

PAULA SOARES ALVES

**COMPATIBILIDADE ENTRE *Pochonia chlamydosporia* E *Trichoderma* spp. NO
CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM TOMATEIRO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

A474c
2016
Alves, Paula Soares, 1990-
Compatibilidade entre *Pochonia chlamydosporia* e
Trichoderma spp. no controle de *Meloidogyne javanica* em
tomateiro / Paula Soares Alves. – Viçosa, MG, 2016.
ix, 54f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Leandro Grassi de Freitas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Tomate - Doenças e pragas - Controle biológico.
2. Fungos nematófagos. 3. Nematóides. 4. *Pochonia
chlamydosporia*. 5. *Trichoderma*. 6. *Meloidogyne javanica*.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Fitopatologia. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia.
II. Título.

CDD 22. ed. 632.96

PAULA SOARES ALVES

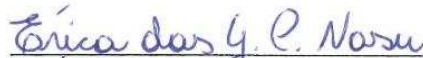
COMPATIBILIDADE ENTRE *Pochonia chlamydosporia* E *Trichoderma* spp. NO
CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM TOMATEIRO

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

APROVADA: 29 de Fevereiro de 2016.



Silamar Ferraz



Érica das Graças Carvalho Nasu



Leandro Grassi de Freitas
(Orientador)

Aos meus pais, Elena e Paulo, pela força e incentivo,
Aos meus irmãos Daniel, Marco Túlio e Leidyane, pelo apoio,
Ao meu noivo José Francisco Luciano (Teté), pelo amor, paciência e companheirismo,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida durante o curso.

Ao professor Leandro Grassi de Freitas, pela orientação, confiança e pelos ensinamentos.

À estudante de Doutorado Thalita Monteiro, à Doutora Érica Nasu e ao Dr. Samuel Valadares, pela amizade e pelas críticas e sugestões neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides (BIONEMA), Raul, Rosana, Josiane, Fernanda, Huarlen, Leonardo, Élder, Dayana, Guilherme e Osvaldo, pelo convívio, amizade e colaboração. Sem vocês tudo seria mais difícil. Obrigada por toda a ajuda!

Às minhas amigas Raiane, Willyane e Rosana, pelo apoio e incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e da casa de vegetação por todas as informações e serviços prestados.

Aos meus colegas da turma de mestrado, pela amizade e apoio.

Aos amigos e aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus tios, primos, avó, que sempre torceram por mim.

Ao meu noivo José Francisco Luciano (Teté), por estar sempre ao meu lado, sendo meu porto seguro!

Aos meus queridos irmãos, Daniel, Marco Túlio e Leidyane!

Aos meus pais, Elena e Paulo, por tudo!

BIOGRAFIA

PAULA SOARES ALVES, filha de Elena Rosa Soares Alves e Vicente de Paula Alves, nasceu em 06 de Agosto de 1990, em Viçosa Minas Gerais.

Em 2009, iniciou os estudos em Agronomia, na Universidade Federal de Viçosa.

Em Março de 2014 graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa.

Em Março de 2014 iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em Fevereiro de 2016.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1- INTRODUÇÃO GERAL	1
2- REFERÊNCIAS	6
CAPÍTULO 1: Compatibilidade entre <i>Pochonia chlamydosporia</i> e <i>Trichoderma</i> spp. em experimentos <i>in vitro</i>	10
Resumo	10
Abstract	11
1- INTRODUÇÃO	12
2- MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. Obtenção das culturas para testes “ <i>in vitro</i> ”	13
2.2. Compatibilidade entre <i>Pochonia chlamydosporia</i> e <i>Trichoderma</i> spp. em experimentos “ <i>in vitro</i> ”	14
2.3. Teste de antagonismo em confrontação direta	14
2.4. Teste de antibiose	15
2.5. Efeito de metabólitos voláteis	16
3- RESULTADOS	16
4- DISCUSSÃO	20
5- CONCLUSÕES	23
6- REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO 2: Compatibilidade entre <i>Pochonia chlamydosporia</i> e <i>Trichoderma</i> spp. no controle de <i>Meloidogyne javanica</i> em tomateiro	27
Resumo	27
Abstract	28
1- INTRODUÇÃO	29
2- MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1. Obtenção e preparo do inóculo de <i>Meloidogyne javanica</i>	31
2.2. Preparo das mudas de tomate	31
2.3. Obtenção e produção dos inóculos fúngicos	31
2.4. Condução dos experimentos	32
2.4.1. Ensaio 1: Compatibilidade entre <i>Pochonia chlamydosporia</i> Pc-10 e <i>Trichoderma</i> spp. em casa de vegetação no controle de <i>Meloidogyne javanica</i>	32
2.4.2. Ensaio 2: Compatibilidade entre <i>Pochonia chlamydosporia</i> Pc-10 e <i>Trichoderma</i> isolado T-1.	34
3- RESULTADOS	37
Ensaio 1: Compatibilidade entre <i>Pochonia chlamydosporia</i> e <i>Trichoderma</i> spp. em casa de vegetação no controle de <i>Meloidogyne javanica</i>	37
Ensaio 2: Compatibilidade entre <i>Pochonia chlamydosporia</i> Pc-10 e <i>Trichoderma</i> isolado T-1	40
4- DISCUSSÃO	42
5- CONCLUSÕES	48
6- REFERÊNCIAS	49
7- CONCLUSÕES GERAIS	54

