

JOSÉ RICARDO VIGGIANO

***Pochonia chlamydosporia* NO CONTROLE DO NEMATOIDE DAS GALHAS
E NA PRODUÇÃO DE ALFACE E PEPINO**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011**

JOSÉ RICARDO VIGGIANO

***Pochonia chlamydosporia* NO CONTROLE DO NEMATOIDE DAS GALHAS
E NA PRODUÇÃO DE ALFACE E PEPINO**

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

APROVADA: 30 de março de 2011.

Prof. Silamar Ferraz
(Co-Orientador)

Prof. Luiz Antonio Maffia

Dr. Trazilbo José de Paula Júnior

Prof. Everaldo Antônio Lopes

Prof. Leandro Grassi de Freitas
(Orientador)

À minha esposa, Joelma, pelo amor, carinho e compreensão.

Ao meu filho, José Gabriel, pela alegria, companheirismo e ajuda.

Aos meus pais, José e Léa, pelo exemplo, apoio e estímulo.

Aos meus familiares e amigos, pelo incentivo e paciência.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Leandro Grassi de Freitas, pela paciência, determinação e orientação segura dos trabalhos de pesquisa.

Ao Professor Silamar Ferraz, pelos conhecimentos transmitidos na área de Fitonematologia desde a graduação.

Ao colega Paulo Afonso Ferreira, pela amizade e apoio nas análises estatísticas do trabalho, contribuindo com valiosas correções, críticas e sugestões para os artigos da tese.

À Empresa Rizoflora Biotecnologia S.A., nas pessoas de Ronaldo João Falcão Zooca e Marcos Antônio dos Reis Teixeira, pelas facilidades e auxílios concedidos no preparo do material, montagem, condução e avaliação dos experimentos.

Ao Produtor Rural, Sr. Marino Abrantes Pereira, pela cessão de áreas de cultivo em sua propriedade para a instalação de experimentos de campo e pela ajuda na montagem e condução destes experimentos.

Aos Professores Silamar Ferraz, Luiz Antonio Maffia, Everaldo Antônio Lopes e ao Pesquisador Dr. Trazilbo José de Paula Júnior, pela participação como membros da Banca de Defesa de Tese, tendo contribuído com correções, críticas e sugestões para o aperfeiçoamento dos artigos da tese.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, Sr. Mário e sua esposa Neusa, Sara, Dona Rita, Dona Berlamina, Bráz, Camilo, Delfino e Célio pelos serviços prestados com gentileza, presteza e qualidade.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo concedida durante o curso.

A todos os colegas do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides, Érica, Deisy, Guilherme, Murilo, Hugo e Alessandro, pelo convívio, amizade, colaborações e alegrias. Um agradecimento especial à Marilene, Fernanda, Leonardo e Ronaldo, pela disposição para ajudar-me sempre que solicitei.

Aos meus colegas do Curso de Fitopatologia pela amizade, companheirismo e convívio acadêmico agradável.

À Deus, fonte de tudo.

BIOGRAFIA

JOSÉ RICARDO VIGGIANO, filho de José Viggiano e Léa Célia de Andrade Viggiano, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 28 de abril de 1966.

Em outubro de 1989, graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 1995, iniciou o Curso de Mestrado em Produção Vegetal, área de concentração em Fitotecnia, no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, concluindo-o em fevereiro de 1999.

Em março de 2006, iniciou o Curso de Especialização em Proteção de Plantas, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, concluindo-o em fevereiro de 2007.

Em março de 2007, iniciou o Curso de Doutorado em Fitopatologia, no Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	12
ARTIGO 1	
RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE <i>Pochonia chlamydosporia</i> NO DESENVOLVIMENTO DE MUDAS E PLANTAS DE ALFACE.	
RESUMO	22
ABSTRACT	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
CONCLUSÕES	38
AGRADECIMENTOS	38
REFERÊNCIAS	39
ARTIGO 2	
FORMAS DE APLICAÇÃO DE <i>Pochonia chlamydosporia</i> NO CONTROLE DE <i>Meloidogyne javanica</i> EM ALFACE.	
RESUMO	44
ABSTRACT	45

INTRODUÇÃO	46
MATERIAL E MÉTODOS	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
AGRADECIMENTOS	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ARTIGO 3	
<i>Pochonia chlamydosporia</i> NO CONTROLE DE <i>Meloidogyne javanica</i> EM PEPINO.	
RESUMO	72
INTRODUÇÃO	73
MATERIAL E MÉTODOS	75
RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
CONCLUSÕES	94
AGRADECIMENTOS	94
REFERÊNCIAS	95
ARTIGO 4	
CONTROLE DE <i>Meloidogyne</i> spp. EM CULTIVO COMERCIAL DE PEPINO COM DIFERENTES DOSES DE <i>Pochonia chlamydosporia</i> .	
RESUMO	101
ABSTRACT	102
INTRODUÇÃO	103
MATERIAL E MÉTODOS	106
RESULTADOS E DISCUSSÃO	110
AGRADECIMENTOS	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
CONCLUSÕES GERAIS	125

RESUMO

VIGGIANO, José Ricardo, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2011. ***Pochonia chlamydosporia* no controle do nematoide das galhas e na produção de alface e pepino.** Orientador: Leandro Grassi de Freitas. Co-Orientadores: Silamar Ferraz, Rosângela D’Arc de Lima Oliveira, Maurício Dutra Costa e José Rogério de Oliveira.

O fungo *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* tem um grande potencial para o controle biológico do nematoide das galhas em campos de produção de olerícolas, entretanto, as formas mais adequadas de aplicação desse organismo ainda necessitam ser determinadas. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivos: (a) verificar o efeito de diferentes tipos de substratos para produção de mudas, enriquecidos com um resíduo resultante do processo de produção do fungo, no desenvolvimento de mudas e de plantas de alface; (b) avaliar o fungo no controle de *M. javanica* quando aplicado nas mudas e no solo cultivado com plantas de alface e pepino; e (c) avaliar o fungo no controle do nematoide das galhas em área de cultivo comercial de pepino. No primeiro experimento, constatou-se que é possível a utilização de um resíduo à base de arroz, resultante do processo de produção do fungo, na concentração de até 2% (v:v) no substrato formulado e comercial, pois essa dose não prejudicou o desenvolvimento das plantas de alface. No segundo e terceiro experimentos, o isolado Pc-10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* foi efetivo no controle de *M. javanica* em plantas de alface e pepino, reduzindo efetivamente o número de galhas e de galhas.g⁻¹ de raízes

de plantas de pepino e o número de ovos e de ovos.g⁻¹ de raízes de plantas de alface e pepino. Efeitos mais expressivos sobre o controle do nematoide foram obtidos com a aplicação de 18,0 g.L⁻¹ de Pc-10 nas mudas de alface e pepino, sendo que a aplicação de Pc-10 no solo (5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo) também aumentou o controle de *M. javanica* em alface. A aplicação parcelada de Pc-10 nas mudas de alface e pepino não afetou o desenvolvimento das mesmas. No quarto experimento, em área cultivada com hortaliças e naturalmente infestada com o nematoide das galhas a dose de 75 g de um produto à base de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10) por cova foi a que proporcionou maior controle do nematoide das galhas, enquanto, a dose de 100 g do produto por cova foi a que proporcionou maior aumento da produção comercial de pepino. Portanto, o isolado Pc-10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, aplicado nas formas de clamidósporos puros, clamidósporos sobre arroz ou apenas arroz após a extração da maioria dos clamidósporos, nas mudas e no solo cultivado com as plantas de alface e pepino, mostrou-se eficiente no controle do nematoide das galhas.

ABSTRACT

VIGGIANO, José Ricardo, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2011. ***Pochonia chlamydosporia* in the control of the knot-root nematode and in the production of lettuce and cucumber.** Adviser: Leandro Grassi de Freitas. Co-Advisers: Silamar Ferraz, Rosângela D'Arc de Lima Oliveira, Maurício Dutra Costa and José Rogério de Oliveira.

The fungus *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* presents great potential for the biological control of the root-knot nematode in fields of vegetable production, however, the proper ways to apply this organism still need to be determined. Thus, this study aimed to: (a) evaluate the effect of different substrates for seedling production, enriched with a residue from the production process of the fungus, in the development of seedlings and plants of lettuce; (b) evaluate the fungus for the control *M. javanica* when applied to seedlings and to the soil cultivated with lettuce and cucumber; and (c) evaluate the fungus in the control of knot-root nematodes in an area of commercial cultivation of cucumber. In the first experiment, it was found that it is possible to use a residue of rice resulting from the production process of the fungus at concentrations of up to 2% (v:v) of a formulated and a commercial substrate, because this dose did not adversely affect the development of the lettuce plants. In the second and third experiments, the isolated Pc-10 of *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* was effective in controlling *M. javanica* in lettuce and cucumber, by reducing the number of galls and galls.g⁻¹ root of cucumber plants, and the number of eggs and eggs.g⁻¹ roots of lettuce and cucumber plants. The best results were obtained with the

application of 18.0 g.L^{-1} of Pc-10 on seedlings of lettuce and cucumber, although the application of Pc-10 on the ground ($5,000 \text{ chlamydo spores.g}^{-1}$ soil) also increased the control of *M. javanica* in lettuce. The divided application of Pc-10 on cucumber and lettuce seedlings did not affect their development. In the fourth experiment, in an area cultivated with vegetables and naturally infested with nematodes, the dose of 75 g of a product based on *P. chlamydo sporia* var. *chlamydo sporia* (isolate Pc-10) per hole resulted in higher level of control of the knot-root nematodes, while the dose of 100 g of product per hole gave the largest increase in the commercial production of cucumber. Therefore, the Pc-10 isolate of *P. chlamydo sporia* var. *chlamydo sporia* applied as pure chlamydo spores, chlamydo spores over rice or as the rice after extraction of most of the chlamydo spores, on seedlings and soil cultivated with lettuce and cucumber, shown to be effective in the control of the knot-root nematodes.

INTRODUÇÃO GERAL

Os fitonematoides são patógenos de grande importância econômica para a agricultura mundial. As perdas devido à redução da produtividade e da qualidade da produção são muito variáveis e difíceis de serem quantificadas. Estimativas da importância econômica desses patógenos na produção agrícola mundial existem, porém, os valores não são determinados precisamente (Tihohod, 1993). Segundo Agrios (2005), as perdas causadas por esses patógenos nas culturas de maior importância econômica no mundo são de aproximadamente 14% e representam, anualmente, mais de US\$ 80 bilhões de dólares.

As maiores perdas decorrem dos fitonematoides endoparasitas sedentários da família Heteroderidae: o nematoide dos cistos (*Heterodera* spp. e *Globodera* spp.) e o nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) (Williamson, 1999). No Brasil, estimativas de perdas causadas pelos nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) variam de 5 a 15%, dependendo da cultura (Lordello, 1984).

Entre as espécies de nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) amplamente distribuídas nos solos agrícolas do Brasil e que possuem ampla gama de hospedeiros, destacam-se *M. incognita* e *M. javanica*, que podem provocar perdas consideráveis em alface (*Lactuca sativa* L.) e pepino (*Cucumis sativus* L.) (Campos, 1995; Charchar & Moita, 1996; Charchar & Aragão, 2005). Sikora & Fernández (2005) relataram a ocorrência das seguintes espécies de nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) nos

cultivos de alface e pepino em regiões tropicais e subtropicais: *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, relatados nas duas espécies de hortaliças, além de *M. hapla* e *M. enterolobi* em alface, e de *M. floridensis* em pepino.

O manejo integrado de fitonematoides é uma tarefa complexa e difícil, pois, geralmente, o agricultor desconhece a presença desses patógenos ou subestima os seus danos. Além disso, o monitoramento de sua população no solo exige amostragens sistemáticas. Portanto, o manejo integrado exige refinado conhecimento dos agricultores e técnicos para que as medidas de controle a serem adotadas sejam eficientes, técnica e economicamente viáveis, de baixo impacto ambiental e integradas ao sistema produtivo.

Entre os principais métodos de controle do nematoide das galhas no cultivo da alface, destacam-se a utilização de cultivares resistentes do tipo crespas (Charchar & Moita, 1996, 2005); a solarização e adição de matéria orgânica (Silva et al., 2006); e o alqueive úmido (Dutra et al., 2003, 2006). No pepino, destacam-se a rotação de culturas com espécies vegetais não-hospedeiras e a utilização de mudas enxertadas (Charchar & Aragão, 2005; Wilcken et al., 2010).

Os fitonematoides, quando introduzidos e disseminados numa área agrícola, são difíceis de ser erradicados e a única alternativa que resta aos agricultores é conviver com esses indesejáveis patógenos, utilizando práticas agrícolas que visem à redução e/ou manutenção das populações presentes na área em níveis que não causem danos e perdas expressivas. Portanto, uma boa estratégia de controle baseia-se em medidas de exclusão que evitam a introdução de novas espécies de fitonematoides na área de cultivo (Ferraz et al., 2010). Segundo Charchar & Moita (1996), em áreas de cultivo de alface, a disseminação de fitonematoides ocorre principalmente por meio de substrato de muda infestado, água de irrigação contaminada e solo infestado aderido em máquinas e implementos agrícolas.

O plantio de cultivares resistentes para o controle de fitonematoides traz enormes vantagens, por ser um método eficiente, prático e econômico. No caso da alface, as cultivares do tipo crespa, geralmente, apresentam maior resistência ao nematoide das galhas. Porém, alguns mercados consumidores tem preferência por cultivares do tipo lisa, que apresentam maior suscetibilidade ao patógeno, principalmente, quando cultivadas no verão (Charchar & Moita, 1996, 2005). No pepino, não existem cultivares comerciais resistentes a *M. incognita* e *M. javanica* (Wilcken et al., 2010). Vale ressaltar que, no Brasil, não existem nematicidas químicos registrados para o uso em alface e pepino (MAPA, 2011).

A rotação de culturas é uma prática que, bem utilizada, proporciona excelentes resultados, porém, em solos infestados com diferentes espécies do nematoide das galhas, sua implementação é limitada e, conseqüentemente, o sucesso dessa medida também, pois esse gênero de fitonematoide é polífago (Sikora et al., 2005). No cultivo de alface e pepino, a rotação de culturas é feita com o plantio de espécies menos suscetíveis aos nematoides das galhas, a exemplo das gramíneas, milho e sorgo; e das leguminosas antagonistas, tais quais as crotalárias e mucunas, que nem sempre proporcionam um controle eficiente (Charchar & Moita, 1996; Wilcken et al., 2010).

Outras medidas, como a escolha do local de plantio, a limpeza de máquinas e implementos agrícolas, o uso de mudas saudáveis, o revolvimento do solo, a destruição dos restos culturais, o controle de plantas invasoras, o cultivo de plantas antagonistas e a rotação de culturas com plantas não-hospedeiras, também devem ser utilizadas (Lordello, 1984; Campos et al., 2001, 2007; Sikora et al., 2005; Ferraz et al., 2010).

Em virtude das limitações dessas medidas de controle, grandes esforços tem sido feitos no desenvolvimento de métodos alternativos de controle (Stirling, 1991; Kerry, 2001; Freitas & Ferraz, 2005; Salgado & Borges, 2008). Entre esses métodos, o controle

biológico tem grande potencial como estratégia no controle integrado dos fitonematoides (Jatala, 1986; Stirling, 1991; Siddiqui & Mahmood, 1996; Freitas & Ferraz, 2005; Dong & Zhang, 2006; Ferraz et al., 2010).

O controle biológico é definido como a redução da capacidade de sobrevivência e reprodução dos fitonematoides pela ação de outros organismos vivos do solo, chamados de antagonistas ou inimigos naturais (Stirling, 1991). Pode ocorrer por meio da manipulação do ambiente do solo para manter ou aumentar a população desses antagonistas e/ou a sua introdução no solo de forma inoculativa ou inundativa. Os mecanismos envolvidos nessa relação podem ser de vários tipos: parasitismo, predação, competição, antibiose, indução de resistência e promoção de crescimento. Entre os antagonistas que ocorrem no solo, as bactérias e os fungos são os que apresentam maior potencial para o desenvolvimento de agentes de biocontrole de fitonematoides (Stirling, 1991; Sikora, 1992; Kerry, 1997).

Entre as bactérias, *Pasteuria penetrans* tem sido utilizada no biocontrole do nematoide das galhas. Esta bactéria é agressiva, resistente e controla esse patógeno em diversas culturas por meio da redução da penetração de juvenis de segundo estágio (J₂) nas raízes e pela inibição da produção de ovos pela fêmea. Sua utilização é limitada devido à dificuldade de produção de seu inóculo *in vitro* em escala comercial e porque seus isolados apresentarem alto grau de especificidade no parasitismo (Freitas & Carneiro, 2000; Carneiro & Freitas, 2006).

As rizobactérias e bactérias endofíticas, principalmente *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp., também tem sido pesquisadas e apresentado potencial como agentes de biocontrole, pois tem demonstrado a capacidade de induzir resistência sistêmica (RSI) ao hospedeiro (Sikora, 1992; Freitas, 2006; Sikora et al., 2007).

Os fungos antagonistas, também conhecidos como nematófagos, são classificados, de acordo com a estratégia utilizada para infectar ou capturar os fitonematoides, em predadores, endoparasitas, produtores de metabólitos tóxicos e parasitas de ovos e fêmeas (Barron, 1977; Stirling, 1991; Chen & Dickinson, 2004). Os endoparasitas produzem esporos que são ingeridos ou aderidos à cutícula dos fitonematoides. Posteriormente, esses esporos germinam e dão origem às hifas que colonizam o corpo do fitonematoide. Seu potencial de uso como agente de biocontrole é limitado, pois são muito sensíveis às variações químicas, físicas e biológicas do solo. Exemplos desses fungos são *Catenaria anguillulae*, *Myzocythium* spp., *Haptoglossa heterospora*, *Hirsutella rhossoliensis*, *Nematoctonus* spp. (Barron, 1977; Stirling, 1991; Ferraz & Santos, 1995; Hertz et al., 2006).

Os fungos predadores formam estruturas especializadas, do tipo armadilhas, para a captura dos fitonematoides ao longo de suas hifas. O micélio fúngico cresce a partir do corpo do fitonematoide capturado produzindo novas estruturas. Apresentam habilidade saprofítica variada e produzem diferentes tipos de armadilhas: hifas adesivas não-diferenciadas, redes adesivas, nódulos adesivos, anéis constritores e não-constritores. Importantes exemplos são encontrados no gênero *Arthrobotrys*. A produção das armadilhas é induzida pela presença do fitonematoide, sendo essa uma das limitações no desenvolvimento desses fungos como agentes de biocontrole (Stirling, 1991; Ferraz & Santos, 1995; Hertz et al., 2006). Existem produtos no mercado, como ‘Nemastin’, elaborado com a mistura de *Arthrobotrys* spp., *Verticillium* spp. e *Paecilomyces* spp., na Índia; e ‘Nemat_{Ap}’, que consiste na mistura de *Arthrobotrys* spp. e *Paecilomyces* spp., no Brasil.

Alguns fungos nematófagos são produtores de metabólitos tóxicos que interferem no comportamento do fitonematoide. Entre estes se destacam *Paecilomyces*

lilacinus, *Myrothecium* spp., *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp., *Pleurotus* spp., *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. (Stirling, 1991; Ferraz & Santos, 1995; Chen & Dickinson, 2004). Produtos comerciais elaborados com esses agentes já foram lançados no mercado mundial, destacando-se BioAct[®] e MeloCon[®], ambos à base de *P. lilacinus*; e DiTera[®], que é um produto originado da fermentação de *Myrothecium verrucaria* (Guerena, 2006).

Entre os fungos nematófagos parasitas de ovos e fêmeas, destacam-se *P. lilacinus* e *Pochonia chlamydosporia*. São saprofitos, estabelecem-se facilmente no solo e colonizam rapidamente ovos e fêmeas de fitonematoides, destruindo de uma só vez grande número de indivíduos (Stirling, 1991).

Mais recentemente, pesquisas com fungos endofíticos tem demonstrado a capacidade destes em induzir resistência sistêmica (RSI) aos hospedeiros dos fitonematoides. Trabalhos recentes demonstraram a capacidade de uma forma não-patogênica de *Fusarium oxysporum* de induzir resistência sistêmica em tomateiros à *M. incognita* (El-Fattah et al., 2007) e em bananeiras à *Radopholus similis* (Vu et al., 2006).

Pochonia chlamydosporia, conhecido anteriormente por *Verticillium chlamydosporium*, é um fungo parasita de ovos e fêmeas de espécies de fitonematoides endoparasitas sedentários. Tem sido um dos fungos mais pesquisados para o controle biológico (Kerry, 1997; Bourne & Kerry, 1999; Bourne, 2001; Kerry & Bourne, 2002). Esse fungo é tido como responsável pelo desenvolvimento de solos supressivos ao nematoide dos cistos dos cereais (*Heterodera avenae*) em áreas de monocultivo com cereais na Inglaterra (Kerry & Crump, 1998). A supressividade de um solo ao nematoide das galhas (*M. incognita*) já foi conseguida através de aplicações de *P.*

chlamydosporia dentro de um sistema de rotação de culturas, após três anos de cultivo (Bourne, 2001). Esse fungo apresenta boa capacidade saprofítica, o que permite seu crescimento em matéria orgânica entre as estações de cultivo. Logo, o fungo não é dependente da presença do nematóide para a sua nutrição, podendo atuar como saprófita na ausência do nematóide hospedeiro. Esse fungo também produz clamidósporos, estruturas de armazenamento de reservas nutricionais e de sobrevivência que favorecem sua manipulação e produção *in vitro*. Outra característica marcante é a sua capacidade de colonização da rizosfera de algumas plantas, permitindo a multiplicação do seu inóculo no solo (Kerry, 2001).

Outros estudos tem demonstrado o grande potencial de *P. chlamydosporia* como agente de biocontrole de *Globodera pallida* em batata (Jacobs et al., 2003), *Rotylenchulus reniformis* em algodeiro (Wang et al., 2005), *Heterodera schachtii* em beterraba açucareira (Ayatollahy et al., 2008) e *G. pallida* e *G. rostochiensis* em batata (Tobin et al., 2008). Também tem apresentado antagonismo a patógenos fúngicos do solo, como *F. oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* e *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Kerry & Bourne, 2002; Monfort et al., 2005).

O desenvolvimento de formulações comerciais aceitáveis de *P. chlamydosporia* é um desafio. Existem produtos que estão sendo testados em sistemas produtivos comerciais, como 'KlamiC', em desenvolvimento pelo instituto CENSA, em Cuba; 'MicoTec', pela empresa ClamiTec, em Portugal; e uma formulação pela empresa Rizoflora Biotecnologia S.A., em Viçosa, Minas Gerais.

O fungo *P. chlamydosporia* cresce facilmente em vários meios de cultura sólidos *in vitro*, porém, produz poucos clamidósporos em meios líquidos (Kerry, 2001; Mo et al., 2005). A produção de clamidósporos do fungo já foi obtida com sucesso em meio

sólido utilizando-se areia:farelo (Stirling et al., 1998), milho triturado (Lopes et al., 2007a), milho triturado:areia (Dallemole-Giaretta et al. 2008; Coutinho et al., 2009) e palha de café (Dallemole-Giaretta et al., 2010b). Recentemente, devido à disponibilidade, preços acessíveis e características físico-químicas, o arroz tem sido utilizado como substrato para meio de crescimento e produção massal de clamidósporos do isolado Pc-10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, em um produto em desenvolvimento pela Rizoflora Biotecnologia. Entretanto, esse processo gera uma quantidade considerável de um resíduo sólido e seco do substrato, podendo ultrapassar 80% da quantidade de arroz utilizado como substrato para meio de cultivo do fungo (comunicação pessoal de Rodrigo Valdes, Rizoflora Biotecnologia). Avaliações prévias desse resíduo *in vitro*, indicaram a presença de uma quantidade considerável de clamidósporos viáveis. Dessa forma, melhorias no processo de produção massal dos clamidósporos e investigações das possibilidades de aproveitamento desse resíduo são essenciais para a redução dos custos de produção, além de contribuir para uma menor geração de impactos ambientais pela indústria produtora de agentes de biocontrole. No 1º artigo da presente tese, foram investigados os efeitos da utilização do resíduo gerado no processo de produção de clamidósporos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10) no desenvolvimento de mudas e plantas de alface.

A introdução de *P. chlamydosporia* no solo de uma forma prática, eficiente e integrada ao sistema produtivo também é um desafio. Segundo Kerry & Bourne (2002), várias técnicas foram testadas, entretanto, essas técnicas não proporcionaram resultados satisfatórios, necessitando de outras investigações. A implantação de cultivos de alface, pepino e outras hortaliças no campo é feita principalmente por meio de mudas produzidas com diferentes tipos de substratos comerciais ou formulados pelo próprio agricultor (Trani et al., 2004, 2007; Lopes et al., 2007b), podendo ser uma técnica

simples e economicamente viável de introdução do fungo no solo que merece ser investigada. Dessa forma, nos 2º e 3º artigos, foram investigadas as formas de aplicação do fungo no solo e o seu efeito no controle de *M. javanica* em duas espécies de hortaliças, alface e pepino.

A eficácia de *P. chlamydosporia* em estratégias de manejo integrado em sistemas produtivos comerciais ainda carece de avaliações (Kerry & Bourne, 2002). Pesquisas em condições controladas, utilizando-se diferentes isolados de *P. chlamydosporia* no controle do nematoide das galhas em tomateiros cultivados em casa de vegetação foram realizadas por Lopes (2007), Dallemole-Giaretta (2008), Podestá et al. (2009), Coutinho et al. (2009) e Dallemole-Giaretta et al. (2010a e b), sendo necessário avaliar a eficiência do fungo em condições de campo. No 4º artigo, foi investigada a eficiência do controle do nematoide das galhas em pepino cultivado em área de produção comercial de hortaliças, utilizando-se diferentes doses de um produto formulado com *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10).

Apesar do controle biológico de fitonematoides ser estudado em todo o mundo há décadas (Barron, 1977; Stirling, 1991; Sikora, 1992; Dong & Zhang, 2006), alguns poucos produtos formulados com fungos nematófagos e bactérias tem alcançado limitado sucesso comercial. Resultados inconsistentes de experimentos de casa de vegetação e de campo, inclusive com *P. chlamydosporia* (Ferraz & Santos, 1995; Kerry, 1997; Dong & Zhang, 2006), podem ocorrer devido à falta de formulação que favoreça o estabelecimento do fungo no solo.

A preocupação com a preservação ambiental tem levado à busca por métodos de controle de doenças alternativos e eficientes, mediante a utilização de produtos não poluentes, de custo acessível e de fácil aplicação nas lavouras (Salgado & Borges, 2008). No Brasil, pesquisadores, governantes, agricultores, indústria de bioprodutos e

consumidores tem se esforçado no sentido de incentivar, produzir e consumir alimentos e derivados sem ou com a mínima utilização de defensivos agrícolas. Dessa forma, o controle de pragas utilizando agentes de controle biológico está sendo incentivado. Entretanto, segundo Ferraz et al. (2010), vários aspectos devem ser considerados no desenvolvimento de bionematicidas no Brasil, destacando-se: (a) a adaptação do agente de biocontrole às variadas condições edafoclimáticas; (b) o custo de produção do bionematicida; (c) a formulação e forma de aplicação do bionematicida; (d) o registro do produto.

Diante dessas exposições, formulou-se a hipótese de que melhorias do processo de produção massal de clamidósporos e de técnicas de aplicação do fungo no solo, bem como, a avaliação da eficiência do fungo no controle do nematoide das galhas em condições de campo são essenciais para suportar o uso prático e comercial desse agente de biocontrole no cultivo de hortaliças.

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivos específicos:

1. Avaliar o efeito de três tipos de substratos para mudas enriquecidos com um resíduo resultante do processo de produção massal de clamidósporos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10) no desenvolvimento de mudas e de plantas de alface;

2. Avaliar o efeito de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10) no controle de *M. javanica* quando aplicado em diferentes doses nas mudas e no solo cultivado com plantas de alface;

3. Avaliar o efeito de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10) no controle de *M. javanica* quando aplicado em diferentes doses nas mudas e no solo cultivado com plantas de pepino;

4. Avaliar o uso de um produto formulado com *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10) no controle do nematoide das galhas em área de cultivo comercial de pepino.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5nd ed. Amsterdan: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.
- AYATOLLAHY, E.; FATEMY, S.; ETEBARIAN, H.R. Potential for biological control of *Heterodera schachtii* by *Pochonia chlamyosporia* var. *chlamyosporia* on sugar beet. **Biocontrol Science and Technology**, v.18, p.157-167, 2008.
- BARRON, G.L. **The nematode-destroying fungi**. Ontario: Canadian Biological Publications, 1977. 140p.
- BOURNE, J.M.; KERRY, B.R. Efect of the host plant on the efficacy of *Verticillium chlamyosporium* as a biological control agent of root-knot nematodes at diferent nematode densities and fungal application rates. **Soil Biology and Biochemistry**, v.31, p.75-84, 1999.
- BOURNE, J.M. Making a soil supressive to root-knot nematodes by applications of *Verticillium chlamyosporium*. **IOBC/WPRS Bulletin**, v.24, p.25-30, 2001.
- CAMPOS, V.P. Doenças causadas por nematóides em alcachofra, alface, chicória, morango e quiabo. **Informe Agropecuário**, v.17, p.17-22, 1995.

