssen & Lapidot, 2012).

Condições deficientes em produções horticolas como o excesso de humidade ambiental, estrutura irregular de estufas, más desinfestações do solo e falta de rotação de culturas são um problema com importância global no contexto de produção (Abrantes et al., 2007). Por conseguinte, o cultivo do tomate é submetido a um grande stress biótico e abiótico, o que tem levado a perdas económicas nestas condições. Enquanto os fatores abióticos estão relacionados com o excesso ou carência de água e/ou nutrientes ou da ação de substâncias tóxicas, os fatores bióticos causadores de stress estão associados geralmente a vários inimigos do tomateiro, entre os quais pragas, doenças e infestantes (Amaro, 2003).

As pragas abrangem agentes macroscópicos complexos como insetos, ácaros, moluscos e vertebrados (Tabela 1). Entre os vários organismos que constituem pragas, destacam-se as tripes, entre outros, que podem provocar danos direta e indiretamente uma vez que além de se alimentarem da planta são responsáveis pela transmissão do vírus TSWV (*Tomato spotted wilt virus*) (Best, 1968; Hanssen & Lapidot, 2012). A traça-do-tomateiro tem devastado culturas de tomate após ter sido detetada inicialmente em Espanha em 2006 e se ter propagado ao longo da bacia mediterrânica. Uma vez não controlada eficientemente pode provocar cerca de 80-100% de perda de produtividade (Desneux et al., 2010). As larvas deste organismo alimentam-se das folhas e caules assim como do fruto do tomateiro, podendo ainda afetar várias outras culturas horticolas como a batata e o pimento. O seu potencial de invasão associado ao aumento da sua resistência a inseticidas e outros compostos (Siqueira et al., 2001; Siqueira et al., 2000) fazem desta praga uma ameaça séria a culturas horticolas. Entre as pragas com importância económica na cultura do tomateiro estão o ácaro do bronzeamento do tomateiro, *Aculops lycopersici*, e a mosca branca - *Bemisia tabaci* (Lopes & Simões, 2006) .

Tabela 1. Principais pragas da cultura do tomate (adaptado de Abrantes et al., 2007)

Pragas	Espécies
Ácaros	Ácaro-branco (<i>Polyphagotarsonemus latus</i>)
	Ácaro-do-bronzeamento-do-tomateiro (<i>Aculops lycopersici</i>)
Dípteros	Larvas-mineiras (<i>Liriomyza trifolii</i> , <i>L. huidobrensis</i>)
Homópteros	Afideo-da-sardineira e batateira (<i>Aulacorthum solani</i> e <i>Macrosiphum euphorbiae</i>)
	Mosca-branca (<i>Trialeurodes vaporariorum</i>)
Lepidópteros	Traça-do-tomateiro (<i>Tuta absoluta</i>)
	Lagarta-do-tomate (<i>Helicoverpa armigera</i>)
Tisanópteros	Tripe-da-Califórnia (<i>Frankliniella occidentalis</i>)

As doenças das plantas são causadas por agentes microscópicos como fungos, bactérias, vírus e nemátodes (Tabela 2). No caso do míldio, o oomiceto *P. infestans* ataca a parte aérea da planta, incluindo o caule, folha e fruto sobretudo em condições de elevada humidade, levando a acentuadas perdas económicas. À semelhança do míldio, a doença vulgarmente conhecida como podridão cinzenta, causada pelo fungo *Botrytis cinerea*, afeta a parte aérea da planta causando quebras de produção. Os nemátodes, nomeadamente os fitoparasitas, são igualmente responsáveis por grandes quebras de produção na cultura do tomateiro. Geralmente afetam diretamente as raízes da planta, mas as nematoses causam também sintomas inespecíficos na parte aérea da planta, como a clorose das folhas e a queda das folhas e frutos e/ou sua redução, bem como a murchidão da planta (Abrantes et al., 2007). Como estes sintomas se situam na parte aérea da planta e não são específicos do ataque de nemátodes fitoparasitas, são muitas vezes confundidos com uma deficiência química de nutrientes ou outros desequilíbrios do solo (Webster, 1969).

Tabela 2. Principais doenças da cultura do tomate (adaptado de Abrantes et al., 2007)

Doenças	Espécies
Bacterioses	Mal-murcho-do-tomateiro (<i>Ralstonia solanacearum</i>) Ponteado bacteriano (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>)
Micoses	Altermariose (<i>Alternaria dauci</i> f. sp. <i>solan</i>) Fusariose vascular (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>) Mildio (<i>Phytophthora infestans</i>) Rizoctônia (<i>Rhizoctonia solani</i>) Podridão cinzenta (<i>Botrytis cinerea</i>)
Viroses	Bronzeamento do tomateiro (<i>Tomato spotted wilt virus – TSWV</i>) Amarelo do tomateiro (<i>Tomato chlorosis virus – ToCV</i>)
Nematoses	Nemátodes-das-galhas-radiculares (<i>Meloidogyne</i> spp.)

3. Nemátodes-das-galhas-radiculares

Os nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR) são nemátodes pertencentes ao género *Meloidogyne* e estão mais amplamente distribuídos do que qualquer outro género de nemátodes fitoparasitas (Sasser, 1977), sendo considerado o género economicamente mais relevante (Jones et al., 2013)

3.1 Ciclo de vida de NGR

O ciclo de vida destes organismos é ilustrado na Figura 1. Os ovos são depositados pela fêmea numa matriz gelatinosa denominada massa de ovos, que pode conter cerca de mil ovos. Ainda dentro do ovo, após o desenvolvimento embrionário, o jovem do 1º estágio (J1), sofre uma muda tornando-se num jovem de 2º estágio (J2) que seguidamente eclode, ficando livre no solo. Este é o estágio infetivo, que se desloca na rizosfera em busca da raiz de uma planta hospedeira. O J2 penetra então na raiz, geralmente logo acima da coifa, usando o estilete para perfurar as células vegetais. Após migração, o J2 fixa-se em um dado local da raiz, continua a alimentar-se e vai injetando várias secreções que provocam crescimento das células no cilindro vascular levando à hipertrofia por aumento da taxa de divisão celular no periciclo – hiperplasia – induzindo a formação de células gigantes e provocando formação de galhas na raiz. As fêmeas de *Meloidogyne* alimentam-se do citoplasma destas células, cuja densidade e teor em proteína e outros compostos

é superior ao das células circundantes. Nesta fase e nestas condições, o J2 vai continuar a alimentar-se aumentando de tamanho e sofre três mudas até atingir o estágio adulto, em que se torna globosa (Taylor & Sasser, 1978).

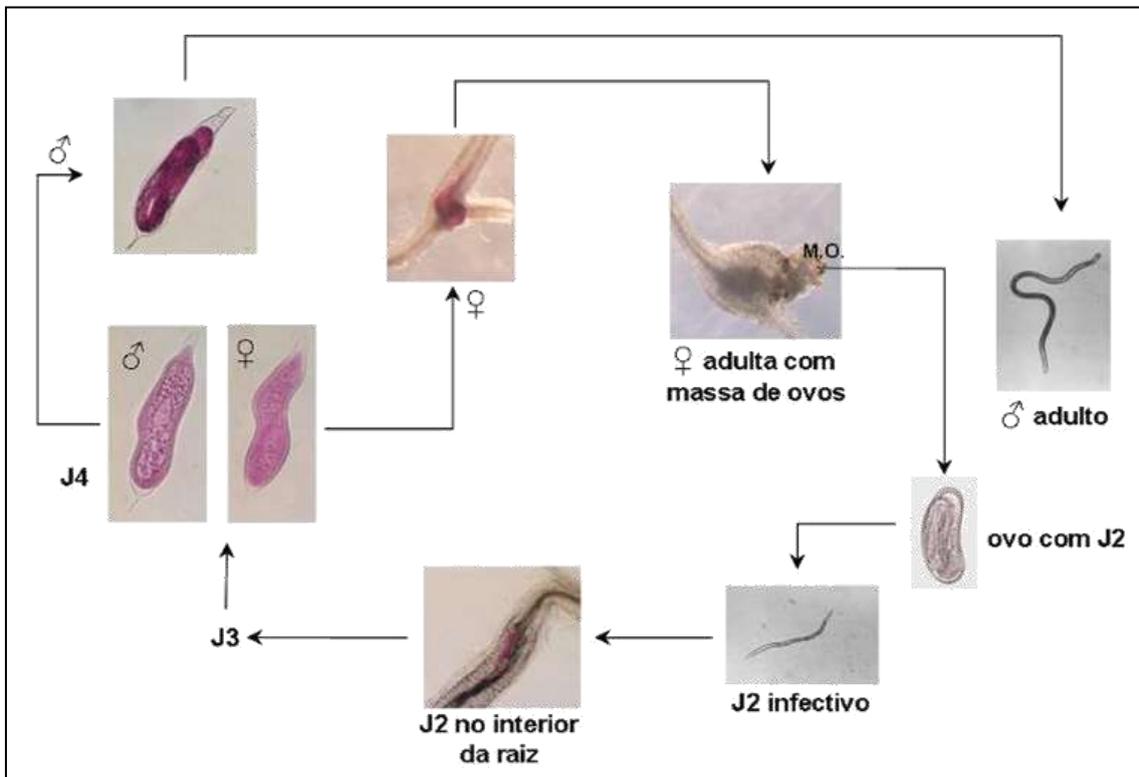


Figura 1. Esquema do ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. (retirado de Abrantes et al., 2007)

De um modo geral, as espécies anfimíticas, ou seja com fertilização cruzada, são relativamente mais específicas quanto ao seu hospedeiro, enquanto as espécies sem especificidade de hospedeiro se reproduzem por partenogênese mitótica (Jepson, 1987). No entanto, mesmo quando apenas consideramos o gênero *Meloidogyne* existem várias exceções tanto na especificidade de hospedeiro como no seu tipo de reprodução (Blok et al., 2008; Castagnone-Sereno et al., 2013; Jepson, 1987; Taylor & Sasser, 1978). Como o movimento destes nemátodes no solo é reduzido, assim como o fluxo génico, não existe grande benefício na reprodução sexual. Por essa razão, a partenogênese mitótica permite contrariar essas limitações aumentando o seu potencial de colonização, e a sua importância na agricultura. Neste tipo de reprodução, no processo de oogénese dá-se apenas uma divisão mitótica sem redução no número de cromossomas (Sasser & Carter, 1985; Triantaphyllou, 1981).

4. Estratégias de proteção de culturas contra NGR

Um vasto leque de estratégias na proteção de culturas contra NGR têm sido utilizadas, no entanto, com sucesso variável. Tradicionalmente, o controlo químico era o mais eficaz e utilizado contra NGR pela aplicação de nematodocidas de síntese. Como referido anteriormente, um método amplamente utilizado era a aplicação de brometo de metilo, que funciona como um biocida de grande espectro de ação, com alta toxicidade, acabando por ser prejudicial para os organismos edáficos, sendo estes benéficos ou patogénicos. Este nematodocida acabou por ser banido na Europa em 2005 pelos seus efeitos nefastos na camada do ozono (European Union, 2000; Noling & Becker, 1994). O uso de pesticidas químicos de síntese como nematodocidas continua a ser dos métodos mais utilizados na agricultura convencional, apesar destes também constituírem um problema para a saúde ambiental pela sua toxicidade. Consequentemente, alguns pesticidas estão em risco de verem a sua utilização banida segundo as diretivas da União Europeia (Arena et al., 2018). Por esta razão, outros métodos têm vindo a ser cada vez mais utilizados trazendo, no entanto, novas vantagens e desvantagens.

4.1 Controlo físico e alteração do solo

A solarização consiste num método de desinfeção físico que assenta na cobertura do solo com uma película de polietileno transparente durante um período de até 2 meses. Desta forma, através da energia solar, é possível um sobreaquecimento do solo até temperaturas de 35 a 55°C até uma determinada profundidade. Além de fácil aplicação, não é prejudicial ao ambiente e pode aumentar o nível de produtividade (Streck et al., 1995; DRAPN, 2018). No entanto o seu uso não é um método adequado a culturas extensas ou locais de relevo acentuado (Elmore et al., 1997). Ainda, em regiões temperadas o método de solarização é menos eficiente no controlo de agentes patogénicos das plantas e, além de o seu tempo de ação ser reduzido e estes agentes recolonizarem após uma desinfeção inicial, este método também poderá eliminar outros organismos do solo, como agentes de controlo biológico (Mahrer et al., 1987). Para ser utilizado, este método requer que o solo esteja livre por um mês, ou mais tempo, durante a estação quente de cultivo, o que pode ser economicamente desfavorável para alguns produtores de hortícolas (Katan, 1981).

4.2 Controlo cultural

Métodos culturais para o controlo de NGR incluem, entre outros, o uso de cultivares resistentes e rotação de culturas com cultivares ou espécies menos suscetíveis. A rotação de culturas com plantas não-hospedeiras permite a supressão da densidade populacional destes fitoparasitas e consequente prevenção de danos para as culturas seguintes (Chen & Tsay, 2006). Também se utiliza a prática de consociação de culturas, que consiste no cultivo conjunto de várias culturas, e permite uma diminuição do stress das plantas e o enriquecimento do solo, uma vez que as relações de vários agentes patogénicos com plantas criam predisposição a ocorrer em monoculturas (Altieri & Liebman, 1986).

Outro método de controlo cultural cada vez mais utilizado é a enxertia de hortícolas. Atualmente já com muitas cultivares comerciais disponíveis, tem revelado resultados positivos sobretudo em solos que oferecem dificuldade de crescimento à cultura de tomate como resultado da ação de populações de nemátodes fitoparasitas (Barrett et al., 2012; Singh et al., 2017). Esta técnica iniciou-se no Japão no início do século passado para a cultura de melancia, alcançando tamanho sucesso que na década de 1990 em 95% da cultura de melancia já se utilizava esta técnica (Peil, 2005). O modo de enxertia pode variar mas de uma forma geral consiste na união do tecido de duas plantas – o enxerto e o porta-enxerto – sendo o primeiro a parte superior da planta enquanto o porta-enxerto é a parte inferior e responsável pelo sistema radicular. Agronomicamente e sobretudo num contexto de produção, é muito importante, uma vez que permite combinar várias características desejáveis tanto *above ground* como *below ground*, tais como a qualidade dos frutos e a resistência a agentes patogénicos do solo, respetivamente. A enxertia é também utilizada para conferir à planta resistência à seca e melhor absorção de nutrientes (Kumar et al., 2017).

Apesar de todas estas condições, a enxertia na cultura do tomateiro tem sido utilizada particularmente pela sua resistência contra NGR, conferida pela presença do gene *Mi 1.2*. Este gene foi descoberto num parente selvagem do tomateiro, *Solanum peruvianum*, e posteriormente incorporado no tomateiro de cultivo por introgressão (Rossi et al., 1998; Seah et al., 2004)

Os porta-enxertos resistentes têm sido cada vez mais utilizados na cultura de tomate, e, segundo vários estudos de investigação, têm demonstrado eficiência no controlo de NGR, dependendo da cultivar do porta-enxerto (Rich & Olson, 1999; Sorribas et al., 2005; Verdejo-Lucas & Sorribas, 2008). No entanto, apesar de a sua resistência conferir uma grande vantagem mesmo

em solos com altas densidades de NGR, o gene Mi é sensível à temperatura do solo a partir dos 28°C, diminuindo a sua expressão (Dropkin, 1969; Verdejo-Lucas et al., 2012). Além disso, outra desvantagem dos porta-enxertos baseia-se na durabilidade da sua resistência pela potencial seleção de nemátodes virulentos (Ros et al., 2006, 2004) o que tem levantado preocupação sobre o uso e exclusividade deste método.

Resumidamente, nenhum método, físico ou cultural, revela uma taxa de sucesso ao ponto poder ser utilizado singularmente, especialmente no presente com todo o conhecimento científico existente. Dado que o tomate é uma das produções horticolas de consumo em fresco com maior produção, tendo atingido o 2º lugar de produção em 2017 com um total 97.000 toneladas, tendo apenas a cultura da batata tido produção mais elevada (INE, 2017), é natural o aumento da consciencialização dos consumidores em relação ao efeito nefasto de pesticidas químicos. Esta consciencialização acaba por se traduzir numa maior aposta na produção integrada, que combina as melhores práticas ambientais com um nível de biodiversidade superior, utilizando substâncias e processos naturais (DGADR, 2018). Como resultado, nos últimos anos tem aumentado a investigação sobre os agentes de controlo biológico de nemátodes, existindo já certas formulações comerciais à base de fungos e outros antagonistas de nemátodes.

4.3 Controlo biológico

O controlo biológico é um processo natural em ecossistemas de solos com baixo impacto humano. Estas condições alteram-se quando os mecanismos biológicos que sustentam este equilíbrio, por exemplo inimigos naturais, deixam de estar presentes ou ativos, permitindo a desestabilização das densidades de populações de nemátodes. Alguns destes inimigos naturais de NGR estão já referenciados há bastante tempo e têm sido submetidos a intensa investigação científica.

A bactéria *Pasteuria penetrans* é um parasita obrigatório de NGR com potencial como agente de controlo biológico (Brown et al., 1985; Davies, 2009; Sayre, 1980). Esta é uma bactéria formadora de esporos que se aderem à cutícula dos jovens de NGR. Depois de infetarem a raiz, os NGR começam o seu processo de alimentação e os esporos germinam, penetrando a cutícula com um tubo germinativo formando micro-colónias vegetativas que colonizam todo o corpo do nemátode. Quando ocorre esporulação das micro-colónias após fragmentação, a fêmea de NGR

fica cheia de esporos e incapacitada para a reprodução (Sayre & Wergin, 1977). No entanto, apesar dos esporos aderirem à cutícula de diferentes espécies de nemátodes, certas populações de *P. penetrans* são muito específicas quanto ao seu hospedeiro (Stirling, 1985). Como a rizosfera constitui um importante nicho ecológico, muitos organismos prosperam na zona onde a exsudação radicular é mais intensa enquanto outros organismos crescem na zona da epiderme ou no córtex radicular. Por estas razões, outros agentes de controlo biológico partilham o mesmo habitat havendo múltiplas interações na microfauna do solo, como é o caso do fungo *Trichoderma harzianum* (Curtis et al., 2011).

Trichoderma é um género de fungos que vivem tanto no solo como nas raízes. Já foram registados em alguns isolados deste fungo benefícios para as plantas tanto a nível da colonização da raiz e da sua absorção, como do crescimento da planta e consequentemente, a sua produtividade (Inbar et al., 1994; Kleifeld & Chet, 1992; Yedidia et al., 1999). Sendo antagonistas de uma variedade de pragas e doenças consideradas economicamente importantes, estes fungos têm sido avaliados como agentes de controlo biológico contra nemátodes. A sua interação com os NGR pode direta ou indiretamente influenciar as populações destes fitoparasitas, seja pela indução de resistência nas plantas seja por vários mecanismos afetarem os NGR como a antibiose – produção de metabolitos tóxicos - e ainda a sua capacidade de parasitar nemátodes (Fravel, 1988; Harman, 2006; Harman et al., 2004; Viterbo et al., 2007). O fungo é responsável por libertar várias substâncias como enzimas (proteases) que atuam no processo digestivo tanto no parasitismo dos ovos como na imobilização de J2 dentro de ovos em massa de ovos (Sharon et al., 2001).

Entre os vários fungos utilizados como agentes de controlo biológico, um dos mais estudados e com resultados mais promissores para a gestão de NGR é o fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*.

5. *Pochonia chlamydosporia* como agente de controlo biológico

O fungo *P. chlamydosporia* foi referido pela primeira vez como parasita de ovos de nemátodes em 1974 por Wilcox e Tribe no Reino Unido. Subsequentemente tem sido amplamente estudado para avaliar a sua capacidade como agente de controlo biológico e revisto extensivamente (Kerry, 1997; Kerry, 2000; Kerry & Hirsch, 2011; Lopez-Llorca et al., 2007; Manzanilla-López et al., 2012; Sayre & Walter, 2003).

Anteriormente designado como *Verticillium chlamydosporium*, este fungo é parasita facultativo de ovos de nemátodes-de-quisto (*Heterodera* spp. e *Globodera* spp.) e de NGR, encontrando-se distribuído globalmente e em diferentes tipos de solo, tendo a capacidade de crescer saprofiticamente no solo na ausência de nemátodes. Quando na rizosfera, consegue colonizar as raízes de espécies hospedeiras e já foi registado o seu comportamento endófito em algumas espécies de Solanaceae e Poaceae, não tendo atividade patogénica mas podendo até fornecer à planta resistência a agentes patogénicos sem prejudicar o crescimento desta (De Leij & Kerry, 1991; Lopez-Llorca et al., 2002; Maciá-Vicente et al., 2009). Alguns isolados do fungo tiveram inclusive um papel importante como promotores de crescimento de diferentes plantas (Dallemole-Giaretta et al., 2015; Dias-Arieira et al., 2011; Escudero & Lopez-Llorca, 2012; Monfort et al., 2005).