RESUMO

ALVES, Paula Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2016. **Compatibilidade entre *Pochonia chlamydosporia* e *Trichoderma* spp. no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro.** Orientador: Leandro Grassi de Freitas.

O presente estudo teve como objetivos: a) avaliar a compatibilidade entre *Pochonia chlamydosporia* (isolado Pc-10) e isolados de *Trichoderma* sp. em experimentos “in vitro” e em casa de vegetação, e a ação desses organismos sobre *Meloidogyne javanica*; b) Avaliar se os fungos promovem o crescimento das plantas de tomateiro. Os isolados de *Trichoderma* sp. são componentes ativos de produtos formulados, de diferentes empresas: Ecotrich® WP, composto pelo fungo *T. harzianum*, empresa Ballagro; Quality®, *T. asperellum* do laboratório Farroupilha, e o terceiro produto, desenvolvido pela cooperativa Coopacer, será aqui denominado *Trichoderma* isolado C-1. O isolado T-1 de *Trichoderma*, pertencente à coleção do Departamento de Fitopatologia da UFV, também foi testado. Nos ensaios de compatibilidade de Pc-10 com os isolados de *Trichoderma* sp. “in vitro”, Pc-10 foi compatível com todos os isolados no teste de antagonismo em confrontação direta. Já no teste de antibiose, todos os isolados de *Trichoderma* sp. inibiram o crescimento de Pc-10, e Pc-10 inibiu o crescimento de *T. asperellum* e *Trichoderma* isolado C-1. No teste de metabólitos voláteis, Pc-10 não produziu compostos que influenciaram o crescimento micelial dos isolados de *Trichoderma* sp., entretanto, os metabólitos voláteis produzidos por *T. harzianum* e *Trichoderma* isolado C-1 reduziram ($p < 0,05$) o crescimento das colônias de Pc-10. Já o isolado T-1 e *T. asperellum* não influenciaram o crescimento micelial de Pc-10. A maior compatibilidade ocorreu entre os isolados Pc-10 e T-1. Dois experimentos foram realizados em casa de vegetação para avaliar a ação conjunta ou isolada de Pc-10 e isolado de *Trichoderma* sp. no controle de *M. javanica*. As variáveis, ovos g^{-1} de raiz, galhas g^{-1} de raiz, altura da parte aérea (APA), massa da raiz fresca (MRF), massa da raiz seca (MRS), massa da parte aérea fresca (MPAF) e massa da parte aérea seca (MPAS) foram avaliadas. Não houve efeito significativo ($p < 0,05$) para APA, MFR, MSR, MPAF e MPAS. No experimento 1, os tratamentos Pc-10 + *Trichoderma* isolado T-1, Pc-10 + *Trichoderma* isolado C-1, *T. harzianum* e *Trichoderma* isolado T-1 reduziram o número ovos g^{-1} de raiz em 58, 48, 47 e 43% respectivamente, em relação à testemunha ($p < 0,05$). Não houve diferença para o número de galhas g^{-1} de raiz. Já no experimento 2, Pc-10 + *T. asperellum* e Pc-10 + *T. harzianum* reduziram o número de ovos g^{-1} de raiz em 62 e 55% respectivamente. Quanto ao número de galhas g^{-1} de raiz,