CAMPOS, V.P.; CAMPOS, J.R.; SILVA, L.H.C.P.; DUTRA, M.R. Manejo de nematóides em hortaliças. In: SILVA, L.H.C.P; CAMPOS, J.R.; NOJOSA, G.B.A. (Ed.). **Manejo integrado: doenças e pragas em hortaliças**. Lavras: UFLA, 2001. p.125-158.

CAMPOS, V.P.; SILVA, J.R.C.; CAMPOS, H.D.; PEREIRA, L.H.C. Manejo de fitonematoides. **Fitopatologia Brasileira**, v.32(Supl.), p.16-17, 2007.

CARNEIRO, R.M.D.G.; FREITAS, L.G. **Utilização de *Pasteuria penetrans* no controle do nematoide das galhas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 32p.

CHARCHAR, J.M.; ARAGÃO, F.A.S. Reprodução de *Meloidogyne* spp. em cultivares de tomate e pepino sob estufa plástica e campo. **Nematologia Brasileira**, v.29, p.243-249, 2005.

CHARCHAR, J.M.; MOITA, A.W. Reação de cultivares de alface à infecção por mistura populacionais de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *M. javanica* em condições de campo. **Horticultura Brasileira**, v.4, p.185-189, 1996.

CHARCHAR, J.M.; MOITA, A.W. **Metodologia para seleção de hortaliças com resistência a nematoides: alface/*Meloidogyne* spp.** Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. 8p.

CHEN S.; DICKSON, D.W. Biological control of nematodes by fungal antagonists. In: CHEN, Z.; CHEN, S.; DICKSON, D.W. (Ed.). **Nematology - advances and perspectives. Volume II: Nematode management and utilization**. Beijing and Wallingford: Tsinghua University Press and CABI Publishing, 2004. p.979-1039.

COUTINHO, M.M.; FREITAS, L.G.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; NEVES, W.S.; LOPES, E.A.; FERRAZ, S. Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pochonia chlamydosporia* e farinha de sementes de mamão. **Nematologia Brasileira**, v.33, p.169-175, 2009.

DALLEMOLE-GIARETTA, R. **Isolamento, identificação e avaliação de *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica* e na promoção de crescimento de tomateiro.** 2008. 83p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; FERRAZ, S.; NEVES, W.S.; LOPES, E.A.; COUTINHO, M.M. Efeito da concentração de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.32, p.327-332, 2008.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; COUTINHO, M.M.; NEVES, W.S.; ZOOCA, R.J.F.; FERRAZ, S. Efeito da farinha de sementes de abóbora e de *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.34, p.91-97, 2010a.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; ZOOCA, R.J.F.; CAIXETA, L.B. & LOPES, E.A. Controle de *Meloidogyne javanica* por meio da aplicação de palha de café colonizada por *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. **Nematologia Brasileira**, v.34, p.137-140, 2010b.

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

DUTRA, M.R.; CAMPOS, V.P.; TOYOTA, M. Manejo do solo e da irrigação para o controle de *Meloidogyne javanica* em alface. **Nematologia Brasileira**, v.27, p.29-34, 2003.

DUTRA, M.R.; CAMPOS, V.P.; ROCHA, F.S.; SILVA, J.R.C.; POZZA, E.A. Manejo do solo e da irrigação no controle de *Meloidogyne incognita* em cultivo protegido. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.405-407, 2006.

EL-FATTAH, A.; DABABAT, A.; SIKORA, R.A. Influence of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* 162 on *Meloidogyne incognita* attraction and invasion. **Nematology**, v.9, p.771-776, 2007.

FERRAZ, S., SANTOS, M.A. Controle biológico de fitonematoides pelo uso de fungos. **Revisão Anual de Proteção de Plantas**, v.3, p.283-314, 1995.

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

FREITAS, L.G. **Rizobactérias versus nematóides**. 2006. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/rizo.pdf>>. Acesso em: 23 Abr 2007.

FREITAS, L.G.; CARNEIRO, R.M.D.G. Controle biológico de fitonematoides por *Pasteuria* spp. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico v. II**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. p.91-125.

FREITAS, L.G.; FERRAZ, S. Controle alternativo de pragas e doenças In: VENZON, M.; PAULA JUNIOR, T.J.; PALLINI, A. (Ed.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG-UFV, 2005. p.331-359.

GUERENA, M. **Nematodes: alternative controls**. 2006. Disponível em: <<http://attra.ncat.org/attra-pub/PDF/nematode.pdf>>. Acesso em: 24 Jun 2009.

HERTZ, B.N.; JANSSON, H.B.; TUNLID, A. **Nematophagous fungi**. 2006. Disponível em: <<http://www.ua.es/personal/hb.jansson/Reprints/NHertz%20et%20al%20ELSHtm%202006.pdf>>. Acesso em: 28 de Abr 2008.

JACOBS, H.; GRAY, S.N.; CRUMP, D.H. Interactions between nematophagous fungi and consequences for their potential as biological agents for the control of potato cyst nematodes. **Mycological Research**, v.107, p.47-56, 2003.

JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.453-489, 1986.

KERRY, B.R. Biological control of nematodes: prospects and opportunities. In: MAQBOOL, M.A.; KERRY, B. (Ed.). **Plant nematode problems and their control in the Near East Region (FAO Plant Production and Protection Paper - 144)**. Rome: FAO, 1997. Disponível em: <[http://www.fao.org/docrep/v9978e/v9978e0b.htm#biological control of nematodes: prospects and opportunities](http://www.fao.org/docrep/v9978e/v9978e0b.htm#biological%20control%20of%20nematodes%3A%20prospects%20and%20opportunities)>. Acesso em: 23 Mai 2008.

KERRY, B.R. Exploitation of nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Ed.). **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**. Wallingford: CAB International, 2001. p.155-167.

KERRY, B.R.; BOURNE, J.M. **A manual for research on *Verticillium chlamydosporium*, a potencial biological control agent for root-knot nematodes**. Gent: IOBC-WPRS, 2002. 84p.

KERRY, B.R.; CRUMP, D.H. The dynamics of the decline of the cereal cyst nematode, *Hetreodera avenae*, in four soils under intensive cereal production. **Fundamental and Applied Nematology**, v.21, p.617-625, 1998.

LOPES, E.A. **Formulação de condicionadores de solo com propriedades nematocidas**. 2007. 99p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

LOPES, E.A.; FERRAZ, S.; FERREIRA, P.A.; FREITAS, L.G.; DHINGRA, O.D.; GARDIANO, C.G.; CARVALHO, S.L.. Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.31, p.78-84, 2007a.

LOPES, J.L.W.; BOARO, C.S.F.; PERES, M.R.; GUIMARÃES, V.F.. Crescimento de mudas de alface em diferentes substratos. **Biotemas**, v.20, p.19-25, 2007b.

LORDELLO, L.G.E. **Nematóides das Plantas Cultivadas**. 8. ed. São Paulo: Nobel, 1984. 314 p.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimentos. AGROFIT. Relatório de pragas e doenças nas culturas da alface e pepino. 2011. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 11 Mar 2011.

MO, M.; XU, C.K.; ZHANG, K.Q. Effects of carbon and nitrogen sources, carbon-to-nitrogen ratio, and initial pH on the growth of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* in liquid culture. **Mycopathologia**, v.159, p.381-387, 2005.

MONFORT, E.; LOPEZ-LLORCA, L.V.; JANSSON, H.B.; SALINAS, J.; PARK, J.O.; SIVASITHAMPARAM, K. Colonization 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**, v.37, p.1229-1235, 2005.

PODESTÁ, G.S.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A.; FERRAZ, S.; ZOOCA, R.J.F. Atividade nematófaga de *Pochonia chlamydosporia* em solo natural ou autoclavado sobre *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.33, p.191-193, 2009.

SALGADO, S.M.L.; BORGES, J. Controle alternativo de fitonematoides. In: VENZON, M.; PAULA JUNIOR, T.J.; PALLINI, A. (Ed.). **Avanços no controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG, 2008. p.179-206.

SIDDIQUI, Z.A.; MAHMOOD, I. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: a review. **Bioresource Technology**, v.58, p.229-239, 1996.

SIKORA, R.A. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plant parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.245-270, 1992.

SIKORA, R.A.; BRIDGE, J.; STARR, J.L. Management practices: an overview of integrated nematode management technologies. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CAB International, 2005. p.793-825.

SIKORA, R.A.; FERNÁNDEZ, E. Nematode parasites of vegetables. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CAB International, 2005. p.319-392.

SIKORA, R.A.; SCHAFER, K.; DABABAT, A.A. Modes of action associated with microbially induced *in planta* suppression of plant-parasitic nematodes. **Australasian Plant Pathology Society**, v.36, p.124-134, 2007.

SILVA, M.G.; SHARMA, R.D.; JUNQUEIRA, A.M.R.; OLIVEIRA, C.M. Efeito da solarização, adubação química e orgânica no controle de nematoides em alface sob cultivo protegido. **Horticultura Brasileira**, v.24, p.489-494, 2006.

STIRLING, G.R. **Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects**. Wallingford: CAB International, 1991. 282p.

STIRLING, G.R.; LICASTRO, K.A.; WEST, L.M.; SMITH, L.J. Development of commercially acceptable formulations of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium*. **Biological Control**, v.11, p.217-223, 1998.

TIHOHOD, D. **Nematologia Agrícola Aplicada**. Jaboticabal: FUNEP, 1993. 372p.

TOBIN, J.D.; HAYDOCK, P.P.J.; HARE, M.C.; WOODS, S.R.; CRUMP, D.H. Effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* and fosthiazate on the multiplication rate of potato cyst nematodes (*Globodera pallida* and *G. rostochiensis*) in potato crops grown under UK field conditions. **Biological Control**, v.46, p.194-201, 2008.

TRANI, P.E.; NOVO, M.C.S.S.; CAVALLARO JÚNIOR, M.L.; TELLES, L.M.G. Produção de mudas de alface em bandejas e substratos comerciais. **Horticultura Brasileira**, v.22, p.290-294, 2004.

TRANI, P.E.; FELTRIN, D.M.; POTT, C.A.; SCHWINGEL, M. Avaliação de substratos para produção de mudas de alface. **Horticultura Brasileira**, v.25, p.256-260, 2007.

VU, T.; HAUSCHILD, R.; SIKORA, R.A. *Fusarium oxysporum* endophytes induced systemic resistance against *Radopholus similis* on banana. **Nematology**, v.8, p.847-852, 2006.

WANG, K.; RIGGS, R.D.; CRIPPEN, D. Isolation, selection and efficacy of *Pochonia chlamydosporia* for control of *Rotylenchulus reniformis* on cotton. **Phytopathology**, v.95, p.890-893, 2005.

WILCKEN, S.R.S.; ROSA, J.M.O.; HIGUTI, A.R.O.; GARCIA, M.J.M.; CARDOSO AII. Reprodução de *Meloidogyne* spp. em porta-enxertos e híbridos de pepino. **Horticultura Brasileira**, v.28, p.120-123, 2010.

WILLIAMSON, V.M. Plant nematode resistance genes. **Plant Biology**, v.2, p.327-331, 1999.

ARTIGO 1

RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE *Pochonia chlamydosporia* NO DESENVOLVIMENTO DE MUDAS E PLANTAS DE ALFACE.¹

¹Artigo elaborado de acordo com as normas da revista “Pesquisa Agropecuária Brasileira”.

**Resíduo da produção de *Pochonia chlamydosporia* no desenvolvimento
de mudas e plantas de alface.**

José Ricardo Viggiano⁽¹⁾, Leandro Grassi de Freitas⁽¹⁾ e Paulo Afonso Ferreira⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, CEP 36.570-000, Viçosa, MG.

E-mail: jrviggiano@bol.com.br, leandro@ufv.br, pafonsoferreira@uol.com.br

Resumo - O objetivo desse trabalho foi avaliar a utilização de um subproduto do processo de produção de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no desenvolvimento de mudas e plantas de alface. Esse subproduto, um resíduo constituído de arroz contendo propágulos do fungo, foi adicionado em diferentes concentrações (0, 2 e 4% v:v resíduo:substrato) a três tipos de substratos para mudas (formulado, comercial e fibra de coco). Sementes de alface foram semeadas em bandejas de isopor contendo os diferentes substratos enriquecidos com o resíduo. As mudas de alface foram transplantadas para vasos contendo o substrato solo de barranco e areia lavada 1:1 (v:v), 28 dias após o semeio. Todos os tipos de substratos e doses do resíduo apresentaram interação significativa para todas as variáveis relacionadas ao desenvolvimento das mudas e plantas de alface. O maior desenvolvimento das mudas ocorreu nas testemunhas (sem o resíduo) dos substratos. Entretanto, após o transplante das mudas para os vasos, as doses de resíduo até 4% e 2% v:v, respectivamente, nos

substratos formulado e comercial, foram as que promoveram maior desenvolvimento das plantas. A utilização dos substratos formulado e comercial com resíduo até 2% v:v é viável e não prejudica o desenvolvimento das plantas de alface.

Termos para indexação: fungos nematófagos, controle biológico, reciclagem, substratos, *Lactuca sativa*.

Residue from the production of *Pochonia chlamydosporia* in the development of seedlings and plants of lettuce.

Abstract - The objective of this study was to evaluate the use of a by-product of the production process of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* in the development of seedlings and plants of lettuce. This by-product, a residue constituted of rice containing the propagules fungus, was added in different concentrations (0, 2 and 4% v:v residue:substrate) to three types of substrates for seedlings (formulated, commercial and coconut fiber). Lettuce seeds were sown in polystyrene trays containing the different substrates enriched residue. The lettuce seedlings were transplanted into pots containing horizon C soil and sand washed 1:1 (v:v) as substrate, 28 days after sowing. All types of substrates and residue levels showed a significant interaction for all variables related to the development of lettuce seedlings and plants. The highest development of seedlings occurred in the control treatment (no residue) of the substrates. However, after transplanting the seedlings into the pots, the residue levels of up to 4% v:v and 2% v:v, respectively, in the substrates formulated and commercial, resulted in the highest growth of plants. The utilization of the formulated and commercial substrates with up to 2% v:v of residue is feasible and does not affect the development of lettuce plants.

Index terms: nematophagous fungi, biological control, recycling, substrates, *Lactuca sativa*.

Introdução

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça muito apreciada no Brasil e em todo o mundo. Suas folhas são importante fonte de sais minerais e de vitaminas, principalmente cálcio e vitamina A. No mercado encontram-se cultivares com folhas lisas ou crespas, com ou sem formação de cabeça, existindo alfaces com folhas verde-claras, verde-escuras ou roxas (Filgueira, 2008).

O fungo *Pochonia chlamydosporia* Zare & Gans (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard) é um agente de controle biológico que tem se destacado no controle do nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) (Kerry & Bourne, 2002; Ferraz et al., 2010). Cresce facilmente em vários meios de cultura sólidos *in vitro*, porém, produz poucos clamidósporos em meios líquidos (Kerry & Bourne, 2002; Mo et al., 2005). Os clamidósporos são o tipo de inóculo mais efetivo para o estabelecimento do fungo no solo e na rizosfera, pois não requer nutrientes adicionais (Bourne & Kerry, 1999).

Atualmente, os clamidósporos são produzidos em meios de substratos sólidos de cereais, a exemplo do arroz (*Oryza sativa* L.), que permite produzir aproximadamente $1,0 \times 10^9$ clamidósporos por grama de meio de cultura (Lopes, 2007; Dalemolle-Giaretta, 2008). Porém, o processo de produção massal de clamidósporos do fungo gera uma quantidade considerável de resíduo sólido e seco do substrato, podendo ultrapassar 80% da quantidade total do arroz utilizado como substrato para meio de cultivo do fungo (comunicação pessoal de Rodrigo Valdes, Rizoflora Biotecnologia S.A.). Dessa forma, melhorias no processo de produção massal dos clamidósporos e a investigação

das possibilidades de aproveitamento desse resíduo são essenciais para a redução dos custos de produção, além de contribuir para uma menor geração de impactos ambientais pela indústria produtora de agentes de biocontrole.

A introdução de *P. chlamydosporia* no solo de forma prática, eficiente e integrada ao sistema produtivo também é um desafio. Ferraz et al. (2010) relataram que uma alternativa de aplicação do fungo é por meio da irrigação, utilizando-se formulações de suspensão aquosa de conídios ou de pó de clamidósporos. Segundo Kerry & Bourne (2002), várias técnicas foram testadas. Entretanto, falta avaliar a utilização de resíduos resultantes do processo de produção massal dos clamidósporos, ou seja, o resíduo que contém micélio e clamidósporos do fungo (cerca de 1×10^4 unidades formadoras de colônia.g⁻¹ de resíduo) e o seu efeito sobre o desenvolvimento das mudas e plantas, evidenciando a necessidade de maiores investigações.

Geralmente, a implantação de cultivos de alface e outras hortaliças no campo é feita por meio de mudas produzidas com diferentes tipos de substratos comerciais ou formulados pelo próprio agricultor (Trani et al., 2004, 2007; Lopes et al., 2007), podendo essa técnica ser uma alternativa para a introdução do fungo no solo da área de cultivo de hortaliças.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de três tipos de substratos enriquecidos com um resíduo, resultante do processo de produção de clamidósporos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10), no desenvolvimento de mudas e plantas de alface.

Material e Métodos

O experimento foi instalado em casa de vegetação equipada com sistema de aquecimento e resfriamento, localizada em área experimental de campo do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Viçosa, Município de Viçosa, MG. O experimento foi realizado de 01 de julho a 17 de setembro de 2010.

Um resíduo sólido e seco de arroz, resultante do processo de produção de clamidósporos do isolado Pc-10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, em desenvolvimento pela empresa Rizoflora Biotecnologia, do lote 24/02, obtido em 26/03/2010, foi utilizado no experimento e será doravante chamado de resíduo. Avaliações prévias desse resíduo em meio semi-seletivo de Gaspard et al. (1990), indicaram a presença de clamidósporos viáveis em uma concentração média de $1,0 \times 10^4$ clamidósporos.g⁻¹ de resíduo e densidade de 0,65 g.cm⁻³. Neste experimento, nos diferentes substratos, foram aplicados 220 a 440 clamidósporos.g⁻¹ de substrato nas doses de 2% e 4% v:v, respectivamente.

Os seguintes substratos para produção de mudas foram utilizados: substrato formulado (17% terra de barranco, 50% de vermiculita e 33% de húmus de minhoca); substrato comercial (Tropstrato Hortaliças II – HT, marca Vida Verde); e fibra de coco (Golden MIX granulado, formulação número 11, marca Amafibra). Ao substrato formulado, foram adicionados 500 g de 04-14-08 em pó para cada 20 L da mistura. Todos os substratos foram peneirados. O substrato formulado e o comercial foram umedecidos com 5% de água (v:v) e a fibra de coco com 25% de água (v:v), para aumentar a umidade dos substratos e, dessa forma, facilitar o enchimento das bandejas. Em seguida, o resíduo em três doses (0, 2 e 4% v:v resíduo:substrato) foi adicionado e homogeneizado aos substratos das mudas, sete dias antes da montagem do experimento,

constituindo-se nove tratamentos em um esquema fatorial 3 x 3: substrato formulado, substrato comercial e fibra de coco, todos contendo as doses 0, 2 e 4% v:v do resíduo. Amostras dos substratos utilizados no experimento foram coletadas e análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Análises de Solo Viçosa Ltda (Tabela 1).

Tabela 1. Análises físico-químicas dos substratos formulado (SF), comercial (SC) e fibra de coco (FB) enriquecida com diferentes doses do resíduo (% v:v resíduo:substrato) realizadas no Laboratório de Análises de Solo Viçosa Ltda.

Substratos com diferentes doses do resíduo	pH	N	P	K	Ca	Mg	S	C.O.	C/N	Zn	Fe	Mn	Cu	B	Dens.
	H ₂ O	%							ppm					g.mL ⁻¹	
SF 0%	5,75	0,34	0,47	1,20	1,12	3,67	1,18	2,96	8,71	91	38208	299	20	9,1	0,94
SF 2%	5,93	0,34	0,57	1,04	1,12	3,49	1,25	3,12	9,17	89	42707	294	20	7,6	0,94
SF 4%	5,94	0,40	0,53	1,20	1,05	3,92	1,32	3,43	8,57	91	44956	307	18	9,1	0,94
SC 0%	5,54	0,55	0,26	0,22	1,40	0,77	0,44	13,10	23,81	51	8516	105	29	13,6	0,64
SC 2%	6,00	0,71	0,23	0,18	1,21	0,71	0,39	12,48	17,57	48	7166	92	25	15,2	0,66
SC 4%	6,00	0,68	0,23	0,21	1,26	0,88	0,42	12,94	19,02	51	7616	90	27	13,6	0,66
FC 0%	5,95	0,74	0,15	2,08	0,48	0,37	0,39	25,42	34,35	169	1588	67	82	76,8	0,18
FC 2%	5,90	0,83	0,12	1,20	0,70	0,33	0,31	27,14	32,69	176	1273	63	88	100,8	0,17
FC 4%	5,88	0,99	0,14	1,12	0,63	0,26	0,29	27,61	27,88	162	1273	55	108	87,9	0,18

Teores totais, determinados em extrato ácido (ácido nítrico com ácido perclórico); N, pelo método do Kjeldahl; CO, pelo método Walkley-Black.

Sementes de alface Regina 255 (marca Topseed, lote 011.912, germinação: 83%, pureza: 99,9%, teste: 04/2010, validade: 04/2012) foram semeadas manualmente em cinco bandejas de isopor cortadas (do tipo 128 células) com 56 células, com capacidade para aproximadamente 1,8 L de substrato. Foram utilizadas 2-3 sementes por célula, à profundidade de 1 cm, padronizada com o uso de um marcador de madeira. Após o

semeio, as bandejas foram colocadas sobre bancada telada em casa de vegetação, cobertas com tela de nylon preta e, em seguida, irrigadas. A emergência ocorreu três dias após o semeio, quando a tela de nylon foi retirada. Sete dias após o semeio, o desbaste foi realizado deixando-se uma plântula por célula.

Adubações de cobertura das mudas foram realizadas aos 15, 19 e 23 dias após o semeio, aplicando-se as soluções de adubos foliares por meio de um regador. As duas primeiras adubações foram realizadas utilizando-se 3 g do adubo foliar Plantafol 10-54-10 por litro de água, gastando-se, em média, 10 L de solução em cada aplicação. A terceira foi realizada utilizando-se 1 g do adubo foliar Plantin II por litro de água, gastando-se, em média, 12 L de solução na aplicação. O adubo foliar Plantafol 10-54-10 apresentou as seguintes características químicas: 10% N; 54% P₂O₅ (pentóxido de fósforo); 10% de K₂O (óxido de potássio); 0,1% Fe; 0,02% B e 0,05% Cu. O adubo foliar Plantin II apresentou as seguintes características químicas: 10% N; 1,5% Ca; 1,0% Mg; 3,5% S; 3,0% B; 0,5% Cu; 0,5% Fe; 0,5% Mn; 0,05% Mo e 6,0% Zn. As irrigações das mudas foram realizadas diariamente, duas vezes ao dia, de manhã e de tarde, utilizando-se mangueira adaptada com bico regador.

Na avaliação da emergência das plântulas, cada parcela experimental foi constituída por 30 células centrais de cada bandeja. Sete dias após o semeio, as plântulas de cada parcela foram contadas e o percentual de emergência calculado. Na avaliação do desenvolvimento das mudas de alface, cada parcela experimental foi constituída por 10 mudas coletadas ao acaso, das 30 células centrais de cada bandeja, 26 dias após o semeio. Os sistemas radiculares dessas mudas foram imersos em água corrente para a retirada do excesso de substrato, secos em papel toalha por 10 min e, em seguida, a massa da parte aérea fresca (MPAF) e do sistema radicular fresco (MSRF), a altura e o número de folhas dessas mudas foram determinados.

Para o crescimento das plantas de alface, foram utilizados vasos de 2 L contendo o substrato solo de barranco e areia lavada 1:1 (v:v), previamente adubado com 120 g de superfosfato simples para cada 20 L da mistura (m:v) e tratado com brometo de metila na dose de $180 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-3}$. Uma muda de alface foi transplantada para cada vaso, 28 dias após o semeio, constituindo-se nove tratamentos em um esquema fatorial 3 x 3, como descrito anteriormente. Cada parcela experimental foi constituída por uma planta por vaso. Após o transplântio, os vasos foram colocados sobre bancada telada em casa de vegetação e irrigados diariamente, quando necessário, duas vezes ao dia, de manhã e de tarde, utilizando-se mangueira adaptada com bico regador.

As plantas de alface foram coletadas 42 dias após o transplântio. Em seguida, os sistemas radiculares dessas plantas foram imersos em água corrente para a retirada do excesso de solo, secos em papel toalha por 10 min e as massas da parte aérea fresca (MPAF) e do sistema radicular fresco (MSRF) foram determinadas.

O delineamento experimental foi realizado em blocos casualizados. Na avaliação das mudas e das plantas de alface, utilizaram-se, respectivamente, seis e oito repetições por tratamento. Os dados obtidos, transformados ou não, foram analisados pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo as pressuposições de normalidade do erro e a homogeneidade de variância do erro analisadas, respectivamente, pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett a 5% de probabilidade. Os dados foram submetidos à análise estatística e os resultados apresentados em tabelas de interação. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico Statistica (Statsoft, 2001).

Resultados e Discussão

Os tipos de substratos e as doses de resíduo apresentaram interação significativa ($p < 0,05$) para todas as variáveis relacionadas ao desenvolvimento das mudas e das plantas de alface.

A maior emergência foi verificada na testemunha (sem o resíduo) da fibra de coco (Tabela 2). Entretanto, a menor emergência também foi observada nesse tipo de substrato com a dose de resíduo a 4%. A emergência das plântulas não foi afetada significativamente ($p < 0,05$) pelo aumento da concentração do resíduo nos substratos formulado e comercial. A fibra de coco, por ser um material leve e solto, proporciona excelentes condições para germinação das sementes, contribuindo, conseqüentemente, para o maior índice de emergência das plântulas. Resultados semelhantes foram obtidos por Trani et al. (2004), que observaram excelente emergência de plântulas de alface com esse tipo de substrato.

Tabela 2. Efeito da aplicação de diferentes doses do resíduo em três tipos de substratos para produção de mudas sobre a percentagem de emergência de plântulas de alface, sete dias após o semeio.

Tipos de substrato	Emergência (%)		
	Doses do resíduo (%)		
	0	2	4
Formulado	81,7 Aab	73,3 Ab	72,8 Aa
Comercial	75,6 Ab	87,8 Aab	86,7 Aa
Fibra de Coco	95,0 Aa	93,3 Aa	66,7 Bb
Médias	84,1	84,8	75,4
C.V.	13,40%		

Médias dentro da linha seguidas pela mesma letra maiúscula e dentro da coluna seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si.
C.V.: Coeficiente de Variação (%)

Na avaliação do desenvolvimento das mudas de alface, 26 dias após o semeio, considerando-se as massas da parte aérea (MPAF) e do sistema radicular (MSRF), a altura e o número de folhas das mudas, verificou-se uma tendência semelhante para todas essas variáveis (Tabelas 3 e 4). O substrato formulado foi o que proporcionou maior desenvolvimento das mudas de alface. Entre todos os tratamentos, o maior desenvolvimento das mudas foi alcançado na testemunha (sem o resíduo) do substrato formulado, ou seja, as maiores massas da parte aérea e do sistema radicular, altura e número de folhas das mudas de alface.

Tabela 3. Efeito da aplicação de diferentes doses do resíduo nos substratos formulado, comercial e fibra de coco sobre as massas da parte aérea fresca (MPAF) e do sistema radicular fresco (MSRF) das mudas de alface, 26 dias após o semeio.

Tipos de substrato	MPAF (g) ¹				MSRF (g) ¹			
	Doses do resíduo (%)							
	0	2	4	Médias	0	2	4	Médias
Formulado	2,15 Aa	1,24 Ba	0,41 Ca	1,27	0,58 Aa	0,49 Aa	0,22 Ba	0,43
Comercial	0,87 Ab	0,39 Bb	0,06 Cb	0,44	0,25 Ab	0,20 Ab	0,05 Bb	0,17
Fibra de coco	0,13 Ac	0,02 Bc	0,02 Bc	0,06	0,09 Ac	0,03 Bc	0,02 Cc	0,05
Médias	1,05	0,55	0,17		0,30	0,24	0,10	
C.V.	18,50%				42,70%			

Para cada variável, as médias dentro da linha seguidas pela mesma letra maiúscula e dentro da coluna seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

C.V.: Coeficiente de Variação (%)

¹Valores transformados para Log₁₀(x)

Segundo Katayama (1993), o crescimento da alface é lento até 30 dias após a emergência, aumentando rapidamente após esse período. Apesar de absorverem quantidades relativamente pequenas de nutrientes, comparativamente com outras culturas, devido ao seu ciclo curto (50 a 70 dias), a alface é considerada uma espécie

exigente em nutrientes, principalmente na fase final do ciclo. No presente experimento, o substrato formulado foi o que apresentou maior densidade e uma tendência a maiores teores dos nutrientes P, Mg, S, Zn, Fe e Mn (Tabela 1). Provavelmente, tal fato, proporcionou maior desenvolvimento das mudas de alface. Essas informações são um indicativo de que alguns substratos comerciais apresentam composição nutricional inadequada para algumas espécies cultivadas, como ocorreu neste experimento.