De entre as principais características que fazem de *P. chlamydosporia* um potencial agente de controlo biológico, as três que mais se destacam são: a) capacidade de criar clamidósporos b) colonização da rizosfera e c) parasitismo de ovos de nemátodes. Estas características variam, no entanto, de acordo com o isolado de *P. chlamydosporia* (Abrantes et al., 2002; De Leij & Kerry, 1991). Apesar dos conídios e fragmentos de hifas apresentarem uma reduzida taxa de sobrevivência no solo, os clamidósporos são resistentes sem fonte de energia adicional (Kerry et al., 1993; Manzanilla-López et al., 2013; Mauchline et al., 2002). A prática de rotação de culturas ajuda a promover a colonização da rizosfera pelo fungo desde que realizada com culturas compatíveis. Isto é, pelo facto de que diferentes plantas libertam diferentes exsudatos, os quais contêm os nutrientes de que o fungo necessita, além da capacidade de suporte. Para a planta contribuir para o crescimento do fungo, esta deve ter uma capacidade de suporte de pelo menos 200 UFC's (Unidades formadoras de colónias) /cm² de raiz (Kerry, 2000). Vários ensaios foram já realizados para testar a eficácia do parasitismo de *P. chlamydosporia* sobre diferentes tipos de nemátodes parasitas, apresentando capacidade no controlo de diferentes espécies de *Meloidogyne*, tanto em vaso em condições controladas como em estufa (De Leij & Kerry, 1991; Hidalgo-Diaz et al., 2000; Kerry & Bourne, 1996; Verdejo-Lucas et al., 2003; Vieira dos Santos et al., 2019). No entanto, concluiu-se que o fungo não parasita nemátodes no estágio ativo, mas apenas ovos de NGR que se encontrem à superfície da raiz, sobretudo os que se encontram na fase inicial do desenvolvimento embrionário (Irving & Kerry, 1986; Kerry, 1995). Adicionalmente, foi possível concluir que o sucesso do fungo no estabelecimento no solo e, conseqüentemente, no seu controlo biológico pode ser muito variado. Os isolados de *P. chlamydosporia* com elevado

sucesso de parasitismo de ovos de nemátodes nem sempre são efetivamente bons colonizadores no solo e da superfície da raiz (Kerry & Bourne, 1996; Vieira dos Santos et al., 2019). Embora diferentes isolados possuam diferente tolerância à temperatura, quando estes são inoculados no ambiente são submetidos a fatores abióticos instáveis que podem influenciar o estabelecimento do controlo biológico (Irving & Kerry, 1986; Luambano et al., 2015; Magan, 2001; Vieira dos Santos et al., 2013). O tipo de solo é também um fator importante no estabelecimento do fungo, dado que os solos arenosos potenciam o seu estabelecimento após aplicação (Verdejo-Lucas et al., 2003).

De modo a potenciar o efeito do fungo contra as infestações de NGR, é necessário um profundo conhecimento sobre a ecologia dos três organismos – fungo, NGR e planta - e da sua relação tritrófica. Por exemplo, o parasitismo dos ovos pelo fungo pode ser afetado por vários fatores. Alguns ensaios efetuados sugerem uma relação entre as variáveis pH, azoto e carbono e a ação da enzima VCP1 – enzima envolvida no processo de infeção dos ovos de nemátodes (Ward et al., 2012). Segundo Vieira dos Santos et al., 2014, o sucesso de *P. chlamydosporia* como controlo biológico pode aumentar quando aplicado associado a outras técnicas que limitem a infestação inicial por populações de nemátodes, como por exemplo, *sprays* foliares com indutores de defesa das plantas. Tendo em conta o potencial da enxertia em porta-enxertos parcialmente resistentes contendo o gene *Mi* para prevenir a infeção das raízes na fase inicial de cultivo de tomateiro, perspetiva-se que esta também seja uma técnica que permita atuar em sinergia com a aplicação de *P. chlamydosporia* para o controlo de NGR.

6. Efeitos de pesticidas sobre *Pochonia chlamydosporia*

A aplicação de agentes de controlo biológico para a proteção da cultura de tomate contra o ataque de NGR deverá ser compatível com a aplicação de outros métodos de proteção da cultura contra o ataque de outras doenças e pragas. A partir de investigação e estudos anteriores tem-se conhecimento do potencial nefasto de alguns pesticidas sobre muitas espécies que habitam no solo, incluindo fungos e outros organismos. Foi possível aferir que os fungicidas, previsivelmente, eram os que apresentavam maior risco para fungos considerados como possíveis agentes de controlo biológico, em oposição aos herbicidas e nematodocidas, que não revelaram qualquer efeito significativo no crescimento do fungo à exceção do nematodocida Oxamil, em concentrações elevadas (Crump & Kerry, 1986). . No entanto, quando testado em microcosmos a compatibilidade

entre *P. chlamydosporia* e um dos fungicidas mais utilizados globalmente, Azoxistrobina, o ensaio demonstrou um possível decréscimo da sensibilidade do fungo com o tempo (Tobin et al., 2008).

Jacobs e Crump, (2003), testaram a compatibilidade de fungos nematófagos - *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* - com vários compostos químicos utilizados em infestações de nemátodes-de-quisto da batateira e, também, a sua habilidade para competir com outros fungos naturais do solo. Chegou-se à conclusão que o fungo *Purpureocillium lilacinum* era o que tinha o maior potencial como agente de controlo biológico podendo ser combinado com *P. chlamydosporia* a par de um fungicida e, se necessário, o nematocida Oxamil (Jacobs et al., 2003). Resultados semelhantes foram obtidos por Nasu et al., (2019), testando diferentes pesticidas com diferentes concentrações no crescimento de *P. chlamydosporia*. Inicialmente, verificou-se que o fungo era afetado pelos pesticidas influenciando o seu crescimento, no entanto, este viria a estabelecer-se no solo e nas raízes das plantas de soja e algodão, concluindo-se do ensaio que *P. chlamydosporia* pode ser aplicado em conjunto com alguns pesticidas sem comprometer a sua atividade enquanto agente de controlo biológico. Contudo, pesticidas como Tirame + Carbendazime (fungicida) e Imidaclopride + Tiodicarbe (inseticida) revelaram ter um efeito inibitório acentuado no crescimento de *P. chlamydosporia* em ensaios *in vitro*. Apesar de em condições de campo os resultados parecerem otimistas quanto à sobrevivência e estabelecimento do fungo no solo, é difícil apurar o impacto de compostos químicos no solo dada a sua complexidade biótica e abiótica (Munnecke, 1972).

7. Objetivos

Os objetivos deste trabalho estão interligados com os do projeto COCOON “Estratégias sustentáveis combinadas para a gestão de nemátodes das galhas radiculares em cultura protegida” -POCI-01-0145-FEDER-016611 (PTDC/AGR-PRO/3438/2014), sendo o trabalho parcialmente inserido neste projeto de investigação. Apesar dos estudos efetuados no fungo como agente de controlo biológico, pouco ainda se conhece sobre os efeitos de pesticidas em geral sobre o fungo *P. chlamydosporia* e a compatibilidade da sua aplicação. Por essa razão, este estudo ecotoxicológico pretende investigar, *in vitro*, os efeitos diretos de pesticidas habitualmente utilizados em agroecossistemas sob gestão convencional no crescimento e produção de clamidósporos do fungo *P. chlamydosporia*. Paralelamente, pretende-se avaliar o estabelecimento do fungo no solo em cultura protegida de tomateiro enxertado, sob gestão convencional, de modo

a entender-se de que forma este é afetado pelos variados fatores de produção, o que permitirá ainda perceber se os métodos de enxertia e controlo biológico podem ser utilizados de forma complementar.

Em suma, pretende-se não só atualizar a informação existente acerca dos efeitos de pesticidas na biologia de *P. chlamydosporia* mas, também desenvolver investigação aplicada com o objetivo de melhorar o seu sucesso no controlo biológico de NGR, quando associado à enxertia.

8. Hipóteses

Com este trabalho pretende-se avaliar as três hipóteses seguintes, relacionadas com os objetivos do trabalho acima expostos: i) os pesticidas comumente aplicados no cultivo de tomateiro em cultura protegida sob gestão convencional terão um efeito negativo no fungo; ii) por conseguinte, estes pesticidas afetarão negativamente o estabelecimento do fungo no solo e a sua capacidade parasítica sobre ovos de NGR; e iii) a conjugação do método de enxertia com o controlo biológico por *P. chlamydosporia* terá um efeito complementar mais bem-sucedido em comparação com a aplicação de cada um dos métodos isoladamente.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Ensaio de campo

1.1 Descrição da área de estudo

Para a realização do presente trabalho foi instalado e conduzido um ensaio de campo numa estufa de produção comercial de tomate situada na Apúlia (WGS84: 41.4758614, -8.7689483), no conselho de Esposende, Braga, entre janeiro e julho. A estufa era composta por três setores, cada um dividido em dois subsetores com rega independente, tendo o ensaio sido conduzido num só setor de rega, constituído por 6 linhas de plantação. O local do ensaio foi escolhido nesta zona da estufa, que se sabia estar infestada por NGR, uma vez que esta seria, de acordo com o produtor, a parte mais afetada por NGR. Os NGR foram identificados como pertencendo à espécie *Meloidogyne incognita* pela equipa do Projeto COCOON. Foi traçado o desenho experimental (Figura 2) para o ensaio, que decorreu nas 3 linhas centrais do setor. Cada linha continha 10 talhões com um total de 7 plantas à exceção do primeiro talhão com 15 plantas que servia de zona-tampão. A plantação teve um compasso de 40 cm, tendo um espaçamento de 2 m na entrelinha. Foram definidos 4 talhões em cada uma das três linhas, que corresponderam a três repetições de cada um de 4 tratamentos, distribuídos aleatoriamente. De modo a evitar uma possível contaminação de talhões adjacentes pelo fungo, os talhões foram distribuídos alternadamente, tanto na linha como entre linhas, tendo ficado todos os talhões em estudo intercalados por um talhão não avaliado, onde foram cultivados tomateiros cv. Coração de Boi enxertados na cv. Embajador.

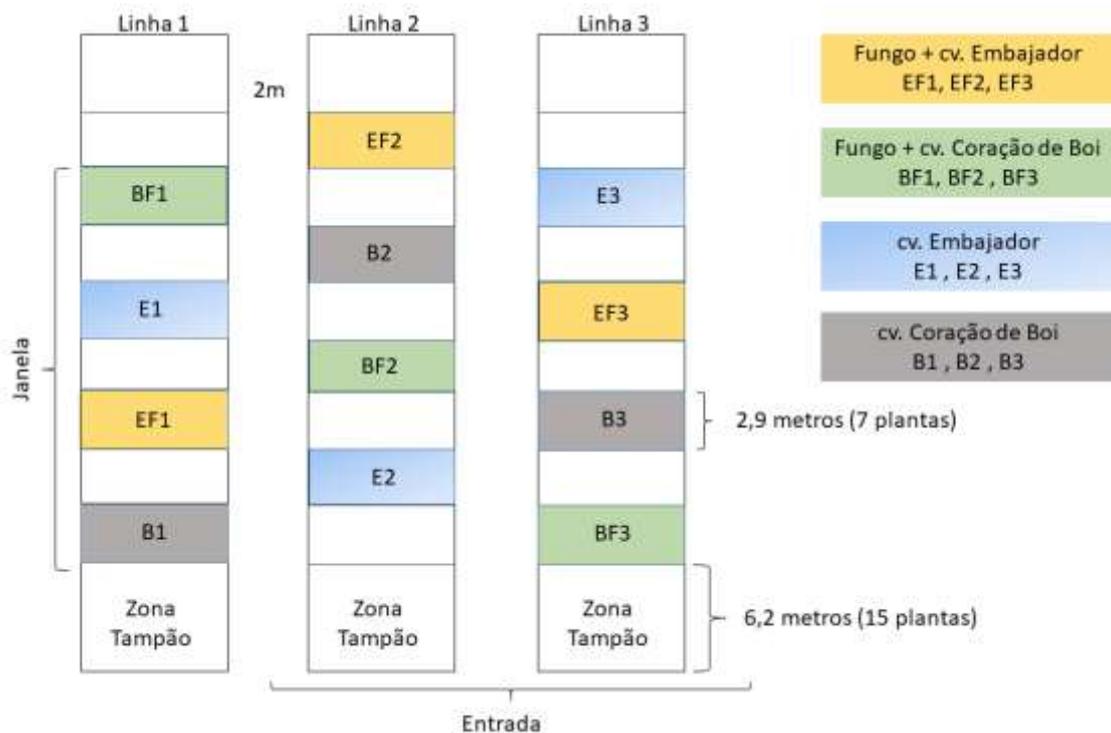


Figura 2 – Esquema do desenho experimental do ensaio conduzido na estufa de tomateiros, ao longo de três linhas, cada uma com com 12 talhões. As cores correspondem aos tratamentos B, BF, E e EF, indicados na Tabela 3.

Os quatro tratamentos em estudo (Tabela 3) corresponderam a combinações da inoculação com *P. chlamydosporia* com a enxertia das plantas no porta-enxerto comercial cv. Embajador (Rijk Zwaan). Todas as plantas enxertadas foram conduzidas a duas hastes, enquanto as não enxertadas, conduzidas a uma haste, foram plantadas em duplicado para manter o número de hastes por área (Figura 3).



Figura 3. Aspeto geral dos tomateiros, na estufa do ensaio, um mês após a plantação. A - tomateiro enxertado em porta-enxerto Embajador; B - cv. Coração de boi plantada em duplicado.

Tabela 3. Designações atribuídas aos diferentes tratamentos dos ensaios realizados.

Referência	Tratamentos
B	Tomateiro cv. Coração de Boi não-enxertado
E	Tomateiro cv. Coração de Boi enxertado em cv. Embajador
BF	Tomateiro não enxertado + <i>P. chlamydosporia</i>
EF	Tomateiro enxertado + <i>P. chlamydosporia</i>

1.2 Inoculação com *P. chlamydosporia*

O fungo *Pochonia chlamydosporia* foi aplicado como inóculo ao solo, no dia anterior à plantação dos tomateiros, nos talhões designados a esses tratamentos (BF e EF). Em cada um destes locais destinado à transplantação do tomateiro, foi retirada com o auxílio a uma sonda uma porção do solo, seguidamente colocado num saco de plástico, ao qual se misturou o fungo contido num tubo de 15mL com o inóculo constituindo uma concentração de 5000 UFC/g (total de 150×10^5 por alvéolo). Posteriormente, o saco foi remexido de modo a permitir distribuir uniformemente o fungo naquele volume de solo, tendo sido devolvido então ao alvéolo de onde tinha sido retirado e que iria receber a planta no dia seguinte.

Após dois meses, foi realizada uma segunda inoculação do solo com clamidósporos de *P. chlamydosporia* (Figura 4). O procedimento foi ligeiramente diferente, uma vez que as plantas já

estavam bem enraizadas nos talhões, pelo que, ao invés de aplicados diretamente no solo de cada planta como referido para a primeira aplicação, foi aberto um rego no solo paralelamente ao alinhamento das plantas do talhão, no qual foi espalhado o inóculo do fungo, tendo este rego sido depois tapado e regado com água.

1.3 Amostragem

A amostragem do solo da estufa foi iniciada no dia anterior à plantação (17 de janeiro) e posteriormente realizada mensalmente até ao final do ensaio (Figura 4). Antes da aplicação do fungo no solo, foram sempre retiradas três amostras aleatórias com o auxílio de uma pá de jardinagem, da zona central de cada talhão, num total de aproximadamente 500g de solo por talhão, a uma profundidade de 10cm. O solo retirado das subamostras de cada talhão foi depois misturado num balde, com a pá, de modo a homogeneizar a amostra composta, antes de ser colocado no respetivo saco de plástico, devidamente identificado, e guardado no frigorífico. O mesmo processo foi realizado para todos os 12 talhões, independentemente do tratamento.

1.4 Determinação da população do fungo no solo

Para se poder determinar a densidade da população de *P. chlamydosporia* no solo, foi retirada uma subamostra de solo de cada amostra composta de cada um dos 12 talhões e preparada uma diluição serial, misturando 1 g de solo numa solução de 9mL de WA 0,05% (Water Agar), agitando de modo a homogeneizar a solução. Em seguida, foi pipetado 1mL desta solução novamente para um novo volume de 9mL de meio WA a 0,05% obtendo uma diluição de 10^2 e, a partir deste último volume procedeu-se da mesma forma até atingir uma solução de diluição 10^3 . Após agitação, foram pipetados 200 μ L de cada diluição, 10^2 e 10^3 , para as placas de Petri de 9cm de diâmetro - duas repetições por diluição - com meio semi-selectivo (Kerry et al., 1993) e, com a ajuda de uma ansa de vidro foram espalhados pela placa. O meio semi-selectivo foi previamente preparado contendo 17g de meio CMA (Corn Meal Agar), 17,5g de NaCl e 75mg de corante Rose Bengal, por litro de água destilada. Após esta solução ter sido autoclavada, foram-lhe adicionados 3 mL de Triton X-100, 37,5g de cada um dos fungicidas, Tiabendazol e

Carbendazim, e 50mg dos antibióticos Sulfato de Estreptomicina, Cloranfenicol e Clorotetraciclina, por litro de meio. Finalmente, cada placa foi devidamente identificada por talhão, diluição e número de repetição, selada com parafilme e incubada a 25 °C no escuro. Após cerca de 2 semanas, quando as colónias já estavam visíveis nas placas de Petri, foi feita uma observação individual de cada placa para quantificar o número colónias de *P. chlamydosporia*. Todas as colónias que visualmente e/ou à lupa aparentavam ser de *P. chlamydosporia* foram isoladas em meio de WA a 0,8% que promove o rápido crescimento do fungo e a sua esporulação (Irving & Kerry, 1986). O isolamento foi feito na câmara de fluxo vertical com o auxílio de palitos de madeira previamente esterilizados, raspando primeiro nas colónias selecionadas e, a seguir, na placa com o meio WA a 0,8%. Após o processo ter sido efetuado para todas as colónias, as placas de Petri e as colónias foram referenciadas, novamente relativamente ao tratamento, talhão, diluição, repetição e data. Ao fim de 3 a 4 dias procedeu-se à identificação das colónias de *P. chlamydosporia* por observação das estruturas do fungo, ao microscópio estereoscópico e invertido. Ao mesmo tempo e de modo a evitar erros na identificação da espécie, as colónias foram sempre comparadas com a cultura do fungo utilizado em todo o ensaio, o isolado Pc-1a de *P. chlamydosporia*, o qual foi gentilmente cedido pela Doutora. M. Clara Vieira dos Santos, do Laboratório de Nematologia do Centro de Ecologia Funcional do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra.

1.5 Determinação da colonização da raiz e parasitismo dos ovos

Na amostragem final, que decorreu seis meses após início do ensaio, em 16 de julho, foram levantadas as plantas centrais de cada talhão, que tinham vindo a ser amostradas ao longo do ensaio: três tomateiros enxertados nos tratamentos E e EF, e seis tomateiros (três pares) não enxertados, que tinham sido plantados em duplicado, nos tratamentos B e BF. As raízes de cada par de tomateiros não enxertados foram processadas como uma só. Depois de ter sido eliminada a maior parte do solo aderido às raízes, estas foram rotuladas e colocadas em tabuleiros individualmente, sendo então visualizadas para atribuição do grau de danos, numa escala de 0-10, de acordo com a presença, quantidade, distribuição e tamanho das galhas induzidas por NGR (Bridge & Page, 1980). As raízes foram então guardadas em sacos de plástico e transportadas para o laboratório numa caixa refrigerada, e posteriormente armazenadas numa câmara frigorífica a 4 °C, até ao seu processamento.

No laboratório, as raízes foram lavadas com água da torneira para retirar o solo aderente e o excesso de humidade foi depois retirado com papel absorvente. Foi então registado o seu peso fresco, sendo depois cortadas em pedaços de cerca de 3 a 5 cm de comprimento, e separada uma amostra representativa de cada raiz com o seu peso determinado e em que se quantificaram visualmente as galhas e massas de ovos. Com a ajuda de uma pinça, foram recolhidas 5 massas de ovos de cada sistema radicular para avaliação simultânea do número de ovos por massa de ovos e do parasitismo pelo fungo. Uma outra amostra de 1 g de raízes finas foi separada de cada sistema radicular, tendo sido reservada para averiguação da colonização pelo fungo *P. chlamydosporia*, de acordo com a metodologia-padrão (Abrantes et al., 2002).