os tratamentos Pc-10 + *T. harzianum* e *T. harzianum* induziram reduções de 68 e 60% respectivamente, quando comparados ao controle. Na avaliação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *P. chlamydosporia* g⁻¹ de solo, verificou-se a presença do fungo em todos os tratamentos em que este foi utilizado em conjunto com os isolados de *Trichoderma* sp., porém, em ambos os experimentos, *Trichoderma* isolado T-1 foi o isolado que menos influenciou o crescimento de Pc-10 no solo. Um segundo ensaio foi realizado para avaliar a combinação de *P. chlamydosporia* com *Trichoderma* isolado T-1. Não houve promoção de crescimento das plantas. O tratamento Pc-10 reduziu o número de ovos g⁻¹ de raiz. Conclui-se, portanto, que *Pochonia chlamydosporia* e isolados de *Trichoderma* sp. são compatíveis, a utilização conjunta desses organismos tem potencial para o controle do nematoide das galhas, e que Pc-10 e *Trichoderma* isolado T-1 são os isolados que apresentaram maior compatibilidade.

ABSTRACT

ALVES, Paula Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Compatibility between *Pochonia chlamydosporia* and *Trichoderma* spp. in control of *Meloidogyne javanica* in tomato.** Advisor: Leandro Grassi de Freitas.

This study aimed to: a) assess the compatibility between *Pochonia chlamydosporia* (isolated Pc-10) and *Trichoderma* isolated in experiments "in vitro" and in the greenhouse; and the action of these microorganisms on *Meloidogyne javanica*; b) evaluate whether the fungi promote the tomato plants growth. The different isolated of *Trichoderma* sp. are active components of formulated products from different companies: Ecotrich® WP, composed by the fungus *T. harzianum*, Ballagro company; Quality®, *T. asperellum*, from Farroupilha laboratory and the third product developed by cooperative Coopacer will be referred as *Trichoderma* isolated C-1. The isolated T-1 of *Trichoderma* belonging to the collection of the UFV Plant Pathology Department was also tested. In compatibility tests between Pc-10 with isolated of *Trichoderma* sp. "in vitro", Pc-10 is compatible with all isolated the antagonism test in direct confrontation. In the antibiosis test, all isolated of *Trichoderma* sp. inhibited the growth of Pc-10 and Pc-10 inhibited the growth of *T. asperellum* and *Trichoderma* isolated C-1. In the volatile metabolites test, Pc-10 did not produce compounds that influenced the mycelial growth of *Trichoderma* isolated. However, the volatile metabolites produced by *T. harzianum* and *Trichoderma* isolated C-1 reduced ($p < 0.05$) the Pc-10 colonies growth. Already the isolate T1 and *T. asperellum* did not affect the mycelial growth of Pc-10. The greater compatibility occurred between Pc-10 and T-1 isolated. Two experiments were conducted in a greenhouse to evaluate the combined or isolated action on Pc-10 and *Trichoderma* sp. in control of *M. javanica*. The variables, eggs g^{-1} root, galls g^{-1} root, aerial part height (APH), mass of fresh root (MFR), mass of dried root (MDR), mass of fresh shoots (MFS) and mass dry shoots (MDS) were evaluated. There was not significant effect ($p < 0.05$) for APH, MFR, MDR, MFS and MDS. In experiment 1, treatments Pc-10 + *Trichoderma* isolated T-1, Pc-10 + *Trichoderma* isolated C-1, *T. harzianum* and *Trichoderma* isolated T-1 reduced the number of eggs g^{-1} root of 58, 48, 47 and 43% respectively, compared to control ($p < 0.05$). There was not difference in the number of galls g^{-1} root. In the experiment 2, Pc-10 + *T. asperellum* and Pc-10 + *T. harzianum* reduced the eggs g^{-1} root in 62 and 55% respectively. In the

number of galls g^{-1} root, the Pc-10 + *T. harzianum* and *T. harzianum* treatments induced reductions of 68 and 60% respectively compared to control. In assessing the number of colony forming units (CFU) of *P. chlamydosporia* g^{-1} soil, it was found the presence of the fungus in all treatments where this was used in conjunction with *Trichoderma* sp. However, in both experiments, *Trichoderma* isolated T-1 was the isolated that less influenced the growth of Pc-10 in the soil. A second test was conducted to evaluate the combination between *P. chlamydosporia* with isolated *Trichoderma* T-1. There was not observed growth promoting of plant. Pc-10 treatment reduced the number of g^{-1} root eggs. It follows therefore that *Pochonia chlamydosporia* and *Trichoderma* sp. are compatible, the combined use of these organisms has the potential to control root-knot nematode, and Pc-10 and *Trichoderma* isolated T-1 are the isolated showed greater compatibility.