Tabela 4. Efeito da aplicação de diferentes doses do resíduo nos substratos formulado, comercial e fibra de coco sobre a altura e o número de folhas das mudas de alface, 26 dias após o semeio.

Tipos de substrato	Altura (cm) ¹			Doses do resíduo
	0	2	4	Médias
Formulado	8,89 Aa	6,53 Ba	3,73 Ca	6,38
Comercial	5,14 Ab	3,54 Bb	1,50 Cb	3,39
Fibra de coco	2,28 Ac	1,19 Bc	1,15 Bc	1,54
Médias	5,44	3,75	2,13	
C.V.				1,20%

Para cada variável, as médias dentro da linha seguidas pela mesma letra maiúscula e dentro da coluna seguidas pela mesma letra minúscula.

C.V.: Coeficiente de Variação (%)

¹Valores transformados para Log₁₀(x)

Em todos os substratos testados, verificou-se que o aumento da dose do resíduo prejudicou o desenvolvimento das mudas de alface, sendo que esse efeito foi mais acentuado na dose do resíduo a 4% no substrato formulado e comercial, enquanto, na fibra de coco, a dose do resíduo, igual ou superior a 2%, já foi suficiente para reduzir o desenvolvimento das mudas de alface (Figura 1).

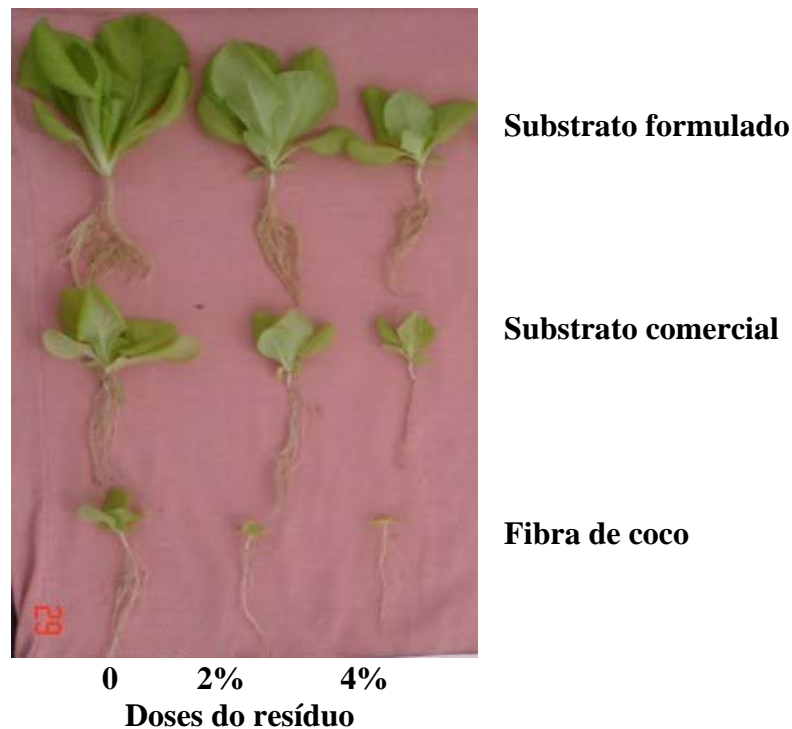


Figura 1. Efeito da aplicação de diferentes doses do resíduo nos substratos formulado, comercial e fibra de coco no desenvolvimento das mudas de alface, 26 dias após o semeio.

A fibra de coco, por ser um material orgânico, naturalmente com baixo teor de nutrientes disponíveis, proporcionou reduzido desenvolvimento das mudas de alface, fato também constatado em trabalhos com produção de mudas de alface realizados por Trani et al. (2004) e Lopes et al. (2007). A utilização desse tipo de substrato na produção de mudas de hortaliças exige um manejo da fertirrigação mais criterioso e intenso para que se obtenham mudas bem desenvolvidas. Outra opção de utilização da fibra de coco é a mistura com outros tipos de substratos e/ou componentes na formulação de substratos (Trani et al., 2004).

A menor relação C:N do substrato formulado e comercial, provavelmente, favoreceu a liberação mais fácil de nutrientes, em especial, nitrogênio, para a solução do

meio (Tabela 1). A fibra de coco, comparativamente aos outros substratos testados, possui menor disponibilidade de nutrientes e uma relação C:N com tendência de ser muito superior, o que resulta em pouca liberação de nutrientes para o meio. Na competição por nutrientes, geralmente, os microrganismos são mais eficientes em aproveitar os nutrientes disponíveis no solo do que as raízes das plantas (Wolf & Wagner, 2005). Por isso, a menor disponibilidade de nutrientes na fibra de coco reduziu o desenvolvimento das mudas de alface.

Mo et al. (2005) avaliaram o efeito de fontes de carbono e nitrogênio, relação C:N e pH inicial no crescimento de *P. chlamydosporia*, e observaram que o crescimento micelial e a esporulação são influenciados pelos componentes do meio e condições da cultura. A alta produção de conídios foi alcançada principalmente em meios líquidos com relação C:N de 10:1 e pH inicial de 3,7. No presente experimento, uma relação C:N próxima de 10:1 foi verificada no substrato formulado com as diferentes doses do resíduo e, provavelmente, contribuiu para maior desenvolvimento das mudas nesse tipo de substrato.

Em outros trabalhos, como os realizados por Coutinho et al. (2009) e por Dallemole-Giaretta et al. (2010a e b), outras formas de aplicação combinada de *P. chlamydosporia* com materiais orgânicos foram testadas. Dallemole-Giaretta et al. (2010a) avaliaram o efeito da farinha de sementes de abóbora (FSA) e *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no controle de *M. javanica* e observaram visualmente que doses a partir de 20 g de FSA.kg⁻¹ de solo apresentaram efeito fitotóxico em tomateiros. Logo, dependendo do tipo, quantidade e qualidade do material orgânico utilizado para aplicar o fungo, o desenvolvimento das mudas e das plantas pode ser afetado.

O aumento da taxa de aplicação de clamidósporos de *P. chlamydosporia* aumenta sua densidade no solo, entretanto, sem necessariamente aumentar a colonização da rizosfera. A multiplicação de *P. chlamydosporia* também pode ser limitada, pois o fungo pode ser dependente de sua densidade e competir por nutrientes limitantes no solo (Bourne & Kerry, 1999). Zou et al. (2007) obtiveram 1018 isolados bacterianos do solo e 32% desses isolados apresentaram efeito inibitório, de intensidade variada, na germinação de conídios e no crescimento micelial de *Paecilomyces lilacinus* e *P. chlamydosporia*. No presente experimento, o desenvolvimento das mudas foi afetado em consequência da relação C:N dos diferentes substratos, e provavelmente, também por mecanismos de antagonismo, como a fungistase ou, devido às características do resíduo utilizado, um material orgânico que pode conter microrganismos contaminantes como, por exemplo, *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp.

Na avaliação do desenvolvimento das plantas de alface, 42 dias após o transplântio das mudas, considerando-se as massas da parte aérea (MPAF) e do sistema radicular (MSRF), observou-se um comportamento semelhante para ambas as variáveis (Tabela 5).

Como na avaliação do desenvolvimento das mudas, o substrato formulado foi o que proporcionou maior desenvolvimento das plantas de alface, seguido do substrato comercial e da fibra de coco (Tabela 5). Entre todos os tratamentos, o maior desenvolvimento das plantas de alface foi observado no substrato formulado com a dose do resíduo a 2%. No substrato formulado, verificou-se que as doses do resíduo não afetaram as massas da parte aérea e do sistema radicular. No substrato comercial, a dose do resíduo a 2% foi a mais favorável ao desenvolvimento das plantas de alface, enquanto que na fibra de coco, a testemunha foi a que proporcionou maior desenvolvimento das plantas. Como na avaliação do desenvolvimento das mudas,

aquelas produzidas em fibra de coco resultaram no menor desenvolvimento das plantas de alface nos vasos.

Tabela 5. Efeito da aplicação de diferentes doses do resíduo nos substratos formulado, comercial e fibra de coco sobre as massas da parte aérea fresca (MPAF) e do sistema radicular fresco (MSRF) das plantas de alface, 42 dias após o transplântio das mudas.

Tipos de substrato	MPAF (g)				MSRF (g)			
	Doses do resíduo (%)							
	0	2	4	Médias	0	2	4	Médias
Formulado	46,78 Aa	48,20 Aa	47,38 Aa	47,45	32,25 Aa	34,30 Aa	30,67 Aa	32,41
Comercial	39,78 ABb	42,80 Ab	36,09 Bb	39,56	26,02 ABb	28,84 Aa	22,32 Bb	25,73
Fibra de coco	33,88 Ac	23,90 Bc	19,27 Cc	25,68	23,65 Ab	14,86 Bb	11,71 Bc	16,74
Médias	40,14	38,30	34,25		27,31	26,00	21,57	
C.V.	8,24%				24,47%			

Para cada variável, as médias dentro da linha seguidas pela mesma letra maiúscula e dentro da coluna seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

C.V.: Coeficiente de Variação (%)

Os resultados observados no desenvolvimento das mudas e das plantas de alface indicam que a dose do resíduo a 2% nos substratos formulado e comercial, apesar de ter provocado um atraso no desenvolvimento das mudas na fase de sementeira, não afetou o desenvolvimento das plantas de alface nos vasos (Figura 2). Provavelmente, o resíduo contendo *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* promoveu o crescimento das plantas de alface após o transplântio das mudas para os vasos. Foi relatado que alguns isolados de *P. chlamydosporia* promoveram o crescimento de plantas de trigo, tomate e cevada (Monfort et al., 2005; Dalemolle-Giaretta, 2008; Marciá-Vicente et al., 2009). Além disso, o fungo pode colonizar endofiticamente e externamente a rizosfera de plantas, a exemplo de cevada e tomateiro (Bordallo et al., 2002; Lopez-Llorca et al., 2002; Dalemolle-Giaretta, 2008).

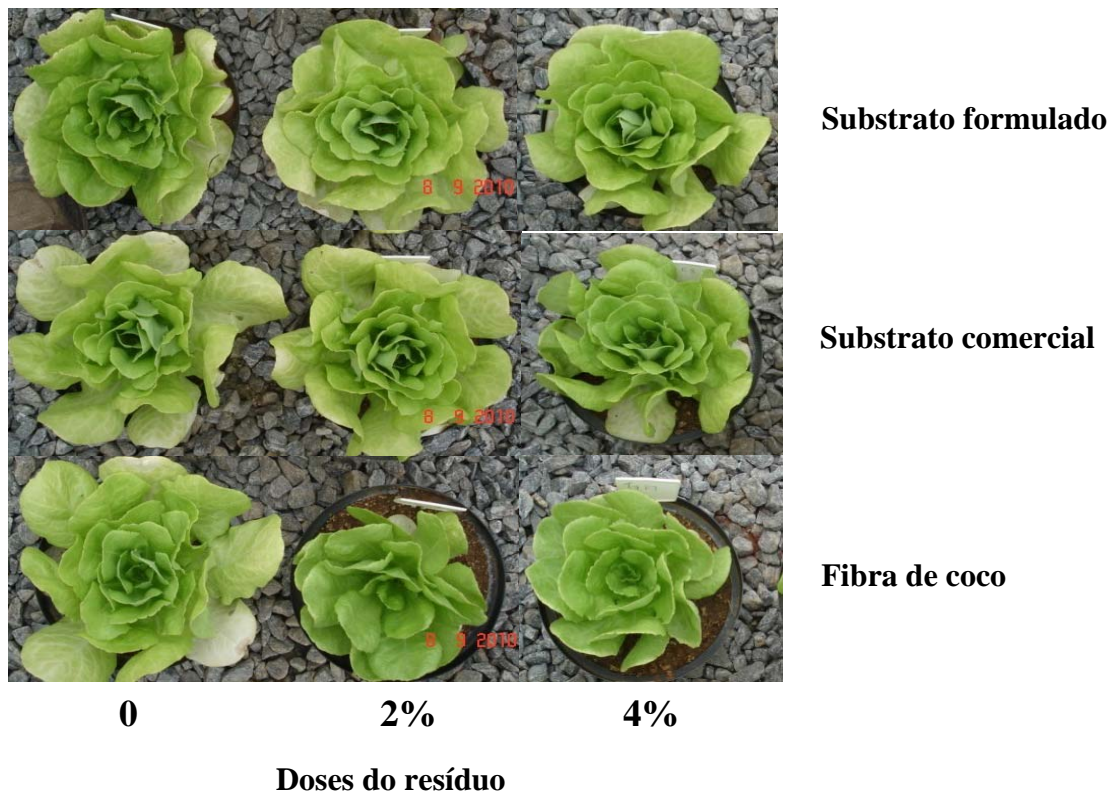


Figura 2. Efeito da aplicação de diferentes doses do resíduo nos substratos formulado, comercial e fibra de coco no desenvolvimento das plantas de alface, 42 dias após o transplântio das mudas.

Algumas espécies de plantas, por exemplo, repolho, crotalária, couve, milho e tomateiro permitem extensa colonização de sua rizosfera por *P. chlamydosporia* e são consideradas boas hospedeiras para o fungo, enquanto outras, a exemplo da berinjela, quiabo, soja e feijão não permitem um crescimento rizosférico satisfatório (Bourne et al., 1994, 1996, 2001; Bourne & Kerry, 1999, 2002). A maior influência da planta hospedeira na eficácia do fungo é sua suscetibilidade ao ataque dos nematoides, que influenciará o número de nematoides que se desenvolverão e o tamanho das galhas produzidas, que, por sua vez, afetará o número de massa de ovos que permanecerá dentro das raízes, protegidas contra a infecção do fungo (Bourne & Kerry, 1999). Em

plantas de alface, a colonização das raízes e o efeito da promoção de crescimento de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* ainda carecem de estudos.

A mistura do resíduo contendo *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* com diferentes tipos de substratos para mudas ou fertilizantes orgânicos, comumente utilizados pelos agricultores no cultivo de hortaliças, é uma maneira simples e relativamente barata de aproveitamento desse resíduo na agricultura. Além disso, poderá ser uma forma de introdução desse agente de biocontrole no solo de áreas cultivadas com hortaliças e naturalmente infestado com o nematoide das galhas.

A utilização do resíduo até 2% v:v nos substratos formulado e comercial para a produção de mudas é viável, sem prejudicar o desenvolvimento das plantas de alface após o transplântio.

Conclusões

1. A utilização de substrato para mudas formulado pelo próprio agricultor permite a produção de mudas e de plantas de alface de maior qualidade.
2. É viável o aproveitamento do resíduo resultante do processo de produção de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* em mistura com diferentes tipos de substratos na produção de mudas de alface.

Agradecimentos

À Marilene, Fernanda e Leonardo (Graduandos de Agronomia-UFV), pela colaboração na montagem e avaliação do experimento. À Rizoflora Biotecnologia, pelo

fornecimento do resíduo da produção de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* para realização do experimento. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de doutorado ao primeiro autor.

Referências

BORDALLO, J.J.; LOPEZ-LLORCA, L.V.; JANSSON, H.B.; SALINAS, J.; PERSMARK, L.; ASENSIO, L. Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. **New Phytologist**, v.154, p.491-499, 2002.

BOURNE, J.M. Making a soil suppressive to root-knot nematodes by applications of *Verticillium chlamydosporium*. **IOBC/WPRS Bulletin**, v.24, p.25-30, 2001.

BOURNE, J.M.; KERRY, B.R. 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**, v.31, p.75-84, 1999.

BOURNE, J.M.; KERRY, B.R.; DE LEIJ, F.A.A.M. Methods for the study of *Verticillium chlamydosporium* in the rhizosphere. **Journal of Nematology**, v.26, p.587-591, 1994.

BOURNE, J.M.; KERRY, B.R.; DE LEIJ, F.A.A.M. 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**, v.6, p.539-548, 1996.

COUTINHO, M.M.; FREITAS, L.G. de; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; NEVES, W.S.; LOPES, E.A.; FERRAZ, S. Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pochonia chlamydosporia* e farinha de sementes de mamão. **Nematologia Brasileira**, v.33, p.169-175, 2009.

DALLEMOLE-GIARETTA, R. **Isolamento, identificação e avaliação de *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica* e na promoção de crescimento de tomateiro.** 2008. 83p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G. de; COUTINHO, M.M.; NEVES, W.S.; ZOOCA, R.J.F.; FERRAZ, S. Efeito da farinha de sementes de abóbora e de *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.34, p.91-97, 2010a.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G. de; ZOOCA, R.J.F.; CAIXETA, L.B.; LOPES, E.A. Controle de *Meloidogyne javanica* por meio da aplicação de palha de café colonizada por *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. **Nematologia Brasileira**, v.34, p.137-140, 2010b.

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

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças.** Viçosa: UFV, 2008. 421p.

GASPARD, J.T.; JAFFEE, B.A.; FERRIS, H. Association of *Verticillium chlamydosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with root-knot nematode infested soil. **Journal of Nematology**, v.22, p.207-213, 1990.

KATAYAMA, M. Nutrição e adubação de alface, chicória e almeirão. In: FERREIRA, M.E.; CASTELLANE, P.D; CRUZ, M.C.P. (Ed.). **Nutrição e adubação de hortaliças**. Piracicaba: Potafos, 1993. p.141-148.

KERRY, B.R.; BOURNE, J.M. **A manual for research on *Verticillium chlamydosporium*, a potencial biological control agent for root-knot nematodes**. Gent: IOBC-WPRS, 2002. 84 p.

LOPES, E. A. **Formulação de condicionadores de solo com propriedades nematicidas**. 2007. 99p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

LOPES, J.L.W.; BOARO, C.S.F.; PERES, M.R.; GUIMARÃES, V.F. Crescimento de mudas de alface em diferentes substratos. **Biotemas**, v.20, p.19-25, 2007.

LOPEZ-LLORCA, L.V.; BORDALLO, J.J.; SALINAS, J.; MONFORT, E.; LÓPEZ-SERNA M.L. Use of light and scanning electron microscopy to examine colonisation of barley rhizosphere by the nematophagous *Verticillium chlamydosporium*. **Micron**, v.33, p.61-67, 2002.

MARCIÁ-VICENTE, J.G.; ROSSO, L.C.; CIANCIO, A.; JANSON, H.B.; LOPEZ-LLORCA, L.V. Colonization of roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*: effects on plant growth and disease. **Annals of Applied Biology**, v.155, p.391-401, 2009.

MO, M.; XU, C.K.; ZHANG, K.Q. Effects of carbon and nitrogen sources, carbon-to-nitrogen ratio, and initial pH on the growth of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* in liquid culture. **Mycopathologia**, v.159, p.381-387, 2005.

MONFORT, E.; LOPEZ-LLORCA, L.V.; JANSSON, H.B.; SALINAS, J.; PARK, J.O.; SIVASITHAMPARAM, K. Colonization 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**, v.37, p.1229-1235, 2005.

STATSOFT. **Statistica (Release 7.0.61.0)**. Tulsa, OK: Statsoft, 2001. Disponível em: <http://www.statsoft.com>. Acesso em: 18 dez. 2001.

TRANI, P.E.; NOVO, M.C.S.S.; CAVALLARO JÚNIOR, M.L.; TELLES, L.M.G. Produção de mudas de alface em bandejas e substratos comerciais. **Horticultura Brasileira**, v.22, p.290-294, 2004.

TRANI, P.E.; FELTRIN, D.M.; POTT, C.A.; SCHWINGEL, M. Avaliação de substratos para produção de mudas de alface. **Horticultura Brasileira**, v.25, p.256-260, 2007.

WOLF, D.C.; WAGNER, G.H. Carbon transformations and soil organic matter formation. In: SYLVIA, D.M.; FUHRMANN, J.J.; HARTEL, P.G.; ZUBERER, D.A. (Ed.). **Principles and applications of soil microbiology**. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2005. p.285-332.

ZOU, C.S.; MO, M.H.; GU, Y.Q.; ZHOU, J.P.; ZHANG, K.Q. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungitaxis. **Soil Biology e Biochemistry**, v.39, p.2371-2379, 2007.

ARTIGO 2

FORMAS DE APLICAÇÃO DE *Pochonia chlamydosporia* NO CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM ALFACE.²

²Artigo elaborado de acordo com as normas da revista “Tropical Plant Pathology”.

Formas de aplicação de *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica* em alface.

José R. Viggiano¹ & Leandro G. de Freitas¹

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36.570-000, Viçosa, MG, Brasil.

Autor para correspondência: José R. Viggiano, e-mail: jrviggiano@bol.com.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do bionemático Pc-10, à base de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, no controle de *Meloidogyne javanica* quando aplicado nas mudas e no solo cultivado com alface. Mudas de alface foram inoculadas com diferentes doses de Pc-10 (0; 4,5; 9,0; 13,5 e 18,0 g de Pc-10.L⁻¹ de água). Uma mistura de solo de barranco e areia lavada 1:1 (v:v) foi usada como substrato para o cultivo das plantas de alface. O solo de cada vaso foi infestado com 3.000 ovos de *M. javanica*. Em seguida, o solo de 40 vasos foi infestado com Pc-10 (5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo). Os outros 40 vasos não foram infestados. Uma muda foi transplantada para cada vaso. A aplicação de 18 g.L⁻¹ de Pc-10 nas mudas reduziu o número de ovos, no primeiro e no segundo experimento, respectivamente, em 41,69% e 45,03%; e o número de ovos.g⁻¹ de raízes em 41,86% e 57,42%, em relação à

testemunha. A aplicação de Pc-10 nas mudas não prejudicou o desenvolvimento das mudas de alface. A aplicação de Pc-10 no solo e da dose de 18 g.L⁻¹ de Pc-10 nas mudas resultou na melhor combinação para o controle de *M. javanica* em plantas de alface.

Palavras-chave: controle biológico; fungos nematófagos; nematoide das galhas; *Lactuca sativa*.

ABSTRACT

Forms of application of *Pochonia chlamydosporia* for the control of *Meloidogyne javanica* in lettuce.

The objective of this work was to evaluate the effect of the bionematicide Pc-10, based on *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, for the control of *Meloidogyne javanica* when applied to the seedlings and the soil cultivated with lettuce. Lettuce seedlings were inoculated with different doses of Pc-10 (0, 4.5, 9.0, 13.5 and 18.0 g of Pc-10.L⁻¹ of water). A mixture of horizon C soil and washed-river sand 1:1 (v:v) was used as substrate for lettuce cultivation. The substrate of each pot was infested with 3,000 eggs of *M. javanica*. Next, the substrate of 40 pots was infested with Pc-10 (5,000 chlamydospores.g⁻¹ soil). The other 40 pots were not infested. One seedling was transplanted into each pot. The application of 18 g.L⁻¹ of Pc-10 in the seedlings reduced the number of eggs in the first and second experiment, respectively, by 41.69% and 45.03%, and the number of eggs.g⁻¹ root by 41.86% and 57.42%, when compared to control. The application of Pc-10 in the seedlings did not adversely affect the development of the lettuce seedlings. The application of Pc-10 in soil and the dose of 18 g.L⁻¹ of Pc-10 in the seedlings resulted in the best combination for the control of *M. javanica* in lettuce plants.

Keywords: biological control; nematophagous fungi; root-knot nematodes; *Lactuca sativa*.

INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa mais consumida no Brasil. Dados da CEASAMINAS, referentes ao ano de 2010, indicaram a comercialização de 1,44 mil toneladas de alface, correspondente ao valor de R\$3.153.267,36 e preço médio de R\$2,19.kg⁻¹. Entre os 70 municípios produtores de alface no Estado de Minas Gerais, o cultivo dessa hortaliça destacou-se em Uberlândia, Piedade de Caratinga, Brumadinho, Barbacena, Mário Campos, Caratinga, São Joaquim de Bicas, São João Del Rey, Uaporanga e Sarzedo que, em conjunto, totalizaram 74% da alface comercializada (CEASAMINAS, 2011).

O nematoide das galhas, especialmente, em condições de elevadas temperaturas tem afetado a produção comercial da alface devido à infestação por *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood e *M. javanica* (Treub) Chitwood (Campos, 1995; Charchar & Moita, 1996; Fiorini et al., 2005). Em áreas infestadas, o sistema radicular da alface suscetível pode apresentar elevado nível de infecção, comprometendo o desenvolvimento da planta, reduzindo a altura e o diâmetro da cabeça e, provocando o amarelecimento e a murcha das folhas. Esses danos não permitem ou dificultam a comercialização da produção da alface (Charchar & Moita, 2005).

O fungo *Pochonia chlamydosporia* Zare & Gans (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard) é um agente de controle biológico, parasita de ovos e fêmeas de espécies de fitonematoides endoparasitas sedentários que se destaca no controle do nematoide das galhas (Kerry & Bourne, 2002; Chen & Dickinson, 2004).

Produz clamidósporos, estruturas de sobrevivência resistentes, que favorecem a manipulação, a produção *in vitro* e o estabelecimento do fungo no solo e na rizosfera das plantas (Kerry, 2001; Kerry & Bourne, 2002).

A introdução de *P. chlamydosporia* no solo de forma prática, eficiente e econômica em sistemas produtivos comerciais ainda necessita de avaliações. Segundo Kerry & Bourne (2002), várias técnicas foram testadas, como por exemplo, a aplicação na superfície do solo em suspensão aquosa ou em forma de grânulos; a imersão das raízes em pasta de alginato contendo clamidósporos; e o transplântio de mudas em blocos de turfa colonizada. Essas técnicas, no entanto, não proporcionaram resultados completamente satisfatórios, necessitando de maiores investigações.

As formas de aplicação de *P. chlamydosporia* no solo evoluíram nos últimos anos. Lopes et al. (2007a) e Dallemole-Giaretta et al. (2008) fizeram a aplicação por meio da mistura de substrato colonizado pelo fungo com o solo. Coutinho et al. (2009) aplicaram o fungo ao solo na forma de mistura de suspensão de clamidósporos e farinha de sementes de mamão, um nematicida natural. Dallemole-Giaretta et al. (2010a) fizeram a aplicação no solo utilizando-se mistura de arroz colonizado pelo fungo e farinha de sementes de abóbora. Outra forma utilizada por Dallemole-Giaretta et al. (2010b) foi a incorporação ao solo de palha de café colonizado pelo fungo.

Existem produtos em desenvolvimento e em testes nos sistemas produtivos comerciais, como o Rizotec, pela empresa Rizoflora Biotecnologia S.A, em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Neste caso, a introdução do isolado de Pc-10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no solo tem sido testada através da irrigação das mudas no viveiro e das plantas sob pivô central. O bionematicida foi testado com

sucesso no controle de *M. javanica* por Podestá et al. (2009), Coutinho et al. (2009) e Dallemole-Giaretta et al. (2010a e b) em tomateiro.

Geralmente, a implantação de cultivos de alface no campo é feita por meio de mudas produzidas em bandejas de isopor com diferentes tipos de substratos comerciais ou formulados pelo próprio agricultor (Trani et al., 2004, 2007; Lopes et al., 2007b). Essa técnica já é amplamente utilizada pelos agricultores e pode ser uma alternativa técnica e economicamente viável de introdução de *P. chlamydosporia* no solo.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no controle de *M. javanica* quando aplicado em diferentes doses nas mudas e no solo cultivado com plantas de alface.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram instalados em casa de vegetação equipada com sistema de aquecimento e resfriamento, localizada na área experimental de campo do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Viçosa, no Município de Viçosa, MG, Brasil. As temperaturas mínimas e máximas do ar e do solo no interior da casa de vegetação durante a realização dos experimentos foram registradas diariamente (Figura 1).

Um produto (Rizotec) constituído de clamidósporos do isolado Pc-10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, em desenvolvimento pela empresa Rizoflora Biotecnologia, com uma concentração média de $3,1 \times 10^8$ clamidósporos.g⁻¹ do produto, lote de agosto/2010, foi utilizado nos experimentos e será doravante chamado de Pc-10.

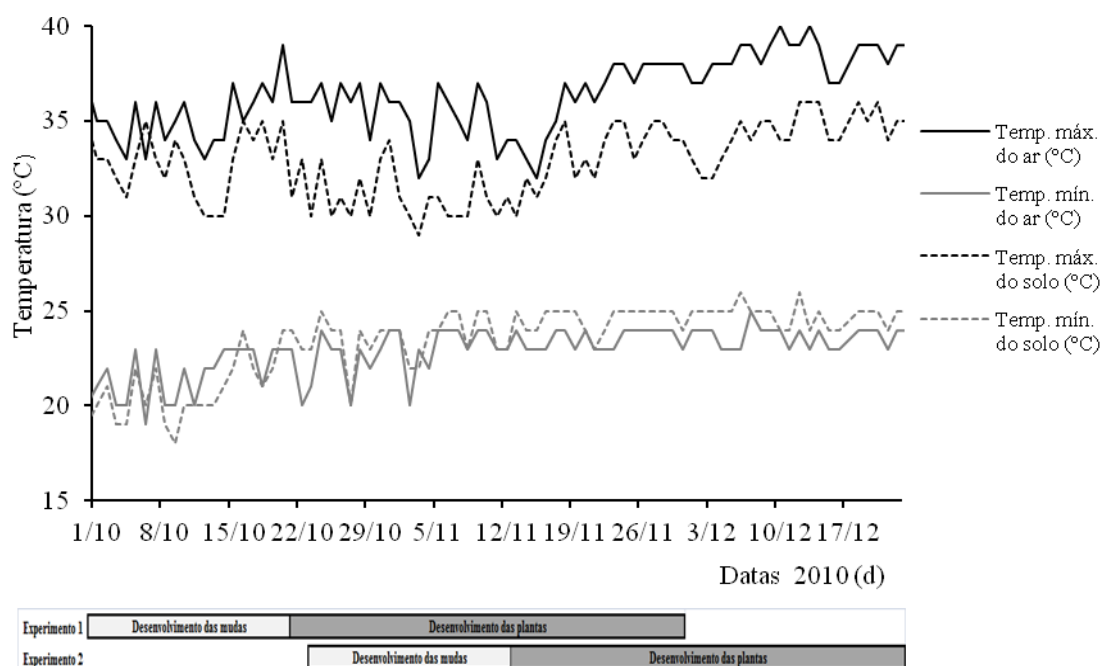


FIGURA 1 - Temperaturas mínimas e máximas do ar e do solo (°C) em casa de vegetação durante a realização dos experimentos.