1.5.1 Colonização da raiz

As amostras de 1 g de raiz foram maceradas em 9 ml de WA (0,05%) em almofarizes esterilizados, na câmara de fluxo laminar vertical. Em seguida, 200 µL da suspensão obtida foram transferidos para placas de Petri contendo meio semi-seletivo para *P. chlamydosporia*. Foram preparadas três placas por cada amostra de raiz, que foram seladas e incubadas no escuro a 25°C, sendo depois contabilizadas as UFCs do fungo como descrito em 1.4 (Abrantes et al., 2002).

1.5.2 Parasitismo dos ovos

As cinco massas de ovos colhidas como descrito acima foram maceradas cuidadosamente em 1 mL de água destilada esterilizada, com a ajuda de um pistão de plástico, em microtubos de 1,5 mL de capacidade. A suspensão obtida foi transferida com o auxílio de uma micropipeta para placas de Petri contendo meio de WA a 0,8% com antibióticos. Foram preparadas três caixas de Petri por cada amostra de suspensão de ovos. As placas foram seladas com parafilme e colocadas no escuro, a 25 °C, durante 3 dias, sendo então observadas ao microscópio estereoscópico para determinação do número total de ovos e da percentagem de ovos parasitados pelo fungo (Abrantes et al., 2002)

1.6 Aplicação de fatores de produção

Após a plantação dos tomateiros foi realizada uma rega sem fertilização, durante dez minutos, seguido de um período de quinze dias sem rega para promover o enraizamento.

Quanto à nutrição vegetal, esta dividiu-se em duas fases: nutrição da fase vegetativa e nutrição da fase reprodutiva, sendo adicionados fertilizantes necessários às duas fases de desenvolvimento dos tomateiros. A primeira decorreu de 15 de fevereiro até 15 de março com rega programada de dez minutos a cada dois dias. Do dia 16 de março até dia 1 de abril a rega passou a ser realizada durante dez minutos, todos os dias, aumentando para 15 minutos até ao dia 15 de Abril. A nutrição na fase reprodutiva decorreu de 16 de Abril até 22 de junho com regas diárias durante 20 minutos.

Todas as aplicações de fatores de produção na cultura do tomate ao longo do ensaio foram registadas num caderno de campo (Anexo V) pelo produtor comercial, em que constam todas as aplicações, tanto de pesticidas como de outras formulações, bem como a data da sua aplicação. Todos os pesticidas aplicados no ensaio e respetivas informações sobre a aplicação constam na seguinte tabela (Tabela 4). O Eng. Davide Sousa, que monitorizou e desenhou o esquema de nutrição e de proteção da cultura na estufa do ensaio, forneceu amostras de cada um dos pesticidas utilizados. Não se conseguiu uma amostra do pesticida Belthirul em tempo útil, pelo que esta formulação foi excluída dos seguintes trabalhos. A calendarização de aplicações dos pesticidas ao longo do ensaio é indicada na Figura 4.

Tabela 4. Nome comercial, designação e teor da substância ativa, função, data e modo de aplicação e dose recomendada dos pesticidas aplicados no ensaio conduzido numa estufa de tomateiros, na Apúlia.

Nome comercial	Substância ativa (s.a)	Teor (%)	Função	Data de Aplicação	Dose rec.	Modo de aplicação
Vydate 10L	Oxamil	10	Nematodocida	17/jan	-	Rega
Cupramax	Cobre	6.9	Resistência Fungicida	11/fev	300mL/hL	Rega
Mesuroil 200	Metiocarbe	20	Inseticida	16/fev	0.5L/hL	Foliar
Spintor	Spinosade	48	Inseticida	20/fev 18/mar 27/abril	25mL/hL	Foliar
Boreal	Abamectina	1.8	Inseticida	06/mar	60mL/hL	Foliar
Melody	Cobre	40.6	Fungicida	18/mar	250g/hL	Foliar
Cobre	Iprovalicarbe	8.4				
Signum	Boscalide	26.7	Fungicida	27/mar	150g/hL	Foliar
	Piroclastrobina	6.7				
Azbany	Azoxistrobina	25	Fungicida	19/abril	80mL/hL	Foliar
Scala	Pirimetanil	40	Fungicida	27/abril	200mL/hL	Foliar
Steward	Indoxacarbe	30	Inseticida	10/maio	15g/hL	Foliar
Oberon	Espiromesifena	24	Inseticida	17/maio	60mL/hL	Foliar
Ridomil Gold	Cobre	14.2	Fungicida	07/jun	500g/hl	Foliar
R	Metalaxil-M	2				
Belthirul	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. kurstak	18	Inseticida	12/abril 07/jun 21/jul	0.5g/L	Foliar

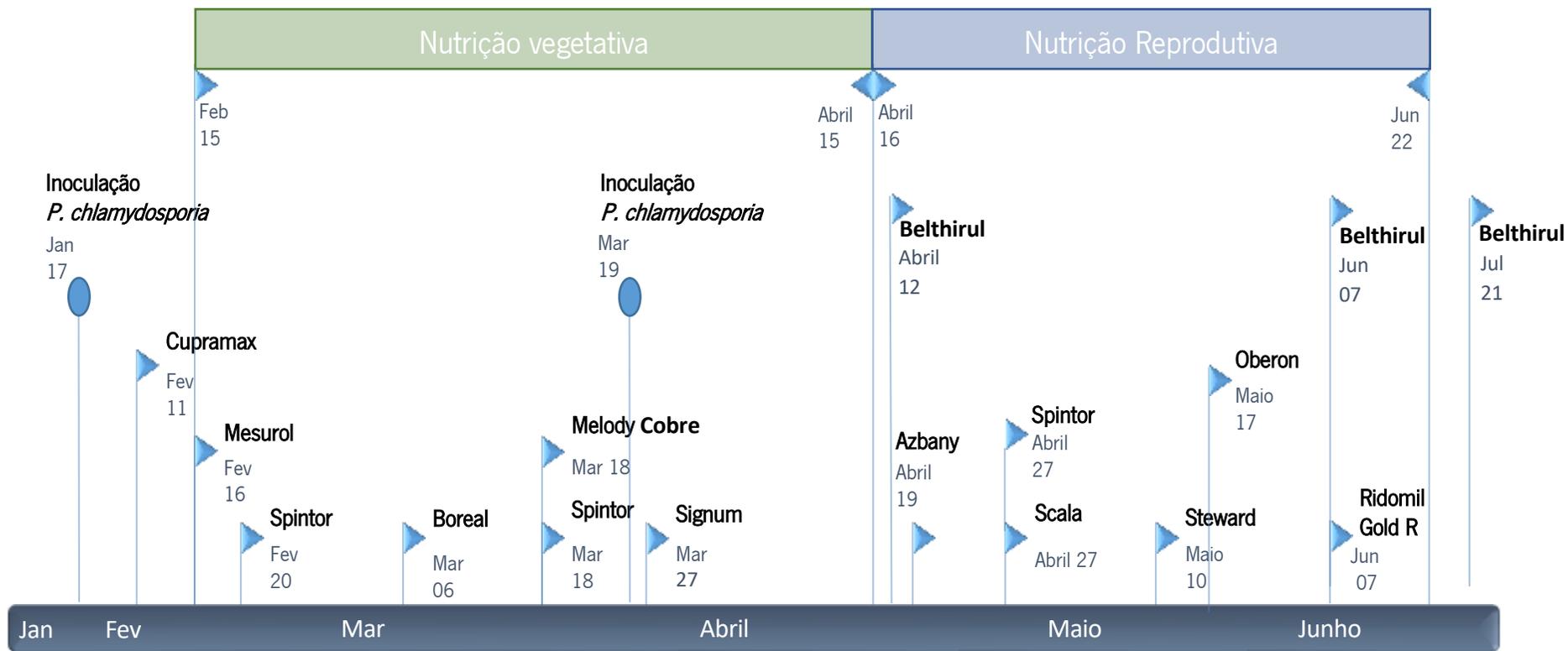


Figura 4. Calendarização das aplicações dos diferentes pesticidas, inoculações com *Pochonia chlamydosporia* e indicação dos períodos de nutrição vegetal ao longo do ensaio de campo na estufa de tomateiro onde decorrer o ensaio.

- Inoculação do solo com *P. chlamydosporia*
- ▶ Datas e períodos de aplicação de pesticidas e nutrição vegetal

2. Ensaio laboratoriais

2.1 Obtenção e manutenção do isolado de *P. chlamydosporia*

Os ensaios *in vitro* foram realizados com o isolado Pc-1a de *P. chlamydosporia* utilizado na inoculação do ensaio de campo. O isolado foi inicialmente multiplicado a partir da cultura inicial que consistiu numa placa de Petri inoculada com *P. chlamydosporia* em meio de PDA (Potato Dextrose Agar). Na câmara de fluxo vertical, com o auxílio de uma ponta de pipeta de 1000 µL foi perfurado o meio de agar da placa, em diversos pontos, na zona mais periférica da colónia – zona de maior viabilidade do fungo - e, com uma ansa de plástico foram retirados *plugs* com *P. chlamydosporia* para outras placas de Petri contendo meio de CMA a 1,7% (Corn Meal Agar), e 50 mg dos antibióticos Sulfato de Estreptomicina, Cloranfenicol e Clorotetraciclina por litro de água destilada estéril (Kerry & Bourne, 2002).

2.2 Crescimento radial

De modo a poder entender-se se os pesticidas usados no ensaio de campo provocam algum efeito direto no crescimento de *P. chlamydosporia* e, em caso afirmativo, em que concentrações, foi realizado um ensaio de crescimento radial. Para cada pesticida foram testadas três concentrações de 1, 10 e 100 ppm da substância ativa, tendo a testemunha sido preparada com água, com cinco repetições por tratamento. Para se a apurar as concentrações de substância ativa no meio a utilizar, foi sempre verificada a concentração referida na ficha técnica comercial do respetivo pesticida (Tabela 4).

À exceção da diluição necessária para atingir a concentração pretendida, a metodologia foi igual para todos os pesticidas que foram preparados em meio de CMA a 1,7% (Kerry & Bourne., 2002). Quatro frascos de capacidade 100mL correspondentes às três concentrações referidas e à testemunha, cada um deles com 50mL de meio CMA foram autoclavados, enquanto os antibióticos foram adicionados posteriormente em 30mL de água estéril, a cada frasco. Após o cálculo do volume de substância ativa necessário para cada concentração, cada um desses volumes foi pipetado para um tubo contendo 20mL de água destilada estéril e rotulado por concentração. Por fim, o conteúdo de cada um desses tubos foi adicionado ao devido frasco de

vidro com o meio, perfazendo cada um dos frascos 100mL de meio CMA + Antibióticos + Pesticida. Após ligeira agitação manual, foi plaqueado o meio num total de 20 placas de Petri correspondendo a 5 repetições por concentração. Foram preparadas, de igual modo, placas-testemunha, adicionando água, e não pesticidas, ao meio de cultura. Após a polimerização do meio, as caixas foram inoculadas a partir de uma cultura anterior proveniente de meio de CMA em laboratório, com um *plug* de 7mm com *P. chlamydosporia* na zona central da placa com o auxílio de uma ansa de plástico, à semelhança do procedimento referido em 1.2. De seguida, as placas foram incubadas a 25 °C no escuro, numa estufa, de onde foram retiradas apenas para a medição de dois diâmetros perpendiculares, em intervalos de cerca de 6 dias, até ao fim de 22 dias (Crump & Kerry, 1986).

2.3 Germinação de clamidósporos de *P. chlamydosporia* em meio com pesticidas

2.3.1 Ensaio de germinação de clamidósporos I

Foram obtidos clamidósporos de *P. chlamydosporia* que apresentassem viabilidade satisfatória (acima de 80%) de sete culturas antigas de meio de CMA, com idade superior a três meses. Nestas foram colocados volumes de cerca de 1,5mL de água destilada estéril, agitadas e, depois, raspadas ligeiramente, com o auxílio de uma ansa de plástico de modo a colocar os clamidósporos em suspensão. Esta foi recolhida com uma micropipeta e colocada num microtubo de 1,5mL. Após agitação no vórtex, foram pipetados 200 µL desta suspensão para uma câmara de Neubauer para serem contabilizados os clamidósporos mL⁻¹, ao microscópio, com uma ampliação de 10x. O processo foi repetido para todas as suspensões obtidas a partir das culturas antigas referidas.

Posteriormente, foi preparado meio de sorbose composto por 12g de agar, 2g de sorbose com 50mg de cada um dos antibióticos Sulfato de Estreptomicina, Cloranfenicol e Clorotetraciclina, por litro de água destilada (Kerry & Bourne, 2002). Os frascos contendo o meio de sorbose foram autoclavados e etiquetados de acordo com o tratamento. Posteriormente, na câmara de fluxo laminar, foram adicionadas a cada frasco uma pequena quantidade de água contendo os antibióticos e outra quantidade de água com pesticida, totalizando 60mL de meio de sorbose + antibiótico + pesticida a uma concentração de 100 ppm. Após ligeira agitação manual

de cada frasco, o meio foi então plaqueado, correspondendo a três repetições por pesticida, e devidamente etiquetado.

Depois de o meio estar polimerizado, foram pipetados cerca de 200 μL de solução de clamidósporos, após homogeneização no vórtex, e inoculados nas placas de Petri. Por fim, as placas foram incubadas a 25 °C, no escuro, tendo sido retiradas após 48h para contabilização de pelo menos 100 clamidósporos, tendo sido averiguada a germinação de cada para cálculo da percentagem de germinação (Kerry & Bourne, 2002).

2.3.2 Ensaio de germinação de clamidósporos II

Ao contrário do Ensaio 2.2 em que os clamidósporos foram obtidos de placas com meio CMA sem pesticidas, neste ensaio os clamidósporos foram obtidos de culturas do fungo em meio contendo pesticidas a uma concentração de 100 ppm de substância ativa. A germinação dos clamidósporos foi então avaliada em meio de sorbose sem pesticidas.

Em cada frasco referente a cada pesticida, foi colocado meio de CMA a 1,7% a que, depois de autoclavado, foi adicionada uma pequena quantidade de água contendo antibióticos e o pesticida a analisar, perfazendo 60 mL por frasco de meio de CMA com pesticida a uma concentração de 100 ppm. O meio foi então plaqueado e, após polimerização, foi inoculado com um *plug* de 7 mm com *P. chlamydosporia* proveniente de uma cultura de laboratório. O processo foi repetido para todos os pesticidas e todos os *plugs* de *P. chlamydosporia* tinham o mesmo tempo de vida na altura da transferência. Após 45 dias, o tempo necessário para as culturas perderem a elevada densidade de hifas e terem clamidósporos em abundância, foram extraídos os clamidósporos de três placas de cada pesticida onde foram contabilizados os clamidósporos mL^{-1} (segundo a metodologia em 2.3.1), e transferidos para um meio de sorbose sem pesticidas. Finalmente as placas, três por tratamento, foram então colocadas numa estufa a 25°C no escuro durante 48h tendo sido depois avaliadas para determinação da percentagem de germinação dos clamidósporos, à semelhança do ponto 2.3.1.

3. Análise estatística

A análise estatística foi efetuada no software estatístico R (versão 3.6.1, R Development Core Team 2019), através do ambiente de desenvolvimento integrado (IDE), Rstudio (versão 1.2.5019).

3.1 Resultados do ensaio de campo

A análise dos dados sobre o estabelecimento do fungo no solo foi realizada através de Modelos Mistos Generalizados (GLMM). Foi então escolhido o modelo que melhor se adequava através da análise de residuais, incluído na biblioteca “lme4” (Pinheiro et al., 2019), onde Tratamento e Mês de aplicação foram tratados como *fixed effects*, e o Talhão como *random effect*. Foi realizada também uma análise sobre os diferentes tratamentos através da biblioteca “lsmeans” (Lenth, 2016).

Os dados relativos às populações do fungo nas raízes foram analisados segundo modelos lineares generalizados (GLM). Inicialmente, foi utilizado um modelo de Poisson, no entanto os dados apresentavam uma dispersão elevada inflacionada pela quantidade de valores zero referentes à não deteção do fungo. Por essa razão, estes tiveram de ser tratados através de modelos ZIP & ZINB – *Zero inflated models*. As comparações entre os diferentes tratamentos foram obtidas através da biblioteca “emmeans” (Lenth et al., 2019).

Quanto aos dados de parasitismo, estes foram tratados igualmente através de GLMM. Foi realizada uma transformação da percentagem de parasitismo em $(\arcsin(\sqrt{X/100}))$ e, por fim, realizado um teste LSD para aferir as diferenças entre os tratamentos.

3.2 Resultados dos ensaios *in vitro*

De forma a tentar perceber o efeito dos pesticidas no crescimento radial e germinação de clamidósporos, os dados foram submetidos a análise através de GLMs. Ambos os ensaios de crescimento radial e germinação em meio com pesticidas foram submetidos a um GLM gaussiano, sendo que ambas as taxas de germinação foram transformadas em $(\arcsin(\sqrt{X/100}))$. De seguida, para avaliar o efeito de cada pesticida nas diferentes concentrações, foi realizada uma

comparação entre os pesticidas e uma comparação destes com a testemunha através do teste LSD presente na biblioteca “agricolae” (De Mendiburu, 2014).

Com os resultados obtidos foi possível calcular os valores de inibição através da fórmula de correção de Abbot $\left(\frac{A-B}{A}\right) \times 100$ (Abbott, 1925), em que A é o diâmetro da colónia da testemunha e B o diâmetro da colónia de *P. chlamydosporia* juntamente com o pesticida, ao fim de 22 dias. Por fim, os valores de inibição permitiram estimar os valores de Ec50 através de um modelo de análise dose-resposta no software R inserido na biblioteca “drc” (Ritz et al., 2015)

III. RESULTADOS

1. Ensaio de campo

1.1 Densidade de *P. chlamydosporia* no solo

Os resultados durante o ensaio nos talhões com os diferentes tratamentos (com e sem porta-enxerto) não revelaram diferentes densidades do fungo no solo ($p < 0,05$, Figura 5). Embora pareça ter havido uma tendência para um estabelecimento mais rápido do fungo nos talhões EF do que em BF a densidade do fungo foi muito variável, e o tempo foi o único fator significativo na quantidade de fungo no solo. Apenas cinco meses após a primeira inoculação e três meses depois da segunda inoculação foram registadas densidades significativamente mais elevadas do fungo no solo do que antes da plantação. O seu estabelecimento no solo foi superior após a segunda inoculação e o número de UFCs/g de solo decresceu progressivamente após a aplicação.

Nas amostras colhidas de solo da estufa, antes da plantação, não foram detetados isolados nativos de *P. chlamydosporia*. Da mesma forma, até ao final do ensaio, não foi detetada contaminação de *P. chlamydosporia* no solo dos talhões não inoculados.

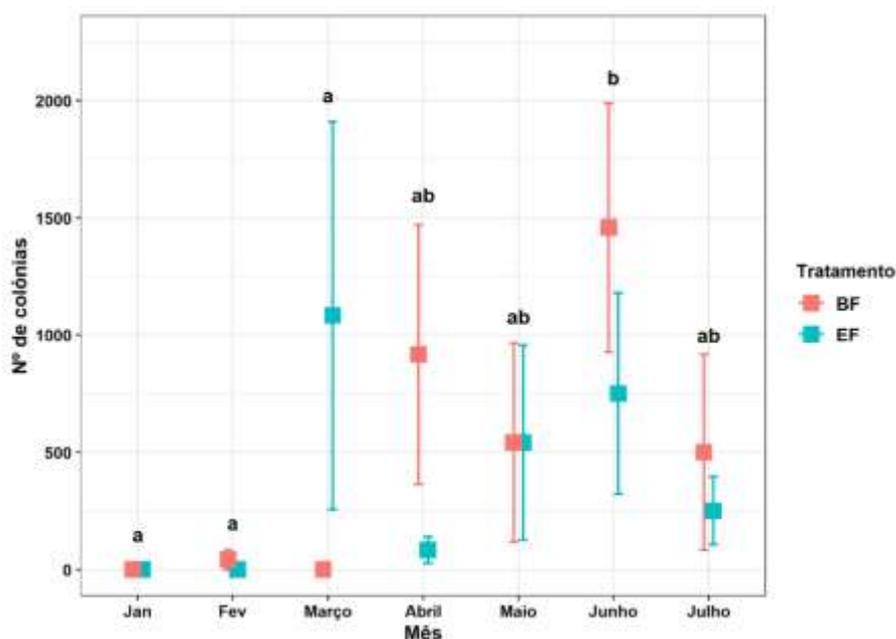


Figura 5. Número de UFC/g de solo nos diferentes tratamentos inoculados com *Pochonia chlamydosporia* (BF – tomateiro cv. Coração de Boi não-enxertado; EF – tomateiro cv. Coração de Boi enxertado em porta-enxerto cv. Embajador) no decorrer do ensaio. Os valores são média de 6 repetições e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas na densidade do fungo nos diferentes meses do ensaio ($p < 0,05$)

1.2 Densidade de *P. chlamydosporia* nas raízes

Os resultados relativos à densidade do fungo *P. chlamydosporia* nas raízes dos tomateiros do ensaio realizado (Figura 6) indicam que, à semelhança dos resultados apresentados no ponto anterior (1.1), não houve diferenças significativas no número de UFC/g de raiz nas plantas entre os tratamentos inoculados com o fungo (BF e EF).