1- INTRODUÇÃO GERAL

Nematoides são os organismos pluricelulares mais abundantes na terra, e podem ser encontrados em diversos habitats desertos, oceanos, regiões frias e quentes (Cunha, 2002). A maioria dos nematoides é de vida livre, porém, existem espécies parasitas de animais e plantas (Ferraz & Monteiro, 2005).

Os fitonematoides causam grandes perdas na agricultura global, pois reduzem a produtividade e qualidade dos produtos, inviabilizam áreas de plantio, e conseqüentemente, aumentam os custos da produção (Barcelos, 1997). Em 2008, Abad et al. (2008) estimaram um prejuízo anual de cerca de 157 bilhões de dólares. No entanto, é possível que estes prejuízos sejam uma subestimativa das perdas reais, já que muitas vezes os danos não são percebidos pelos agricultores, pois os sintomas do ataque podem implicar em distúrbios secundários, como deficiência nutricional ou sintomas causados por parasitismo de outros fitopatógenos (Tihohod, 1993).

Dentre os fitonematoides destaca-se o gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1892, conhecido como nematoide das galhas. Este foi encontrado pela primeira vez em plantas de pepino em casa de vegetação, na Inglaterra (Berkeley, 1855). *Meloidogyne* spp. são parasitas obrigatórios e constituem o grupo de fitonematoides de maior importância econômica, infectando mais de 3000 espécies de plantas em todo o mundo (Sasser, 1980). É o gênero que, junto com *Heterodera*, apresenta o mais alto grau de evolução em termos de parasitismo, modificando células na região vascular, causando assim redução na absorção de água e nutrientes, e induzindo, na maioria das vezes, a formação de galhas no sistema radicular das plantas parasitadas, que são os sintomas característicos de seu parasitismo (Moura, 1997).

O ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. tem duração de 28 a 35 dias, dependendo das condições ambientais. O juvenil de segundo estágio (J_2), que eclode do ovo, é o responsável pela infecção primária da raiz. Após penetrar regiões não diferenciadas na ponta da raiz, o J_2 se move intercelularmente até atingir as células parenquimáticas do cilindro central da raiz, induzindo a formação de sítios de alimentação denominados células gigantes. Nos sítios de alimentação os J_2 passam por mais três ecdises que levam à formação de machos ou fêmeas. Os machos são raros, já que a reprodução na maioria das espécies desse gênero é partenogenética. As fêmeas produzem ovos que são liberados juntamente com uma matriz gelatinosa na superfície ou nos tecidos da raiz sob a forma de massa e ovos (Taylor & Sasser, 1983). Cada fêmea produz cerca de 500

ovos num período médio de 30 dias, o que faz com que as populações desse nematoide cresçam muito rápido dentro de um ciclo de cultura suscetível. Esse nematoide permanece no solo na forma de ovos entre uma cultura e outra. Esse inóculo inicial representa um grande risco para o próximo cultivo a ser instalado, pois na fase jovem as plantas se mostram mais sensíveis ao nematoide, podendo até morrer.

Os métodos utilizados para o manejo de fitonematoides envolvem várias estratégias, como o uso de nematicidas sintéticos, rotação de culturas, resistência genética, controle biológico, e outros. O uso de variedades resistentes é um bom método de controle de doenças, porém o uso dessa estratégia nem sempre é possível, já que depende da disponibilidade de genótipos que combinem características de resistência com qualidades agronômicas (Dropkin, 1969; Freitas et al., 1999; Ferraz et al., 2001). A rotação de culturas também apresenta dificuldades para ser executada, já que as opções de culturas não hospedeiras de nematoides polípagos, como *Meloidogyne* spp., são escassas. O uso de nematicidas tem sido restrito em vários países, inclusive no Brasil, pois são produtos altamente tóxicos, poluentes ao ambiente e que nem sempre são eficientes, além de possuírem preço elevado (Ferraz & Freitas, 2004). Tais dificuldades no manejo acarretam problemas na produção de várias culturas em todo o mundo, criando a necessidade de inserir outros métodos de manejo, sendo o controle biológico uma alternativa que tem ganhado destaque nos últimos anos (Neves et al., 2008).