Na produção das mudas de alface foi utilizado o substrato comercial Tropstrato Hortaliças II HT (marca Vida Verde), previamente umedecido com 5% de água (v:v). Amostra do substrato utilizado nos experimentos foi coletada e análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Análises de Solo Viçosa Ltda (Tabela 1).

Sementes de alface cultivar Regina 255 (marca Topseed, lote 011.912, germinação: 83%, pureza: 99,9%, teste: 04/2010, validade: 04/2012) foram semeadas manualmente em cinco bandejas de isopor cortadas (do tipo 128 células) com 56 células, com capacidade para aproximadamente 1,8 L de substrato. Foram utilizadas 2-3 sementes por célula, à profundidade de 1 cm, padronizada com o uso de um marcador de madeira. Após o semeio, as bandejas foram colocadas sobre bancada telada em casa de vegetação, cobertas com tela de nylon preta e, em seguida, irrigadas. A emergência ocorreu três dias após o semeio, quando a tela de nylon foi retirada. Sete dias após

TABELA 1 - Análises físico-químicas do substrato comercial Tropstrato Hortaliças II HT, utilizado na produção das mudas de alface dos experimentos, realizadas no Laboratório de Análises de Solo Viçosa Ltda.

pH	N	P	K	Ca	Mg	S	C.O.	C/N	Zn	Fe	Mn	Cu	B	Densidade
H ₂ O	%								ppm					g.mL ⁻¹
5,54	0,55	0,26	0,22	1,40	0,77	0,44	13,10	23,81	51	8516	105	29	13,6	0,64

Teores totais, determinados em extrato ácido (ácido nítrico com ácido perclórico); N, pelo método do Kjeldahl; CO, pelo método Walkley-Black.

o semeio, o desbaste foi realizado deixando-se uma plântula por célula. As irrigações foram realizadas diariamente, duas vezes ao dia, de manhã e de tarde, utilizando-se mangueira adaptada com bico regador.

A aplicação de Pc-10 nas mudas de alface em cada bandeja foi realizada por meio de irrigação, utilizando-se uma garrafa PET (500 ml) com tampa perfurada contendo 250 ml de uma suspensão com diferentes doses de Pc-10: 0; 4,5; 9,0; 13,5 e 18,0 g de Pc-10.L⁻¹ de água. Cada dose de Pc-10 foi dividida em três partes iguais e aplicada nas mudas, em cada bandeja correspondente, aos 3, 7 e 12 dias após o semeio.

Para o crescimento das plantas de alface, foram utilizados vasos de 2 L contendo o substrato solo de barranco e areia lavada 1:1 (v:v), previamente adubado com 120 g de superfosfato simples para 20 L da mistura (m:v) e tratado com brometo de metila na dose de 180 cm³.m⁻³. O solo de cada vaso foi infestado com um volume de suspensão contendo 3.000 ovos de *M. javanica*, sete dias antes do transplantio das mudas. O inóculo de *M. javanica* foi constituído por ovos obtidos de populações puras e coletados de raízes de tomateiros mantidos em vasos em casa de vegetação e extraídos pela técnica de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981). Em seguida, o solo de 40 vasos foi infestado com 20 mL de uma suspensão formulada com

Pc-10 e calculada para fornecer 5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo por vaso. O solo dos outros 40 vasos não foi infestado com o fungo. O solo nos vasos foi mantido úmido, próximo a 60% da capacidade de campo. Uma muda de alface foi transplantada para cada vaso, 22 dias após o semeio, constituindo-se 10 tratamentos num esquema fatorial 2 x 5: solo sem Pc-10 (0; 4,5; 9,0; 13,5 e 18,0 g.L⁻¹ de Pc-10 nas mudas) e solo com Pc-10 (0; 4,5; 9,0; 13,5 e 18,0 g.L⁻¹ de Pc-10 nas mudas). Após o transplântio, os vasos foram colocados sobre bancada telada em casa de vegetação e irrigados diariamente, quando necessário, duas vezes ao dia, de manhã e de tarde, utilizando-se mangueira adaptada com bico regador.

Para a determinação do número de unidades formadoras de colônias de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no substrato das mudas tratadas com diferentes doses de Pc-10 (número de UFC.g⁻¹ de substrato), 10 mudas de alface de cada bandeja foram escolhidas ao acaso. O substrato aderido aos respectivos sistemas radiculares dessas mudas foi coletado, constituindo-se uma amostra composta de substrato por dose de Pc-10 utilizada nas mudas. As amostras compostas dos substratos foram coletadas 23 dias após o semeio, em ambos os experimentos. O número de UFC.g⁻¹ de substrato foi determinado conforme metodologia descrita por Kerry (1991), usando meio semi-seletivo de Gaspard et al. (1990).

As plantas de alface foram coletadas 43 dias após o transplântio. Em seguida, foram determinadas as massas da parte aérea fresca (MPAF) e do sistema radicular fresco (MSRF), o número de galhas e de ovos, e calculado o número de galhas.g⁻¹ de raízes e de ovos.g⁻¹ de raízes. Durante a extração das raízes, amostras de solo, dos respectivos tratamentos, foram coletadas para a determinação do número de unidades formadoras de colônias do fungo no solo dos vasos. O número de UFC.g⁻¹ de solo foi determinado conforme metodologia descrita anteriormente.

O delineamento experimental foi realizado em blocos casualizados com oito repetições por tratamento. Cada unidade experimental foi constituída por uma planta por vaso. O experimento foi realizado duas vezes. Os dados obtidos, transformados ou não, foram analisados pelo teste F a 5% de probabilidade, sendo as pressuposições de normalidade do erro e da homogeneidade de variância do erro analisadas, respectivamente, pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett a 5% de probabilidade. Os dados foram submetidos à análise estatística e os resultados apresentados em gráficos de regressão quando significativos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico Minitab (Minitab, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento 1, a média das temperaturas mínimas e máximas durante o período de desenvolvimento das plantas de alface foram, respectivamente, de 23,3°C e 36,0°C no ar, e de 24,2°C e 32,1°C no solo. No experimento 2, a média das mínimas e máximas foram, respectivamente, de 23,6°C e 37,3°C no ar, e de 24,7°C e 33,7°C no solo. Na primeira quinzena do experimento 1, período no qual o experimento 2 ainda não havia sido iniciado, a média das temperaturas mínimas e máximas do solo foram, respectivamente, inferiores em 0,7°C e 1,1°C. Inversamente, na última quinzena do experimento 2, quando o experimento 1 já havia sido retirado para avaliação, a média das mínimas e máximas foram, respectivamente, superiores em 0,5°C e 0,1°C no ar, e 0,1°C e 1,2°C no solo. A ocorrência de temperaturas mais baixas durante a fase de desenvolvimento vegetativo da alface no experimento 1, principalmente na primeira quinzena, proporcionou maior desenvolvimento das plantas de alface, o que pode ser comprovado pelas maiores massas da parte aérea e do sistema radicular das plantas

nesse experimento. A alface é uma espécie de hortaliça tipicamente de inverno, que tem seu desenvolvimento favorecido por temperaturas inferiores a 20°C. Algumas cultivares foram selecionadas para o verão e formam cabeça com temperaturas mais elevadas (Sonnenberg, 1985; Filgueira, 2003; Souza & Resende, 2003), como é o caso da Regina 255 utilizada nos experimentos. Entretanto, foi observado ao final do experimento 2, uma tendência das plantas pendoarem, um indicativo de que a temperatura e/ou o fotoperíodo estavam em condições inadequadas para o cultivo ideal dessa cultivar.

Na avaliação do número de unidades formadoras de colônias de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no substrato das mudas tratadas com Pc-10 (número de UFC.g⁻¹ de substrato), verificou-se que não ocorreu a contaminação das testemunhas dos experimentos. Na análise de regressão do número de UFC.g⁻¹ de substrato, o modelo ajustado foi o linear de 1º grau (Figura 2). A utilização de doses crescentes de Pc-10 nas mudas aumentou o número de UFC.g⁻¹ de substrato das mudas de alface, em ambos os experimentos. A aplicação parcelada de Pc-10 nas mudas, que forneceu, aproximadamente, 1,21 x 10⁶ (dose 4,5 g.L⁻¹ de Pc-10) a 4,84 x 10⁶ clamidósporos.g⁻¹ de substrato (dose 18,0 g.L⁻¹ de Pc-10), resultou, em média, na produção de 4,16 x 10⁴ a 10,5 x 10⁴ UFC.g⁻¹ de substrato. Em ambos os experimentos, a aplicação de altas concentrações de Pc-10 nas mudas não prejudicou o desenvolvimento das mudas de alface. Bourne & Kerry (1999) verificaram que aumento nas taxas de aplicação de *P. chlamydosporia* no solo (5.000, 10.000 e 50.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo) resultou no aumento da colonização do solo e da rizosfera (número de UFC.g⁻¹ de solo ou raiz) de diferentes plantas hospedeiras do fungo no final de seus experimentos. No presente experimento, a lixiviação da água de irrigação do substrato das mudas pode ter contribuído para eliminar parte dos clamidósporos aplicados nas mudas, ainda mais, considerando-se que a última aplicação do Pc-10 nas mudas foi realizada 12 dias após o

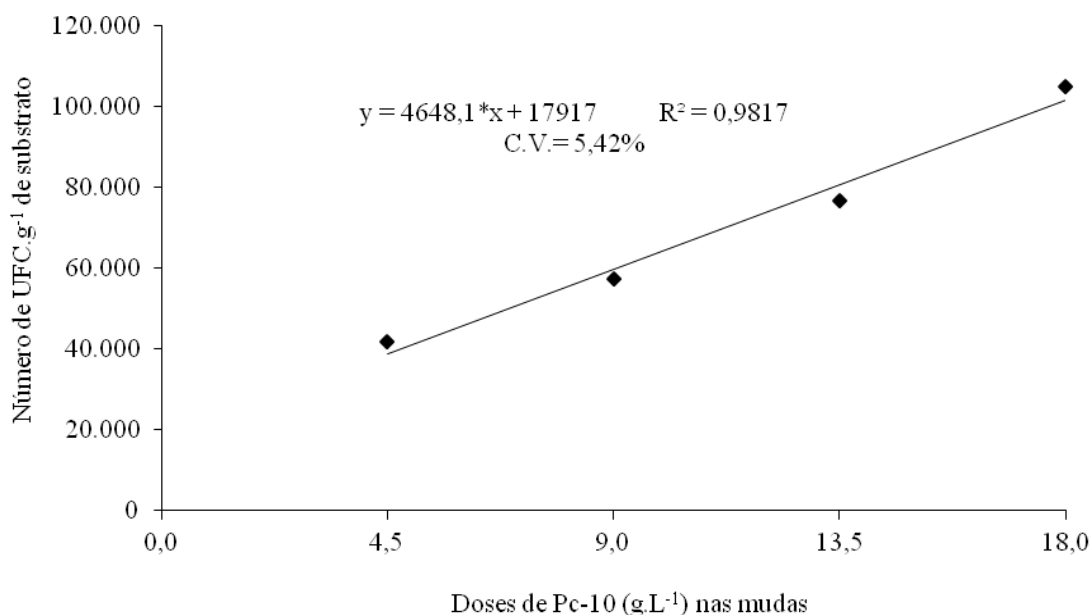


FIGURA 2 - Número médio de unidades formadoras de colônias de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10) no substrato das mudas de alface (número de UFC.g⁻¹ de substrato) sob diferentes doses de Pc-10 (g.L⁻¹) aplicadas nas mudas aos 3, 7 e 12 dias após o semeio. Cada ponto representa a média de seis repetições. C.V.: Coeficiente de variação (%); * Significativo pelo Teste t a 5% de probabilidade.

semeio e 10 dias antes do transplantio das mudas de alface. Provavelmente, aplicações das mesmas doses em um maior intervalo de dias, ou parceladas em quatro vezes, por exemplo, aos 3, 7, 12 e 18 dias após o semeio, proporcionassem melhores resultados, ou seja, maior número de UFC.g⁻¹ de substrato à época de transplantio das mudas de alface.

Houve interação significativa ($p < 0,05$) entre os fatores Pc-10 no solo e Pc-10 nas mudas no número de galhas e de galhas.g⁻¹ de raízes no experimento 2. Entretanto, nenhum desses dois fatores afetou o número de galhas e de galhas.g⁻¹ de raízes no experimento 1 (dados não apresentados). No experimento 2, nos vasos com Pc-10 no solo, não houve diferença no número de galhas nas raízes das plantas de alface em

função do aumento da dose de Pc-10 nas mudas (dados não apresentados). Entretanto, nos vasos sem Pc-10 no solo, houve efeito significativo ($p < 0,05$) das doses de Pc-10 nas mudas (Figura 3). Na análise de regressão dessa variável, o modelo ajustado foi o linear de 1º grau. Observou-se que a utilização de doses crescentes de Pc-10 nas mudas diminuiu o número de galhas nas raízes das plantas de alface cultivadas nos vasos sem Pc-10 no solo. O menor número de galhas (371) foi observado com a dose de $18,0 \text{ g.L}^{-1}$ de Pc-10 nas mudas, com redução no número de galhas de 49,10%, em relação à testemunha (729).

Na avaliação do número de galhas. g^{-1} de raízes do experimento 2, houve efeito significativo das doses de Pc-10 nas mudas nos vasos sem e com Pc-10 no solo (Figura 4). Ou seja, a utilização de doses crescentes de Pc-10 nas mudas reduziu o número de galhas. g^{-1} de raízes, tanto nas raízes das plantas cultivadas no solo dos vasos onde o fungo não foi aplicado, quanto nos que foi aplicado. Na análise de regressão dessa variável, o modelo ajustado foi o linear de 1º grau, em ambos os casos. O menor número de galhas. g^{-1} de raízes foi observado nos vasos sem Pc-10 e com a dose de $18,0 \text{ g.L}^{-1}$ de Pc-10 nas mudas (17,17), que representou uma redução de 58,96%, em relação à testemunha (sem Pc-10 no solo e nas mudas).

O aumento da taxa de aplicação do fungo aumenta sua densidade no solo (Bourne & Kerry, 1999). Entretanto, as espécies de plantas hospedeiras diferem em sua habilidade de suportar o crescimento do fungo em sua rizosfera, assim como, o aumento da taxa de aplicação do fungo no solo não necessariamente aumenta a colonização da rizosfera (Kerry, 2000). Além disso, de acordo com Bourne & Kerry (1999), a multiplicação de *P. chlamydosporia* pode ser limitada, pois o fungo pode ser dependente de sua densidade e competir por nutrientes limitantes no solo. A utilização

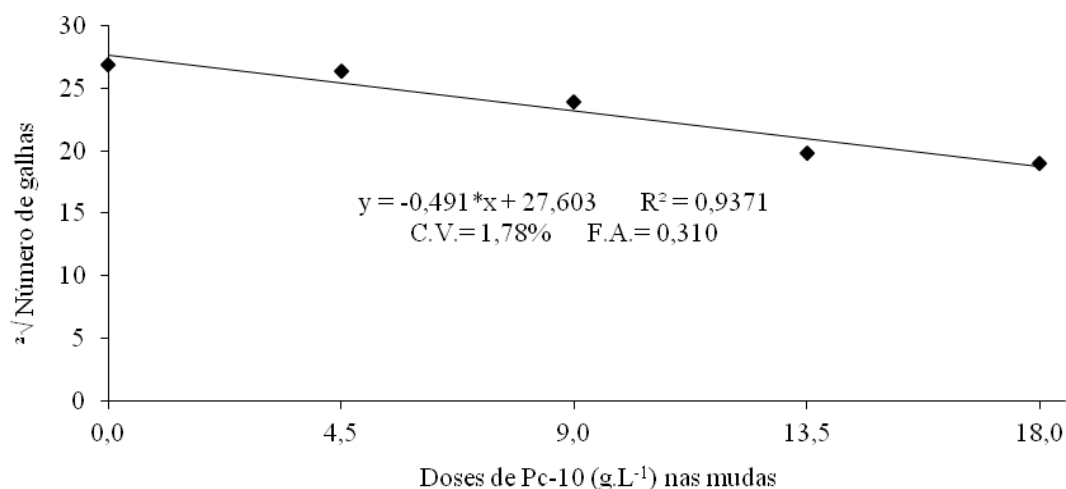


FIGURA 3 - Raiz quadrada do número de galhas nas raízes das plantas de alface cultivadas no solo dos vasos sem Pc-10, no experimento 2, sob diferentes doses de Pc-10 (g.L⁻¹) aplicadas nas mudas, 43 dias após o transplântio. Cada ponto representa a média de oito repetições. C.V.: Coeficiente de variação (%); F.A.: Falta de ajustamento; * Significativo pelo Teste t a 5% de probabilidade.

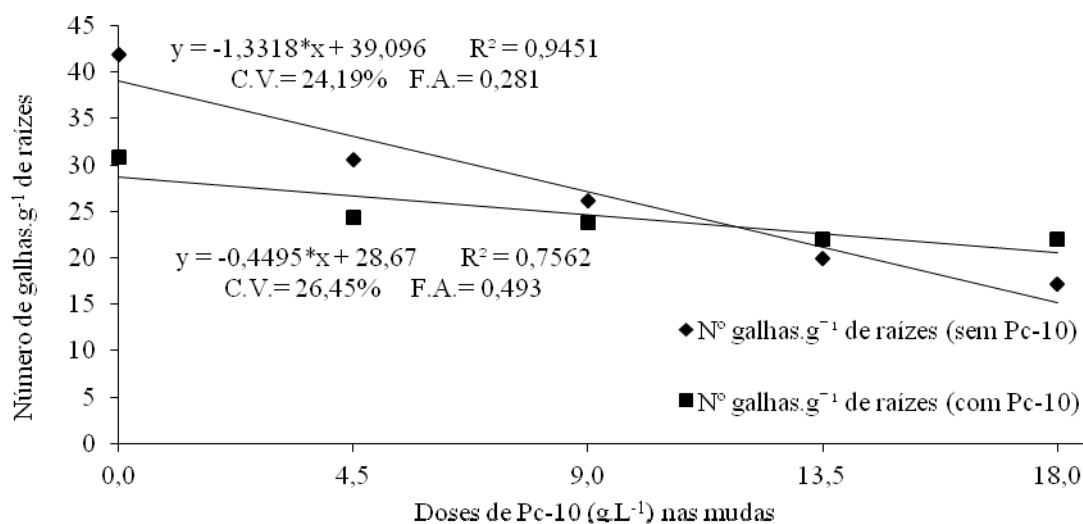


FIGURA 4 - Número de galhas.g⁻¹ de raízes das plantas de alface cultivadas no solo dos vasos sem e com Pc-10, no experimento 2, sob diferentes doses de Pc-10 (g.L⁻¹) aplicado nas mudas, 43 dias após o transplântio. Cada ponto representa a média de oito repetições. C.V.: Coeficiente de variação (%); F.A.: Falta de ajustamento; * Significativo pelo Teste t a 5% de probabilidade.

de doses crescentes de Pc-10 nas mudas proporcionou aumento da densidade do fungo no solo e, provavelmente, da colonização rizosférica. O parasitismo dos ovos no solo foi maior, reduzindo a formação e a eclosão dos J₂, a infecção inicial das raízes e, conseqüentemente, a formação de galhas nas raízes. Entretanto, no solo dos vasos tratados com altas concentrações de Pc-10, ou seja, com a aplicação de Pc-10 no solo e nas mudas, provavelmente, a multiplicação de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* foi limitada.

Lopes et al. (2007a) observaram que nenhum dos quatro isolados de *P. chlamydosporia* testados por eles reduziu o número de galhas de *M. javanica*. Dallemole-Giaretta et al. (2008), em apenas um ciclo do nematoide, observaram que quantidades crescentes de clamidósporos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10) no solo também não afetaram o número de galhas de *M. javanica*. Podestá et al. (2009) observaram que as aplicações de 5.000 e 10.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo de *P. chlamydosporia* (isolado Pc-10) reduziram significativamente o número de galhas de *M. javanica*, em comparação com o tratamento testemunha, sem o fungo. Nesses três experimentos, o fungo foi aplicado sete dias antes do transplântio das mudas de tomateiro. Em outros trabalhos, como os realizados por Dallemole-Giaretta et al. (2008), Coutinho et al. (2009) e Dallemole-Giaretta et al. (2010a e b), quando o fungo foi aplicado 15 dias antes do transplântio das mudas de tomateiro, *P. chlamydosporia* foi efetivo na redução do número de galhas. Segundo Dallemole-Giaretta et al. (2008), maior período de contato entre o fungo e os ovos do nematoide no solo favorecem o controle de *M. javanica* em tomateiro por *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, aumentando o parasitismo dos ovos no solo, impedindo a formação e a eclosão dos J₂. Com isso, a infecção inicial das raízes é reduzida e, conseqüentemente, o número de galhas e de ovos nas raízes. Nos presentes experimentos, o isolado Pc-10 foi aplicado na

dose de 5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo, sete dias antes do transplântio das mudas e esse período de tempo foi suficiente para reduzir o número de galhas e de galhas.g⁻¹ de raízes das plantas de alface, somente no experimento 2. Talvez, a aplicação do Pc-10 no solo, 15 dias antes do transplântio, proporcionasse maior redução do número de galhas e de galhas.g⁻¹ de raízes das plantas de alface.

As temperaturas mais altas ocorridas durante a condução do experimento 2 (Figura 1), proporcionaram condições menos favoráveis ao desenvolvimento das plantas de alface, resultando no menor crescimento da parte aérea e do sistema radicular (Tabela 2). Conseqüentemente ocorreu menor parasitismo das raízes das plantas por J₂ de *M. javanica*, resultando no menor número de galhas formadas. Temperaturas altas e fotoperíodos longos provocam o pendoamento precoce, impedindo ou prejudicando o fechamento de cabeça nas alfaces repolhudas (Sonnenberg, 1985). Segundo Kerry e Bourne (1996), a suscetibilidade da planta hospedeira pode influenciar o número de nematoides que atacam as raízes, a taxa de desenvolvimento dos nematoides e sua multiplicação, fatores esses, que influenciam o impacto do fungo na dinâmica populacional do nematoide. No presente experimento, provavelmente, alterações fisiológicas da planta em consequência das temperaturas mais altas podem ter afetado, por exemplo, a produção de exsudatos nas raízes, que interfeririam na interação nematoide-planta, afetando a atração, a penetração e o desenvolvimento dos nematoides nas plantas de alface.

Apenas a aplicação de Pc-10 no solo, isoladamente, foi significativa (p<0,05) na massa da parte aérea (MPAF) das plantas de alface, em ambos os experimentos (Tabela 2). Ou seja, independentemente do aumento das doses de Pc-10 nas mudas, a aplicação de Pc-10 no solo aumentou a massa da parte aérea (MPAF) das plantas de alface.

TABELA 2 - Efeito da aplicação de Pc-10 no solo sobre as massas da parte aérea fresca (MPAF) e do sistema radicular fresco (MSRF) das plantas de alface, 43 dias após o transplântio das mudas, nos experimentos 1 e 2.

Experimentos	MPAF (g)			MSRF (g)		
	Quantidade de clamidósporos.g ⁻¹ de solo nos vasos					
	0	5.000		0	5.000	
1	73,67	82,18	*	28,28	29,32	ns
2	60,38	64,55	*	21,71	24,42	*

. ns: não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade
. Média de oito repetições

*: significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

Dallemole-Giaretta et al. (2008) não observaram aumento na massa da parte aérea em comparação com a testemunha com nematoides e nem diferença na massa das raízes das plantas, quando avaliaram o efeito da aplicação de quantidades crescentes de clamidósporos (0, 5.000, 10.000, 15.000, 20.000 e 25.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo) de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10) em tomateiro. Em outros trabalhos, Dallemole-Giaretta et al. (2010a) observaram que as massas da parte aérea e das raízes de tomateiros não foram afetadas pela aplicação de 5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo de *P. chlamydosporia* (isolado Pc-19). As mesmas variáveis não foram afetadas pela aplicação de diferentes doses de palha de café colonizada com o isolado Pc-10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Dallemole-Giaretta et al., 2010b). Dessa forma, dependendo da taxa de aplicação de clamidósporos de *P. chlamydosporia* no solo e das condições experimentais, o desenvolvimento das plantas pode ser afetado.

Nenhum dos fatores, Pc-10 no solo e Pc-10 nas mudas, afetou a massa do sistema radicular (MSRF) das plantas de alface no experimento 1 (Tabela 2). Entretanto, no experimento 2, os dois fatores isoladamente foram significativos (p<0,05), ou seja, a

aplicação de Pc-10 no solo e de Pc-10 nas mudas aumentou a massa do sistema radicular (MSRF) das plantas de alface.

Na análise de regressão da massa do sistema radicular (MSRF) do experimento 2, o modelo ajustado foi o linear de 2º grau (Figura 5). Observou-se que a utilização de doses crescentes de Pc-10 nas mudas aumentou a massa do sistema radicular das plantas de alface. A maior massa do sistema radicular (24,57 g) foi observada no tratamento com a dose de 18,0 g.L⁻¹ de Pc-10 nas mudas. Essa dose aumentou em 31,39% a massa do sistema radicular das plantas de alface em relação à testemunha (18,70 g). Entretanto, a utilização da menor dose de Pc-10 nas mudas (4,5 g.L⁻¹) já foi suficiente para aumentar em 27,0% a massa do sistema radicular das plantas de alface. Monfort et al. (2005) constataram que *P. chlamydosporia* (isolado 4624) pode ter um efeito de promotor de crescimento em plantas de trigo. Dallemole-Giaretta et al. (2008) constataram que os isolados Pc-3, Pc-10 e Pc-19 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* colonizaram eficientemente a rizosfera e promoveram o crescimento de plântulas de tomate. Os isolados Pc123 e Pc21 de *P. chlamydosporia* tiveram um claro efeito promotor de crescimento em cevada (Marciá-Vicente et al., 2009). O efeito promotor de crescimento proporcionado por *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10) nas plantas de alface do experimento 2 foi pequeno em relação ao aumento da dose de Pc-10 nas mudas e, provavelmente, está relacionado com a menor adaptação climática da cultivar às condições de temperaturas do experimento 2.

Os dois fatores, aplicação de Pc-10 no solo e de Pc-10 nas mudas, foram significativos ($p < 0,05$) isoladamente para as variáveis número de ovos e de ovos.g⁻¹ de raízes, em ambos os experimentos (Tabela 3).

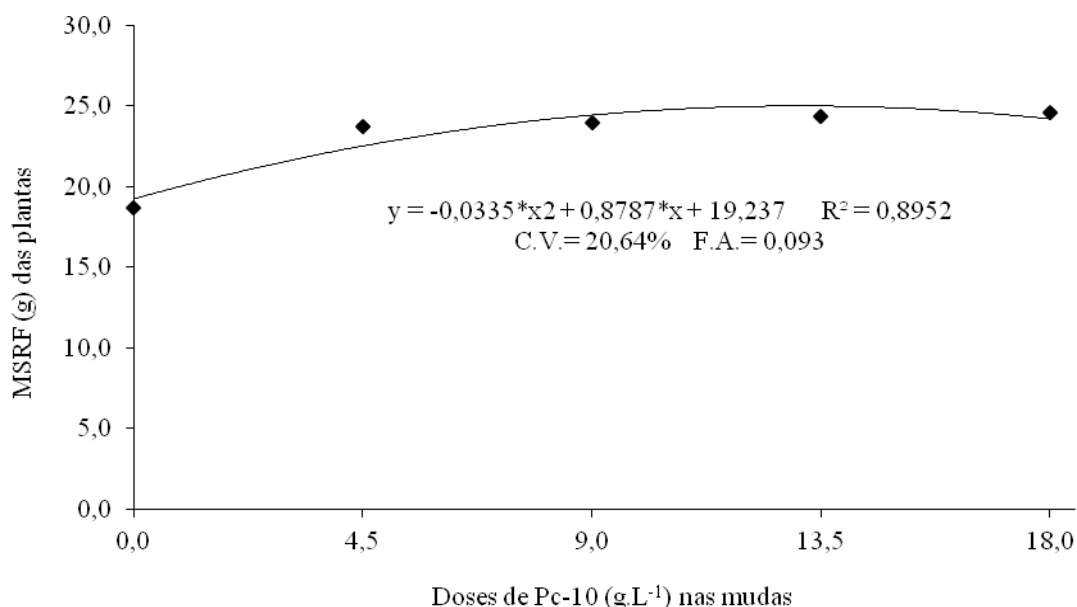


FIGURA 5 - Massa do sistema radicular fresco (MSRF) das plantas de alface do experimento 2, sob diferentes doses de Pc-10 (g.L⁻¹) aplicadas nas mudas, 43 dias após o transplântio. Cada ponto representa a média de oito repetições. C.V.: Coeficiente de variação (%); F.A.: Falta de ajustamento; * Significativo pelo Teste t a 5% de probabilidade.