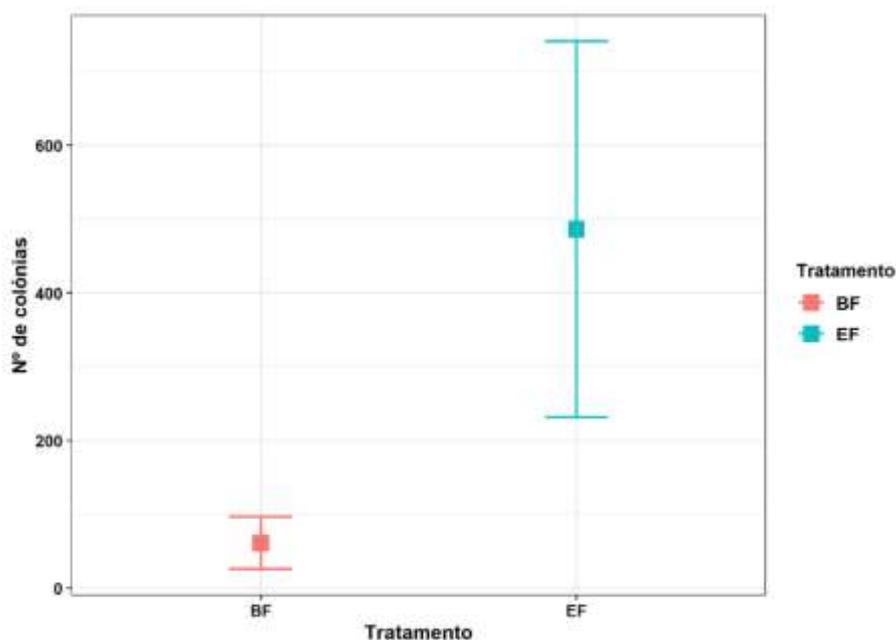


Figura 6. Número de UFC/g de raiz de *Pochonia chlamydosporia*, das raízes de plantas retiradas no final do ensaio, dos diferentes tratamentos nos talhões em que foi aplicado o fungo (BF – tomateiro cv. Coração de Boi não-enxertado; EF – tomateiro cv. Coração de Boi enxertado em porta-enxerto cv. Embajador). Os valores são a média de 6 repetições e as barras representam o respetivo erro padrão.

Nas raízes dos tomateiros recolhidas dos talhões sem inóculo não foram encontradas UFC de *P. chlamydosporia*, à semelhança do obtido nas amostras de solo. A avaliação do nº de colónias do fungo nos tomateiros dos tratamentos BF e EF revelaram valores médios de 61 e 486 UFC/g de raiz, respetivamente, o que sugere uma colonização superior da raiz por parte do fungo no tratamento EF. No entanto, a variação da densidade do fungo foi muito superior nas raízes dos tomateiros dos talhões do tratamento EF comparativamente à registada nos tomateiros dos talhões do tratamento BF. Neste último, não foi detetado qualquer UFC de *P. chlamydoisporia* em dois dos três talhões avaliados.

1.3 Parasitismo dos ovos

Com base na análise dos resultados do número total de ovos de nemátodes-das-galhas-radiculares e de ovos parasitados pelo fungo em 5 massas de ovos recolhidas de amostras das raízes no final do ensaio (Anexo I e Anexo II), foi possível calcular a percentagem de parasitismo nos diferentes tratamentos (Figura 7). Ocorreu parasitismo dos ovos de NGR das massas de ovos das raízes dos tomateiros colhidos nos talhões onde não foi inoculado o fungo (B e E), embora a níveis residuais, e significativamente menores, quando comparados com os dos tomateiros restantes tratamentos (EF e BF). As únicas diferenças significativas ocorreram entre os tratamentos com e sem inóculo. Nas raízes dos tomateiros dos tratamentos BF e EF, a média de percentagem de ovos parasitados foi de 29,22% e 26,97%, respetivamente.

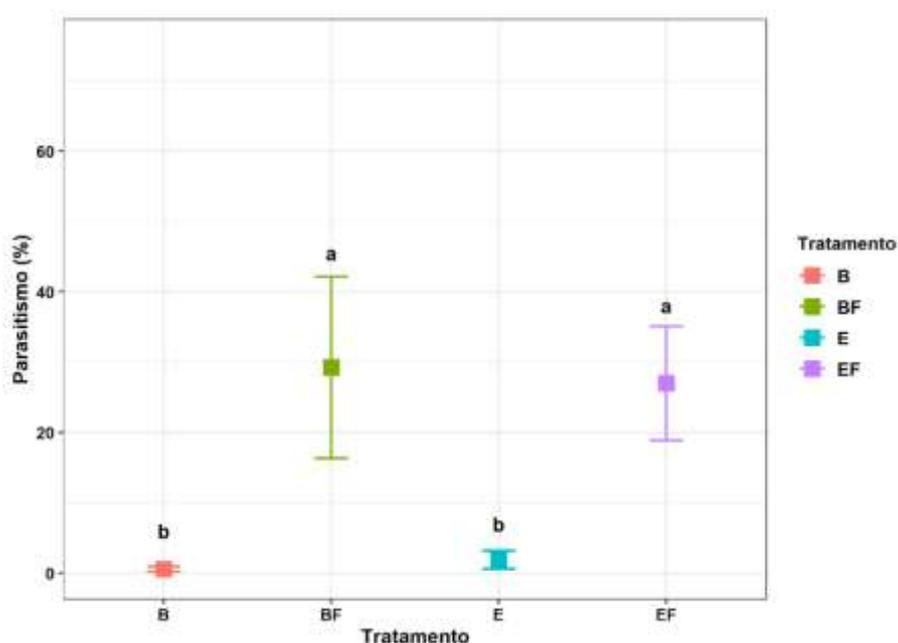


Figura 7. Percentagem de parasitismo de ovos de nemátodes-das-galhas-radiculares *Meloidogyne* pelo fungo *Pochonia chlamydosporia* nos diferentes tratamentos do ensaio B, E, EF e BF (B - tomateiro cv. Coração de Boi não-enxertado; E - tomateiro cv. Coração de Boi enxertado em porta-enxerto cv. Embajador ; BF – tomateiro cv. Coração de Boi não-enxertado aplicado com *P. chlamydosporia*; EF – tomateiro cv. Coração de Boi enxertado em porta-enxerto cv. Embajador). Os valores são a média de 6 repetições e as barras representam o respetivo erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$)

A percentagem de parasitismo parece ter sido influenciada pela disposição espacial dos talhões do ensaio, onde foi sendo possível verificar uma percentagem superior de parasitismo dos ovos nos talhões da terceira linha ($p < 0,05$, Figura 8). Enquanto as médias de percentagem de parasitismo na terceira fila do ensaio se situaram à volta de 50%, nas restantes duas filas do ensaio a média de percentagem de parasitismo não chegou a 20%. No que respeita à segunda repetição do tratamento BF, não foi possível recolher massas de ovos das raízes dos tomateiros em quantidade suficiente para a quantificação do parasitismo dos ovos.

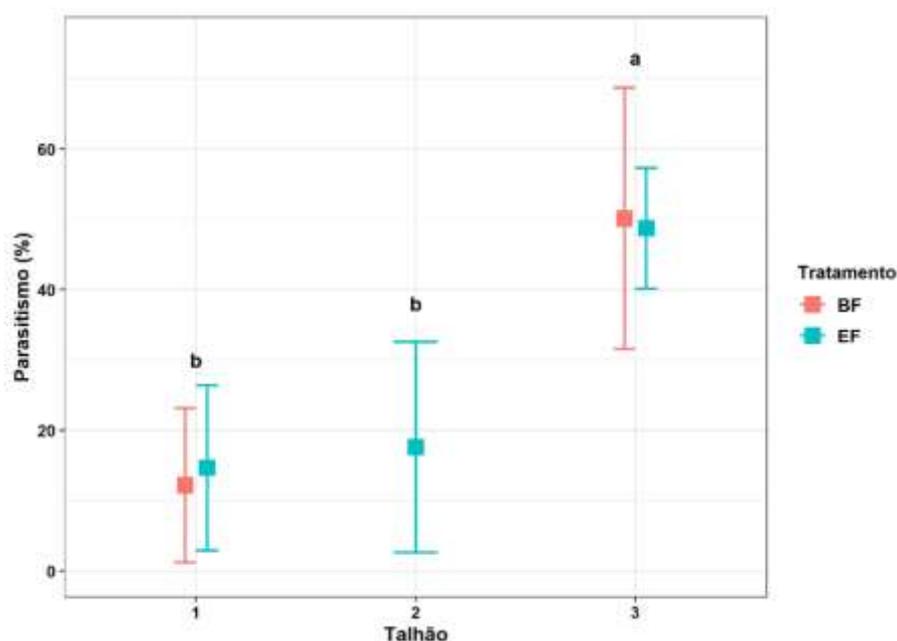


Figura 8. Percentagem de parasitismo de ovos de *Meloidogyne incognita* pelo fungo *P. chlamydosporia* nos tratamentos com o fungo (BF – tomateiro cv. Coração de Boi não-enxertado; EF – tomateiro cv. Coração de Boi enxertado em porta-enxerto cv. Embajador) nas diferentes linhas de plantação do ensaio. Os valores são a média de 2 repetições por talhão e as barras representam o respetivo erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

2. Efeito dos pesticidas no crescimento radial de *P. chlamydosporia*

Relativamente ao efeito dos pesticidas, aplicados durante o ensaio na estufa, sobre o crescimento do fungo *P. chlamydosporia*, no laboratório, os resultados obtidos demonstraram diferenças significativas da ação dos diferentes pesticidas no crescimento radial de *P. chlamydosporia* nas diferentes concentrações de substância ativa (s.a.) testadas. Em geral, o inseticida Mesurol 200 (s.a. metiocarbe) foi o único com efeito positivo no crescimento do fungo. Os pesticidas Oberon (s.a. espiromesifena) e Ridomil Gold R (s.a. cobre com metalaxil-m) não

revelaram efeitos significativos sendo que os restantes apresentaram um efeito negativo no crescimento do fungo ($p < 0,05$).

2.1 Fungicidas

Os fungicidas foram, entre os pesticidas testados, os que mostraram um impacto mais acentuado no crescimento de *P. chlamydosporia*, sobretudo em concentrações mais elevadas (Figura 9). O fungicida Ridomil Gold R foi o único sem efeito negativo significativo no crescimento radial, a 100 ppm. Os fungicidas Scala (s.a. pirimetanil) e Signum (s.a. boscalide com piroclastrobina) produziram um efeito semelhante no crescimento do fungo ($p > 0,05$) e foram os mais prejudiciais nesse parâmetro ($p < 0,05$). Dos restantes fungicidas, o Cupramax (s.a. cobre) foi o que produziu menor efeito significativo no crescimento de *P. chlamydosporia*, seguido dos fungicidas Azbany (s.a. azoxistrobina) e Melody Cobre (s.a. cobre com iprovalicarbe)

Numa concentração de 10 ppm s.a., o Cupramax demonstrou ter um efeito positivo significativo no crescimento do fungo enquanto que o Ridomil Gold R revelou não afetar o fungo ($p > 0,05$). Os restantes fungicidas produziram um efeito negativo no crescimento radial de *P. chlamydosporia*, no entanto, todos eles com intensidades variadas ($p < 0,05$). Assim, o Melody Cobre foi o que, causou menor efeito nocivo ($p < 0,05$), seguido pelo Azbany, Scala e, por fim, Signum.

A 1 ppm s.a. o Cupramax revelou ter um efeito estimulador do crescimento radial fungo ($p < 0,05$). Apenas os fungicidas Signum e Scala produziram um efeito negativo significativo no crescimento radial do fungo, tendo o Signum causado um efeito negativo mais acentuado ($p < 0,05$).

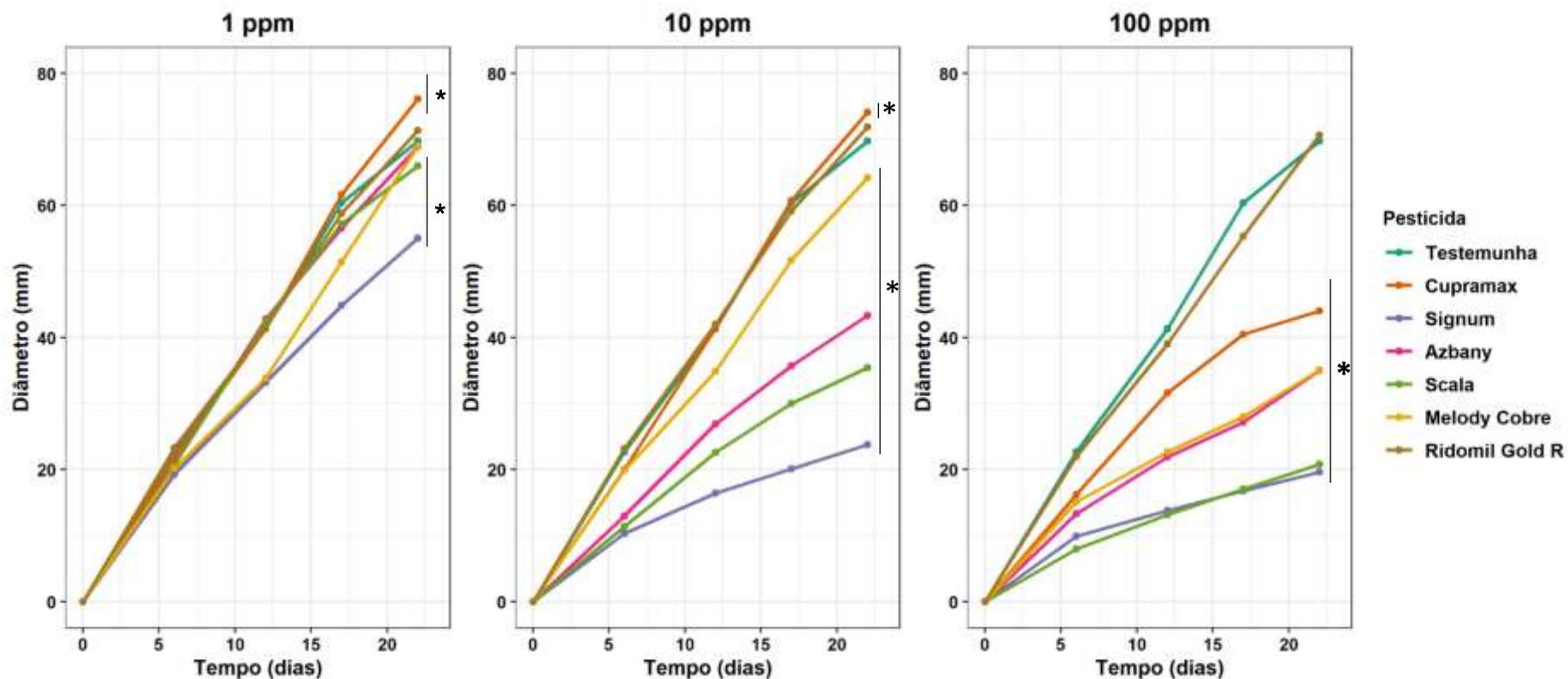


Figura 9. Efeito dos diversos fungicidas testados no crescimento radial de *Pochonia chlamydosporia* nas concentrações de 1, 10 e 100 ppm de substância ativa. Os valores apresentados são a média de 5 repetições. Pesticidas com * representam diferenças significativas relativamente à testemunha ($p < 0,05$).

2.2 Inseticidas

Em comparação com o efeito dos fungicidas descritos no ponto anterior (2.1), os inseticidas e o nematodocida (Vydate 10L) (Figura 10), demonstraram ter um efeito menos acentuado sobre *P. chlamydosporia*. A 100 ppm s.a., apenas os inseticidas formulados pelas s.a. metiocarbe e pela espiromesifena, MesuroI 200 e Oberon respectivamente, não afetaram significativamente o crescimento do fungo. No entanto, ainda sob a mesma concentração, os restantes inseticidas e nematodocida afetaram o crescimento do fungo com diferentes intensidades entre si ($p < 0,05$). A formulação Steward (s.a. indoxacarbe) seguida do nematodocida Vydate 10L foram os que produziram menor efeito negativo sobre o fungo relativamente aos inseticidas Spintor (s.a. spinosade) e Boreal (s.a. abamectina), tendo sido este último o que produziu o efeito negativo mais acentuado ($p < 0,05$).

A 10 ppm, o nematodocida Vydate 10L não produziu efeito negativo no crescimento radial do fungo, a par dos inseticidas Oberon e MesuroI 200. Dos inseticidas que reduziram significativamente o crescimento do fungo, a formulação Steward demonstrou ter um efeito menos nocivo ($p < 0,05$), não tendo havido diferenças significativas no crescimento do fungo entre Spintor e Boreal.

A 1 ppm, os únicos inseticidas com efeito negativo no crescimento de *P. chlamydosporia* ($p < 0,05$) foram o Boreal e Steward, não tendo, no entanto, havido diferenças significativas entre ambos. A formulação de metiocarbe evidenciou um efeito positivo significativo sobre o crescimento de *P. chlamydosporia*.

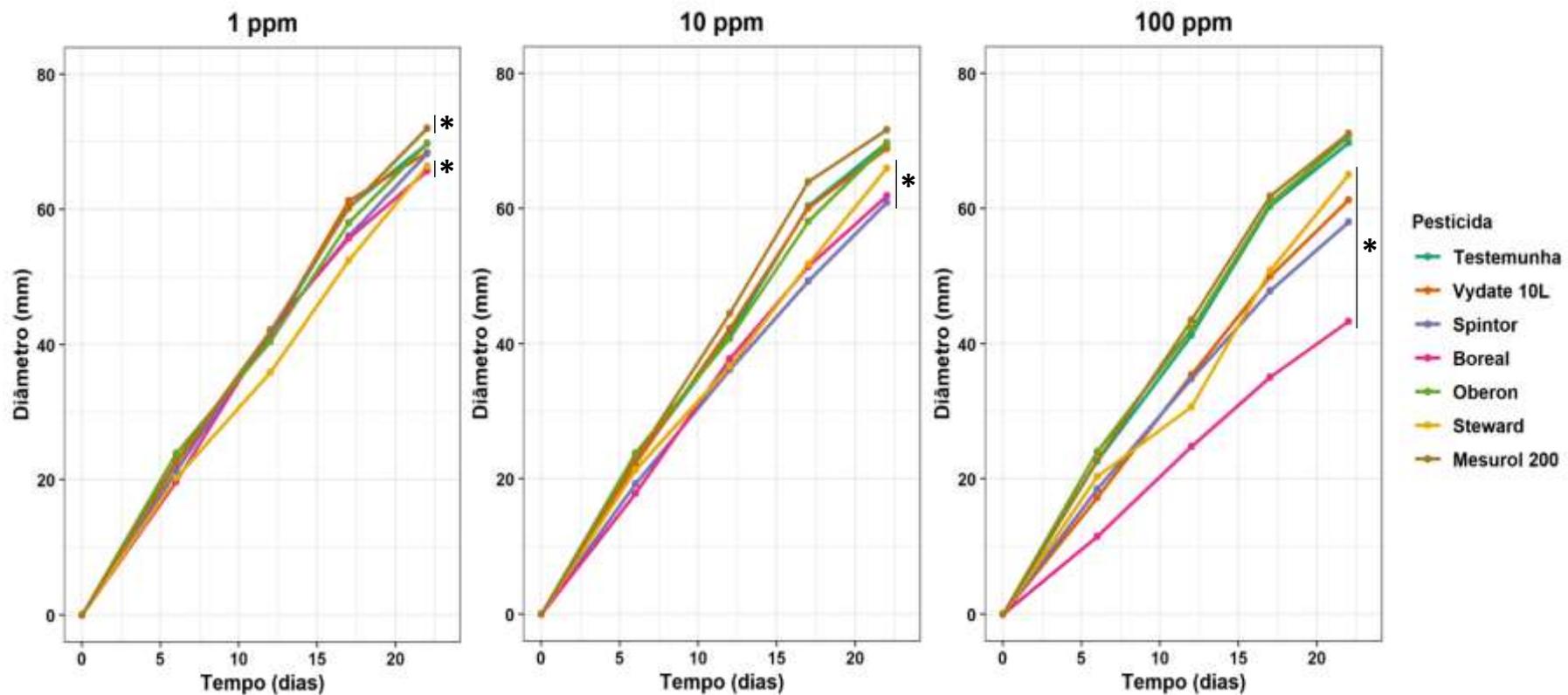


Figura 10. Efeito dos diversos inseticidas testados e um nematocida (Vydate 10L) no crescimento radial de *Pochonia chlamydosporia* nas concentrações de 1, 10 e 100 ppm de substância ativa. Os valores apresentados são a média de 5 repetições. Pesticidas com * representam diferenças significativas relativamente à testemunha ($p < 0,05$).