Segundo Stirling et al.(1991), o “controle biológico” pode ser definido como sendo a redução da população de um organismo alvo por outro organismo, que não plantas resistentes. O controle ocorre através do equilíbrio biológico natural dos microrganismos do solo, ou de forma induzida, através de programas que visam aumentar a população e a atividade de organismos antagonistas dos nematoides (Jatala, 1986; Stirling, 1991; Ferraz & Santos, 1995).

Vários organismos do solo podem ser considerados inimigos naturais dos fitonematoides, como fungos, bactérias, nematoides predadores, ácaros e outros (Kerry, 1990). Dentre esses organismos, os fungos nematófagos são os mais estudados, e podem ser agrupados em: fungos predadores, endoparasitas, parasitas de ovos e fêmeas sedentárias e fungos que produzem metabólitos tóxicos. Mais de 140 espécies fúngicas taxonomicamente distintas, que diferem quanto sua habilidade saprofítica, estão incluídas dentro do grupo dos fungos nematófagos (Freitas et al., 2000).

Drechmeria, *Hirsutella*, *Haptoglossa* e *Catenaria* são exemplos de fungos endoparasitas. Seus esporos são ingeridos pelos nematoides ou aderem-se a cutícula, e após a germinação, parasitam o corpo do nematoide. Porém, o potencial de uso como

agente de biocontrole é pequeno, pois são muito dependentes dos nematoides, com baixo desenvolvimento diretamente no solo (Freitas et al., 2000).

Os gêneros *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* são representantes do grupo dos fungos predadores. Eles podem capturar, matar e consumir a sua presa. Produzem órgãos especializados ao longo da hifa para a captura de nematoides vermiformes, denominados armadilhas (Ferraz et al., 2010), mas apresentam baixa capacidade saprofítica e competitividade para se estabelecer no solo.

Pochonia chlamydosporia (sin. *Verticillium chlamydosporium*, teleomorfo *Metacordyceps chlamydosporia*) (Zare et al., 2001; Sung et al., 2007) é um fungo de solo, parasita facultativo de ovos e fêmeas de nematoides sedentários, considerado um dos agentes de controle biológico mais promissores. O gênero foi relatado pela primeira vez no Brasil em amostras de solos de diferentes regiões do Nordeste pelos pesquisadores Batista & Fonseca (1965), entretanto, o seu primeiro relato como parasita de ovos de fitonematoides foi realizada por Willcox & Tribe (1974), após ter sido isolado de ovos de *Heterodera schachtii* Schmidt e *Heterodera avenae* Woll (Kerry, 1975). Em alguns agroecossistemas este fungo é a principal causa de solo supressivo a esses nematoides, atuando como um agente natural de controle biológico (Kerry et al., 1993).

O fungo produz clamidósporos, estruturas de armazenamento de reservas nutricionais e de sobrevivência, que auxiliam no estabelecimento desse organismo no solo. Os clamidósporos são propágulos efetivos para o estabelecimento do fungo no solo e na rizosfera, pois não precisam de nutrientes adicionais (Bourne & Kerry, 1998). Além disso, possui uma boa habilidade saprofítica, sobrevivendo no solo na ausência do nematoide. Ele pode colonizar as raízes superficialmente e endofiticamente, sendo capaz de promover o crescimento da planta (Freitas et al., 2009). De Leij & Kerry (1991) sugerem que a colonização das raízes por *P. chlamydosporia* é fundamental para um controle biológico de sucesso.

A fase de ovo de *Meloidogyne* sp. é o estágio do ciclo de maior suscetibilidade ao ataque de microrganismos antagonistas, pelo fato de se localizarem na superfície das raízes, tornando-se mais expostos ao ataque (Stirling, 1991). A penetração de *P. chlamydosporia* é o resultado da pressão física do apressório, que se desenvolve a partir de hifas não diferenciadas (Lopez-Llorca et al., 2002), e através de atividade enzimática. A enzima protease serina (VCP1), subtilisina, remove a camada vitelínica da casca do ovo e expõe a camada de quitina, que é então dissolvida (Kerry & Bourne, 2002).