TABELA 3 - Efeito da aplicação de Pc-10 no solo sobre o número de ovos e de ovos.g⁻¹ de raízes das plantas de alface, 43 dias após o transplântio das mudas, nos experimentos 1 e 2.

Experimentos	Número de ovos ¹		*	Número de ovos.g ⁻¹ de raízes ¹		*
	Quantidade de clamidósporos.g ⁻¹ de solo nos vasos					
	0	5.000		0	5.000	
1	35.471	30.581	*	1.306	1.066	*
2	41.472	36.916	*	2.050	1.606	*

. ns: não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade * significativo pelo teste F a 5% de probabilidade
. Média de oito repetições ¹Valores transformados para \sqrt{x} (experimento 2)

Ou seja, independentemente das doses de Pc-10 aplicadas nas mudas, a aplicação de Pc-10 no solo proporcionou redução do número de ovos e de ovos.g⁻¹ de raízes nas plantas de alface, em ambos os experimentos (Tabela 3).

Da mesma forma, independentemente da aplicação de Pc-10 no solo, o aumento das doses de Pc-10 nas mudas reduziu o número de ovos e de ovos.g⁻¹ de raízes das plantas de alface (Figuras 6A a D). Na análise de regressão dessas variáveis, os modelos ajustados foram o linear de 1º grau para o número de ovos (Figuras 6A e B) e de 2º grau para o número de ovos.g⁻¹ de raízes (Figuras 6C e D), em ambos os experimentos. Observou-se que a utilização de doses crescentes de Pc-10 nas mudas diminuiu o número de ovos e de ovos.g⁻¹ de raízes das plantas de alface, em ambos os experimentos. Os menores valores foram obtidos nos tratamentos com a dose de 18g.L⁻¹ de Pc-10 nas mudas. A dose de 18 g.L⁻¹ de Pc-10 nas mudas reduziu o número de ovos no primeiro e no segundo experimento, em 41,69% e 45,03%, respectivamente, e de ovos.g⁻¹ de raízes em 41,86% e 57,42%, em relação à testemunha.

Esses resultados confirmam a eficiência de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10) no controle de *M. javanica* em alface e reforçam os resultados obtidos por Podestá et al. (2009), Coutinho et al. (2009) e Dallemole-Giaretta et al. (2010a e b) em tomateiros. O mesmo foi observado com pepino (dados não publicados). A aplicação parcelada de Pc-10 nas mudas poderá ser uma alternativa viável de introdução do fungo no substrato para mudas e, conseqüentemente, no solo de áreas cultivadas com o alface e com outras hortaliças.

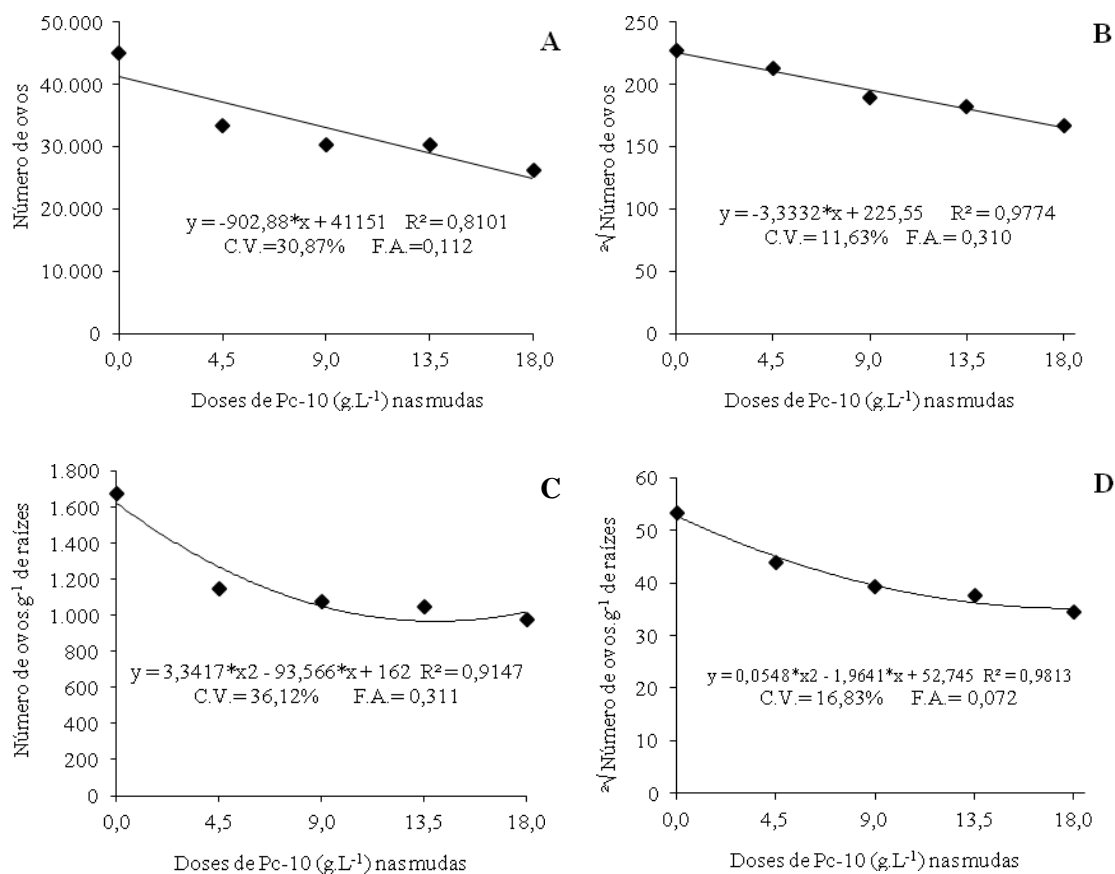


FIGURA 6 - Número de ovos e de ovos.g⁻¹ raízes das plantas de alface com diferentes doses de Pc-10 (g.L⁻¹) aplicadas nas mudas, no experimento 1 (6A e C) e 2 (6B e D), 43 dias após o transplântio. Cada ponto representa a média de oito repetições. C.V.: Coeficiente de variação (%); F.A.: Falta de ajustamento; * Significativo pelo Teste t a 5% de probabilidade.

As relações entre a planta hospedeira, o nematoide e *P. chlamydosporia* no solo são complexas. Algumas espécies de plantas como repolho, couve, crotalária, milho e tomateiro permitem extensa colonização de sua rizosfera e são considerados bons hospedeiros para o fungo, enquanto outras, como quiabo, sorgo, feijão e berinjela não permitem um crescimento rizosférico satisfatório (Kerry & Bourne, 1996; Bourne & Kerry, 1999). Aumentos na taxa de aplicação do fungo no solo superiores a 10 vezes a

dose padrão (5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo) aumentaram progressivamente a colonização na rizosfera e o controle do nematoide das galhas em couve. Entretanto, em quiabo, sorgo e feijão, esses efeitos foram observados apenas com altas doses do fungo. Em berinjela, não houve aumento na colonização da rizosfera, mas houve melhora no controle do nematoide e a população final de nematoides foi menor de acordo com as altas doses do fungo. A maior influência da planta hospedeira na eficácia do fungo é, provavelmente, sua suscetibilidade ao ataque dos nematoides, que influenciará o número de nematoides que se desenvolverão e o tamanho das galhas produzidas, que, por sua vez, afetará o número de massa de ovos que permanecerá dentro das raízes, protegidas contra a infecção do fungo (Bourne & Kerry, 1999). Segundo Charchar & Moita (1996), as cultivares de alface do tipo lisa (Vitória e Regina) são as mais suscetíveis ao nematoide das galhas (*M. incognita* e *M. javanica*), quando comparadas com as cultivares do tipo crespa. Apesar de não ter sido avaliado o tamanho das galhas, nestes experimentos, observou-se que as raízes das plantas de alface Regina 255 apresentaram uma grande quantidade de galhas pequenas. Portanto, as plantas de alface Regina 255 foram muito suscetíveis ao *M. javanica* e, aparentemente, a alface foi uma boa hospedeira para o fungo. Com isso, controle mais efetivo de *M. javanica* em plantas de alface Regina 255 é alcançado com aumento de taxas de aplicação do fungo, como observado nos tratamentos com a aplicação de Pc-10 no solo e com aumento das concentrações de Pc-10 nas mudas de alface.

Na avaliação do número de unidades formadoras de colônias de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no solo dos vasos cultivados com plantas de alface com os diferentes tratamentos, verificou-se que não houve a contaminação das testemunhas dos experimentos. Na análise de regressão do número de UFC.g⁻¹ de solo, os dados não se ajustaram a nenhum modelo de regressão. As altas taxas de aplicação de

Pc-10 nas mudas resultaram, aproximadamente, em $4,0 \times 10^4$ a $10,66 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ de substrato no experimento 1; e em $4,33 \times 10^4$ a $10,33 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ de substrato no experimento 2. Considerando-se a aplicação de Pc-10 no solo (5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo) e nas mudas, e a quantidade relativamente pequena de UFC.g⁻¹ de solo observada nos vasos dos diferentes tratamentos, em média, 8.167 ± 5.701 e 19.533 ± 6.009 UFC.g⁻¹ de solo nos experimentos 1 e 2, respectivamente, observa-se que a coleta das amostras de solo dos vasos não foi apropriada ou representativa dos tratamentos. Ou, ainda, de acordo com Bourne & Kerry (1999), provavelmente, a multiplicação de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no solo dos diferentes tratamentos foi limitada, pois o fungo pode ser dependente de sua densidade e competir por nutrientes limitantes.

O agente de biocontrole *P. chlamydosporia* tem baixa eficiência de controle quando ocorre alta população de J₂ no solo em culturas suscetíveis, pois o fungo não previne a invasão inicial das raízes pelos J₂ e os danos que eles causam ao crescimento da planta. Conseqüentemente, se o solo estiver fortemente infestado com J₂ do nematoide das galhas, outros métodos de controle compatíveis devem ser utilizados para aumentar a sua eficácia (Kerry & Bourne, 2002). Uma alternativa para aumentar a eficiência do controle de *M. javanica* em alface é a integração do uso combinado de Pc-10 no solo e nas mudas com o uso de cultivares mais resistentes do tipo crespas (Charchar & Moita, 2005); a rotação de culturas com gramíneas, a exemplo do milho e sorgo, e com leguminosas antagonistas, por exemplo, as crotalárias e as mucunas (Charchar & Moita, 1996); o revolvimento do solo (Dutra & Campos, 1998) e o alqueive úmido (Dutra et al., 2003, 2006). O revolvimento do solo e o alqueive úmido são técnicas que reduzem consideravelmente a população de J₂ de *Meloidogyne* spp. no solo em curtos períodos de tempo (3 a 15 dias) e são fáceis de serem implementadas

pelos agricultores. Entretanto, o efeito de combinado de Pc-10 com outras práticas de controle cultural, como as anteriormente sugeridas, precisa ser mais bem investigado.

Conclui-se que a aplicação do produto Pc-10, à base de clamidósporos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10), aumenta o controle de *M. javanica* em plantas de alface. A utilização de Pc-10 reduz o número de ovos e de ovos.g⁻¹ de raízes de plantas de alface, sendo os melhores resultados obtidos nos tratamentos onde ocorrem a aplicação de Pc-10 no solo (5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo) e de 18,0 g.L⁻¹ de Pc-10 nas mudas de alface.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Paulo Afonso Ferreira, pela colaboração nas análises estatísticas; à Fernanda, Érica, Deisy Leonardo e Guilherme, pela colaboração nas atividades de laboratório desenvolvidas durante a condução dos experimentos. À Rizoflora Biotecnologia, pelo fornecimento do produto Pc-10 para a realização dos experimentos. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de doutorado ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bonetti JIS, Ferraz S (1981) Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira 6 (Supl.):553.

Bourne JM, Kerry BR (1999) Efect of the host plant on the efficacy of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent of root-knot nematodes at diferent nematode densities and fungal application rates. *Soil Biology and Biochemistry* 31:75-84.

Campos VP (1995) Doenças causadas por nematóides em alcachofra, alface, chicória, morango e quiabo. *Informe Agropecuário* 17:17-22.

CEASAMINAS. Centrais de Abastecimento de Minas Gerais. Informações de mercado, http://minas.ceasa.mg.gov.br/detec/Procedencia/cst_prd_consolidado/cst_prd_consolidado.php (11 de Março de 2011).

Charchar JM, Moita AW (1996) Reação de cultivares de alface à infecção por mistura populacionais de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *M. javanica* em condições de campo. *Horticultura Brasileira* 14:185-189.

Charchar JM, Moita AW (2005) Metodologia para seleção de hortaliças com resistência a nematoides: alface/*Meloidogyne* spp. Brasília. Embrapa Hortaliças.

Chen S, Dickinson DW (2004) Biological control of nematodes by fungal antagonists. In: Chen Z, Chen S, Dickinson DW (Eds.) *Nematology - advances and perspectives*. Volume II: Nematode management and utilization. Beijing & Wallingford. Tsinghua University Press & CABI Publishing. pp. 979-1039.

Coutinho MM, Freitas LG, Dallemole-Giaretta R, Neves WS, Lopes EA, Ferraz S (2009) Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pochonia chlamydosporia* e farinha de sementes de mamão. *Nematologia Brasileira* 33:169-175.

Dallemole-Giaretta R, Freitas LG, Ferraz S, Neves WS, Lopes EA, Coutinho MM (2008) Efeito da concentração de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* var.

chlamydosporia no controle de *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira 32:327-332.

Dallemole-Giaretta R, Freitas LG, Coutinho MM, Neves WS, Zooca RJF, Ferraz S (2010a) Efeito da farinha de sementes de abóbora e de *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira 34:91-97.

Dallemole-Giaretta R, Freitas LG, Zooca RJF, Caixeta LB, Lopes, EA (2010b) Controle de *Meloidogyne javanica* por meio da aplicação de palha de café colonizada por *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. Nematologia Brasileira 34:137-140.

Dutra MR, Campos VP (1998) Efeito do preparo do solo na população dos nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.). Nematologia Brasileira 22:19-34.

Dutra MR, Campos VP, Toyota M (2003) Manejo do solo e da irrigação para o controle de *Meloidogyne javanica* em alface. Nematologia Brasileira 27:29-34.

Dutra MR, Campos VP, Rocha FS, Silva JRC, Pozza EA (2006) Manejo do solo e da irrigação no controle de *Meloidogyne incognita* em cultivo protegido. Fitopatologia Brasileira 31:405-407.

Filgueira FAR (2003) Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2ª Ed. Viçosa. UFV.

Fiorini CVA, Gomes LAA, Maluf WR, Fiorini IVA, Duarte RPF, Licursi V (2005) Avaliação de populações F₂ de alface quanto à resistência aos nematóides das galhas e tolerância ao florescimento precoce. Horticultura Brasileira 23:299-302.

Gaspard JT, Jaffee BA, Ferris H (1990) Association of *Verticillium chlamyosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with root-knot nematode infested soil. *Journal of Nematology* 22:207-213.

Kerry BR (1991) Methods for studying the growth and survival of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamyosporium* Goddard, in soil. *Bulletin SROP* 14:34-38.

Kerry BR (2000) Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 38:423-441.

Kerry BR (2001) Exploitation of nematophagous fungal *Verticillium chlamyosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: Butt TM, Jackson C, Magan N (Eds.) *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Wallingford UK. CAB International. pp. 155-167.

Kerry BR, Bourne JM (1996) The importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant parasite nematodes - a case study using *Verticillium chlamyosporium*. *Pesticide Science* 47:69-75.

Kerry BR, Bourne JM (2002) A manual for research on *Verticillium chlamyosporium*, a potential biological control agent for root-knot nematodes. *Gent. IOBC-WPRS*.

Lopes EA, Ferraz S, Ferreira PA, Freitas LG, Dhingra OD, Gardiano CG, Carvalho SL (2007a) Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira* 31:78-84.

Lopes JLW, Boaro CSF, Peres MR, Guimarães VF (2007b) Crescimento de mudas de alface em diferentes substratos. *Biotemas* 20:19-25.

Marcía-Vicente JG, Rosso LC, Ciancio A, Janson HB, Lopez-Llorca LV (2009) Colonization of roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*: effects on plant growth and disease. *Annals of Applied Biology* 155:391-401.

MINITAB. Minitab (Release 14.1), <http://www.minitab.com/pt-BR/default.aspx> (28 de Abril de 2003).

Monfort E, Lopez-Llorca LV, Jansson HB, Salinas J, Park JO, Sivasithamparam K (2005) Colonization 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.

Podestá GS, Dallemole-Giaretta R, Freitas LG, Lopes EA, Ferraz S, Zooca RJF (2009) Atividade nematófaga de *Pochonia chlamydosporia* em solo natural ou autoclavado sobre *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira* 33:191-193.

Sonnenberg PE (1985) Olericultura especial: 2ª parte. 5ª Ed. Goiânia. UFG.

Souza JL, Resende P (2003) Manual de horticultura orgânica. Viçosa. Aprenda Fácil.

Trani PE, Novo MCSS, Cavallaro Júnior ML, Telles LMG (2004) Produção de mudas de alface em bandejas e substratos comerciais. *Horticultura Brasileira* 22:290-294.

Trani PE, Feltrin DM, Pott CA, Schwingel M (2007) Avaliação de substratos para produção de mudas de alface. *Horticultura Brasileira* 25:256-260.

ARTIGO 3

***Pochonia chlamydosporia* NO CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM
PEPINO.³**

³Artigo elaborado de acordo com as normas da revista “Biological Control”.

***Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica* em pepino.**

José Ricardo Viggiano^{1,*}, Leandro Grassi de Freitas¹, Everaldo Antônio Lopes²

Endereço atual: ¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36.570-000, Viçosa, MG, Brasil, E-mail: leandro@ufv.br; ²Instituto de Ciências Agrárias, Campus Rio Paranaíba, Universidade Federal de Viçosa, CEP 38.810-000, Rio Paranaíba, MG, Brasil, E-mail: everaldolopes@ufv.br.

* Autor para correspondência: E-mail: jrvggiano@bol.com.br, Telefax: +55 31 3892-2742 (J.R. Viggiano)

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito do bionemático Pc-10, à base de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, no controle de *Meloidogyne javanica* quando aplicado nas mudas e no solo cultivado com pepino. Mudas de pepino foram inoculadas com diferentes doses do Pc-10 (0; 4,5; 9,0; 13,5 e 18,0 g de Pc-10.L⁻¹ de água). Para crescimento das plantas foram utilizados vasos contendo o substrato solo de barranco e areia lavada. O solo de cada vaso foi infestado com 3.000 ovos de *M. javanica*. Em seguida, o solo de 35 vasos foi infestado com o Pc-10 (5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo). Os outros 35 vasos não foram infestados. Uma muda foi transplantada para cada vaso. Os resultados demonstraram que a aplicação de 18 g.L⁻¹ de Pc-10 nas mudas reduziu o

número de galhas, no primeiro e no segundo experimento, respectivamente, em 34,94% e 37,17%; e o número de ovos em 36,93% e 30,83%, em relação à testemunha. A aplicação de Pc-10 nas mudas não prejudicou o desenvolvimento das mudas de pepino. Conclui-se que a aplicação de 18 g.L⁻¹ de Pc-10 nas mudas resultou no maior controle de *M. javanica* em pepino.

Palavras-chave: controle biológico, fungos nematófagos, nematoide das galhas, *Cucumis sativus*.

1. Introdução

O pepino (*Cucumis sativus* L.) é uma cucurbitácea de clima tropical cujo centro de origem é a Índia. Desenvolve-se bem em condições de temperaturas elevadas, podendo ser cultivado em regiões com temperaturas amenas, mas não tolera temperaturas muito baixas e geadas. Seu fruto, geralmente, é consumido cru em saladas ou em conservas, na forma de pickles (Souza e Resende, 2003; Filgueira, 2008).

O nematoide das galhas, principalmente as espécies *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood e *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood estão amplamente distribuídos nos solos cultivados com hortaliças no Brasil causando perdas que podem atingir 100% (Campos et al., 2001; Sikora e Fernández, 2005).

O fungo *Pochonia chlamydosporia* Zare e Gams (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard) é um agente de controle biológico, parasita de ovos e fêmeas de espécies de fitonematoides endoparasitas sedentários, que se destaca no controle do nematoide das galhas (Kerry, 1997). Esse agente de biocontrole produz clamidósporos, estruturas de sobrevivência resistentes que favorecem sua manipulação e produção *in vitro*. Os clamidósporos são o tipo de inóculo mais efetivo para o

estabelecimento do fungo no solo e na rizosfera, e a concentração mais indicada para boa eficiência no campo é de aproximadamente 5.000 clamidósporos por grama de solo (Kerry, 2001).

A introdução de *P. chlamydosporia* no solo de forma prática, eficiente e integrada aos sistemas produtivos comerciais ainda carece de avaliações. Segundo Kerry e Bourne (2002), várias técnicas tem sido testadas, como por exemplo, a aplicação na superfície do solo em suspensão aquosa ou em forma de grânulos; a imersão das raízes em pasta de alginato contendo clamidósporos; e o transplante de mudas em blocos de turfa colonizado. Essas técnicas, no entanto, ainda não proporcionaram resultados completamente satisfatórios, necessitando de maiores investigações. Campos e Campos (1997) utilizaram grãos de trigo pré-cozidos inoculados e suspensão de esporos de *P. chlamydosporia* ($2,0 \times 10^6$ esporos.ml⁻¹) em três aplicações para a introdução do fungo em solo infestado por *Meloidogyne exigua* e cultivado com cafeeiro.

As formas de aplicação de *P. chlamydosporia* no solo evoluíram nos últimos anos. Lopes et al. (2007) e Dallemole-Giaretta et al. (2008) fizeram a aplicação por meio da mistura de substrato colonizado pelo fungo com o solo. Coutinho et al. (2009) aplicaram o fungo ao solo na forma de mistura de suspensão de clamidósporos e farinha de sementes de mamão, um nematicida natural. Dallemole-Giaretta et al. (2010b) fizeram a aplicação no solo utilizando-se da mistura de arroz colonizado pelo fungo e farinha de sementes de abóbora. Outra forma utilizada por Dallemole-Giaretta et al. (2010a) foi a incorporação ao solo de palha de café colonizado pelo fungo.

Existem produtos em desenvolvimento e em testes em sistemas produtivos comerciais, como o Rizotec, pela empresa Rizoflora Biotecnologia S.A, em Viçosa,

Minas Gerais, Brasil. Nesse caso, a introdução do isolado de Pc-10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no solo tem sido testada por meio da aplicação do fungo via água de irrigação das mudas no viveiro e das plantas sob pivô central. O bionemático foi testado com sucesso no controle de *M. javanica* por Podestá et al. (2009), Coutinho et al. (2009) e Dallemole-Giaretta et al. (2010a e b) em tomateiro, e em cenoura e beterraba no campo.

A implantação de pepino e outras hortaliças no campo é feita, principalmente, por meio de mudas produzidas em bandejas de poliestireno com diferentes número e tamanho de células e diversos tipos de substratos comerciais ou formulados pelo próprio agricultor (Seabra Junior et al., 2004). Essa técnica já é amplamente utilizada pelos agricultores brasileiros e pode ser uma alternativa tecnicamente e economicamente viável de introdução de *P. chlamydosporia* no solo.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no controle de *M. javanica* quando aplicado em diferentes doses nas mudas e no solo cultivado com plantas de pepino.

2. Material e Métodos

2.1. Local dos experimentos

Os experimentos foram instalados em casa de vegetação equipada com sistema de aquecimento e resfriamento, localizada na área experimental de campo do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. As temperaturas mínimas e máximas do ar e do solo no interior da casa de vegetação durante a realização dos experimentos foram registradas diariamente (Fig. 1).

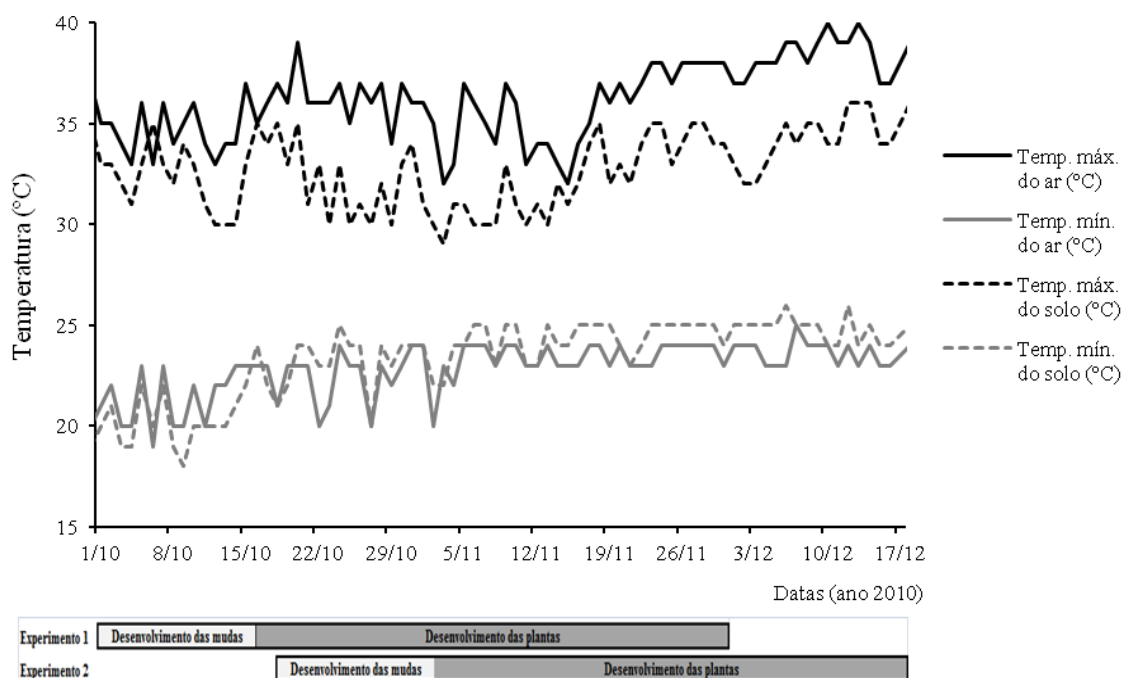


Fig. 1. Temperaturas mínimas e máximas do ar e do solo (°C) em casa de vegetação durante a realização dos experimentos.

2.2. Obtenção do produto Pc-10

Um produto constituído de clamidósporos do isolado Pc-10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, em desenvolvimento pela empresa Rizoflora Biotecnologia, com concentração média de $3,1 \times 10^8$ clamidósporos por grama do produto, lote de agosto/2010, foi utilizado nos experimentos e será doravante chamado de Pc-10.

2.3. Produção das mudas de pepino

Na produção das mudas de pepino foi utilizado o substrato comercial Tropstrato Hortaliças II HT (marca Vida Verde), previamente umedecido com 5% de água (v:v).

Amostra do substrato utilizado nos experimentos foi coletada e análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Análises de Solo Viçosa Ltda (Tabela 1).

Tabela 1. Análises físico-químicas do substrato comercial Tropstrato Hortaliças II HT, utilizado na produção das mudas de pepino dos experimentos, realizadas no Laboratório de Análises de Solo Viçosa Ltda.

pH	N	P	K	Ca	Mg	S	C.O.	C/N	Zn	Fe	Mn	Cu	B	Densidade
H ₂ O	%								ppm					g.mL ⁻¹
5,54	0,55	0,26	0,22	1,40	0,77	0,44	13,10	23,81	51	8516	105	29	13,6	0,64

Teores totais, determinados em extrato ácido (ácido nítrico com ácido perclórico); N, pelo método do Kjeldahl; CO, pelo método Walkley-Black.

Sementes de pepino Caipira (marca Isla, lote 24.234, germinação: 96%, pureza: 100%, teste: 10/2009, validade: 10/2012) foram semeadas manualmente em cinco bandejas de isopor cortadas (do tipo 128 células) com 56 células, com capacidade para aproximadamente 1,8 L de substrato. Foi utilizada uma semente por célula, à profundidade de 1 cm, padronizada com o uso de um marcador de madeira. Após o semeio, as bandejas foram colocadas sobre bancada telada em casa de vegetação, cobertas com tela de nylon preta e, em seguida, irrigadas. A emergência ocorreu dois dias após o semeio, quando a tela de nylon foi retirada. As irrigações foram realizadas diariamente, duas vezes ao dia, de manhã e de tarde, utilizando-se mangueira adaptada com bico regador.

2.4. Aplicação do Pc-10 nas mudas

A aplicação de Pc-10 nas mudas de pepino em cada bandeja foi realizada por meio de irrigação, utilizando-se uma garrafa PET (500 ml) com tampa perfurada,

contendo 250 ml de uma suspensão com diferentes doses de Pc-10: 0; 4,5; 9,0; 13,5 e 18,0 g de Pc-10.L⁻¹ de água. Cada dose de Pc-10 foi dividida em três partes iguais e aplicada parceladamente nas mudas, em cada bandeja correspondente, aos 3, 7 e 12 dias após o semeio.