2.3 Inibição do crescimento radial do fungo

Os resultados do ensaio do ensaio anterior (2.1 e 2.2) permitiram calcular a percentagem de inibição do crescimento radial sob o efeito dos vários pesticidas (Tabela 5). Os pesticidas Ridomil Gold R (s.a. cobre com metalaxil-m) e Mesurol 200 (s.a. metiocarbe) foram os únicos que não induziram qualquer efeito inibitório ao longo das várias concentrações de s.a. O fungicida Cupramax (s.a. cobre) não provocou efeito inibitório em menores concentrações, porém, a 100 ppm induziu cerca de 58% de inibição no crescimento radial. Os seguintes pesticidas causaram uma inibição superior a 30% a 100 ppm, em ordem crescente: Boreal (s.a. abamectina), Azbany (s.a. azoxistrobina) Melody Cobre (s.a. cobre com iprovalicarbe), Cupramax (s.a. cobre), Scala (s.a. pirimetanil) e Signum (s.a. boscalide com piroclastrobina).

Tabela 5. Valores de inibição do crescimento radial das colónias de *Pochonia chlamydosporia* sob o efeito de cada pesticida a 1, 10 e 100 ppm de concentração de substância ativa, ao fim de 22 dias de exposição, e valores de Ec50 dos pesticidas com efeito inibitório dose-resposta.

Pesticidas	Percentagem de inibição			Ec50 (ppm)
	Concentração (ppm)			
	1	10	100	
Testemunha	0 cd	0 bcd	0 a	-
Fungicidas				
Azbany	1,18 d	37,89 g	49,80 f	44,46 *
Cupramax	-9,28 a	-6,28 a	58,45 e	121,79 ***
Melody Cobre	-0,40 d	7,92 e	49,66 f	101,82 ***
Ridomil Gold R	-2,27 bc	-3,13 ab	-1,26 a	-
Scala	5,34 f	49,23 h	70,17 g	11,91 **
Signum	21,04 g	65,86 i	71,89 g	5,05 *
Inseticidas				
Boreal	5,77 f	11,22 f	37,89 e	214,25 ***
Mesurol 200	-3,27 b	-2,84 bc	-1,98 a	-
Oberon	-0,11 cd	0,17 cd	-1,41 a	-
Spintor	2,04 de	12,65 f	16,74 d	-
Steward	4,76 ef	5,34 e	6,77 b	-
Nematodocida				
Vydate 10L	1,89 de	1,18 d	12,08 c	-

* Os valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Através dos valores de percentagem de inibição nas diferentes concentrações foi possível estimar os valores de Ec50 de 6 pesticidas para o tempo de exposição do ensaio (Tabela 5). Todos estes revelaram um efeito inibitório dose-resposta com um modelo de curva tipo sigmóide. Dos

seis pesticidas, cinco pertencem à classe dos fungicidas, tendo sido detetado um efeito dose-resposta em apenas um dos inseticidas, Boreal, para o qual foi obtido o valor mais alto de EC_{50} , 214,25 ppm. Dos fungicidas, o Melody Cobre e o Cupramax foram os únicos que demonstraram ter valores de EC_{50} superiores a 100 ppm. Os fungicidas Signum e Scala mostraram maior capacidade de afetar negativamente o crescimento do fungo, com valores de EC_{50} de 5,05 e 11,91 ppm, respetivamente, para uma exposição de 22 dias.

3. Efeito de pesticidas na germinação de clamidósporos de *P. chlamydosporia*

3.1 Germinação de clamidósporos - Ensaio I

A germinação de clamidósporos de *P. chlamydosporia* revelou diferenças perante a exposição aos diferentes pesticidas ($p < 0,05$, Tabela 6). Os resultados obtidos demonstraram que havia diferenças significativas da ação de todos os pesticidas na germinação de clamidósporos do fungo, relativamente à testemunha, à exceção dos inseticidas Mesurol 200 (s.a. metiocarbe), Spintor (s.a. spinosade) e Steward (s.a. indoxacarbe). As menores taxas de germinação de clamidósporos foram obtidas sob o efeito de fungicidas, tendo sido obtidos valores superiores a 50% de germinação sob o efeito de apenas uma destas formulações – Scala (s.a. pirimetanil). A taxa de germinação de clamidósporos em meio com o fungicida Azbany (s.a. azoxistrobina) foi de aproximadamente 46%, seguida de Signum (s.a. boscalide com piroclastrobina) – 10,80% -, tendo os restantes fungicidas resultado em taxas de germinação inferiores a 15%. O fungicida Cupramax (s.a. cobre) foi o que causou o efeito negativo mais pronunciado sobre a germinação de clamidósporos, não tendo os fungicidas Ridomil Gold R (s.a. cobre com metalaxil-m) e Melody Cobre (s.a. cobre com iprovalicarbe) mostrado diferenças significativas entre si. A exposição dos clamidósporos aos inseticidas e ao nematocida Vydate 10L (s.a. oxamil) resultou em maiores taxas de germinação em relação às obtidas sob efeito dos fungicidas, com a exceção do Boreal – 24,27%.

Tabela 6. Efeito de pesticidas a uma concentração de 100 ppm de substância ativa, e de uma testemunha, nos valores percentuais de germinação de clamidósporos de *Pochonia-chlamydosporia*.

Germinação de clamidósporos (%)*	
Testemunha	82,37 ± 2,63 a
Fungicidas	
Azbany	46,57 ± 2,22 d
Cupramax	0,33 ± 0,33 h
Melody Cobre	5,03 ± 0,75 g
Ridomil Gold R	4,80 ± 0,99 g
Scala	71,23 ± 2,73 bc
Signum	10,80 ± 2,91 f
InsecticidasNematodicida	
Boreal	24,27 ± 1,31 e
Mesuroil 200	77,87 ± 0,97 abc
Oberon	68,93 ± 1,96 c
Spintor	78,67 ± 6,75 ab
Steward	85,00 ± 2,00 a
Nematodicida	
Vydate 10L	70,53 ± 3,43 bc

* Os valores apresentados são a média de três repetições ± erro padrão. Valores seguidos de letras diferentes demonstram diferenças significativas (p<0,05).

3.2 Germinação de clamidósporos - Ensaio II

No segundo ensaio de germinação de clamidósporos, obtidos 45 dias após a inoculação das placas de Petri em meio que continha pesticidas, não foram recuperados clamidósporos de *P. chlamydosporia* nas placas com os pesticidas Signum, Cupramax e Melody Cobre, a uma concentração de 100 ppm de substância ativa (Tabela 7).

Tabela 7. Estimativa da densidade de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* mantido em meio de cultura com pesticidas a uma concentração de 100 ppm de substância ativa durante 45 dias, em suspensões obtidas de três placas de CMA (Corn Meal Agar).

	Nº de clamidósporos mL ⁻¹
Testemunha	1,40 x 10 ⁰⁵
Fungicidas	
Azbany	8,50 x 10 ⁰⁴
Cupramax	0
Melody Cobre	1,27 x 10 ⁰⁵
Ridomil Gold R	0
Scala	2,01 x 10 ⁰⁵
Signum	0
Inseticidas	
Boreal	1,03 x 10 ⁰⁵
Mesulrol 200	1,48 x 10 ⁰⁵
Oberon	4,90 x 10 ⁰⁴
Spintor	6,60 x 10 ⁰⁴
Steward	2,74 x 10 ⁰⁵
Nematodocida	
Vydate 10L	3,00 x 10 ⁰³

Foram encontradas diferenças significativas na taxa de germinação dos clamidósporos de *P. chlamydosporia* que foi possível recuperar entre os diferentes pesticidas após 45 dias (Tabela 8). Todos os pesticidas demonstraram ter um efeito negativo na germinação dos clamidósporos ($p < 0,05$), tendo sido o Boreal, Melody Cobre, Scala e Steward os que mais afetaram a germinação ($< 50\%$). Entre os restantes pesticidas, o Spintor foi o que produziu um efeito significativo menos negativo, seguido do Mesulrol 200 e Oberon, com efeito semelhante ($p > 0,05$). A formulação de abamectina, Boreal, foi a que produziu um maior impacto negativo na germinação dos clamidósporos. Dos fungicidas, o Azbany demonstrou ter sido o que permite a maior germinação dos clamidósporos, seguido pelo Melody Cobre e Scala, que não apresentaram diferenças significativas entre si. Os fungicidas Ridomil Gold R, Signum e o Cupramax não permitiram a formação de clamidósporos, motivo pelo qual, para estes, não foi calculada a taxa de germinação.

Tabela 8. Taxa de germinação de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* formados em meio de cultura com pesticidas a uma concentração de 100 ppm de substância ativa durante 45 dias.

Germinação de clamidósporos (%) *	
Testemunha	86,37 ± 1,18 a
Fungicidas	
Azbany	57,40 ± 2,05 c
Cupramax	S/ clamidósporos
Melody Cobre	18,67 ± 2,28 e
Ridomil Gold R	S/ clamidósporos
Scala	15,51 ± 0,70 ef
Signum	S/ clamidósporos
Inseticidas	
Boreal	36,16 ± 2,83 d
Mesulrol 200	57,02 ± 0,94 c
Oberon	55,38 ± 2,75 c
Spintor	69,41 ± 1,69 b
Steward	11,30 ± 2,20 f
Nematodocida	
Vydate 10L	67,54 ± 0,59 b

* Os valores apresentados são a média de três repetições e ± erro padrão. Valores seguidos de letras diferentes demonstram diferenças significativas ($p < 0,05$).

IV. DISCUSSÃO

Tendo sido analisada a abundância de *Pochonia chlamydosporia* no solo ao longo do ensaio de campo, bem como a colonização das raízes de plantas enxertadas e não-enxertadas e o parasitismo de ovos de *Meloidogyne incognita* no final do ensaio, foi possível determinar efeitos significativos e tendências relevantes. A dinâmica espacial e temporal da densidade do fungo e o seu sucesso no parasitismo dos ovos de *M. incognita*, também face à combinação das estratégias de controlo biológico com a enxertia em porta-enxertos parcialmente resistentes, pôde ainda ser relacionada com a aplicação de pesticidas durante ensaio. De facto, o estudo *in vitro* da toxicidade destes pesticidas a diferentes fases do ciclo de vida do fungo (crescimento vegetativo e germinação de clamidósporos) permitiu inferências sobre a sua compatibilidade com a aplicação de *P. chlamydosporia*. Estes resultados são interpretados e enquadrados no estado da arte da investigação nas secções que se seguem, permitindo inferir conclusões principais e responder às hipóteses colocadas, indicando ainda desafios e oportunidades de investigação futura.

1. Densidade, distribuição e atividade parasítica de *P. chlamydosporia* em condições de campo

O fungo estabeleceu-se no solo da estufa do ensaio tendo aumentado a sua densidade, contudo, foi recuperado em quantidades significativamente mais elevadas do que antes da primeira aplicação, apenas no terceiro mês após a segunda aplicação do fungo (Figura 5). A dificuldade no estabelecimento do fungo, refletida por um período em que a sua densidade não é detetada a um nível desejável no solo, resultando na necessidade de se recorrer a várias aplicações de inóculo, tem sido referida por outros autores em ensaios de campo e de vaso. Por exemplo, após a aplicação de diversas formulações granulares contendo *P. chlamydosporia* numa variedade de solos, antes da plantação de tomateiros, o fungo não foi recuperado do solo na maioria das amostras recolhidas após 10 a 25 dias (Stirling & Smith, 1998). Tanto em plantação de tomateiros no solo como de alface em vasos em condições de estufa, a densidade do fungo tem tendência a diminuir progressivamente após a primeira aplicação (Verdejo-Lucas et al., 2003; Viaene & Abawi, 2000). No entanto, já foi registado, em vários solos, que o fungo consegue estabelecer-se até três meses após aplicação em quantidades que lhe permitem efetuar um controlo biológico eficiente (Kerry et al., 1993). Por isso, múltiplas inoculações a intervalos regulares poderão ser essenciais para manter as populações de *P. chlamydosporia* no solo e nas raízes de tomateiro (Sorribas et al., 2003).

A dificuldade de estabelecimento do fungo no solo poderá ser atribuída a múltiplos fatores, nomeadamente fatores abióticos. Já foi indicado o efeito da temperatura no desenvolvimento do fungo *in vitro* (Vieira dos Santos et al., 2013) e o mesmo efeito foi verificado em condições de solo em estufas e vasos quando a temperatura no solo atingiu valores abaixo de 15 °C (Luambano et al., 2015; Verdejo-Lucas et al., 2003), o que compromete severamente o seu sucesso no controlo biológico de nemátodes. Neste estudo, junho foi o mês em que foi detetada uma densidade mais elevada no solo. Este mês, juntamente com maio e julho, foram os meses mais quentes de todo o ensaio (AccuWeather, 2019; IPMA, 2020). As temperaturas mais baixas ocorridas durante os primeiros meses do ensaio poderão não ter sido favoráveis ao crescimento do fungo, o que, juntamente com a segunda aplicação em março, poderá explicar a maior densidade do fungo assinalada após este mês.

Ainda assim, não é clara a razão da dificuldade na colonização, tendo possivelmente havido contribuição de vários outros fatores. O efeito de pesticidas no estabelecimento do fungo é raramente referido na bibliografia, embora seja reconhecido que a aplicação de uma formulação de oxamil não interfere com o seu estabelecimento no solo (Verdejo-Lucas et al., 2003). No entanto, formulações de azoxistrobina em ensaios de vasos dentro de estufa revelaram o contrário, tendo afetado a colonização do solo e raízes ($p < 0,001$), após 35 dias (Tobin et al., 2008). No decorrer do presente ensaio foram aplicados vários pesticidas, como o fungicida Cupramax (Figura 4), que foi aplicado 24 dias após a primeira inoculação do fungo. De acordo com os resultados de toxicidade apresentados (Tabela 6), este fungicida inibiu quase completamente a germinação de clamidósporos. Além deste, foram aplicados diferentes pesticidas, e outros fatores de produção, ao longo do ensaio, antes e após a 2ª aplicação do fungo (Figura 4), sendo previsíveis efeitos diferentes na atividade e no estabelecimento do fungo. A transição da nutrição vegetativa para a nutrição reprodutiva (Figura 4), que foi ditada pela própria fenologia das plantas, pode ter influenciado o estabelecimento do fungo, uma vez que diferentes tipos de nutrição podem ter diferentes composições, podendo assim influenciar o crescimento dos fungos (Hallsworth & Magan, 1994). Deste modo, não será de excluir a ação de fungicidas e de outros fatores de produção diretamente na germinação de clamidósporos, constituindo aqueles o inóculo de uso preferencial (Abrantes et al., 2002; Bourne & Kerry, 1999), e na prevenção do estabelecimento do fungo no solo em condições de campo, em gestão convencional.

Mesmo em condições em que o fungo se estabelece no solo, poderá ser encontrada alguma variação na sua densidade, o que poderá refletir uma heterogeneidade espacial na colonização e

estabelecimento do fungo no solo, e que resulta numa distribuição espacial agregada (Atkins et al., 2003; Tzortzakakis, 2009). Não são de excluir, no entanto, dificuldades técnicas na sua quantificação como o baixo volume das amostras (considerando-se 1g como representativo de um grande volume de solo no campo) e a contagem de UFC, que podem representar unidades vegetativas ou reprodutivas, não havendo uma relação clara entre o número de UFC e a abundância e o estado fisiológico ou atividade do fungo (Viaene & Abawi, 2000).

Embora o estabelecimento do fungo no solo tivesse variado temporalmente durante o ensaio, não foram registadas diferenças significativas na sua densidade nos diferentes tratamentos BF e EF no solo (Figura 5). No final do ensaio, também não foram detetadas diferenças na colonização da raiz entre os vários tratamentos (Figura 6). A parte radicular nos tratamentos BF e EF pertencia a plantas de cultivares diferentes (Coração de Boi e Embajador, respetivamente) além de que a cv. Embajador poderá representar um híbrido interespecífico de tomateiro. Assume-se assim uma produção diferente de exsudatos radiculares, que poderia ter condicionado o nível populacional do fungo que as diferentes plantas podiam suportar, afetando a colonização da rizosfera pelo fungo (Bourne & Kerry, 1999; Kerry & Bourne, 1996), porém, isso não aconteceu neste trabalho. Neste estudo não foi avaliado o efeito provocado pela própria enxertia, que não deverá ser descartado. Este efeito em si é comumente antecipado, tendo sido já encontradas moléculas de microRNA características de plantas auto-enxertadas de melancia, comparativamente a plantas de melancia não-enxertadas ou enxertadas em porta-enxertos de outras espécies. Estas moléculas regulam a expressão de genes envolvidos em vários processos, incluindo resposta a stresses (Liu et al., 2013). O processo de enxertia também pode repercutir-se na flora microbiana endófito de raízes de tomateiro: em ensaios de campo, a composição da comunidade de bactérias diferiu entre raízes de plantas auto-enxertadas, e de plantas não-enxertadas ou enxertadas em porta-enxertos híbridos como a cv. Maxifort. É assim sugerido um efeito da enxertia em si na interação das plantas com organismos da rizosfera, que os autores atribuem à lesão de tecidos provocada pela enxertia (Poudel et al., 2019). Assim, para excluir o efeito da enxertia nas interações tomateiro-*P. chlamydosporia*, seria necessário ter tido um tratamento adicional de tomateiro cv. Coração de Boi auto-enxertado, um tratamento que é, aliás, aconselhado nos ensaios que pretendam avaliar efeitos da enxertia de hortícolas (Guan et al., 2012).

Embora não tenham sido encontradas diferenças significativas entre os tratamentos BF e EF na colonização da raiz (Figura 6), foi encontrada uma grande heterogeneidade na distribuição do fungo nas raízes de tomateiros de linhas diferentes, na zona do ensaio. Além disso, é de

evidenciar que foi registada uma abundância ligeiramente superior no tratamento EF da primeira linha próximo da janela da estufa (Figura 2). Como os talhões foram distribuídos aleatoriamente numa dimensão espacial, isto sugere que o fungo pode ser sensível a outros fatores como a humidade do solo ou às diferenças na intensidade da luz que possam ter ocorrido ao longo deste setor na estufa (Bourne et al., 1996). Também, as diferentes densidades de nemátodes ao longo do setor da estufa também poderão explicar a heterogeneidade na distribuição do fungo. Em estudos referidos por outros autores, quando avaliaram semanalmente a abundância de UFC de *P. chlamydosporia* na rizosfera de tomateiros com adição de diferentes quantidades de J2 de *M. incognita* verificaram uma interação significativa ($p < 0,01$) entre a planta hospedeira e a presença de nemátodes na abundância do fungo (Bourne et al., 1996). Como no nosso trabalho esta relação não foi significativa, pode significar, portanto, que resulta da interação de outros fatores. A maior parte dos pesticidas usados no decorrer do nosso ensaio (Tabela 4) foram aplicados via foliar na cultura e, tendo alguns um efeito sistémico na planta, podem afetar a colonização das raízes por parte do fungo, sendo esta uma característica chave de *P. chlamydosporia* para o seu sucesso como controlo biológico, a par da capacidade de parasitar ovos de NGR (Abrantes et al., 2002; Kerry, 1997).

A capacidade parasítica de *P. chlamydosporia* de ovos de NGR não diferiu entre os tratamentos inoculados BF e EF (cv. Coração de Boi e porta-enxerto cv. Embajador). Uma vez que as plantas de ambos os tratamentos revelaram ter uma capacidade semelhante no suporte de UFC de *P. chlamydosporia*, isso poderá explicar os resultados obtidos uma vez que há registo de a colonização da raiz e o parasitismo de ovos de NGR estarem relacionados. Foi verificada *in vitro* uma correlação linear positiva ($p < 0,01$) entre a colonização da raiz e o parasitismo dos ovos pelo mesmo isolado utilizado no nosso trabalho (Vieira dos Santos et al., 2019). Também ficou demonstrado, em ensaios realizados em câmara climática e em estufa, com dois isolados diferentes, que após múltiplas aplicações do fungo o isolado com maior abundância na rizosfera acabava por parasitar significativamente mais ovos em tomateiro. No entanto, o oposto está também referido, quando as galhas são muito grandes e numerosas, uma vez que muitas das massas de ovos acabam por ficar no interior do tecido das galhas acabando este por servir de proteção física contra o parasitismo pelo fungo (de Leij & Kerry, 1991; de Leij et al., 1992).