Espécies de *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Myrothecium* e *Penicillium* estão incluídas no grupo dos fungos produtores de metabólitos tóxicos. Existem vários relatos sobre os efeitos tóxicos de filtrados dessas culturas fúngicas sobre ovos e nematoides vermiformes (Chen & Dickson, 2004; Morton et al., 2004). As toxinas são importantes para o microrganismo parasita, devido ao fato de facilitarem a infecção do hospedeiro. Pesquisas sobre esses metabólitos para o controle de patógenos vêm crescendo na área de fitopatologia (Chen & Dickson, 2004).

O fungo *Trichoderma* sp. é conhecido por ser de ocorrência mundial, que pode ser isolado de solo, madeira em decomposição e outras formas de matéria orgânica vegetal. Muitos desses fungos são classificados como imperfeitos, pois não possuem estágio sexual conhecido. O crescimento rápido em meio de cultura e produção de numerosos esporos (conídios) de coloração verde, ou variações, são características dos fungos deste gênero (Gams & Bisset, 1998). Este fungo é considerado um potencial agente de controle biológico de doenças foliares (Elad & Kapat, 1999), doenças do solo (Papavizas, 1985), e de nematoides (Spiegel & Chet, 1998). A produção de metabólitos antifúngicos, competição por espaço e nutrientes, micoparasitismo, promoção de crescimento e indução de respostas de defesa das plantas têm sido sugeridos como mecanismos para a atividade de biocontrole de *Trichoderma* (Chet et al., 1997; Howell, 2003).

Existem pesquisas que exploram o controle biológico de fitonematoides utilizando apenas um antagonista contra o patógeno alvo (Jatala, 1986; Stirling, 1991; Ferraz & Santos, 1995; Freitas et al., 2000). Geralmente, os casos em que o controle biológico ocorre naturalmente, é resultado de uma mistura de antagonistas (Siddiqui & Shaukat, 2002; Siddiqui & Shaukat, 2003). O declínio da população do nematoide-do-cisto-dos-cereais, *Heterodera avenae*, em áreas agrícolas na Inglaterra, mesmo quando cultivares suscetíveis eram plantadas, foi detalhadamente estudado por Kerry (1982), que obteve a conclusão de que a grande população dos fungos nematófagos *Nematophthora gynophila* Kerry & Crump e *Verticillium chlamydosporium* Goddard encontrada nas áreas de plantio era a principal responsável pela supressividade do solo. Pesquisas recentes que utilizam mais de um agente de controle têm sido desenvolvidas mostrando que há um melhor controle dos patógenos quando os organismos são usados de forma integrada (Chaves et al., 2009; Singh et al., 2012).

A combinação de mais de um antagonista é vantajosa para o controle de fitonematoides, pois os microrganismos utilizados podem possuir diferentes modos de

ação, aumentando o espectro de ação, afetando diferentes estádios de vida do patógeno, com atividade diferenciada durante épocas diferentes do ano (Lemanceau & Alabouvette, 1991; Meyer & Roberts, 2002). Entretanto, a combinação de espécies diferentes de antagonistas pode gerar incompatibilidade ou propriedades antagonistas (Reaves & Crawford, 1994). Estudos de compatibilidade entre agentes de biocontrole são de grande importância para o desenvolvimento de novas ferramentas no manejo de doenças e pragas.

Uma característica interessante que pode ser levada em consideração na escolha do agente de controle biológico é a capacidade de promover o crescimento das plantas, dessa forma, ele atuará no controle da doença e vai contrabalancear os danos causados por ela. Os microrganismos promotores de crescimento influenciam a nutrição e crescimento das plantas por mecanismos como fixação de nitrogênio, decomposição de matéria orgânica, solubilização de minerais, liberação de compostos quelantes e aumento da eficiência do sistema radicular na absorção de nutrientes (Altomare & Tringovska, 2011). Existem trabalhos que relatam a promoção de crescimento das plantas pelos fungos *P. chlamydosporia* (Hidalgo-Diaz et al., 2000; Monfort et al., 2005; Dallemolle-Giaretta, 2015) e *Trichoderma* (Baker & Cook, 1974; Chang et al., 1986; Kleifeld & Chet, 1992; Harman, 2000; Yedidia et al., 2001).