2.5. Desenvolvimento das plantas

Para o crescimento das plantas de pepino foram utilizados vasos de 2 L contendo o substrato solo e areia, na proporção 1:1 (v:v), previamente adubado com 120 g de superfosfato simples para cada 20 L da mistura (m:v) e tratado com brometo de metila na dose de 180 cm³.m⁻³. Sete dias antes do transplântio das mudas, o solo de cada vaso foi infestado com um volume de suspensão contendo 3.000 ovos de *M. javanica*. O inóculo de *M. javanica* foi constituído por ovos obtidos de populações puras e coletados de raízes de tomateiros mantidos em vasos em casa de vegetação e extraídos pela técnica de Hussey e Barker (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981). Em seguida, o solo de 35 vasos foi infestado com 20 ml de uma suspensão formulada com Pc-10 e calculada para fornecer 5.000 clamidósporos por grama de solo por vaso. O solo de outros 35 vasos não foi infestado com o fungo. O solo nos vasos foi mantido úmido próximo a 60% da capacidade de campo.

Uma muda de pepino foi transplantada para cada vaso, 15 dias após o semeio, constituindo-se 10 tratamentos num esquema fatorial 2 x 5: solo sem Pc-10 (0; 4,5; 9,0; 13,5 e 18,0 g.L⁻¹ de Pc-10 nas mudas) e solo com Pc-10 (0; 4,5; 9,0; 13,5 e 18,0 g.L⁻¹ de Pc-10 nas mudas). Após o transplântio, os vasos foram colocados sobre bancada telada em casa de vegetação e irrigados diariamente, quando necessário, duas vezes ao dia, de manhã e de tarde, utilizando-se mangueira adaptada com bico regador.

Uma adubação de cobertura, em ambos os experimentos, foi realizada aos 33 dias após o transplântio das mudas, utilizando-se 3 g do adubo foliar 10-54-10 por litro de água e aplicando-se 20 ml dessa solução em cada vaso. O adubo foliar apresentou as seguintes características químicas: 10% N; 54% P₂O₅ (pentóxido de fósforo); 10% de K₂O (óxido de potássio); 0,1% Fe; 0,02% B e 0,05% Cu. Durante a condução dos experimentos constatou-se a presença de oídio (*Sphaerotheca fuliginea*) na superfície foliar das plantas de pepino. Para o controle do fungo foram realizadas duas pulverizações com leite de vaca cru (Bettioli, 1999, 2004) nas concentrações de 10% e 5% (v:v), respectivamente, no experimento 1, aos 33 e 40 dias após o transplântio, e no experimento 2, aos 15 e 22 dias após o transplântio.

2.6. Avaliação dos experimentos

Após o transplântio das mudas, para a determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* por grama de substrato das mudas tratadas com diferentes doses de Pc-10, 10 mudas de cada bandeja foram escolhidas ao acaso. O substrato aderido aos respectivos sistemas radiculares dessas mudas foi coletado, constituindo-se uma amostra composta de substrato por dose de Pc-10 utilizada nas mudas. As amostras compostas dos substratos foram coletadas no primeiro e no sétimo dia após o transplântio das mudas nos experimentos 1 e 2, respectivamente. O número de UFC.g⁻¹ de substrato foi determinado conforme metodologia descrita por Kerry (1991) usando meio semi-seletivo de Gaspard et al. (1990).

As plantas de pepino foram coletadas 45 dias após o transplântio. Em seguida, foi determinada a altura, as massas da parte aérea fresca (MPAF) e do sistema radicular

fresco (MSRF), o número de galhas e de ovos, e calculado o número de galhas e de ovos por grama do sistema radicular das plantas de pepino. Durante a extração das raízes, amostras de solo dos vasos dos respectivos tratamentos foram coletadas para a determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) do fungo por grama de solo. O número de UFC.g⁻¹ de solo foi determinado conforme metodologia descrita anteriormente.

2.7. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi realizado em blocos casualizados com sete repetições por tratamento. Cada unidade experimental foi constituída por uma planta por vaso. O experimento foi realizado duas vezes.

2.8. Análises estatísticas

Os dados obtidos, transformados ou não, foram analisados pelo teste F a 5% de probabilidade, sendo as pressuposições de normalidade do erro e a homogeneidade de variância do erro analisadas, respectivamente, pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett a 5% de probabilidade. Os dados foram submetidos à análise estatística e os resultados apresentados em gráficos de regressão quando significativos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares estatísticos Minitab (Minitab, 2003) e Statistica (Statsoft, 2004).

3. Resultados e Discussão

3.1. Médias das temperaturas durante os experimentos

No experimento 1, a média das temperaturas mínimas e máximas durante o período de desenvolvimento das plantas de pepino foram, respectivamente, de 23,1°C e 36,0°C no ar, e de 23,9°C e 32,3°C no solo (Fig. 1). No experimento 2, a média das mínimas e máximas foram, respectivamente, de 23,5°C e 36,7°C no ar, e de 24,5°C e 33,0°C no solo. Na primeira quinzena do experimento 1, período no qual o experimento 2 ainda não havia iniciado, a média das temperaturas mínimas e máximas no solo foram, respectivamente, inferiores em 0,7°C e 0,6°C. Inversamente, na última quinzena do experimento 2, quando o experimento 1 já havia sido retirado para avaliação, a média das mínimas e máximas foram, respectivamente, superiores em 0,5°C e 2,4°C no ar, e 0,9°C e 1,9°C no solo.

O pepino é uma espécie de hortaliça que não se adapta ao cultivo sob baixas temperaturas, sendo o desenvolvimento das plantas favorecido por temperaturas superiores a 20°C. Temperaturas inferiores a 20°C afetam a absorção de água e nutrientes pelas raízes das plantas (Lower e Edwards, 1986; Robinson e Decker-Walters, 1999). Sweep (1973), citado por Sonnenberg (1985), considerou as temperaturas mínimas de 20°C à noite e de 24°C durante o dia, as mais adequadas para o bom desenvolvimento das plantas de pepino. Portanto, a ocorrência de temperaturas mais altas durante a fase de desenvolvimento das plantas no experimento 2, principalmente na última quinzena, proporcionou maior desenvolvimento das plantas de pepino, o que pode ser comprovado pela maior altura e massa da parte aérea (MPAF) das plantas de pepino neste experimento.

3.2. Número de UFC.g⁻¹ de substrato das mudas de pepino

Na avaliação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* por grama de substrato das mudas de pepino tratadas com Pc-10, verificou-se que não ocorreu a contaminação das testemunhas dos experimentos. Na análise de regressão do número de UFC.g⁻¹ de substrato, o modelo ajustado foi o linear de 1º grau (Fig. 2).

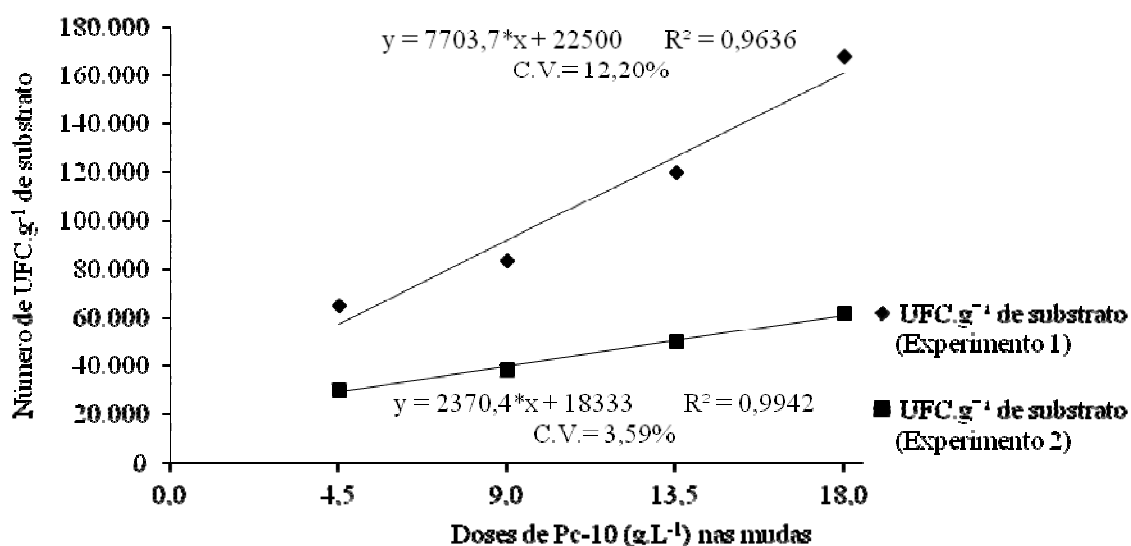


Fig. 2. Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10) por grama de substrato das mudas de pepino sob diferentes doses de Pc-10 (g.L⁻¹) aplicados parceladamente aos 3, 7 e 12 dias após o semeio, nos experimentos 1 e 2. Cada ponto representa a média de três repetições. C.V.: Coeficiente de variação (%).

O número de UFC.g⁻¹ de substrato foi maior no experimento 1 e a utilização de doses crescentes de Pc-10 nas mudas aumentou o número de UFC.g⁻¹ de substrato das

mudas de pepino, em ambos os experimentos (Fig. 2). A aplicação parcelada de Pc-10 nas mudas, que resultaram, aproximadamente, em $1,21 \times 10^6$ (dose $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ de Pc-10) a $4,84 \times 10^6$ clamidósporos. g^{-1} de substrato (dose $18,0 \text{ g.L}^{-1}$ de Pc-10), proporcionou a produção de $6,5 \times 10^4$ a $16,8 \times 10^4$ UFC. g^{-1} de substrato no experimento 1; e de $3,0 \times 10^4$ a $6,16 \times 10^4$ UFC. g^{-1} de substrato no experimento 2. Em ambos os experimentos, a aplicação de altas concentrações de Pc-10 nas mudas não prejudicou o desenvolvimento das mudas de pepino.

Bourne e Kerry (1999) verificaram que o aumento nas taxas de aplicação de *P. chlamydosporia* no solo (5.000, 10.000 e 50.000 clamidósporos. g^{-1} solo) aumentou a colonização do solo e da rizosfera (UFC. g^{-1} solo ou raiz) de diferentes plantas hospedeiras do fungo no final dos experimentos. Nos presentes experimentos, a lixiviação da água de irrigação do substrato das mudas pode ter contribuído para eliminar parte dos clamidósporos aplicados nas mudas. As menores quantidades de UFC. g^{-1} de substrato nas mudas do experimento 2 foi decorrente da coleta tardia das amostras, realizada sete dias após o transplantio das mudas. A coleta tardia permitiu que parte dos clamidósporos fosse perdida pela lixiviação da água de irrigação aplicada nas mudas durante esse período. Dessa forma, a aplicação parcelada de Pc-10 nas mudas poderá ser uma alternativa técnica e economicamente viável de introdução do fungo no substrato das mudas de pepino e, conseqüentemente, no solo de áreas cultivadas com pepino e outras hortaliças

3.3. Desenvolvimento das plantas de pepino

Não houve interação significativa ($p < 0,05$) entre os fatores Pc-10 no solo e doses de Pc-10 nas mudas de pepino para todas as variáveis testadas.

A aplicação de Pc-10 no solo (Tabela 2) ou nas mudas (dados não apresentados) não afetou significativamente ($p < 0,05$) a altura e a massa da parte aérea (MPAF) das plantas de pepino, em ambos os experimentos.

Tabela 2. Efeito da aplicação de Pc-10 no solo sobre a altura, as massas da parte aérea fresca (MPAF) e do sistema radicular fresco (MSRF) das plantas de pepino, 45 dias após o transplântio das mudas, nos experimentos 1 e 2.

Experimentos	Altura (cm) **			MPAF (g)			MSRF (g) **		
	Quantidade de clamidósporos por g de solo nos vasos								
	0	5.000		0	5.000		0	5.000	
1	136,91	142,40	ns	73,48	74,21	ns	19,53	19,73	ns
2	181,94	188,91	ns	87,16	88,49	ns	14,63	16,39	*

. ns: não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade *: significativo pelo teste F a 5% de probabilidade
. Média de sete repetições ** Valores transformados para $\text{Log}_{10}(x)$

Dallemole-Giaretta et al. (2008) não observaram aumentos na altura e na massa da parte aérea em comparação com a testemunha parasitada por nematoides, e nem diferença na massa das raízes das plantas, quando avaliaram o efeito da aplicação de quantidades crescentes de clamidósporos (0, 5.000, 10.000, 15.000, 20.000 e 25.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo) de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10) em tomateiro. Em outros trabalhos, Dallemole-Giaretta et al. (2010b) observaram que a altura das plantas, as massas da parte aérea e das raízes de tomateiros não foram afetadas ($p < 0,05$) pela aplicação de 5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo de *P. chlamydosporia* (isolado Pc-19). As mesmas variáveis não foram afetadas ($p < 0,05$) pela aplicação de diferentes doses de palha de café colonizada com o isolado Pc-10 de *P.*

chlamydosporia var. *chlamydosporia* (Dallemele-Giaretta et al., 2010a). Podestá et al. (2009) observaram que a altura de plantas de tomateiro não diferiu entre a testemunha e a dose de 5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo de *P. chlamydosporia* (isolado Pc-10) aplicados em solo natural ou autoclavado. No entanto, a dose de 10.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo aumentou em 12,82% a altura das plantas em relação à testemunha sem o fungo. Portanto, dependendo da taxa de aplicação de clamidósporos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no solo e das condições experimentais, o desenvolvimento das plantas pode ser afetado. Provavelmente, a aplicação de doses superiores a 5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo proporcionasse melhores resultados no desenvolvimento vegetativo das plantas de pepino. Entretanto, a aplicação de doses superiores a 5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo, podem ser economicamente inviáveis, devido a quantidade do produto Pc-10 necessária por área de cultivo.

A aplicação de Pc-10 no solo (Tabela 2) e nas mudas (dados não apresentados), não afetou significativamente ($p < 0,05$) a massa do sistema radicular (MSRF) das plantas de pepino no experimento 1. Entretanto, no experimento 2, os dois fatores isoladamente foram significativos, ou seja, o uso de Pc-10 no solo e de Pc-10 nas mudas aumentaram a massa do sistema radicular das plantas de pepino. Na análise de regressão da massa do sistema radicular (MSRF) do experimento 2, o modelo ajustado foi o linear de 1º grau (Fig. 3). A maior massa do sistema radicular foi observada nos tratamentos com as doses de 13,5 e 18,0g.L⁻¹ de Pc-10 nas mudas, independentemente da aplicação de Pc-10 no solo. Essas doses aumentaram em 30,28% a massa do sistema radicular das plantas de pepino em relação à testemunha.

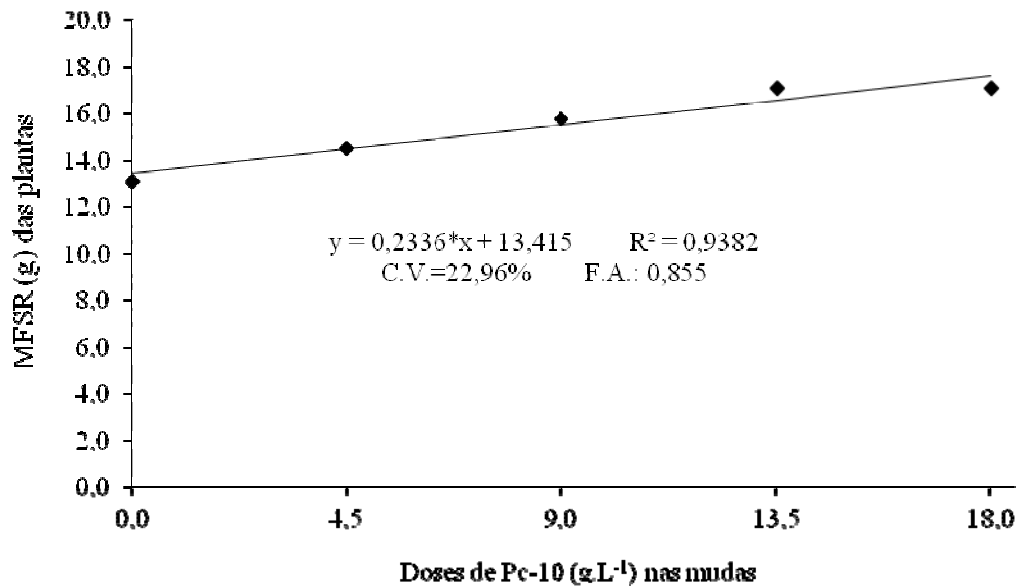


Fig. 3. Massa do sistema radicular fresco (MSRF) das plantas de pepino do experimento 2, sob diferentes doses de Pc-10 (g.L⁻¹) aplicado nas mudas, 45 dias após o transplântio. Cada ponto representa a média de sete repetições. C.V.: Coeficiente de variação (%), F.A.: Falta de ajustamento; * Significativo pelo Teste t a 5% de probabilidade.

Monfort et al. (2005) constataram que *P. chlamydosporia* (isolado 4624) pode ter um efeito de promotor de crescimento em plantas de trigo, pois, em seus experimentos, o aumento da massa fresca das plântulas não pareceu ser resultado da redução da severidade da doença causada pelo patógeno de solo *Gauemannomyces graminis* var. *tritici*. Dallemole-Giaretta et al. (2008) constataram que os isolados Pc-3, Pc-10 (o mesmo desse trabalho) e Pc-19 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* colonizaram eficientemente a rizosfera e promoveram o crescimento de plântulas de tomate. Marciá-Vicente et al. (2009) relataram que os isolados Pc123 e Pc21 de *P. chlamydosporia* promoveram o crescimento em cevada, aumentando as massas da parte aérea e das raízes de plantas de cevada. O efeito de *P. chlamydosporia* var.

chlamydosporia (Pc-10) na promoção de crescimento de plantas de pepino precisa ser mais bem investigado.

3.4. Controle de *M. javanica* nas plantas de pepino

Os dois fatores, aplicação de Pc-10 no solo e nas mudas, isoladamente, foram significativos ($p < 0,05$) para as variáveis número de galhas, de galhas.g⁻¹ de raízes, de ovos e de ovos.g⁻¹ de raízes, em ambos os experimentos.

A aplicação de Pc-10 no solo aumentou significativamente o número de galhas e de galhas.g⁻¹ de raízes e reduziu o número de ovos e de ovos.g⁻¹ de raízes nas plantas de pepino, independentemente das doses de Pc-10 aplicadas nas mudas, somente no experimento 1 (Tabela 3). No experimento 2, essas variáveis não foram afetadas pela aplicação do Pc-10 no solo. Segundo Bourne e Kerry (1999), o aumento da dose do fungo aumenta sua densidade no solo para todas as espécies de plantas. Entretanto, de acordo com os mesmos autores, provavelmente, a multiplicação de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* pode ser limitada, pois o fungo pode ser dependente de sua densidade e competir por nutrientes limitantes, principalmente em temperaturas mais baixas, como foi observado, no experimento 1, mais favoráveis ao desenvolvimento do fungo. Essa possibilidade é reforçada pelo número de UFC.g⁻¹ de solo observado nos tratamentos sem e com Pc-10 no solo (dados não apresentados) do experimento 1. Nos tratamentos sem Pc-10 no solo, o número de UFC.g⁻¹ de solo foi, em média (desconsiderando a testemunha, sem Pc-10 na muda), de 35.833 UFC.g⁻¹ de solo. Nos tratamentos com Pc-10 no solo (5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo) foi, em média, de 51.333 UFC.g⁻¹ de solo. Outra possibilidade, foi o aumento da massa do sistema radicular das plantas que, provavelmente, aumentaram os pontos de penetração dos J₂ e

conseqüentemente, o número de galhas e de galhas.g⁻¹ de raízes (Tabela 2). Entretanto, o aumento do número de galhas e de galhas.g⁻¹ de raízes não afetou o desenvolvimento das plantas e ainda reduziu o número de ovos e de ovos.g⁻¹ de raízes das plantas de pepino.

Tabela 3. Efeito da aplicação de Pc-10 no solo sobre o número de galhas, de galhas.g⁻¹ de raízes, de ovos e de ovos.g⁻¹ de raízes, 45 dias após o transplântio das mudas, nos experimentos 1 e 2.

Exp.	Número de galhas		Nº de galhas.g ⁻¹ de raízes **		Número de ovos ***		Nº de ovos.g ⁻¹ de raízes **	
	Quantidade de clamidósporos por g de solo nos vasos							
	0	5000	0	5000	0	5000	0	5000
1	405	461*	23,68	25,63*	300.457	253.742*	17.595	14.178*
2	612	651 ns	43,90	43,63 ns	136.543	125.803 ns	9.933	8.056 ns

ns: não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade *: significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

** Valores transformados para Log₁₀(x) *** Valores transformados para √ x . Média de sete repetições

Comparando-se os experimentos 1 e 2, observa-se que o maior número de galhas e de galhas.g⁻¹ de raízes ocorreu no experimento 2 (Tabela 3). Provavelmente, tal fato ocorreu devido às temperaturas mais altas e favoráveis à eclosão e penetração dos J₂ nas raízes das plantas de pepino durante esse período. Conseqüentemente, as raízes das plantas de pepino foram afetadas com maior intensidade e apresentaram menor desenvolvimento do sistema radicular, o que pode ser comprovado pela menor massa do sistema radicular (MSRF) das plantas de pepino no experimento 2 (Tabela 2). Entretanto, essas temperaturas foram mais prejudiciais ao desenvolvimento dos J₂ nas raízes das plantas, reduzindo a reprodução das fêmeas e, conseqüentemente, o número de ovos e ovos.g⁻¹ de raízes presentes nas massas de ovos. Segundo Campos et al.

(2008), a eclosão de J₂ de *M. javanica* é maior na temperatura de 28°C, devido a sua maior movimentação, decrescendo com a redução de temperatura. A redução do tempo de exposição à 28°C reduz a eclosão, como ocorre durante as noites, quando as temperaturas diminuem.

Independentemente da aplicação de Pc-10 no solo, o aumento das doses de Pc-10 nas mudas reduziu o número de galhas, de galhas.g⁻¹ de raízes, de ovos e de ovos.g⁻¹ de raízes das plantas de pepino (Figs. 4A-H). Na análise de regressão dessas variáveis, o modelo ajustado foi o linear de 1º grau, com exceção do número de ovos no experimento 1, cujo modelo ajustado foi o linear de 2º grau (Fig. 4E). Observou-se que a utilização de doses crescentes de Pc-10 nas mudas aumentou o controle de *M. javanica* nas raízes das plantas de pepino. O menor número de galhas, de galhas.g⁻¹ de raízes, de ovos e de ovos.g⁻¹ de raízes foram obtidos nos tratamentos com a dose de 18g.L⁻¹ de Pc-10 nas mudas, com exceção do número de ovos.g⁻¹ de raízes no experimento 2 (Fig. 4H), que foi menor com a dose de 13,5 g.L⁻¹ de Pc-10. A dose de 18 g.L⁻¹ de Pc-10 nas mudas reduziu o número de galhas no primeiro e no segundo experimento, respectivamente, em 34,94% e 37,17%; de galhas.g⁻¹ de raízes em 46,04% e 49,44%; de ovos em 36,93%, 30,83%; e de ovos.g⁻¹ de raízes em 48,32% e 40,58%, em relação à testemunha.

As relações tritróficas entre planta hospedeira, o nematoide e *P. chlamydosporia* no solo são complexas e dependem da espécie de planta, da densidade do nematoide e da abundância do fungo no solo. A maior influência da planta hospedeira na eficácia do fungo é, provavelmente, sua suscetibilidade ao ataque dos nematoides, que influenciará o número de nematoides que se desenvolverão e o tamanho das galhas produzidas e que, por sua vez, afetará o número de massa de ovos que permanecerá dentro das raízes, protegidas contra a infecção do fungo (Bourne e Kerry, 1999).

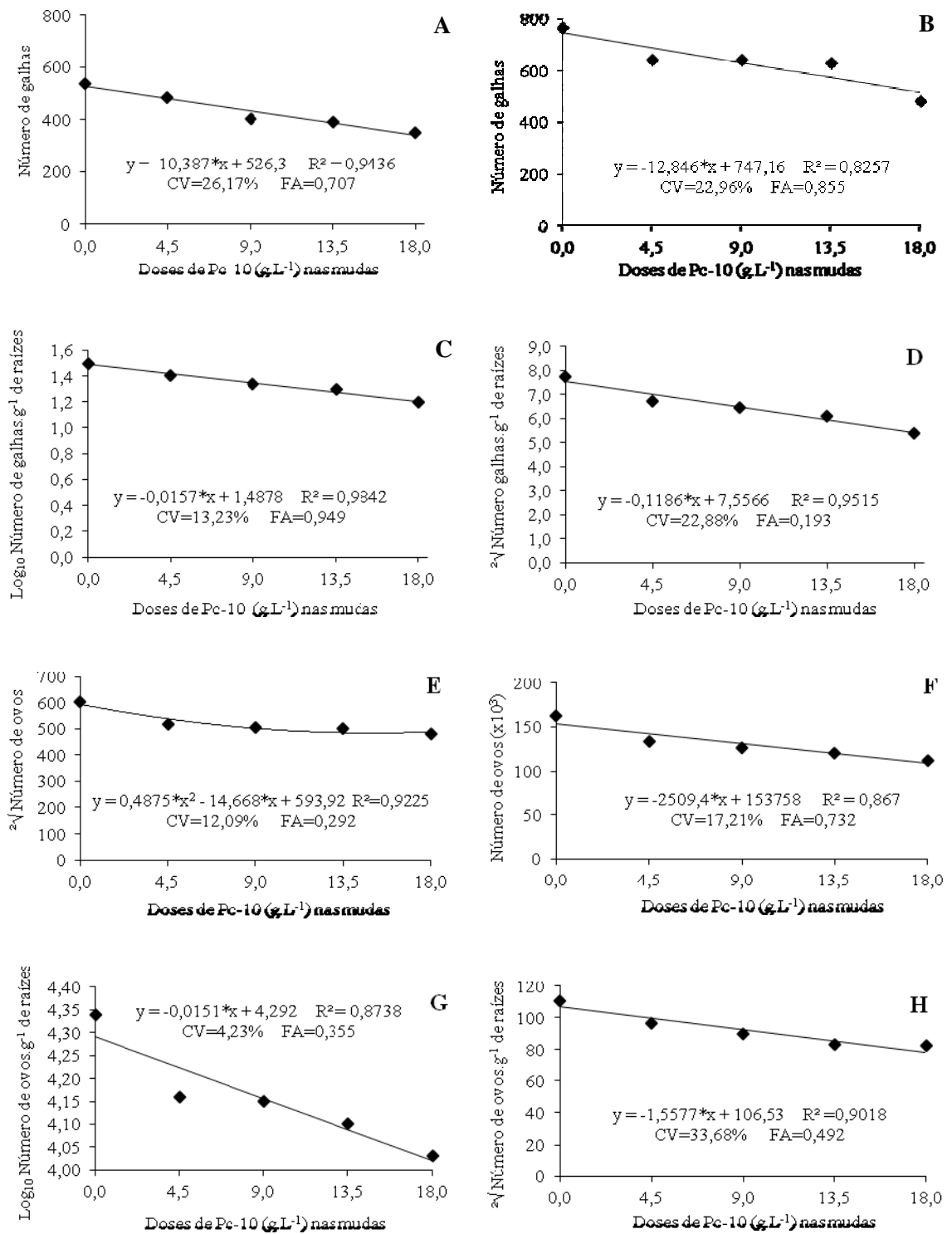


Fig. 4. Número de galhas, de galhas.g⁻¹ raízes, de ovos e de ovos.g⁻¹ raízes das plantas de pepino com diferentes doses de Pc-10 (g.L⁻¹) aplicadas nas mudas, no experimento 1 (4A, C, E e G) e 2 (4B, D, F e H), 45 dias após o transplântio. Cada ponto representa a

média de sete repetições. CV: Coeficiente de variação (%); FA: Falta de ajustamento. * Significativo pelo Teste t a 5% de probabilidade.

As espécies de plantas hospedeiras diferem em sua habilidade de suportar o crescimento do fungo em sua rizosfera, assim como o aumento na taxa de aplicação do fungo no solo não necessariamente aumenta a colonização da rizosfera (Kerry, 2000). Algumas espécies de plantas, a exemplo do repolho, couve, crotalária, milho e tomateiro permitem extensa colonização de sua rizosfera e são consideradas boas hospedeiras para o fungo, enquanto outras, a exemplo do quiabo, sorgo, feijão e berinjela não permitem um crescimento rizosférico satisfatório (Kerry e Bourne, 1996; Bourne e Kerry, 1999). Aumentos na taxa de aplicação do fungo no solo superiores a 10 vezes a dose padrão (5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo) aumentaram progressivamente a colonização na rizosfera e o controle do nematoide das galhas em couve, considerado mau hospedeiro para o nematoide. Entretanto, em quiabo, sorgo e feijão, esses efeitos foram observados apenas a altas taxas de aplicação do fungo. Em berinjela, não houve aumento na colonização da rizosfera, mas houve melhora no controle do nematoide e a população final de nematoides foi menor de acordo com as altas taxas de aplicação do fungo (Bourne e Kerry, 1999). Segundo Charchar e Aragão (2005), não existem cultivares de pepino resistentes a *M. incognita* e *M. javanica*. Apesar de não ter sido avaliado o tamanho das galhas nestes experimentos, observou-se que as raízes das plantas de pepino Caipira apresentaram muitas galhas grandes. Portanto, as plantas de pepino Caipira foram muito suscetíveis ao *M. javanica* e, aparentemente, o pepino se comportou como bom hospedeiro para o nematoide e mau hospedeiro para o fungo. Essas considerações sugerem que o efeito do aumento do controle de *M. javanica* em plantas de pepino Caipira somente será alcançado com aplicações que resultem em altas

concentrações do fungo no solo, como o que foi proporcionado nos tratamentos com a aplicação de Pc-10 no solo e com altas concentrações de Pc-10 nas mudas de pepino.