Apesar da percentagem de ovos parasitados pelo fungo ter sido semelhante entre os tratamentos BF e EF, foi encontrada uma diferença na quantidade de massas de ovos por grama de raiz, em que os tratamentos com cv. Coração de Boi revelaram valores inferiores ($p < 0,05$,

Anexo III). No entanto, o tratamento da cv. Coração de Boi aplicada com *P. chlamydosporia* é o que, em média, se afigura com um número de ovos por grama de raiz superior (Anexo IV). Este resultado poderá explicar-se pelo facto de que havendo menos fêmeas haverá uma menor competição pelos recursos na planta, traduzindo-se numa fecundidade superior. Geralmente o fenómeno em que as massas de ovos têm menor número de ovos ocorre em cultivares mais resistentes em relação a cultivares mais suscetíveis a nemátodes (Stirling, 1979).

Embora não tivesse sido detetado *P. chlamydosporia* nem no solo nem nas raízes das plantas dos tratamentos em que o fungo não foi aplicado (B e E), o fungo foi detetado nesses tratamentos no ensaio de determinação de parasitismo (Figura 7), porém a níveis vestigiais que podem ser resultado de contaminação ou da presença em baixa densidade de um fungo nativo. De facto, ambos os casos podem ocorrer simultaneamente. Já foram testadas e caracterizadas várias componentes e propriedades de diferentes isolados portugueses associados a espécies de *Meloidogyne* (Vieira dos Santos et al., 2019). Isto indica que vários isolados nativos do fungo podem ocorrer naturalmente em condições de estufa no País, mesmo que em baixa quantidade. Pela metodologia utilizada neste trabalho na determinação da densidade do fungo (descrita em II: 1.4), o limite de deteção será de uma UFC no plaqueamento da concentração superior da diluição serial, que corresponde a 500 UFC/g de solo. Um fungo nativo com uma densidade no solo inferior a este limite não teria sido detetado. Por isso, estes fatores aliados à aplicação dos diversos pesticidas, juntamente com fatores bióticos e abióticos, podem afetar os valores obtidos de UFC de *P. chlamydosporia* não só na etapa do parasitismo, apesar de ser crucial no seu desempenho de supressão de nemátodes.

O desempenho de *P. chlamydosporia* enquanto agente de controlo biológico em condições de gestão convencional, além das características intrínsecas de cada isolado, parece depender fundamentalmente de um processo contínuo dividido em várias etapas, que se inicia no seu estabelecimento no solo até à colonização das raízes e, por fim, no parasitismo de ovos de NGR. Estes processos, como descrito anteriormente, podem ser afetados por diferentes fatores como a aplicação de produtos fitofarmacêuticos que foram aplicados no decorrer deste ensaio. Por isso, os pesticidas poderão afetar o desempenho de *P. chlamydosporia* mais ou menos diretamente, uma vez que afetando o estabelecimento do fungo no solo estarão a comprometer as subsequentes etapas do processo. Por essa razão, estudos ecotoxicológicos de pesticidas e outras formulações são de extrema importância na seleção de estratégias que permitam a maior eficiência do fungo *P. chlamydosporia* como agente de controlo de NGR.

2. Efeito ecotoxicológico de pesticidas sobre *P. chlamydosporia*

No presente estudo, o contato do fungo *P. chlamydosporia* com os pesticidas testados provocou uma diminuição da sua viabilidade como agente de controlo biológico, tanto no crescimento radial como na germinação de clamidósporos. Contudo, no primeiro apenas alguns pesticidas se manifestaram prejudiciais quando adicionados em concentrações mais elevadas, estando de acordo com o anteriormente reportado na bibliografia sobre os possíveis efeitos na atividade e fisiologia do fungo (Crump & Kerry, 1986; Jacobs et al., 2003; Nasu et al., 2019; Tobin et al., 2008).

Os pesticidas tiveram um efeito significativo no crescimento radial de *P. chlamydosporia*, tendo variado na sua intensidade de acordo com a formulação e a concentração de substância ativa (s.a.) testada no ensaio. A uma concentração de 100 ppm de s.a., os pesticidas afetaram o crescimento radial, à exceção do fungicida Ridomil Gold R (s.a. cobre com metalaxil-m) e dos inseticidas Oberon (s.a. espiromesifena) e Mesurol 200 (s.a. metiocarbe). Porém, à concentração mais baixa testada no ensaio, 1 ppm, apenas quatro pesticidas revelaram ter efeito negativo ($p < 0,05$): os fungicidas – Signum (s.a. boscalide com piroclastrobina) e Scala (s.a. pirimetanil) – e os inseticidas Boreal (s.a. abamectina) e Steward (s.a. indoxacarbe).

Poucos pesticidas e/ou s.a. testados neste trabalho foram profundamente investigados para determinação de efeitos na atividade biológica de *P. chlamydosporia* e, conseqüentemente, na sua eficiência como agente de controlo biológico. A formulação de oxamil, nematodocida Vydate 10L, demonstrou causar um efeito negativo no crescimento do fungo, porém apenas na concentração de 100 ppm de s.a. O efeito do oxamil já tinha sido observado anteriormente *in vitro*, sendo registado igualmente um efeito negativo ($p < 0,05$) apenas a 100 ppm mas não a concentrações menores como as aplicadas no campo (Tabela 4) (Crump & Kerry, 1986; Jacobs et al., 2003). Da pesquisa bibliográfica percebe-se um maior conhecimento atual sobre os efeitos do oxamil no crescimento de *P. chlamydosporia*, que visam estudar a sua compatibilidade em condições de ataque de NGR às culturas. No entanto, a cultura do tomate sob gestão convencional é fortemente atacada por múltiplas pragas e doenças, evidenciando-se a traça-do-do tomateiro e o míldio. O ataque de míldio é historicamente uma preocupação dos produtores de tomate, pelo que a aplicação de fungicidas é inevitável.

O crescimento radial de *P. chlamydosporia* foi significativamente inibido em meio de cultura pela ação de fungicidas ($p < 0,05$), tendo algumas destas formulações produzido efeitos significativos mais acentuados que outras. Embora o cobre seja um micronutriente essencial às células vivas, este pode ter igualmente propriedades tóxicas (Cervantes, 1994), e por isso é amplamente utilizado como fungicida. Por essa razão, seria de esperar um efeito negativo no crescimento do fungo por parte das seguintes formulações contendo cobre: Ridomil Gold R (14,2% Cobre + 2% Metalaxil-M), Melody Cobre (40,6% cobre + iprovalicarbe) e Cupramax (6,9% cobre). No entanto, o facto de os pesticidas com cobre na sua composição não terem causado inibição do crescimento de *P. chlamydosporia* a baixas concentrações, ou, no caso do Ridomil Gold R, até a 100 ppm, pode dever-se à resistência inerente do fungo à exposição ao cobre. Num ensaio *in vitro* no qual foi avaliada a tolerância de fungos ao cobre, houve crescimento radial de colónias de *P. chlamydosporia* a uma concentração de cobre até 200 ppm, tendo sido calculada uma Ec_{50} de 174 ppm de cobre (Bååth, 1991). Estes valores acabam por ser semelhantes aos obtidos no presente estudo, uma vez que o valor estimado de Ec_{50} para o Cupramax e Melody Cobre foi de 121,79 e 101,82, respetivamente, além de que a concentrações mais baixas, de 1 e 10 ppm, o primeiro demonstrou até ter um efeito ligeiramente benéfico no crescimento do fungo ($p < 0,05$). Contudo, tal pode dever-se também mais a um efeito para-morfológico destes pesticidas, que não foi confirmado, mas que poderia ter atuado na redução da frequência de ramificação em vez de aumentar o crescimento, o que permitiria ao fungo expandir radialmente com maior sucesso com um menor investimento em biomassa (Jacobs et al., 2003, Trinci, 1984). No entanto, apesar das formulações referidas partilharem cobre como s.a., não antecipavam necessariamente efeitos semelhantes, uma vez que haverá componentes distintos nas suas formulações. Num ensaio semelhante para avaliar o efeito de um pesticida com cobre, o crescimento de *P. chlamydosporia* foi mais afetado do que quando comparado neste ensaio com o Cupramax (Ceiro et al., 2015). Por exemplo, o fungicida Melody Cobre tem na sua constituição, para além do cobre, também a s.a. iprovalicarbe (8.4%), o que lhe poderá ter concedido um potencial negativo mais elevado no crescimento do fungo ($p < 0,05$).

Apesar de um efeito mais acentuado dos fungicidas em relação às restantes classes de pesticidas, os que afetaram mais diretamente o crescimento de *P. chlamydosporia* foram os fungicidas Signum e Scala tendo inibido o crescimento de *P. chlamydosporia* em todas as concentrações testadas ($p < 0,05$, Figura 9 e Tabela 5). Numa concentração de 100 ppm de s.a., ao fim de 22 dias, ambos induziram uma inibição do crescimento em 71,89.16% e 71,89%, com

valores de Ec_{50} à volta dos 12 e 5 ppm, respetivamente. Estes dois valores representam os valores mais próximos da realidade de campo (Tabela 4), sendo que para os restantes apenas o fungicida Azbany, na concentração próxima dos 50 ppm, provoca 50% do efeito máximo. Apesar de as caldas com pesticidas Signum e Scala terem uma concentração de s.a. de 150 e 200, ppm respetivamente (Tabela 4), estas concentrações não refletem a encontrada no solo tendo em conta a fraca progressão que os pesticidas têm nesta matriz, especialmente no verão (Crump & Kerry, 1986). No entanto, dos pesticidas para os quais foi possível estimar o valor de Ec_{50} tendo em conta a inibição induzida ao fim de 22 dias, o Boreal é o único na categoria dos inseticidas. Ainda assim, os inseticidas são necessários para suprimir certas pragas importantes como a traça-do-tomateiro, logo, o seu efeito em *P. chlamydosporia* não pode ser descartado.

Os inseticidas não produziram, naturalmente, um efeito tão acentuado como os fungicidas mas também revelaram afetar *P. chlamydosporia* ($p < 0,05$). As formulações Boreal (s.a. abamectina) e Steward (s.a. indoxacarbe) foram os únicos inseticidas que afetaram significativamente o crescimento radial de *P. chlamydosporia* em todas as concentrações. Em ensaios conduzidos *in vitro*, a s.a. abamectina revelou ter efeitos negativos no crescimento do fungo a 10 ppm ($p < 0,05$), embora não tendo causado inibição total (Nasu et al., 2019). Deste modo, os resultados do presente trabalho no crescimento de *P. chlamydosporia* sugerem a possibilidade de alternativas viáveis entre os pesticidas que visem uma aplicação conjunta. No entanto, apesar de o meio de inóculo preferencial no solo ser à base de clamidósporos, não existe um portfólio de investigação aprofundado sobre um possível efeito de pesticidas nesta fase da biologia de clamidósporos de *P. chlamydosporia*.

O ensaio de germinação de clamidósporos de *P. chlamydosporia* em meio com pesticidas numa concentração de 100 ppm de substância ativa (ver II, 2.1) permitiu constatar que quase todos os pesticidas afetam a sua germinação ($p < 0,05$). Assim, os pesticidas podem comprometer seriamente o estabelecimento do fungo no solo, uma vez que a sua aplicação com clamidósporos é o método mais eficiente (Kerry et al., 1993; Mauchline et al., 2002). Os únicos pesticidas que não mostraram efeito ($p > 0,05$) foram os inseticidas Steward, Spintor e o Mesurol 200 (s.a. metiocarbe), sem diferenças significativas entre si. Estes pesticidas e/ou s.a e seus efeitos na germinação de clamidósporos não tinham sido ainda avaliados. Os fungicidas produziram efeitos mais acentuados do que os restantes pesticidas, e apenas o fungicida Scala permitiu uma germinação superior a 50% dos clamidósporos. As formulações à base de cobre foram as que mais afetaram a germinação dos clamidósporos de *P. chlamydosporia*, resultando em menos de

5% de germinação. Num estudo realizado em laboratório por outros autores, o fungicida Cuproflow 37,75 (38% Cobre;) revelou inibir totalmente a germinação de clamidósporos de *P. chlamydosporia*, aplicado a uma dose de 0,03% (Ceiro et al., 2015). Assim, verifica-se que mesmo em concentrações mais reduzidas, o efeito do cobre na germinação do fungo é extremamente inibitório, com efeitos mais pronunciados do que no crescimento radial do fungo *P. chlamydosporia*.

Apesar de no presente trabalho para os ensaios de germinação terem sido testadas formulações apenas a 100 ppm da sua s.a., verifica-se um efeito considerável dos fungicidas ($p < 0,05$). Em relação aos inseticidas e o nematodocida Vydate 10L (s.a oxamil), apenas o Boreal demonstrou provocar uma grande redução na germinação dos clamidósporos (24.27%). Por este motivo, à semelhança do descrito para os efeitos no crescimento radial, parece haver compatibilidade dos inseticidas com *P. chlamydosporia*, permitindo uma ação conjunta contra nemátodes e pragas de insetos. Contudo, quando os pesticidas são aplicados nas culturas agrícolas, estes têm um tempo de dissipação que pode variar com o tipo de pesticida, tipo de solo e outros inúmeros fatores. Já foi evidenciado um tempo mínimo de 5.6 semanas para ocorrer 25% da dissipação total (DT25%) para a s.a. azoxistrobina no solo (Bending et al., 2006). Daí que seja importante entender o efeito causado pelos pesticidas numa dinâmica temporal sobre *P. chlamydosporia*.

Considerando os resultados do ensaio II de germinação de clamidósporos de *P. chlamydosporia* (Tabela 8), foi possível verificar a existência de um efeito negativo dos pesticidas quer na produção (Tabela 7) de clamidósporos, quer na sua germinação ($p < 0,05$). Embora não linearmente, de um modo geral a taxa de germinação dos clamidósporos foi menor no ensaio II do que no ensaio I. Isto significa que para a maioria dos pesticidas testados, o contato prolongado provocou um efeito negativo cumulativo, reduzindo em geral a quantidade e a viabilidade destas estruturas de resistência que permitiriam ao fungo manter-se no solo em condições adversas. Apesar dos pesticidas serem formulações, o que lhes confere diferentes propriedades relativamente às s.a. como a sua solubilidade, a ocorrência de uma degradação gradual do pesticida (Bending et al., 2006) traduz-se num efeito mais prolongado ainda que possivelmente a menores concentrações. Os únicos pesticidas que, em relação aos resultados do ensaio I (Tabela 6), provocaram um aumento ou que não afetaram a germinação foram o Boreal, Azbany e o Melody Cobre. Estes pesticidas originaram um aumento de germinação de clamidósporos inferior a 15% em relação à germinação produzida pelos mesmos pesticidas no ensaio I, pelo que é pouco

perceptível se se deveu a um ajuste do fungo à exposição prolongada ao pesticida ou à degradação dos compostos da formulação. Além disso, no caso do pesticida Melody Cobre, apesar do aumento, a taxa de germinação dos clamidósporos não foi além de 18.67%. Mais uma vez, os inseticidas revelaram ter um efeito menos negativo na germinação, mesmo após 45 dias, em relação aos fungicidas, salvo o pesticida Steward, que reduziu drasticamente a taxa de germinação de 85% para 11,30%. Sendo este inseticida aplicado no combate a pragas de lepidópteros, o uso ou intercalação de aplicações de pesticidas diferentes poderá ser vantajoso no que diz respeito à atividade do fungo. Além deste último, também o fungicida Scala reduziu a germinação dos clamidósporos, de um valor de 71.23% para 15.51%. Assim, a aplicação desta formulação de pirimetanil pode comprometer a atividade de *P. chlamydosporia*, tendo em conta que o mesmo pesticida afetou significativamente o crescimento do fungo a todas as concentrações. Como o fungo esteve 45 dias sob efeito de um produto fitofarmacêutico, vários processos biológicos podem possivelmente ser afetados e uns por consequência de outros, como a produção de clamidósporos na sequência do crescimento radial.

A quantidade de clamidósporos produzidos no decorrer dos 45 dias do ensaio (Tabela 7), apesar de ser apenas uma estimativa, permitiu constatar a inibição total da produção de clamidósporos por parte dos fungicidas Cupramax, Ridomil Gold R e Signum. Ou seja, há uma clara evidência de que a formação de clamidósporos é afetada por formulações à base de cobre, ainda que não produza um efeito significativo no crescimento radial de *P. chlamydosporia* em concentrações mais baixas. A formulação com oxamil, Vydate 10L, não permitiu que o fungo produzisse uma grande quantidade de clamidósporos até ao fim de 45 dias comparativamente com outros pesticidas com efeitos negativos mais significativos nos ensaios anteriores, podendo isto dever-se a vários fatores entre eles o modo como a s.a. e família química atua no fungo. Apesar da substância ativa ser a substância responsável pela atividade biológica do pesticida, existe ainda pouca informação sobre um possível efeito sinérgico de todos os compostos das formulações. À semelhança do ensaio de crescimento radial, alguns pesticidas tendem a apresentar resultados mais semelhantes entre si devido à composição do pesticida e da família química a que pertence a substância ativa. É o caso dos pesticidas: Vydate 10 L e Mesurol 200, pertencentes à família dos carbamatos; Signum e Azbany, com estrobilurina análoga (metoxicarbamato e metoxiacrilato, respetivamente); e o caso do Cupramax, Melody Cobre e Ridomil Gold R, com cobre na sua composição.

Os resultados dos ensaios *in vitro* comprovam a existência de efeitos diretos na atividade biológica do fungo. Consequentemente permite-nos presumir o efeito dos pesticidas tendo em conta a sua dimensão temporal uma vez que estes e as suas substâncias ativas têm um tempo diferente de degradação no solo (EFSA, 2014). Consequentemente, a capacidade do fungo *P. chlamydosporia* enquanto agente de controlo biológico pode estar comprometida pela falta de conhecimento acerca de como diferentes pesticidas podem afetar a sua atividade biológica. No entanto, este trabalho indicou uma possível compatibilidade entre alguns pesticidas e *P. chlamydosporia*, pelo que será importante alargar este tipo de investigação não só a uma maior diversidade de pesticidas como também a outros fatores de produção. As concentrações testadas nos diferentes ensaios ao longo do presente trabalho podem servir de ponto de partida para a realização de estudos semelhantes, no futuro. Mais investigação e uma melhor compreensão sobre as concentrações efetivas no solo e na planta por parte das variadas aplicações químicas podem ajudar a entender melhor o efeito na fisiologia do fungo e a potenciar o seu estabelecimento no solo e nas raízes.

Sendo o estabelecimento no solo e raízes as condições mais importantes para determinar a eficiência de *P. chlamydosporia* enquanto agente de controlo biológico, será indispensável, dentro do possível, entender o efeito individual e conjunto das variáveis bióticas e abióticas em solos predominantemente num contexto agrícola. Neste trabalho, no ensaio em solo de estufa essas condições foram estudadas, porém, não com grande clareza na medida em que os tratamentos avaliados (planta com ou sem porta-enxerto) foram sujeitos a múltiplas variáveis. A realização de estudos em vasos em condições de estufa poderão ser essenciais e servir de ponte de ligação entre os resultados produzidos em laboratório e os encontrados no ensaio de campo. Para tal, o estudo do efeito das variáveis inerentes a um cenário de gestão convencional será da maior importância para a seleção de melhores estratégias de proteção agrícola compatíveis com o fungo *P. chlamydosporia*.

3. Considerações finais

Os resultados desta investigação permitem-nos inferências relativamente às hipóteses previamente propostas no início do trabalho. De acordo com os resultados dos ensaios *in vitro*, verificamos que os pesticidas têm um efeito negativo no fungo *P. chlamydosporia*. Também, permitem-nos concluir que diferentes pesticidas afetam de maneira distinta a fisiologia do fungo e, ainda, de que o efeito de inseticidas não pode ser descartado tendo em conta os resultados, uma vez que são necessários para combater pragas importantes.

Relativamente ao ensaio de campo em solo de estufa, não foi possível, contudo, verificar com clareza um efeito negativo destes pesticidas no estabelecimento de *P. chlamydosporia* no solo e capacidade parasítica. Uma vez que o fungo foi aplicado no solo de estufa e, embora se tenha estabelecido com baixa densidade, este pode ter sido afetado quer pelos pesticidas, quer por uma diversidade de fatores, como referido anteriormente. Também, não se verificou um efeito complementar mais eficaz pelos métodos de enxertia com controlo biológico por *P. chlamydosporia*, não tendo ocorrido diferenças significativas entre os tratamentos, à exceção de que as raízes das plantas não enxertadas revelaram ter inferior número de massa de ovos por grama de raiz. Porém, o efeito da enxertia não pode, ser descartado, uma vez que não foi incluído um tratamento de cv. Coração de Boi auto-enxertado, e também porque só foi testada uma cultivar de porta-enxerto, pelo que seria prematuro inferir sobre o efeito deste método, havendo uma variedade de cultivares comerciais de porta-enxerto.