Lopes et al. (2007) observaram que nenhum dos quatro isolados de *P. chlamydosporia* testados por eles reduziu o número de galhas de *M. javanica*. Dallemole-Giaretta et al. (2008), em apenas um ciclo do nematoide, observaram que quantidades crescentes de clamidósporos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10) no solo também não afetaram o número de galhas de *M. javanica*. Podestá et al. (2009) observaram que as aplicações de 5.000 e 10.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo de *P. chlamydosporia* (isolado Pc-10) reduziram significativamente o número de galhas de *M. javanica*, em comparação com o tratamento testemunha, sem o fungo. Nesses três experimentos, o fungo foi aplicado apenas sete dias antes do transplântio das mudas de tomateiro. Em outros trabalhos, como os realizados por Dallemole-Giaretta et al. (2008); por Coutinho et al. (2009); e por Dallemole-Giaretta et al. (2010a e b), quando o fungo foi aplicado 15 dias antes do transplântio das mudas de tomateiro, *P. chlamydosporia* foi efetivo na redução do número de galhas. Segundo Dallemole-Giaretta et al. (2008), maior período de contato entre o fungo e os ovos do nematoide no solo proporciona melhor atuação de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no controle de *M. javanica* em tomateiro, pois mais eficiente é o parasitismo dos ovos, podendo impedir a formação e a eclosão dos J₂, reduzindo, dessa forma, a infecção inicial das raízes e, conseqüentemente, o número de galhas e de ovos nas raízes. Nos presentes experimentos, o isolado Pc-10 foi aplicado na dose de 5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo, sete dias antes do transplântio das mudas, sendo que esse período de tempo foi suficiente para reduzir o número de galhas e de galhas.g⁻¹ de raízes das plantas de pepino, somente no experimento 1 (Tabela 3). Provavelmente, as temperaturas mais baixas permitiram maior crescimento do fungo no solo e, conseqüentemente, um maior

parasitismo de ovos e menor número de J₂ eclodidos que penetraram as raízes, desenvolveram-se e formaram galhas.

3.5. Número de UFC.g⁻¹ de solo das plantas de pepino

Na avaliação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* por grama de solo dos vasos cultivados com plantas de pepino com diferentes tratamentos, verificou-se que não houve a contaminação das testemunhas dos experimentos. Na análise de regressão do número de UFC.g⁻¹ de solo, os dados não se ajustaram a nenhum modelo de regressão (dados não apresentados). Entretanto, nos tratamentos onde ocorreu a aplicação combinada de Pc-10 no solo e no substrato das mudas, o solo apresentou, em média de 40.000 ± 5.323 e 38.500 ± 8.466 UFC.g⁻¹ de solo nos experimentos 1 e 2, respectivamente.

As altas taxas de aplicação de Pc-10 nas mudas resultaram, aproximadamente, em $6,5 \times 10^4$ a $16,8 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ de substrato, no experimento 1; e de $3,0 \times 10^4$ a $6,16 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ de substrato, no experimento 2 (Fig. 2). Considerando-se a aplicação de Pc-10 no solo (5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo) e nas mudas, e a quantidade relativamente pequena de UFC.g⁻¹ de solo nos vasos dos diferentes tratamentos, observou-se que a coleta das amostras de solo dos vasos não foi apropriada ou representativa dos tratamentos. Além disso, a multiplicação de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* pode ter sido limitada no solo tratado com altas concentrações de Pc-10, pois o fungo pode ser dependente de sua densidade e competir por nutrientes limitantes (Bourne e Kerry, 1999).

Estratégia de manejo que resulte no uso combinado do agente de biocontrole com outros métodos de controle cultural deve ser realizada para maximizar o efeito do controle biológico. Uma limitação de *P. chlamydosporia* é a sua baixa eficiência de

controle quando ocorre alta população de J_2 no solo em culturas suscetíveis, pois o fungo não previne a invasão inicial das raízes pelos J_2 , e os danos que eles causam ao crescimento da planta. Conseqüentemente, se o solo estiver fortemente infestado com J_2 do nematoide das galhas, outros métodos de controle compatíveis devem ser utilizados para aumentar a eficácia do fungo (Kerry e Bourne, 2002). Uma alternativa para aumentar a eficiência do controle de *M. javanica* em pepino pode ser a integração do uso combinado de Pc-10 no solo e nas mudas com a técnica do revolvimento do solo (Dutra e Campos, 1998) ou alqueive úmido (Dutra e Campos, 2003a, 2003b), pois essas técnicas reduzem consideravelmente a população de J_2 de *Meloidogyne* spp. no solo em curtos períodos de tempo (3 a 15 dias) e são fáceis de serem implementadas pelos agricultores. Entretanto, o efeito combinado de Pc-10 com outras práticas de controle cultural, como as anteriormente sugeridas, precisa ser mais bem investigado.

4. Conclusões

Conclui-se que a aplicação do produto formulado com *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10) aumenta o controle de *M. javanica* em plantas de pepino. A utilização de Pc-10 reduz efetivamente o número de galhas, de galhas.g⁻¹ de raízes, de ovos e de ovos.g⁻¹ de raízes de plantas de pepino, sendo os melhores resultados obtidos em tratamentos onde ocorre a aplicação de 18,0 g.L⁻¹ de Pc-10 nas mudas de pepino. A aplicação de altas concentrações de Pc-10 nas mudas não prejudica o desenvolvimento das mudas de pepino.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem a Paulo Afonso Ferreira pela colaboração nas análises estatísticas e revisão do artigo; e à Fernanda, Érica, Deisy, Guilherme e Leonardo, pela colaboração nas atividades de laboratório desenvolvidas durante a condução dos experimentos. À Rizoflora Biotecnologia, pela cessão do produto Pc-10 para a realização dos experimentos. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de doutorado ao primeiro autor.

6. Referências

- Bettiol, W., 1999. Effectiveness of cow's milk against zucchini squash powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) in greenhouse conditions. *Crop Prot.* 18, 489-492.
- Bettiol, W., 2004. Leite de Vaca Cru para o Controle de Oídio. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna.
- Bonetti, J.I.S., Ferraz, S., 1981. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. *Fitopatol. Bras.* 6 (Supl.), 553.
- 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 Biol. Biochem.* 31, 75-84.
- Campos, H.D., Campos, V.P., 1997. Efeito da época e forma de aplicação dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* no controle de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. *Fitopatol. Bras.* 22, 361-365.

- Campos, V.P., Dutra, M.R., Campos, J.R., Silva, L.H.C.P., Dutra, M.R., 2001. Manejo de nematóides em hortaliças, in: Silva, L.H.C.P., Campos, J.R., Nojosa, G.B.A. (Eds.), Manejo Integrado: Doenças e Pragas em Hortaliças. UFLA, Lavras, pp. 125-158.
- Campos, H.D., Campos, V.P., Pozza, E.A., 2008. Efeito da temperatura na multiplicação celular, no desenvolvimento embrionário e na eclosão de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. Summ. Phytopathol. 34, 29-33.
- Charchar, J.M., Aragão, F.A.S., 2005. Reprodução de *Meloidogyne* spp. em cultivares de tomate e pepino sob estufa plástica e campo. Nematol. Bras. 29, 243-249.
- Coutinho, M.M., Freitas, L.G., Dallemole-Giaretta, R., Neves, W.S., Lopes, E.A., Ferraz, S., 2009. Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pochonia chlamydosporia* e farinha de sementes de mamão. Nematol. Bras. 33, 169-175.
- Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L.G., Ferraz, S., Neves, W.S., Lopes, E.A., Coutinho, M.M., 2008. Efeito da concentração de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica*. Nematol. Bras. 32, 327-332.
- Dallemole-Giaretta, R.; Freitas, L.G.; Zooca, R.J.F.; Caixeta, L.B.; Lopes, E.A., 2010a. Controle de *Meloidogyne javanica* por meio da aplicação de palha de café colonizada por *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. Nematol. Bras. 34, 137-140.
- Dallemole-Giaretta, R.; Freitas, L.G.; Coutinho, M.M.; Neves, W.S.; Zooca, R.J.F.; Ferraz, S., 2010b. Efeito da farinha de sementes de abóbora e de *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica*. Nematol. Bras. 34, 91-97.

- Dutra, M.R., Campos, V.P., 1998. Efeito do preparo do solo na população dos nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.). Nematol. Brasileira 22, 19.
- Dutra, M.R., Campos, V.P., 2003a. Efeito do manejo do solo e da água na população de *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) em quiabeiro em campo. Summ. Phytopathol. 29, 249-254.
- Dutra, M.R., Campos, V.P., 2003b. Manejo do solo e da irrigação como nova tática de controle de *Meloidogyne incognita* em feijoeiro. Fitopatol. Bras. 28, 608-614.
- Filgueira, F.A.R., 2003. Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia Moderna na Produção e Comercialização de Hortaliças, 2 ed. Editora UFV, Viçosa.
- Gaspard, J.T., Jaffee, B.A., Ferris, H., 1990. Association of *Verticillium chlamydosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with root-knot nematode infested soil. J. Nematol. 22, 207-213.
- Kerry, B.R., 1991. Methods for studying the growth and survival of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard, in soil. Bull. SROP 14, 34-38.
- Kerry, B.R., 1997. Biological control of nematodes: prospects and opportunities, in: Maqbool, M.A., Kerry, B. (Eds.), Plant Nematode Problems and Their Control in the Near East Region (FAO Plant Production and Protection Paper - 144). FAO, Rome. pp.79-92.
- Kerry, B.R., 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. Annu. Rev. Phytopathol. 38, 423-441.

- Kerry, B.R., 2001. Exploitation of nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.), in: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. CAB International, Wallingford, pp. 155-167.
- Kerry, B.R., Bourne, J.M., 1996. The importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant parasite nematodes - a case study using *Verticillium chlamydosporium*. *Pestic. Sci.* 47, 69-75.
- Kerry, B.R., Bourne, J.M., 2002. *A Manual for Research on Verticillium chlamydosporium, a Potential Biological Control Agent for Root-Knot Nematodes*. IOBC-WPRS, Gent.
- Lopes, E.A., Ferraz, S., Ferreira, P.A., Freitas, L.G., Dhingra, O.D., Gardiano, C.G., Carvalho, S.L., 2007. Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. *Nematol. Bras.* 31, 78-84.
- Lower, R.L., Edwards, M.D., 1986. Cucumber breeding, in: Basset, M.J. (Ed.), *Breeding Vegetable Crops*. Avi Publishing, Westport, pp. 173-207.
- Marcía-Vicente, J.G., Rosso, L.C., Ciancio, A., Jansson, H.B., Lopez-Llorca, L.V., 2009. Colonization of roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*: effects on plant growth and disease. *Ann. Appl. Biol.* 155, 391-401.
- Monfort, E., Lopez-Llorca, L.V., Jansson, H.B., Salinas, J., Park, J.O., Sivasithamparam, K., 2005. Colonization 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 Biol. Biochem.* 37, 1229-1235.

Minitab, Inc., 2003. Minitab (Statistical Software), version 14.1. www.minitab.com.

Podestá, G.S., Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L.G., Lopes, E.A., Ferraz, S., Zooca, R.J.F., 2009. Atividade nematófaga de *Pochonia chlamydosporia* em solo natural ou autoclavado sobre *Meloidogyne javanica*. *Nematol. Bras.* 33, 191-193.

Robinson, R.W., Decker-Walters, D.S., 1999. Cucurbits. CAB International, Cambridge.

Seabra Junior, S., Gadun, J., Cardoso, A.I.I., 2004. Produção de pepino em função da idade das mudas produzidas com diferentes volumes de substratos. *Hortic. Bras.* 22, 610-613.

Sikora, R.A., Fernández, E., 2005. Nematode parasites of vegetables, in: Luc, M., Sikora, R.A., Bridge, J. (Eds.), *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CAB International, Wallingford, pp. 319-392.

Sonnenberg, P.E., 1985. *Olericultura Especial: 2ª Parte*. UFG, Goiânia.

Souza, J.L., Resende, P., 2003. *Manual de Horticultura Orgânica. Aprenda Fácil*, Viçosa.

Statsoft, Inc., 2004. *Statistica (Data Analysis Software System)*, version 7.0. www.statsoft.com.

ARTIGO 4

CONTROLE DE *Meloidogyne* spp. EM CULTIVO COMERCIAL DE PEPINO COM DIFERENTES DOSES DE *Pochonia chlamydosporia*.⁴

⁴Artigo elaborado de acordo com as normas da revista “Tropical Plant Pathology”.

Controle de *Meloidogyne* spp. em cultivo comercial de pepino com diferentes doses de *Pochonia chlamydosporia*.

José R. Viggiano¹, Leandro G. de Freitas¹, Paulo A. Ferreira¹, Ronaldo J.F. Zooca¹, Marilene A. da Costa¹ & Marcos A.R. Teixeira²

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36.570-000, Viçosa, MG, Brasil; ²Rizoflora Biotecnologia S.A., Parque Tecnológico de Viçosa, Novo Silvestre, CEP 36.570-000, Viçosa, MG, Brasil.

Autor para correspondência: José R. Viggiano, e-mail: jrvggiano@bol.com.br

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito de um produto formulado com *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10) no controle do nematoide das galhas em uma lavoura de pepino. O experimento foi instalado em uma área de produção de hortaliças, com solo naturalmente infestado com fitonematoides, localizado na Fazenda Paraíso, Município de Tocantins, Minas Gerais, Brasil. Mudanças de pepino foram transplantadas para covas de plantio, que receberam os seguintes tratamentos: testemunha (sem húmus de minhoca); testemunha (com húmus de minhoca); húmus de minhoca mais o produto nas doses 25, 50, 75 e 100 g por cova. Os resultados indicaram que o menor índice de galhas (IG) nas raízes das plantas de pepino foi obtido com a dose de 75 g do produto

por cova, com redução de 57% quando comparado à testemunha. A dose de 100 g do produto por cova aumentou o número de frutos e a produção de pepino por planta (kg/planta) da ordem de 31,5% e 36,5% em relação à testemunha, respectivamente. Conclui-se que a utilização do produto à base do isolado Pc-10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* contribuiu para o aumento do controle do nematoide das galhas e da produção comercial de pepino.

Palavras-chave: controle biológico, fungos nematófagos, nematoide das galhas, *Cucumis sativus*.

ABSTRACT

Control of *Meloidogyne* spp. in commercial cultivation of cucumber with different doses of *Pochonia chlamydosporia*.

The objective of this study was to evaluate the effect of a product formulated with *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolate Pc-10) in the control of knot-root nematodes in a field of cucumbers. The experiment was installed in an area of vegetable production, with naturally infested soil by plant parasitic nematodes, located in Farm Paraíso, in the city of Tocantins, Minas Gerais, Brazil. Cucumber seedlings were transplanted into the planting hole, which received the following treatments: control (without earthworm castings); control (with earthworm castings); earthworm castings plus the product in the doses of 25, 50, 75 and 100 g per hole. The results indicated that the minor gall index (GI) in roots of cucumber plants was obtained with a dose of 75 grams of product per hole, with 57% reduction when compared to control. The dose of 100 grams of product per hole increased the number of fruit and the production of cucumber plant (kg/plant) of about 31.5% and 36.5% compared to the

control, respectively. It is concluded that use of the product based on isolated Pc-10 of *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* contributed to the increased control of knot-root nematodes and the commercial production of cucumber.

Keywords: biological control; nematophagous fungi; root-knot nematodes; *Cucumis sativus*.

INTRODUÇÃO

O nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) está amplamente distribuído nos solos cultivados com hortaliças no Brasil, destacando-se *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *M. javanica* (Treub) Chitwood, *M. enterolobi* Yang & Eisenback (= *M. mayaguensis*), *M. arenaria* (Neal) Chitwood e *M. hapla* Chitwood. A ocorrência dessas espécies, isoladamente ou em associação, inclusive com outros gêneros de fitonematoides, pode provocar perdas severas na produção das hortaliças e dificultar o manejo da área de cultivo (Campos et al., 2001; Sikora & Fernández, 2005).

O pepino (*Cucumis sativus* L.) é uma cucurbitácea cujo fruto geralmente é consumido cru, em saladas ou em conservas, na forma de pickles. No Brasil, os frutos mais comumente encontrados no mercado são do tipo comum, caipira, japonês e conserva (Filgueira, 2003; Souza & Resende, 2003). Dados da CEASAMINAS, durante o ano de 2010, indicaram a comercialização de 16,64 mil toneladas de pepino, correspondente ao valor de R\$12.349.288,62 e preço médio de R\$0,74.kg⁻¹. Entre os 144 municípios produtores de pepino no Estado de Minas Gerais, o cultivo dessa hortaliça destacou-se em Mateus Leme, Baldim, Araguari, Inhapim e Tocantins, que, em conjunto, totalizaram 47,66% do pepino comercializado (CEASAMINAS, 2011).

No cultivo do pepino, o nematoide das galhas, principalmente, *M. incognita* e *M. javanica* tem afetado a produção. Essas espécies são as mais comuns em áreas cultivadas sequencialmente com tomate tutorado (*Solanum lycopersicum* L.) e pepino. No Distrito Federal, o plantio sucessivo de cultivares suscetíveis favoreceu a rápida multiplicação desses fitonematoides, ocasionando perdas na produção que variaram de 14 a 44%, no tomateiro, e de 80 a 100%, no pepino, quando cultivados no campo e em estufa, respectivamente (Charchar & Aragão, 2005). O cultivo de pepino após o tomateiro tutorado é uma prática utilizada pelos produtores de hortaliças da Região da Zona da Mata Mineira para aproveitamento do tutoramento e dos resíduos remanescentes da adubação do tomateiro. No entanto, nas áreas infestadas com o nematoide das galhas tem sido constatadas perdas na produção de hortaliças.

Entre as medidas de controle do nematoide das galhas na cultura do pepino, destaca-se a rotação de culturas com espécies vegetais não-hospedeiras (Charchar & Aragão, 2005; Wilcken et al., 2010). A rotação de culturas é uma prática que, bem utilizada, proporciona excelentes resultados, porém, em solos infestados com diferentes espécies do nematoides das galhas, sua implementação é limitada e, conseqüentemente, o sucesso dessa medida também, pois esse gênero de fitonematoide é polífago (Sikora et al., 2005).

Uma técnica alternativa pesquisada para o cultivo protegido em áreas infestadas com o nematoide das galhas é a utilização de mudas enxertadas. Entretanto, a taxa de multiplicação do nematoide das galhas em porta-enxertos recomendados para o pepino ainda são desconhecidas, limitando sua recomendação (Wilcken et al., 2010).

O plantio de cultivares resistentes para o controle de fitonematoides traz enormes vantagens por ser um método eficiente, prático e econômico, mas, no caso do

pepino, não existem cultivares comerciais resistentes a *M. incognita* e *M. javanica* (Wilcken et al., 2010). Também não existem nematicidas químicos registrados para o uso nessa cultura no Brasil (MAPA, 2011) e, portanto, o uso de nematicidas no cultivo do pepino é proibido.

Outras medidas de manejo integrado de fitonematoides podem ser utilizadas, por exemplo, a escolha do local de plantio, a limpeza de máquinas e implementos agrícolas, o uso de mudas saudáveis, o revolvimento do solo, a solarização do solo, a adição de matéria orgânica, a destruição dos restos culturais, o controle de plantas invasoras, o cultivo de plantas antagonistas e a rotação de culturas com plantas não-hospedeiras (Lordello, 1984; Campos et al., 2001, 2007; Sikora et al., 2005; Ferraz et al. 2010).

A preocupação com a preservação ambiental tem levado à busca por métodos de controle de doenças alternativos e eficientes, mediante a utilização de produtos não poluentes, de custo acessível e de fácil aplicação nas lavouras (Salgado & Borges, 2008). Entre esses métodos, a utilização de agentes de controle biológico apresenta grande potencial como estratégia no manejo integrado dos fitonematoides (Stirling, 1991; Freitas & Ferraz, 2005; Dong & Zhang, 2006).

O fungo *Pochonia chlamydosporia* Zare & Gans (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard) é um agente de controle biológico, parasita de ovos e fêmeas de espécies de fitonematoides endoparasitas sedentários, que tem se destacado no controle do nematoide das galhas (Kerry & Bourne, 2002; Chen & Dickinson, 2004). Já foi encontrado em solos supressivos ao nematoide dos cistos dos cereais (*Heterodera avenae* Wollenweber) em áreas de monocultivo com cereais na Inglaterra (Kerry & Crump, 1998). Apresenta boa capacidade saprofítica que permite seu crescimento em matéria orgânica entre as estações de cultivo. Produzem clamidósporos, estruturas de

sobrevivência resistentes que favorecem sua manipulação e produção *in vitro*. Os clamidósporos são um tipo de inóculo mais efetivo para o estabelecimento do fungo no solo e na rizosfera e sua taxa de aplicação no solo é de aproximadamente 5.000 clamidósporos por grama de solo (Kerry, 2001; Kerry & Bourne, 2002).

A eficácia de *P. chlamydosporia* em sistemas produtivos comerciais ainda carece de avaliações. Muitas pesquisas em condições controladas de casa de vegetação foram realizadas (Lopes et al., 2007; Dallemole-Giaretta, et al. 2008; Podestá et al., 2009), sendo necessário atualmente avaliar mais intensamente o fungo em testes de campo (Kerry, 2001). Existem produtos que estão sendo testados em sistemas produtivos comerciais, a exemplo do ‘KlamiC’, em desenvolvimento pelo instituto CENSA, em Cuba; do ‘MicoTec’, pela empresa ClamiTec, em Portugal; e do Rizotec pela empresa Rizoflora Biotecnologia S.A., em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes doses de um bionematicida à base do isolado Pc-10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, no controle do nematoide das galhas em área de cultivo comercial de pepino naturalmente infestada por fitonematoides.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado em área de produção comercial de hortaliças, previamente cultivada com tomate e com solo naturalmente infestado com o nematoide das galhas (*M. incognita* e *M. javanica*), durante o período seco do ano (julho a outubro/2009), na Fazenda Paraíso, no Município de Tocantins, Minas Gerais, Brasil. As coordenadas geográficas do local de realização do experimento foram: latitude 20°44’49.03” S, longitude 42°51’3.81” W; altitude média 294 m.

Na área experimental foram coletadas amostras de solo para contagem de fitonematoides e análise físico-química do solo. O solo da área apresentou as seguintes características físico-químicas: classe textural argila (37% de areia, 13% de silte e 50% de argila) e pH (H₂O)=5,2.

Após a colheita do tomate tutorado, os restos culturais do tomateiro foram arrancados manualmente, o controle das plantas invasoras realizado e, em seguida, foi feito o coveamento para o plantio das mudas de pepino entre as covas dos tomateiros, no espaçamento de 1,0 x 0,5 m. As covas apresentaram volume médio de 4,5 L. Na adubação das covas de plantio foi utilizado 200 g de húmus de minhoca, com exceção de uma testemunha, e mais diferentes doses de um produto formulado com arroz colonizado pelo isolado Pc-10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, em desenvolvimento pela empresa Rizoflora Biotecnologia, com uma concentração média de $4,0 \times 10^7$ clamidósporos.g⁻¹ de formulação. Os seguintes tratamentos foram utilizados: testemunha (sem húmus de minhoca); testemunha (com húmus de minhoca); húmus de minhoca mais o produto nas doses 25, 50, 75 e 100 g por cova. O húmus de minhoca e o produto foram incorporados à cova de plantio, 18 dias antes do transplante das mudas. Após a incorporação, a área foi irrigada até atingir a capacidade de campo, sendo irrigada novamente de acordo com a necessidade, com a finalidade de manter o solo úmido, próximo a 60% da capacidade de campo.

Cada parcela experimental foi constituída por cinco covas por linha dupla (dez covas por parcela). Mudas de pepino Caipira, produzidas em bandejas de isopor de 128 células com o substrato Plantmax HF, foram transplantadas 15 dias após o semeio para as covas de plantio, utilizando-se duas mudas por cova. Os tratamentos culturais e o controle fitossanitário na lavoura foram feitos, de acordo com a necessidade, pelo próprio agricultor.

Para estimativa da quantidade de juvenis do nematoide das galhas no solo, foram feitas amostragens em três pontos nas covas de plantio com o auxílio de uma pequena pá, na camada de 0-20 cm de profundidade, totalizando três amostras simples por parcela, que foram misturadas e delas obtidas uma amostra composta de 200 cm³ de solo de cada parcela. As amostragens foram feitas no dia de aplicação do produto e 60 dias após o transplante das mudas, ao final da última colheita. Os juvenis de segundo estágio (J₂) foram extraídos das amostras de solo pelo método de centrifugação em solução de sacarose (Jenkins, 1964). A relação entre juvenis no solo foi determinada pela contagem final (Cf) e inicial (Ci) do número de juvenis por parcela e foram determinadas em amostras compostas de 100 cm³ de solo. A área apresentou uma contagem inicial (Ci) do nematoide das galhas de 88 juvenis de segundo estágio (J₂) por 100 cm³ de solo.

Na avaliação final, os frutos comercializáveis foram colhidos manualmente de cada parcela, duas vezes por semana. A colheita iniciou-se 39 dias após o transplante das mudas, tendo sido realizadas sete colheitas, por um período de 21 dias. Foi determinado o número de frutos e a massa dos frutos de pepino por parcela em cada colheita. A produção cumulativa foi expressa em kg/planta. Ao final da última colheita, os sistemas radiculares dessas plantas foram coletados com o uso de enxadão, imersos em água para retirada do solo, secos em papel toalha por 10 min e avaliados quanto ao nível de infecção pelo nematoide das galhas por meio de avaliação visual do índice de galhas (IG), utilizando-se diagrama com escala de notas de Bridge & Page (1980) (Figura 1), por três avaliadores previamente treinados, conforme o esquema a seguir:

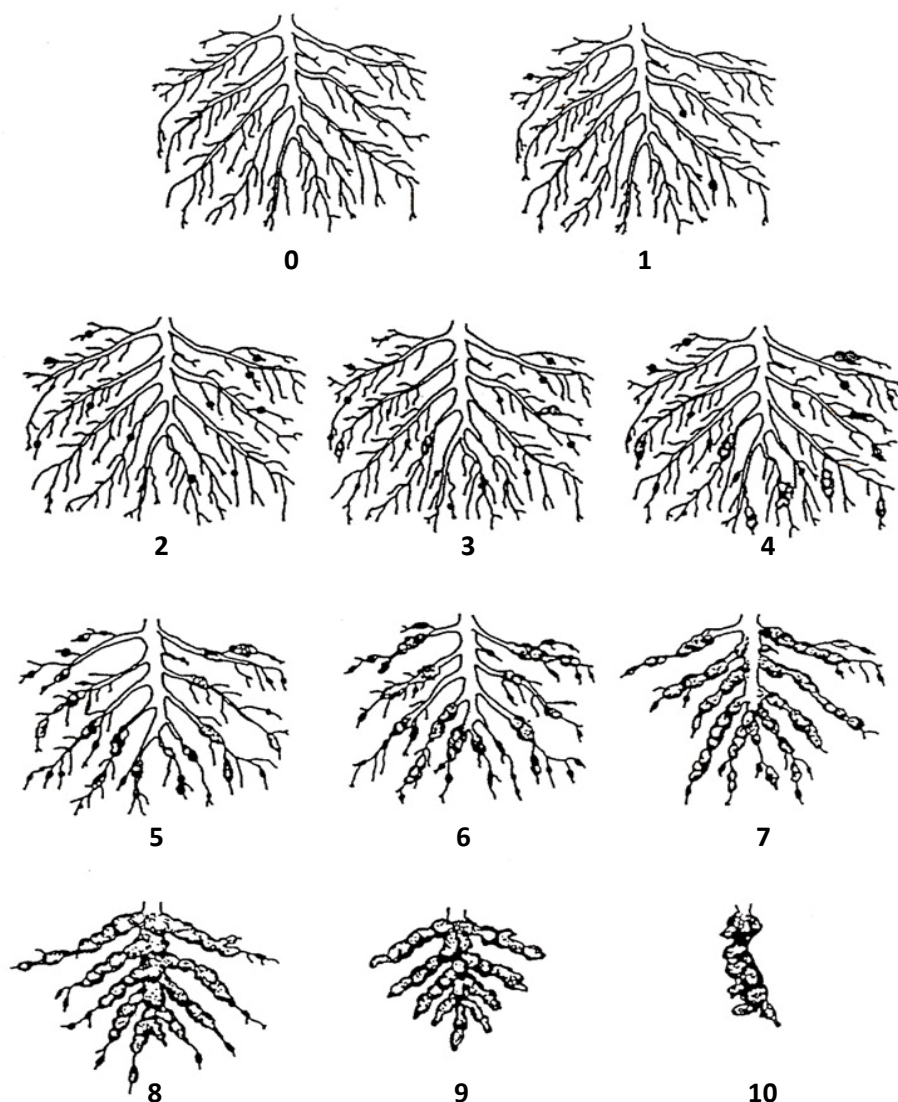


Figura 1 - Diagrama com escala de notas para avaliação de galhas em sistema radicular proposto por Bridge & Page (1980).

(0) Sem galhas; (1) Poucas galhas, pequenas, difíceis de contar; (2) Apenas galhas pequenas, mas bem visíveis. Raízes principais sem galhas; (3) Algumas galhas grandes. Raízes principais sem galhas; (4) Predominância de galhas grandes, mas raízes principais sem galhas; (5) 50% das raízes afetadas. Algumas raízes principais com galhas; (6) Raízes principais com galhas; (7) Maioria das raízes principais com galhas;

(8) Todas as raízes principais com galhas, incluindo as raízes axiais. Poucas raízes sem galhas; (9) Todas as raízes com muitas galhas. Planta quase morta; e (10) Todas as raízes com muitas galhas. Sem sistema radicular. Planta geralmente morta.

O delineamento experimental foi realizado em blocos casualizados com oito repetições por tratamento. Cada parcela experimental foi constituída pelas plantas de 10 covas e a parcela útil pelas plantas das seis covas centrais de cada parcela. Os dados obtidos, transformados ou não, foram analisados pelo Teste t a 5% de probabilidade, sendo as pressuposições de normalidade do erro e a homogeneidade de variância do erro analisadas, respectivamente, pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett a 5% de probabilidade. Os dados foram submetidos à análise estatística e os resultados apresentados em gráficos de regressão quando significativos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares estatísticos Minitab (Minitab, 2003) e Statistica (Statsoft, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Constatou-se que não houve diferenças entre a testemunha sem o húmus de minhoca e o tratamento com apenas húmus de minhoca, pelo Teste t a 5% de probabilidade, para todas as variáveis testadas (dados não apresentados). Entretanto, a aplicação combinada do húmus de minhoca com o produto formulado com *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Pc-10), provavelmente, contribuiu para o estabelecimento do fungo no solo. Dallemole-Giaretta et al. (2010a e b) observaram que a palha de café e a farinha de sementes de abóbora, em doses baixas, são materiais orgânicos que devem ser testados como veículos para a aplicação de *P. chlamydosporia* no solo e que podem contribuir para o estabelecimento do fungo no solo.

O número de galhas nas raízes das plantas de pepino foi reduzido pelos tratamentos realizados com o produto formulado com *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Pc-10) associado ao húmus de minhoca (Figura 2). Não ocorreram diferenças significativas no índice de galhas (IG) entre as diferentes doses de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Pc-10), porém, a dose de 75 g do produto por cova foi menor em relação à testemunha. O índice de galhas nessa dose foi 57% inferior à testemunha.

A dose de 100 g do produto por cova proporcionou um índice de galhas superior à dose de 75 g do produto por cova, ou seja, menor controle do nematoide das galhas nas plantas de pepino. Ainda não está esclarecido, mas segundo Bourne & Kerry (1999), o aumento relativamente pequeno no número de UFC.g⁻¹ de solo observado quando altas taxas de aplicação de *P. chlamydosporia* são utilizadas, sugere que a multiplicação do fungo pode ser dependente de sua densidade e competir por nutrientes limitantes no solo. No presente experimento, a dose de 100 g do produto por cova disponibilizou maior número de clamidósporos.g⁻¹ de solo. Entretanto, a população fúngica formada no solo, provavelmente, não aumentou em função do aumento da dose do produto aplicado, porque *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* teve sua multiplicação limitada pela deficiência de algum nutriente e/ou foi afetada por substâncias produzidas pelo próprio fungo na rizosfera das plantas. Dessa forma, sua eficiência foi reduzida, permitindo menor parasitismo de ovos no solo e, conseqüentemente, maior eclosão e penetração de J₂ nas raízes, e maior formação de galhas nas raízes das plantas de pepino.

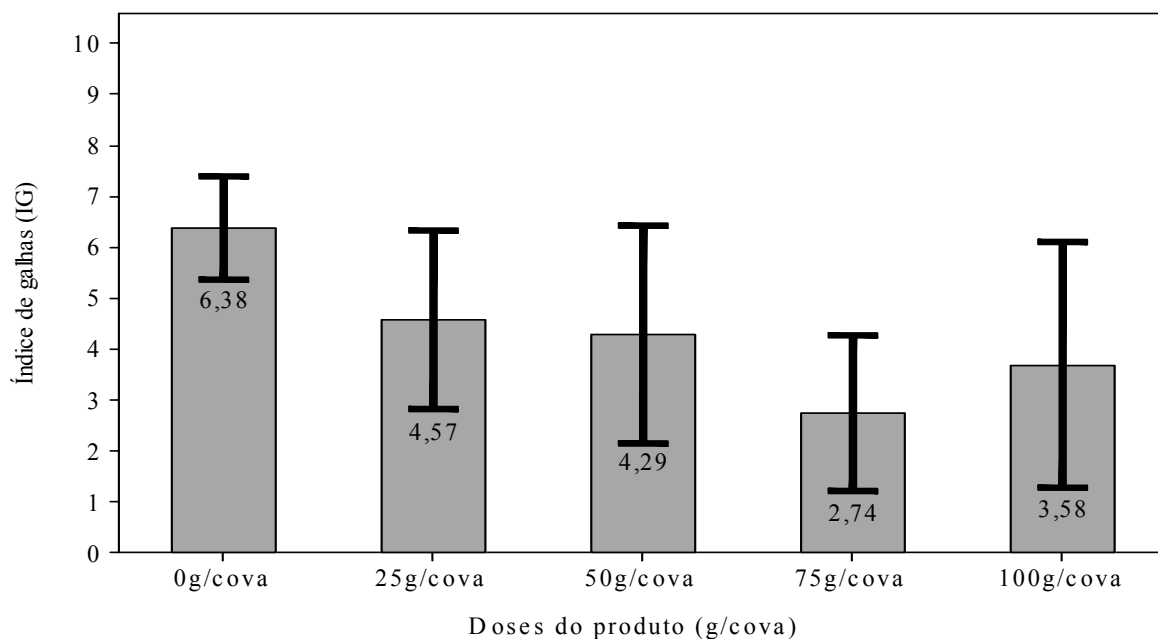


Figura 2 - Efeito de diferentes doses do produto à base de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Pc-10) associado ao húmus de minhoca no índice de galhas (IG) em raízes das plantas de pepino, 60 dias após o transplântio das mudas. A barra representa o intervalo de confiança a 5% de probabilidade.

O controle do nematoide das galhas com a utilização de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* em campo de cultivo comercial de pepino é respaldado por resultados obtidos em outros trabalhos de campo feitos por Atkins et al. (2003), no controle do nematoide das galhas em feijão, repolho e tomate; por Verdejo-Lucas et al. (2003), no controle do nematoide das galhas em tomate; e por Tobin et al. (2008), no controle do nematoide do cistos em batata. É também, o primeiro relato do controle de nematoide das galhas em pepino utilizando um agente de biocontrole à base de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*.

Atkins et al. (2003) demonstraram o controle de *M. incognita* em solo não tratado e tratado com *P. chlamydosporia* var. *catenulata* (Res 392) em sistema de

cultivo sucessivo de beterraba-feijão-repolho-tomate. Quando o fungo foi aplicado após cultivo de beterraba e antes do plantio de feijão, o fungo proporcionou um pequeno efeito adicional na redução da população do nematoide após o cultivo dos dois hospedeiros pobres para o nematoide (feijão e repolho) e evitou o aumento da população do nematoide no cultivo subsequente de tomate. No solo não tratado, a população de nematoides atingiu os níveis que tinham ocorrido após o cultivo da beterraba. A proporção de ovos e de massas de ovos dos nematoides colonizados pelo fungo foram superiores a 70% e, significativamente, maiores que o número de nematoides colonizados no solo não tratado. O efeito de *P. chlamydosporia*, sozinho e em combinação com oxamil foi testado por Verdejo-Lucas et al. (2003), em sistema de cultivo sucessivo de alface e tomate em casa de vegetação, com solo infestado com *M. javanica*, em duas épocas de cultivo e em dois locais na Espanha. Os resultados dos experimentos indicaram que a taxa reprodutiva do nematoide na alface foi igual ou inferior a 1, sendo similar entre os tratamentos nas duas épocas e locais de cultivo. Entretanto, no tomate, a taxa reprodutiva no tratamento do fungo mais oxamil foi menor que os outros tratamentos no primeiro cultivo em ambos os locais e, consistentemente, reduziu o índice de galhas nas raízes dos tomateiros em todos os casos. No entanto, o número de ovos por grama de raízes variou de acordo com o tratamento. Tobin et al. (2008) demonstraram o controle do nematoide do cisto da batata por *P. chlamydosporia* em experimentos de campo, realizados em lavouras comerciais de batata no Reino Unido. O fungo foi igualmente efetivo no controle do nematoide, quando comparado com o nematicida sistêmico fostiazato, não existindo diferenças na taxa de multiplicação do nematoide entre os tratamentos com *P. chlamydosporia*, fostiazato e o tratamento combinado do fungo com o nematicida. Nos tratamentos com o fungo, comparativamente à testemunha, o controle variou de 48% a 51%, sendo suficiente para

levar a uma significativa redução da taxa de multiplicação do nematoide do cisto da batata.

Na análise de regressão do número de frutos por planta e da produção da massa de frutos por planta de pepino (kg/planta), ajustou-se o modelo linear de 1º grau, para ambas as variáveis. No intervalo das doses testadas, observou-se que a utilização de doses crescentes do produto à base de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Pc-10) aumentou o número de frutos (Figura 3) e a produção de pepino por planta (Figura 4). O maior número de frutos e produção de pepino por planta foi obtido no tratamento com a dose de 100 g do produto por cova. Essa dose proporcionou a obtenção de 3,42 frutos por planta e 0,71 kg de pepino por planta representando um incremento de 31,5% no número de frutos e de 36,5% na produção de pepino por planta, em relação à testemunha. Segundo Bourne e Kerry (1999), o aumento da taxa de aplicação do fungo no solo aumenta a sua densidade no solo para todas as espécies de plantas e isso pode afetar o controle. No presente experimento, o aumento da taxa de aplicação (clamidósporos.g⁻¹ de solo), provavelmente, aumentou a colonização rizosférica e o parasitismo dos ovos do nematoide no solo, resultando em maior redução no número de J₂ eclodidos e que penetrariam nas raízes que, conseqüentemente, formariam galhas nas raízes das plantas de pepino.

A dose de 100 g por cova representa a recomendação de 2.000 kg.ha⁻¹ do produto, por exemplo, para a cultura do pepino (20.000 plantas.ha⁻¹). Entretanto, essa recomendação pode ser menor, caso o produto não seja utilizado em área total e apenas, em áreas mais localizadas, a exemplo, de reboleiras com maior infestação do nematoide das galhas. Isso representaria menor quantidade do produto a ser utilizado por área.

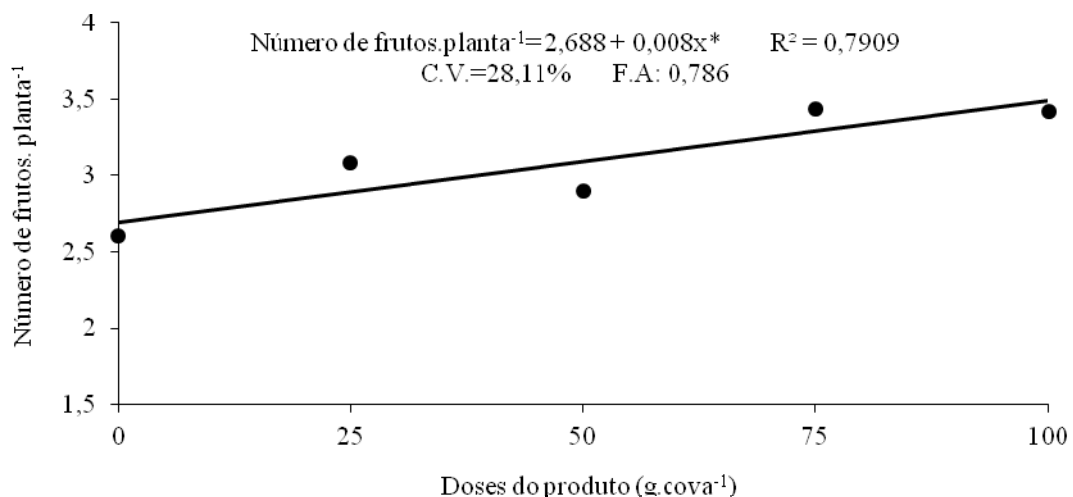


Figura 3 - Número de frutos de pepino por planta sob diferentes doses do produto à base de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Pc-10) associado ao húmus de minhoca, 60 dias após o transplântio das mudas. Cada ponto representa a média de oito repetições. C.V.: Coeficiente de variação (%), F.A.: Falta de ajustamento; * Significativo pelo teste T a 5% de probabilidade.

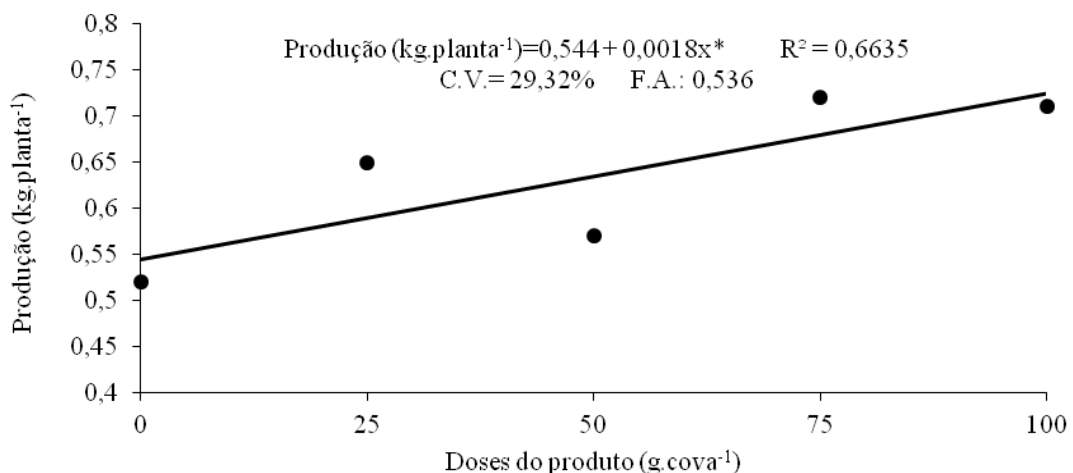


Figura 4 - Produção de pepino (kg.planta⁻¹) sob diferentes doses do produto à base de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Pc-10) associado ao húmus de minhoca, 60 dias após o transplântio das mudas. Cada ponto representa a média de oito repetições. C.V.: Coeficiente de variação (%), F.A.: Falta de ajustamento; * Significativo pelo Teste t a 5% de probabilidade.

Os tratamentos que proporcionaram plantas com menor número de galhas absorveram com maior eficiência água e nutrientes do solo e produziram mais frutos de pepino. O aumento da produção também pode estar relacionado ao possível efeito de promoção de crescimento das plantas provocado por *P. chlamydosporia*, pois alguns de seus isolados já foram relatados como promotores de crescimento de raízes de trigo e tomate (Monfort et al., 2005; Dallemole-Giaretta, 2008). Estudos são necessários para verificar a possibilidade da ocorrência do efeito da promoção de crescimento em plantas de pepino.

Os resultados de produção, ou seja, número de frutos e produção de pepino por planta, obtidos neste experimento, conduzido em área de produção comercial de hortaliças, reforçam a importância do controle biológico do nematoide das galhas utilizando produtos contendo o isolado Pc-10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. Em outros trabalhos, utilizando diferentes isolados de *P. chlamydosporia*, como os realizados por Atkins et al. (2003), Verdejo-Lucas et al. (2003) e Tobin et al. (2008), as produtividades das lavouras tratadas com o fungo nem sempre aumentaram. Provavelmente, o aumento na produção das lavouras tratadas com o fungo pode estar relacionado ao isolado de *P. chlamydosporia* utilizado nos experimentos e sua eficiência em colonizar endofiticamente as raízes das plantas testadas e, conseqüentemente, proporcionar algum efeito na promoção de crescimento das plantas, como os já observados por Monfort et al. (2005) em trigo, Dallemole-Giaretta (2008) em tomate e Marciá-Vicente et al. (2009) em cevada.

Em seus experimentos, Atkins et al. (2003), concluíram que embora o índice de galhas das raízes do tomate tenha sido reduzido significativamente de 4,0 (testemunha) para 2,5 (com o fungo), não houve efeito benéfico nas produções das culturas testadas em nenhum dos tratamentos com o fungo. Resultados semelhantes foram obtidos por

Verdejo-Lucas et al. (2003), posto que nenhum dos tratamentos utilizados nos experimentos (controle, *P. chlamydosporia*, *P. chlamydosporia* + oxamil, oxamil e brometo de metila) aumentaram a produção de alface e, apenas brometo de metila, em uma das localidades, aumentou a produção de tomate, em 50% e 25%, respectivamente, no primeiro e segundo cultivo. A produção comercial de tubérculos de batata obtida por Tobin et al. (2008), diferiu grandemente. Num primeiro experimento, a produção foi de 31,3 t.ha⁻¹, enquanto no segundo foi de 21,6 t.ha⁻¹, porém, não ocorreram diferenças significativas na produção final de tubérculos de batata entre a testemunha (não-tratado) e o tratamento utilizando *P. chlamydosporia*, em ambos os experimentos.

No presente experimento, a contagem final (Cf) de juvenis no solo não foi afetada pela utilização de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Pc-10) em nenhum dos tratamentos utilizados (dados não apresentados). Segundo Kerry & Bourne (2002), essa resposta é esperada, pois o fungo não impede a invasão inicial das raízes pelos juvenis dos nematoides das galhas e os danos que eles causam ao crescimento da planta, observando-se, assim, baixa eficiência de controle quando ocorre alta população de J₂ no solo em culturas suscetíveis. Consequentemente, se o solo estiver fortemente infestado com juvenis dos nematoides das galhas, outros métodos de controle devem ser utilizados para aumentar a eficácia do fungo.

Entretanto, testes de campo com um isolado de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* conduzidos por Freitas et al. (2009) em plantio comercial de banana Galil 18 com alta incidência de fitonematoides, em Janaúba, Minas Gerais apresentaram resultados que afetaram a população do nematoides das galhas no solo. Em junho de 2007, 500 g de um produto contendo o fungo foram aplicados por planta. Avaliações foram feitas em agosto e novembro de 2007 e os resultados observados indicaram uma redução gradual das populações de *Meloidogyne* spp., *Radopholus similis*,

Helicotylenchus sp. e *Pratylenchus* sp. no solo nas duas avaliações. Além disso, a população de *Pratylenchus* sp. alcançou um nível indetectável ainda na primeira avaliação. Nas raízes, não houve redução de *R. similis*, porém houve uma queda acentuada, principalmente, das populações de *Meloidogyne* spp. (70,4%) e, assim como no solo, *Pratylenchus* sp. não foi detectado nas raízes. O menor período de contato do fungo com o nematoide das galhas no presente experimento, em torno de 75 dias, proporcionou menor redução da população de J₂, comparativamente ao experimento realizado por Freitas et al. (2009), no qual o fungo ficou por cinco meses em contato com os fitonematoídes. Provavelmente, o aumento do período de contato do fungo com os fitonematoídes na área aumentaria a eficiência de controle, como relatado por Bourne & Kerry (1999). A aplicação do produto à base de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Pc-10) nas covas de plantio, 18 dias antes do transplante das mudas, também contribuiu para o aumento da eficiência de controle do nematoide das galhas no presente experimento, pois permitiu o seu estabelecimento e maior período de contato do fungo com os ovos do nematoide ainda no solo.

Uma alternativa para potencializar a eficiência do controle do nematoide das galhas seria utilizar o fungo como parte de uma estratégia integrada com outros métodos de controle que podem incluir cultivares resistentes e/ou tolerantes, plantas não-hospedeiras, culturas armadilhas, rotação de culturas e, possivelmente, outros organismos antagonistas (Verdejo-Lucas et al., 2003; Tobin et al., 2008; Ferraz et al., 2010). Outra opção seria associar o fungo com a prática do alqueive úmido (Dutra et al., 2006) que reduz consideravelmente a população de juvenis do nematoide das galhas no solo no cultivo de algumas hortaliças.

Neste experimento, a dose de 75 g do produto à base de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Pc-10) por cova foi a que apresentou melhores resultados no controle

do nematoide das galhas. A dose de 100 g do produto por cova foi a que proporcionou maior aumento da produção comercial de pepino.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Marilene, Murilo e Leonardo (Graduandos em Agronomia-UFV), pela colaboração nas atividades de campo e de laboratório desenvolvidas durante a condução do experimento. À Rizoflora Biotecnologia, pelo apoio financeiro e fornecimento do produto à base de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* para a realização do experimento. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de doutorado ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Atkins SD, Hidalgo-Diaz L, Kalisz H, Mauchline TH, Hirsch PR, Kerry BR (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.

Bourne JM, Kerry BR (1999) Efect of the host plant on the efficacy of *Verticillium chlamyosporium* as a biological control agent of root-knot nematodes at diferent nematode densities and fungal application rates. *Soil Biology and Biochemistry* 31:75-84.

Bridge J, Page SLJ (1980) Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart. *Tropical Pest Management* 26:296-298.

Campos VP, Dutra MR, Campos JR, Silva LHCP (2001) Manejo de nematóides em hortaliças. In: Silva LHCP, Campos JR, Nojosa GBA (Eds.) *Manejo integrado: doenças e pragas em hortaliças*. Lavras. UFLA. pp.125-158.

Campos VP, Silva JRC, Campos HD, Pereira LHC (2007) Manejo de fitonematoides. *Fitopatologia Brasileira* 32(Supl.):16-17.

CEASAMINAS. Centrais de Abastecimento de Minas Gerais. Informações de mercado, http://minas.ceasa.mg.gov.br/detec/Procedencia/cst_prd_consolidado/cst_prd_consolidado.php (11 de Março de 2011).

Charchar JM, Aragão FAS (2005) Reprodução de *Meloidogyne* spp. em cultivares de tomate e pepino sob estufa plástica e campo. *Nematologia Brasileira* 29:243-249.

Chen S, Dickinson DW (2004) Biological control of nematodes by fungal antagonists. In: Chen Z, Chen S, Dickinson DW (Eds.) *Nematology - advances and perspectives*. Volume II: Nematode management and utilization. Beijing & Wallingford. Tsinghua University Press & CABI Publishing. pp. 979-1039.

Dallemole-Giaretta R (2008) Isolamento, identificação e avaliação de *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica* e na promoção de crescimento de tomateiro. Universidade Federal de Viçosa. Tese de Doutorado em Fitopatologia. Viçosa. 83 p.

Dallemole-Giaretta R, Freitas LG, Ferraz S, Neves WS, Lopes EA, Coutinho MM (2008) Efeito da concentração de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* var.

chlamydosporia no controle de *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira 32:327-332.

Dallemole-Giaretta R, Freitas LG, Zooca RJF, Caixeta LB, Lopes EA (2010a) Controle de *Meloidogyne javanica* por meio da aplicação de palha de café colonizada por *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. Nematologia Brasileira 34:137-140.

Dallemole-Giaretta R, Freitas LG, Coutinho MM, Neves WS, Zooca RJF, Ferraz S (2010b) Efeito da farinha de sementes de abóbora e de *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira 34:91-97.

Dong LQ, Zhang KQ (2006) Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. Plant Soil 288:31-45.

Dutra MR, Campos VP, Rocha FS, Silva JRC, Pozza EA (2006) Manejo do solo e da irrigação no controle de *Meloidogyne incognita* em cultivo protegido. Fitopatologia Brasileira 31:405-407.

Ferraz S, Freitas LG, Lopes EA, Dias-Arieira CR (2010) Manejo sustentável de fitonematoides. Viçosa. Editora UFV.

Filgueira FAR (2003) Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2ª Ed. Viçosa. Editora UFV.

Freitas LG, Ferraz S (2005) Controle alternativo de pragas e doenças. In: Venzon M, Paula Junior TJ, Pallini A (Eds.) Controle alternativo de pragas e doenças. Viçosa. EPAMIG-UFV. pp. 331-359.

Freitas LG, Dallemole-Giaretta R, Ferraz S, Zooca RJF, Podestá GS (2009) Controle biológico de nematoides: estudos de casos. In: Zambolim L, Picanço MC (Eds)

Controle biológico de pragas e doenças: exemplos práticos. Viçosa. UFV-DFP. pp. 41-82.

Jenkins WR (1964) A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Report 48:692-695.

Kerry BR, Bourne JM (2002) A manual for research on *Verticillium chlamydosporium*, a potential biological control agent for root-knot nematodes. Gent. IOBC-WPRS.

Kerry BR, Crump DH (1998) The dynamics of the decline of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae*, in four soils under intensive cereal production. Fundamental and Applied Nematology 21:617-625.

Kerry BR (2001) Exploitation of nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: Butt TM, Jackson C, Magan N (Eds.) Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. Wallingford. CAB International. pp. 155-167.

Lopes EA, Ferraz S, Ferreira PA, Freitas LG, Dhingra OD, Gardiano CG, Carvalho SL (2007) Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira 31:78-84.

Lordello LGE (1984) Nematóides das Plantas Cultivadas. 8ª Ed. São Paulo. Nobel.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons (15 de Agosto de 2010).

Marcía-Vicente JG, Rosso LC, Ciancio A, Janson HB, Lopez-Llorca LV (2009) Colonization of roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*: effects on plant growth and disease. *Annals of Applied Biology* 155:391-401.

MINITAB. Minitab (Release 14.1), <http://www.minitab.com/pt-BR/default.aspx> (28 de Abril de 2003).

Monfort E, Lopez-Llorca LV, Jansson HB, Salinas J, Park JO, Sivasithamparam K (2005) Colonization 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.

Podestá GS, Dallemole-Giaretta R, Freitas LG, Lopes EA, Ferraz S, Zooca RJF (2009) Atividade nematófaga de *Pochonia chlamydosporia* em solo natural ou autoclavado sobre *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira* 33:191-193.

Salgado SML, Borges J (2008) Controle alternativo de fitonematoides. In: Venzon M, Paula Junior TJ, Pallini A (Eds.) *Avanços no controle alternativo de pragas e doenças*. Viçosa. EPAMIG. pp. 179-206.

Sikora RA, Bridge J, Starr JL (2005) Management practices: an overview of integrated nematode management technologies. In: Luc M, Sikora RA, Bridge J (Eds.) *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford. CAB International. pp. 793-825.

Sikora RA, Fernández E (2005) Nematode parasites of vegetables. In: Luc M, Sikora RA, Bridge J (Eds.) *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford. CAB International. pp. 319-392.

Souza JL, Resende P (2003) *Manual de horticultura orgânica*. Viçosa. Aprenda Fácil.

STATSOFT. Statistica (Release 7.0.61.0), <http://www.statsoft.com> (18 de Dezembro de 2001).

Stirling GR (1991) Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects. Wallingford. CAB International.

Tobin JD, Haydock PPJ, Hare MC, Woods SR, Crump DH (2008) Effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* and fosthiazate on the multiplication rate of potato cyst nematodes (*Globodera pallida* and *G. rostochiensis*) in potato crops grown under UK field conditions. *Biological Control* 46:194-201.

Verdejo-Lucas S, Sorribas FJ, 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* 52:521-528.

Wilcken SRS, Rosa JMO, Higuti ARO, Garcia MJM, Cardoso AII (2010) Reprodução de *Meloidogyne* spp. em porta-enxertos e híbridos de pepino. *Horticultura Brasileira* 28: 20-123.

CONCLUSÕES GERAIS

- É viável a utilização do resíduo, obtido do processo de produção massal de clamidósporos do isolado Pc-10 de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, na concentração de até 2% (v:v) no substrato formulado e comercial para a produção de mudas de alface;
- A aplicação de até 18,0 g.L⁻¹ do produto Pc-10 em mudas de alface e pepino não afeta o seu desenvolvimento e é uma alternativa de introdução do fungo no substrato das mudas e, conseqüentemente, no solo de áreas cultivadas com hortaliças;
- A aplicação do produto Pc-10 no solo (5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo) e de 18,0 g.L⁻¹ de Pc-10 nas mudas de alface foi efetivo no controle de *M. javanica* em plantas de alface, pois reduz o número de ovos e de ovos.g⁻¹ de raízes;
- No intervalo de 4,5 a 18,0 g.L⁻¹ de Pc-10, a aplicação de doses crescentes de Pc-10 nas mudas aumenta o controle de *M. javanica* em plantas de pepino, pois reduz o número de galhas, de galhas.g⁻¹ de raízes, de ovos e de ovos.g⁻¹ de raízes;
- No intervalo de 25 a 100 g do produto por cova, doses crescentes de um produto formulado à base de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10) reduz o nematoide das galhas e aumenta a produção comercial de pepino em campo.