Ficaram, no entanto, evidenciados os efeitos negativos que os pesticidas podem ter sobre o fungo *P. chlamydosporia* e a possibilidade de comprometer a ação deste enquanto agente de controlo biológico. Da análise dos resultados obtidos, no entanto, é possível perceber que alguns pesticidas terão uma maior compatibilidade com o fungo (exercendo efeitos menos negativos). O recurso a estudos paralelos *in vitro*, em condições controladas e no campo será relevante para a seleção e otimização de estratégias compatíveis para a gestão sustentável de NGR em cultura protegida.

V. Referências Bibliográficas

- Abbott, W. S.** (1925). A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2), 265-267.
- Abrantes, I., S. Santos, J. Bourne, A. Ciancio, L. Lopez-Llorca, B. Kerry, M. Mota, E. Tzortzakakis and S. Verdejo-Lucas.** (2002). *A manual for Research on Verticillium chlamydosporium, a Potential Biological Control Agent for Root-knot Nematodes* (B.R. Kerry and J. Bourne, ed.). International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants/West Palaearctic Regional Section (IOBC/WPRS), Gent, Belgium, 84p. Kerry & Bourne., (2002)
- Abrantes, I., Santos, M. C. V., Clara, M. I., Fernandes, J. E. & Marques, M. L.** (2007). Principais doenças e pragas do tomateiro e meios de luta. Instituto do Ambiente e Vida, Departamento de Zoologia da Universidade de Coimbra.
- AccuWeather.** (2019). AccuWeather, Inc. Consultado em 15/01/2020. Disponível em <https://www.accuweather.com/pt/pt/apulia/272375/june-weather/272375>.
- Altieri, M. A., & Liebman, M.** (1986). Insect, weed and plant disease management in multiple cropping systems. In *Multiple Cropping Systems*, 183–218.
- Amaro, P.** (2003). Chapter: Os inimigos das culturas e a sua importância económica. In *A protecção integrada*, 19–30.
- Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Bellisai, G., Brancato, A., Brocca, D., ... Villamar-Bouza, L.** (2018). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance chlorothalonil. *EFSA Journal*, 16(1), 1–40.
- Atkins, S. D., Hidalgo-Diaz, L., Kalisz, H., Mauchline, T. H., Hirsch, P. R., & Kerry, B. R.** (2003). Development of a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp) in organic vegetable production. *Pest Management Science*, 59, 183-189.
- Bååth, E.** (1991). Tolerance of copper by entomogenous fungi and the use of copper-amended media for isolation of entomogenous fungi from soil. *Mycological Research*, 95(9), 1140–1142.
- Barrett, C. E., Zhao, X., & Mcsorley, R.** (2012). Grafting for root-knot nematode control and yield improvement in organic heirloom tomato production. *HortScience*, 47(5), 614-620.
- Bending, G. D., Lincoln, S. D., & Edmondson, R. N.** (2006). Spatial variation in the degradation rate of the pesticides isoproturon, azoxystrobin and diflufenican in soil and its relationship with chemical and microbial properties. *Environmental Pollution*, 139, 279–287.
- Bergougnoux, V.** (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, 32, 170-189.
- Best, R. J.** (1968). Tomato Spotted Wilt Virus. *Advances in Virus Research*, 13(C), 65-146.
- Blok, V. C., Jones, J. T., Phillips, M. S., & Trudgill, D. L.** (2008). Parasitism genes and host range disparities in biotrophic nematodes: The conundrum of polyphagy versus specialisation. *BioEssays*, 30(3), 249–259.
- Bourne, J. M., & Kerry, B. R.** (1999). Effect of the host plant on the efficacy of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent of root-knot nematodes at different nematode densities and fungal application rates. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(1), 75–84.

- Bourne, J. M.**, Kerry, B. R., & De Leij, F. A. A. M. (1996). The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the Nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* goddard. *Biocontrol Science and Technology*, 6(4), 539–548.
- Bridge, J.**, & Page, S. L. J. (1980). Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart. *Tropical Pest Management*, 26(3), 296–298.
- Brown, S.**, Kepner, J., & Smart, C. (1985). Increased Crop yields following application of *Bacillus penetrans* to field plots infested with *Meloidogyne incognita*, 17(4), 483–486.
- Castagnone-Sereno, P.**, Danchin, E. G. J., Perfus-Barbeoch, L., & Abad, P. (2013). Diversity and Evolution of Root-Knot Nematodes, Genus *Meloidogyne*: New Insights from the Genomic Era. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), 203–220.
- Ceiro, W. G.**, Arévalo, J., & Hidalgo-Díaz, L. (2015). Efectos de plaguicidas y bioestimulantes vegetales sobre la germinación de clamidosporas y el desarrollo in vitro del hongo nematofago *Pochonia chlamydosporia*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(4), 277–280.
- Cely P., L.**, Cantor, F., & Rodríguez, D. (2010). Determination of levels of damage caused by different densities of tuta absoluta populations (Lepidoptera: gelechiidae) under greenhouse conditions. *Agronomía Colombiana*, 28(December), 392–402.
- Cervantes, C.**, (1994). Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 14(2), 121–137.
- Chen, P.**, & Tsay, T. T. (2006). Effect of crop rotation on *Meloidogyne* spp. and *Pratylenchus* spp. populations in strawberry fields in Taiwan. *Journal of Nematology*, 38(3), 339–344.
- Cortet, J.**, Gomot-De Vaufleury, A., Poinso-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C., & Cluzeau, D. (1999). The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *European Journal of Soil Biology*, 35(3), 115–134.
- Crump, D. H.**, & Kerry, B. R. (1986). Effects of some agrochemicals on the growth of two nematophagous fungi, *verticillium chlamydosporium* and *cylindrocarpon destructans*. *Nematologica*, 363–366.
- Curtis, R. H. C.**, Jones, J. T., Davies, K. G., Sharon, E., & Spiegel, Y. (2011). Capítulo: Plant Nematode Surfaces. In: *Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Building Coherence between Microbial Ecology and Molecular Mechanisms*, 115–144.
- Cuthbertson, A. G. S.**, Mathers, J. J., Blackburn, L. F., Korycinska, A., Luo, W., Jacobson, R. J., & Northing, P. (2013). Population development of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) under simulated UK glasshouse conditions. *Insects*, 4(2), 185–197.
- Dalle-mole-Giaretta, R.**, de Freitas, L. G., Lopes, E. A., da Silva, M. D. C. S., Kasuya, M. C. M., & Ferraz, S. (2015). *Pochonia chlamydosporia* promotes the growth of tomato and lettuce plants. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 37, 417–423.
- Davies, K. G.** (2009). Understanding the Interaction Between an Obligate Hyperparasitic Bacterium, *Pasteuria penetrans* and its Obligate Plant-Parasitic Nematode Host, *Meloidogyne* spp. *Advances in Parasitology*, 68, 211–245.

- De Leij, F. A. A. M., & Kerry, B. R.** (1991). The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. *Revue de Nématologie*, *14*, 157–164.
- De Leij, F., Davies, K., & Kerry, B.** (1992). The use of *Verticillium chlamydosporium* Goddard and *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr alone and in combination to control *Meloidogyne incognita* on tomato plants. *Fundamental and Applied Nematology*, *15*(3), 235–242.
- De Ley, P., Blaxter, M.** (2002). Systematic position and phylogeny. *The biology of nematodes*, 1-30.
- De Mendiburu, F.** (2014). *Agricolae: Statistical procedures for agricultural research*. R package version 1.2-0. [Http://CRAN.R-Project.Org/Package=agricolae](http://CRAN.R-Project.Org/Package=agricolae).
- Desneux, N., Wajnberg, E., Wyckhuys, K. A. G., Burgio, G., Arpaia, S., Narváez-Vasquez, C. A., ... Urbaneja, A.** (2010). Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: Ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of Pest Science*, *83*(3), 197-215.
- DGADR, Direção-Geral De Agricultura E Desenvolvimento Rural,** (2018). Consultado em 25/02/2019. <https://www.dgadr.gov.pt/19-modos-de-producao-sustentavel/91-prodbiologica>
- Dias-Arieira, C. R., Santana, S. de M., de Freitas, L. G., da Cunha, T. P. L., Biela, F., Puerari, H. H., & Chiamolera, F. M.** (2011). Efficiency of *Pochonia chlamydosporia* in *Meloidogyne incognita* control in lettuce crop (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food, Agriculture and Environment*, *9*, 561–563.
- DRAPN, Direção Regional de Agricultura e Pescas do Norte.** (2018). Consultado em 30/05/2019 http://www.drapnorte.pt/drapn/conteudos/FICHAS_DRAEDM/Ficha_tecnica_061_1996.pdf
- Dropkin, V.H.,** (1969). The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. *Phytopathology*, *59*, 1632-1637.
- EFSA, European Food Safety Authority.** (2014). EFSA Guidance Document for evaluating laboratory and field dissipation studies to obtain DegT50 values of active substances of plant protection products and transformation products of these active substances in soil. *EFSA Journal*, *12*(5):3662, 1–37.
- Elmore, C. L., Stapleton, J. J., & Bell, C. E.** (1997). Soil Solarization A Nonpesticidal Method for Controlling Diseases, Nematodes, and Weeds. *University of California Vegetable Research and Information Center*, 1-17.
- Escudero, N., Lopez-Llorca, L. V.** (2012). Effects on plant growth and root-knot nematode infection of an endophytic GFP transformant of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Symbiosis*, *57*, 33–42.
- Ettema, C. H.** (1998). Soil nematode diversity: Species coexistence and ecosystem function. *Journal of Nematology*, *30*(2), 159–169.
- European Commission.** (2016). *Approval of active substances*. Consultado em 24/01/2019. https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances_en
- European Commssion.** (2016). *Integrated Pest Management (IPM)*. Consultado em 24/01/2019. https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances_en

- European Union.** (2000). Official Journal. *Official Journal of the European Union*, 43, 1–29.
- Foolad, M. R.** (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*, 1-52.
- Fravel, D. R.** (1988). Role of Antibiosis in the Biocontrol of Plant Diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 26(1), 75–91.
- Guan, W., Zhao, X., Hassell, R., & Thies, J.** (2012). Defense mechanisms involved in disease resistance of grafted vegetables. *HortScience*, 47(2), 164–170.
- Hallsworth, J. E., & Magan, N.** (1994). Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi. *Microbiology*, 140(10), 2705–2713.
- Hanssen, I. M., & Lapidot, M.** (2012). Major Tomato Viruses in the Mediterranean Basin. *Advances in Virus Research*, 84, 31-66.
- Harman, G. E.** (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96, 190–194.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M.** (2004). *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 43–56.
- Hidalgo-Diaz, L., Bourne, J. M., Kerry, B. R., & Rodriguez, M. G.** (2000). Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: Isolation and screening. *International Journal of Pest Management*, 46(4), 277-284
- Inbar, J., Abramsky, M., Cohen, D., & Chet, I.** (1994). Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 100(5), 337-346.
- INE, I. P.** (2017). *Estatísticas Agrícolas 2017 Edição 2018*, 18-19.
- IPMA.** (2020) Instituto Português do Mar e Atmosfera. Consultado em 15/01/2020 em <http://www.ipma.pt/pt/publicacoes/boletins.jsp?cmbDep=cli&cmbTema=pcl&idDep=cli&idTema=pcl&curAno=1>
- Irving, F., & Kerry, B. R.** (1986). Variation Between Strains of the Nematophagous Fungus, *Verticillium Chlamydosporium* Goddard. li. Factors Affecting Parasitism of Cyst Nematode Eggs. *Nematologica*, 32, 461–473.
- Jacobs, H., Gray, S. N., & Crump, D. H.** (2003). Interactions between nematophagous fungi and consequences for their potential as biological agents for the control of potato cyst nematodes. *Mycological Research*, 107(1), 47–56.
- Jatala, P.** (1986). PLANT-PARASITIC NEMATODES, 24(17), 453–489.
- Jenkins, J. A.** (1948). The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany*, 2(4), 379-392.
- Jepson S.B.** (1987). Identification of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* species). Wallingford, UK: CAB International, 265p.

- Jones, J. T.**, Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., ... Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 946-961.
- Karssen, G.** (2002). The plant parasitic nematode genus *Meloidogyne* Goeldi, 1892 (*Tylenchida*) in Europe. *Brill*.
- Katan, J.** (1981). Solar Heating (Solarization) of Soil for Control of Soilborne Pests. *Annual Review of Phytopathology*, 19(1), 211–236.
- Kerry, B. R.** (1995). Ecological considerations for the use of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium*, to control plant parasitic nematodes. *Canadian Journal of Botany*, 73, 65–70.
- Kerry, B. R.** (1997). Biological control of nematodes; prospects and opportunities. *FAO Plant Production and Protection Paper*, 1-10.
- Kerry, B.R., & Bourne, J.** (2002). *A manual for research on verticillium chlamydosporium: A potential biological control agent for root-knot nematodes*. Gent.
- Kerry, B.R., & Bourne, J. M.** (1996). The importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant parasitic nematodes - a case study using *Verticillium chlamydosporium*. *Pesticide Science*, 47(1), 69–75.
- Kerry, B. R., Crump, D. H., & Mullen, L. A.** (1980). Parasitic Fungi, Soil Moisture and Multiplication of the Cereal Cyst Nematode, *Heterodera a Venae*. *Nematologica*, 26, 57–68.
- Kerry, B. R., De Leij, F. A. A. M., Kirkwood, I. A., Barba, J., Leijdens, M. B., & Brookes, P. C.** (1993). Growth and Survival of *Verticillium chlamydosporium* Goddard, a Parasite of Nematodes, in Soil. *Biocontrol Science and Technology*, 3(3), 355–365.
- Kerry, B. R.** (2000). Rhizosphere Interactions and the Exploitation of Microbial Agents for the Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 38(1), 423–441.
- Kerry, B. R., & Bourne, J. M.** (1996). The importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant parasitic nematodes - a case study using *Verticillium chlamydosporium*. *Pesticide Science*, 47(1), 69-85
- Kerry, B R., & Hirsch, P. R.** (2011). Ecology of *Pochonia chlamydosporia* in the Rhizosphere at the Population, Whole Organism and Molecular Scales. In *Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes*, 171-182.
- Kleifeld, O., & Chet, I.** (1992). *Trichoderma harzianum*-interaction with plants and effect on growth response increased number of blooms in Periwinkles. *Plant and Soil*, 144, 267–272.
- Lenth, R., Singmann, H., Love, J., Buerkner, P., & Herve, M.** (2019). Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. *CRAN R*.
- Lenth, R. V.** (2016). Least-squares means: The R package lsmeans. *Journal of Statistical Software*.
- Lilley, C. J., Kyndt, T., & Gheysen, G.** (2011). Nematode Resistant GM Crops in Industrialised and Developing Countries. In *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions Chapter 24*, 517–520.

- Liu, N.**, Yang, J., Guo, S., Xu, Y., & Zhang, M. (2013). Genome-Wide Identification and Comparative Analysis of Conserved and Novel MicroRNAs in Grafted Watermelon by High-Throughput Sequencing. *PLoS ONE*, *8*(2).
- Loewenberg, J. R.**, Sullivan, T., & Schuster, M. L. (1959). A virus disease of *Meloidogyne incognita incognita*, the southern root knot nematode. *Nature*, *184*(4702), 1896.
- Lopes, A.**, & Simões, A. M. (2006). Produção integrada em hortícolas - Família das Solanáceas, p378.
- Lopez-Llorca, L. V.**, Bordallo, J. J., Salinas, J., Monfort, E., & López-Serna, M. L. (2002). Use of light and scanning electron microscopy to examine colonisation of barley rhizosphere by the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium*. *Micron*, *3*(1), 61-67.
- Lopez-Llorca, L. V.**, Maciá-Vicente, J. G., & Jansson, H.-B. (2007). Mode of Action and Interactions of Nematophagous Fungi. In *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes*, 51-76.
- Luambano, N. D.**, Manzanilla-López, R. H., Kimenju, J. W., Powers, S. J., Narla, R. D., Wanjohi, W. J., & Kerry, B. R. (2015). Effect of temperature, pH, carbon and nitrogen ratios on the parasitic activity of *Pochonia chlamydosporia* on *Meloidogyne incognita*. *Biological Control*, *80*, 23–29.
- Luna, M. G.**, Sánchez, N. E., & Pereyra, P. C. (2007). Parasitism of *Tuta absoluta* (Lepidoptera, Gelechiidae) by *Pseudapanteles dignus* (Hymenoptera, Braconidae) Under Laboratory Conditions. *Environmental Entomology*, *36*(4), 887–893.
- Maciá-Vicente, J. G.**, Jansson, H.-B., Talbot, N. J., & Lopez-Llorca, L. V. (2009). Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. *New Phytologist*, *182*(1), 213–228.
- Magan, N.** (2001). Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents in fungi as biocontrol agents. *Fungi as Biocontrol Agents—Progress, Problems and Potential.*, 239–251.
- Mahrer, Y.**, Avissar, R., Naot, O., & Katan, J. (1987). Intensified soil solarization with closed greenhouses: Numerical and experimental studies. *Agricultural and Forest Meteorology*, *41*, 325–330.
- Mai, W. F.**, & Abawi, G. S. (1987a). Interactions Among Root-Knot Nematodes and *Fusarium Wilt* Fungi on Host Plants. *Annual Review of Phytopathology*, *25*, 317–338.
- Mai, W. F.**, & Abawi, G. S. (1987b). Root-Knot Nematodes and *Fusarium Wilt* Fungi on Host. *Nn. Rev. Phytopathol.* 1987. *25*(3)17-338.
- Manzanilla-López, H. R.**, Esteves, I., Finetti-Sialer, M. M., Hirsch, P. R., Ward, E., Devonshire, J., & Hidalgo-Díaz, L. (2013). *Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes. *Journal of Nematology*, *45*(1), 1-7.
- Manzanilla-López, R. H.**, Esteves, I., & Finetti-Sialer, M. M. (2012). *Pochonia chlamydosporia*: Biological, ecological and physiological aspects in the host-parasite relationship of a biological control agent of nematodes. In *Nematodes: Morphology, Functions and Management Strategies*, 267-300.

- Manzanilla-lópez, R. H., & Hunt, D. J.** (2008). Tropical plant and soil nematodes: Diversity and interactions. In K. Del Claro, P. S. Oliveira, V. Rico-Gray, et al. (Eds.), *International Commission on Tropical Biology and Natural Resources, Encyclopaedia of Life Support Systems (EOLSS)*. Oxford: Eolss Publishers.
- Mauchline, T. H., Kerry, B. R., & Hirsch, P. R.** (2002). Quantification in soil and the rhizosphere of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* by competitive PCR and comparison with selective plating. *Applied and Environmental Microbiology*, (68), 1846–1853.
- Monfort, E., Lopez-Llorca, L. V., Jansson, H. B., Salinas, J., Park, J. O., & Sivasithamparam, K.** (2005). Colonisation of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root-rot. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 1229–1235.
- Munnecke, D. E.** (1972). Factors Affecting the Efficacy of Fungicides in Soil. *Annual Review of Phytopathology*, 10(1), 375–398.
- Nasu, E. G. C., Monteiro, T. S. A., Amora, D. X., Alves, P. S., Podestá, G. S., Ferreira, F. C., & Freitas, L. G.** (2019). Pesticides on the viability of *Pochonia chlamydosporia* for controlling *Meloidogyne incognita*. *Australasian Plant Pathology*, 48(4), 331-338.
- Nicol, J. M., Turner, S. J., Coyne, D. L., Hockland, S., Nijs, L. den, & Maafi, Z. T.** (2011). Current Nematode Threats to World Agriculture. In *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*, 21-43.
- Noling, J. W., & Becker, J. O.** (1994). The challenge of research and extension to define and implement alternatives to methyl bromide. *Journal of Nematology*, 26(4S), 573-586.
- Oka, Y., Koltai, H., Bar-Eyal, M., Mor, M., Sharon, E., Chet, I., & Spiegel, Y.** (2000). New strategies for the control of plant-parasitic nematodes. In *Pest Management Science*, 56(11), 983-988.
- Peil, R. M.** (2005). A enxertia na produção de mudas de hortaliças. *Ciência Rural*, 33(6), 1169–1177.
- Peralta, I., & Spooner, D.** (2006). History, Origin and Early Cultivation of Tomato (Solanaceae). In *Genetic Improvement of Solanaceous Crops Volume 2: Tomato*, 1-24..
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., & R Core Team.** (2019). Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. *R Package Version 3. 1-140*. URL <https://CRAN.R-Project.Org/Package=nlme>>.
- Poudel, R., Jumpponen, A., Kennelly, M. M., Rivard, C. L., Gomez-Montano, L., & Garrett, K. A.** (2019). Rootstocks Shape the Rhizobiome: Rhizosphere and Endosphere Bacterial Communities in the Grafted Tomato System. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(2), 1–16.
- Powell, N. T.** (1971). Interactions Between Nematodes and Fungi in Disease Complexes. *Annual Review of Phytopathology*, 9(1), 253–274.
- Rich, J. R., & Olson, S. M.** (1999). Utility of Mi gene resistance in tomato to manage *Meloidogyne javanica* in north Florida. *Journal of Nematology*, 31(4S), 715–718.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., & Gerhard, D.** (2015). Dose-response analysis using R. *PLoS ONE*.
- Ros, C., Guerrero, M. M., Martinez, M. A., Barceló, N., Martínez, M. C., Rodríguez, I., ... Bello, A.** (2006). Integrated management of *Meloidogyne* resistance in sweet pepper in greenhouses. In: *Integrated Control in Protected Crops, Mediterranean Climate. IOBC/Wprs Bulletin*, 29, 305–310.

- Ros, C.,** Guerrero, M., & Martínez, M. (2004). La combinación injerto y biofumigación en el control de *Meloidogyne incognita* en pimiento en invernadero. *Actas de Horticultura*, 42, 26–32.
- Rossi, M.,** Goggin, F. L., Milligan, S. B., Kaloshian, I., Ullman, D. E., & Williamson, V. M. (1998). The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17), 9750–9754.
- Sasser, J. N.** (1977). Worldwide dissemination and importance of the root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. *Journal of Nematology*, 9(1), 26–29.
- Sasser, J. N.,** & Carter, C. C. (1985). An Advanced Treatise on Meloidogyne Volume I: Biology and Control. In *An Advanced Treatise on Meloidogyne*, 1, 113–126.
- Sasser, J. N.,** & Freckman, D. W. (1987). A World Perspective on Nematology: The Role of Society. In *Vistas on Nematology: A Commemoration of the Twenty-fifth Anniversary of the Society of Nematologists*, 7–14.
- Sayre, R. M.** (1980). Biocontrol: *Bacillus penetrans* and Related Parasites of Nematodes. *Journal of Nematology*, 12, 260–270.
- Sayre, R. M.,** & Walter, D. E. (2003). Factors Affecting the Efficacy of Natural Enemies of Nematodes*. *Annual Review of Phytopathology*, 29, 149-166.
- Sayre, R. M.,** & Wergin, W. P. (1977). Bacterial parasite of a plant nematode: morphology and ultrastructure. *Journal of Bacteriology*, 129(2), 1091–1101.
- Seah, S.,** Yaghoobi, J., Rossi, M., Gleason, C. A., & Williamson, V. M. (2004). The nematode-resistance gene, Mi-1, is associated with an inverted chromosomal segment in susceptible compared to resistant tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(8), 1635–1642.
- Sharon, E.,** Bar-Eyal, M., & Chet, I. (2001). *Biological control of the root-knot nematode Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 91(7), 687-693.
- Singh, H.,** Kumar, P., Chaudhari, S., & Edelstein, M. (2017). Tomato Grafting: A Global Perspective. *HortScience*, 52(10), 1328–1336.
- Siqueira, H. A. A.,** Guedes, R. N. C., Fragoso, D. B., & Magalhaes, L. C. (2001). Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *International Journal of Pest Management*, 47(4), 247-251.
- Siqueira, H. A. A.,** Guedes, R. N. C., & Picanño, M. C. (2000). Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agricultural and Forest Entomology*, 2(2), 147-153.
- Sochová, I.,** Hofman, J., & Holoubek, I. (2006). Using nematodes in soil ecotoxicology. *Environment International*, 32(3), 374–383.
- Sorribas, F. J.,** Ornat, C., Galeano, M., & Verdejo-Lucas, S. (2003). Evaluation of a Native and Introduced Isolate of *Pochonia chlamydosporia* against *Meloidogyne javanica*. *Biocontrol Science and Technology*, 13(8), 707–714.
- Sorribas, Francisco Javier,** Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., Galeano, M., & Valero, J. (2005). Effectiveness and profitability of the Mi-resistant tomatoes to control root-knot nematodes. *European Journal of Plant Pathology*, 111(1), 29–38.

- Stirling, G. R.** (1979). Biological Control of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.) on Peach. *Phytopathology*, *69*(8), 806–809.
- Stirling, G. R.** (1985). Host specificity of *Pasteuria penetrans* within the genus *Meloidogyne*. *Nematologica*, *31*, 203–209.
- Stirling, G. R.** (2014). Biological control of plant-parasitic nematodes: Soil ecosystem management in sustainable agriculture, *CABI (2nd)*, 15-47 .
- Stirling, G. R., & Smith, L. J.** (1998). Field tests of formulated products containing either *Verticillium chlamydosporium* or *Arthrobotrys dactyloides* for biological control of root-knot nematodes. *Biological Control*, *11*(3), 231–239.
- Streck, N. A., Schneider, F. M., Buriol, G. A., & Heldwein, A. B.** (1995). Effect of polyethylene mulches on soil temperature and tomato yield in plastic greenhouse. *Scientia Agricola*, *52*(3), 587-593 .
- Taylor, A., & Sasser, J.** (1978). *Biology, Identification and Control of Root-knot Nematodes (Meloidogyne species) Raleigh*. Department of Plant Pathology North Carolina State University and the United States Agency for International Development, p111.
- Taylor, C.** (1990). Nematode interactions with other pathogens. In *Annals of Applied Biology*, 116, 405-416.
- Taylor, C. E., & Brown, D. J.** (1997). Nematode Vectors of Plant Viruses. *Integrated Pest Management Reviews*, 270.
- Tobin, J. D., Haydock, P. P. J., Hare, M. C., Woods, S. R., & Crump, D. H.** (2008). The compatibility of the fungicide azoxystrobin with *Pochonia chlamydosporia*, a biological control agent for potato cyst nematodes (*Globodera* spp.). *Annals of Applied Biology*, *152*(3), 301–305.
- Triantaphyllou, A. C.** (1981). Oogenesis and the Chromosomes of the Parthenogenic Root-knot Nematode *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, *13*(2), 95–104.
- Trinci, A. P. J.** (1984) Antifungal agents and hyphal extension and branching. In *Mode of Action of Antifungal Agents* (A. P. J. Trinci & J. F. Ryley, eds): 113–134.
- Tzortzakakis, E. A.** (2009). A report on the variation in colonization of field soil and associated root by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Nematologia Mediterranea*, *37*(2), 183–189.
- UNEP, United Nations Environmental Program.** (2000). *Montreal protocol on substances that deplete the Ozone layer. Thechnology and Economic Assessment Panel April 2000 report, Vol1.*
- Urbaneja, A., González-Cabrera, J., Arnó, J., & Gabarra, R.** (2012). Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. *Pest Management Science*.
- van den Hoogen, J., Geisen, S., Routh, D., Ferris, H., Traunspurger, W., Wardle, D. A., ... Crowther, T. W.** (2019). Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature*.
- Verdejo-Lucas, S., Sorribas, F. J., Ornat, C., & Galeano, M.** (2003). Evaluating *Pochonia chlamydosporia* in a double-cropping system of lettuce and tomato in plastic houses infested with *Meloidogyne javanica*. *Plant Pathology*, *52*(4), 521–528.

- Verdejo-Lucas, S.**, Talavera, M., & Andrés, M. F. (2012). Virulence response to the Mi.1 gene of *Meloidogyne* populations from tomato in greenhouses. *Crop Protection*, *39*, 97–105.
- Verdejo-Lucas, Soledad**, & Sorribas, F. J. (2008). Resistance response of the tomato rootstock SC 6301 to *Meloidogyne javanica* in a plastic house. *European Journal of Plant Pathology*, *57*, 1125–1135.
- Viaene, N. M.**, & Abawi, G. S. (2000). *Hirsutella rhossiliensis* and *verticillium chlamydosporium* as biocontrol agents of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on lettuce. *Journal of Nematology*, *32*(1), 85–100.
- Vieira dos Santos, M. C.**, Curtis, R. H. C., & Abrantes, I. (2014). The combined use of *Pochonia chlamydosporia* and plant defence activators - A potential sustainable control strategy for *Meloidogyne chitwoodi*. *Phytopathologia Mediterranea*, *53*(1), 66–74.
- Vieira dos Santos, M. C.**, Horta, J., Moura, L., Pires, D. V., Conceição, I., Abrantes, I., & Costa, S. R. (2019). An integrative approach for the selection of *Pochonia chlamydosporia* isolates for biocontrol of potato cyst and root knot nematodes. *Phytopathologia Mediterranea*.
- Vieira dos Santos, M.C.**, Esteves, I., Kerry, B., & Abrantes, I. (2013). Biology, growth parameters and enzymatic activity of *Pochonia chlamydosporia* isolated from potato cyst and root-knot nematodes. *Nematology*, *15*(4), 493–504.
- Viterbo, A.**, Inbar, J., & Hadar, Y. (2007). Plant Disease Biocontrol and Induced Resistance via Fungal Mycoparasites. In *Environmental and Microbial Relationships, 2nd Edn*, 127-142.
- Wang, D. Y. C.**, Kumar, S., & Hedges, S. B. (1999). Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *266*(1415), 163-171.
- Ward, E.**, Kerry, B. R., Manzanilla-López, R. H., Mutua, G., Devonshire, J., Kimenju, J., & Hirsch, P. R. (2012). The *Pochonia chlamydosporia* serine protease gene *vcp1* is subject to regulation by carbon, nitrogen and pH: Implications for nematode biocontrol. *PLoS ONE*, *7*(4).
- Webster, J. M.** (1969). The Host-Parasite Relationships of Plant-Parasitic Nematodes. *Advances in Parasitology*, *7*, 1–40.
- Yeates, G. W.**, Bongers, T., De Goede, R. G. M., Freckman, D. W., & Georgieva, S. S. (1993). Feeding Habits in Soil Nematode Families and Genera-An Outline for Soil Ecologists. *Journal of Nematology*, *25*(3), 315–331.
- Yedidia, I.**, Benhamou, N., & Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1061–1070.

VI. Anexos

Anexo I

Tabela 1S. Rating de galhas (Bridge & Page, 1980), nº de ovos por g de raiz, nº de massa de ovos/g de raiz e percentagem de parasitismo pelo fungo *Pochonia chlamydosporia* das raízes de três plantas dos tratamentos B e E (cv. Coração de Boi e cv. Embajador).

Talhão	Rating de galhas	Nº Ovos por g de raiz	Massas de ovos por g de raiz	Parasitismo (%)*
B1	2	69,72	1,4	2,34
	4	561,60	4,8	0.00
	3	65,76	1,2	0.00
B2	3	200,40	6,68	0.00
	3	10,96	0,2	0.00
	2	127,37	3,48	0.00
B3	3	0,38	0,04	0.00
	3	38,72	0,44	2,40
	4	56,20	0,5	0.00
E1	3	260,68	2,34	0.00
	4	118,14	1,04	0.00
	2	61,27	1,38	1,89
E2	2	382,20	1,96	0.00
	4 / 5	184,04	2,78	11,65
	3	276,14	2,64	0.00
E3	5	438,02	4,64	3,39
	5	468,16	7,6	0.00
	5	357,19	4,84	0.00

*Os valores apresentados são a média de duas repetições.

Anexo II

Tabela 2S. Rating de galhas (Bridge & Page), n° de ovos por g de raiz, n° de massa de ovos por g de raiz e percentagem de parasitismo pelo fungo *Pochonia chlamydosporia* das raízes de três plantas dos tratamentos inoculados com o fungo BF e EF (cv. Coração de Boi e cv. Embajador).

Talhão	Bridge &Page	N° Ovos por g de raiz	Massas de ovos por g de raiz	Parasitismo (%)*
BF1	3	6,68	0,2	23,09
	3	54,96	0,24	1,23
	2	-	0,28	-
BF2	1	39,04	0,64	0,70
	1	-	0,4	-
	0	-	0	-
BF3	1	75,09	0,76	64,18
	3	47,33	0,4	13,25
	3 / 4	33,50	0,48	72,86
EF1	5 / 6	458,83	6,32	37,89
	5	265,82	5,96	6,00
	4	136,14	2,68	0,00
EF2	2	237,55	4,04	47,51
	1 / 2	82,43	2,24	3,48
	3	83,04	2,4	1,74
EF3	6	2,83	0,04	47,54
	4	134,14	3,24	64,13
	4 / 5	204,29	3,04	34,42

*Os valores apresentados são a média de duas repetições.

Anexo III

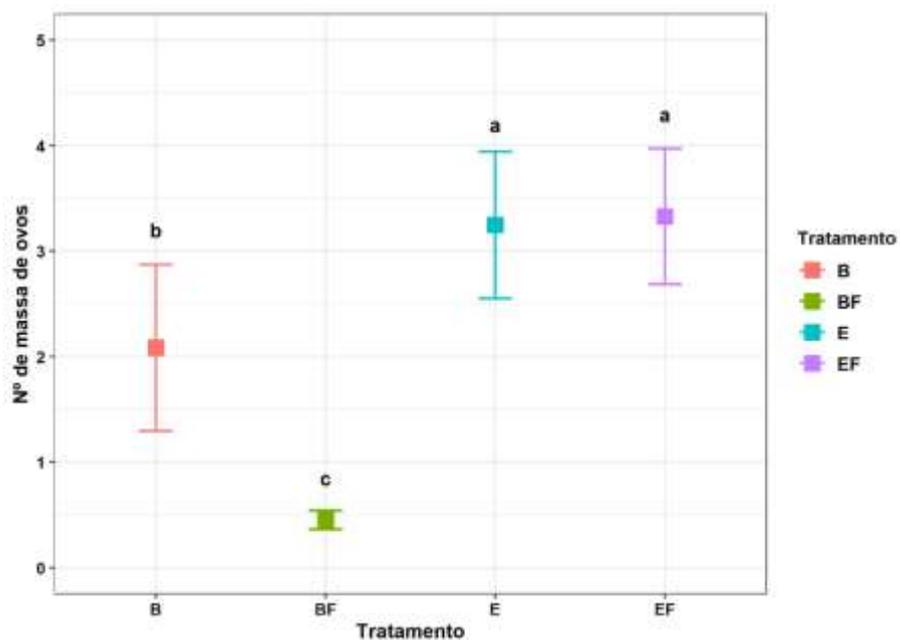


Figura 1S. Número de massas de ovos de nemátodos-das-galhas-radiculares por grama de raiz nos diferentes tratamentos B, E, EF e BF (B - tomateiro cv. Coração de Boi não-enxertado; E - tomateiro cv. Coração de Boi enxertado em porta-enxerto cv. Embajador ; BF – tomateiro cv. Coração de Boi não-enxertado aplicado com *P. chlamydosporia*; EF – tomateiro cv. Coração de Boi enxertado em porta-enxerto cv. Embajador aplicado com *P. chlamydosporia*). Os valores são a média de 6 repetições por tratamento e respetivo erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas no número de massa de ovos por grama nos diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

Anexo IV

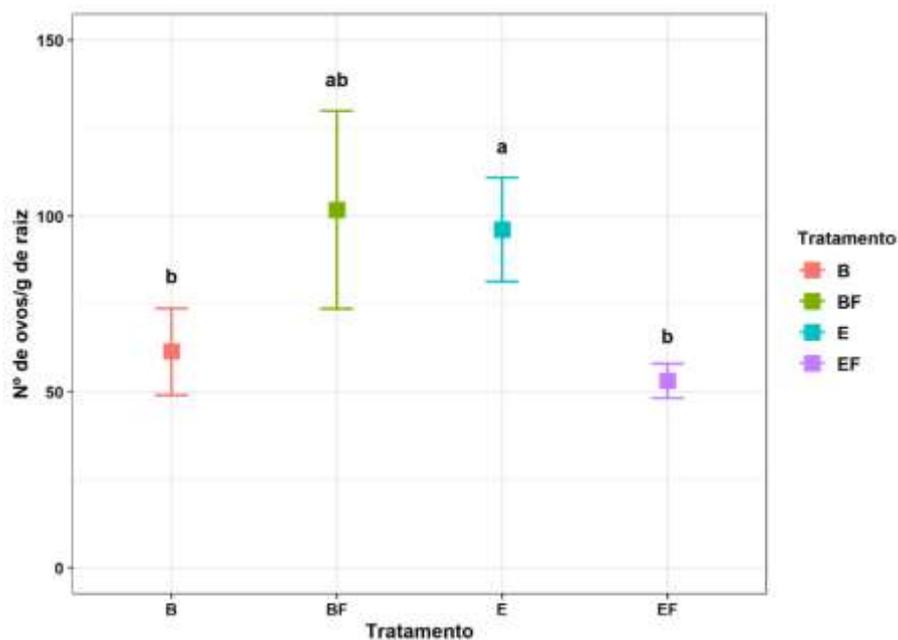


Figura 2S. Número de ovos de nemátodes-das-galhas-radiculares por grama de raiz nos diferentes tratamentos B, E, EF e BF (B - tomateiro cv. Coração de Boi não-enxertado;;E - tomateiro cv. Coração de Boi enxertado em porta-enxerto cv. Embajador ; BF – tomateiro cv. Coração de Boi não-enxertado aplicado com *P. chlamydosporia*; EF – tomateiro cv. Coração de Boi enxertado em porta-enxerto cv. Embajador aplicado com *P. chlamydosporia*). Os valores são a média de três repetições e respetivo erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas no número de massa de ovos por grama nos diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

Anexo V

Tabela 3S. Ficha de registo de aplicação de produtos fitofarmacêuticos no ensaio da Apúlia (adaptado do caderno de campo do produtor comercial) com as seguintes informações sobre os produtos fitofarmacêuticos: Nome comercial; inimigo da cultura; concentração/dose aplicada na calda; data de aplicação; intervalo de segurança e modo de aplicação.

Nome Comercial	Inimigo/Função	Dose	Data de aplicação	Intervalo de Segurança	Modo de aplicação
Vydate 10L	Nemátodes	S.l.*	17-01	-	Rega
Radifarm	Enraizante	5L/ha	01-02	-	Rega
Cupramax	Indutor Resistências	3L/ha	11-02	-	Rega
Strong Power	Fertilizante	S.l.*	15-02	-	Foliar
Mesurool	Trips	5L/ha	16-02	28 dias	Foliar
Procrop Shiel Eu	Promotor defesas	1,5L/ha	20-02	-	Foliar
Advance	Fertilizante	3L/ha	20-02	-	Foliar
Spintor	Trips	250mL/há	20-02	3 dias	Foliar
Altela	Promotor defesas	1,5L/ha	25-02	-	Foliar
Boro Plus	Fertilizante	1,0L/ha	25-02	-	Foliar
Folivex inicio	Fertilizante	3,0/ha	25-06	-	Foliar
Pegasus	Fertilizante	3L/ha	6-03	-	Foliar
Boreal	Trips/Ácaros	1,0L/ha	6-03	3 dias	Foliar
Melody Cobre	Mildio	1,3kg/ha	18-03	7 dias	Foliar
Spintor	Trips	250ml/ha	18-03	3 dias	Foliar
Signum	<i>Botrytis</i>	1,8L/ha	27-03	3 dias	Foliar
Belthirul	<i>Tuta absoluta</i>	500g/ha	12-04	-	Foliar
Procrop Shiel Eu	Promotor defesas	1,5L/ha	12-04	-	Foliar
Azbany	Mildio	800mL/ha	19-04	3 dias	Foliar

Nome Comercial	Inimigo/Função	Dose	Data de aplicação	Intervalo de Segurança	Modo de aplicação
Scala	<i>Botrytis</i>	2,0L/ha	27-04	3 dias	Foliar
Spintor	Trips	250mL/ha	27-04	3 dias	Foliar
Steward	<i>Tuta absoluta</i>	250mL/ha	10-05	3 dias	Foliar
Oberon	Ácaros/Mosca Branca	600mL/ha	17-05	3 dias	Foliar
Ridomil Gold R	Míldio	5,0kg/ha	7-06	3 dias	Foliar
Belthirul	<i>Tuta absoluta</i>	500g/ha	7-06	-	Foliar
Procrop Shiel Eu	Promotor defesas	1,5L/ha	21-07	-	Foliar
Belthirul	<i>Tuta absoluta</i>	500g/ha	21-07	-	Foliar

*S.I. indica falta de informação.

(Continuação da tabela)