Diante do já exposto, o presente trabalho teve como objetivos:

- Avaliar a compatibilidade entre *Pochonia chlamydosporia* (isolado Pc-10) e isolados de *Trichoderma* sp. em experimentos “in vitro” e em casa de vegetação, e a ação desses organismos sobre *Meloidogyne javanica*;
- Avaliar se os fungos promovem o crescimento das plantas de tomateiro.

2- REFERÊNCIAS

- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J.M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E.G., Deleury, E., Perfus-Barbeoch, L., Anthouard, V., Artiguenave, F., Block, V.C., 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature biotechnology* 26, 909-915.
- Altomare, C., Tringovska, I., 2011. Beneficial soil microorganisms, an ecological alternative for soil fertility management. *Genetics, biofuels and local farming systems*. Springer Netherlands, 161-214.
- Baker, K.F., Cook, R.J., 1974. *Biological control of plant pathogens*. WH Freeman and Company. 433p.
- Barcelos, F.F., 1997. Isolamento e avaliação de atividade nematicida de constituintes químicos de *Mucuna aterrima*. Dissertação (Mestrado do Programa de pós-graduação em Agroquímica) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 93p.
- Berkeley, M.J., 1855. *Vibrio* forming excrescences on the roots of cucumber plants. *Gardener's Chronicle* 14, 220-310.
- Batista, A.C., Fonseca, O.M., 1965. *Pochonia humicola* n. gen. e n. sp., uma curiosa entidade fúngica dos solos do Nordeste do Brasil. *Instituto de Micologia, Recife* 462, 1-11.
- Bourne, J.M., Kerry, B.R., 1998. 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 applications rates. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 75-84.
- Chang, Y.C., Chang, Y.C., Baker, R., Kleifeld, O., Chet, I., 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant disease* 70, 145-148.
- Chaves, N.P., Pocasangre, L.E., Elango, F., Rosales, F.E., Sikora, R., 2009. Combining endophytic fungi and bacteria for the biocontrol of *Radopholus similis* (Coob) Thorne and for effects on plant growth. *Scientia Horticulturae* 122(3), 472-478.
- Chen, S., Dickson, D.W., 2004. Biological control of nematodes by fungal antagonists. *Nematology: advances and perspectives* 2, 343-403.
- Chet, I., Inbar, J., Hadar, I., 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Springer-Verlag, Berlin, 165-184.
- Cunha, F.R., 2002. Atividade nematicida de isolados bacterianos e de extratos vegetais e purificação de alguns desses extratos. Dissertação (Mestrado do Programa de pós-graduação em fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais. 54p.

- Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L.G., Lopes, E.A., Silva, M.d.C.S.d., Kasuya, M.C.M., Ferraz, S., 2015. *Pochonia chlamydosporia* promotes the growth of tomato and lettuce plants. *Acta Scientiarum. Agronomy* 37, 417-423.
- De Leij, F.A.A.M., Kerry, B.R., Dennehy, J.A., 1993. *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and micro-plot tests. *Nematologica* 39, 115-126.
- Dropkin, V.H. 1969. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reverse by temperature. *Phytopathology* 59,1632-1639.
- Elad, Y., Kapat, A., 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 105, 177-189.
- Ferraz, S.; Dias, C.R., Freitas, L.G. 2001. Controle de nematóides com práticas culturais. In: ZAMBOLIM, L. (ed). *Manejo Integrado-Fitossanidade: Cultivo protegido, pivô central e plantio direto*. Editora UFV, Viçosa, 1-52.
- Ferraz, S., Freitas, L.G., Lopes, E.A. Dias-Arieira, C., 2010. *Manejo Sustentável de Fitonematoides*. Viçosa: UFV, 139-169.
- Ferraz, S., Freitas, L.G., 2004. Use of antagonistic plants and natural products. *Nematology-Advances and perspectives* 2, 931-97.
- Ferraz, S., Santos, M.A., Luz, W.C., 1995. Controle biológico de fitonematoides pelo uso de fungos. *Revisão anual de patologia de plantas*. Passo Fundo: Embrapa, 283-314.
- Freitas, L.G., Carneiro, R., M.D.G., I.S. Azevedo, J., 2000. Controle biológico de fitonematoides por *Pasteuria* spp. *Controle Biol[ogico* 2, 91-125.
- Freitas, L.G., Dallemole-Giaretta, R., Ferraz, S., Zooca, R.J.F., Podestá, G.S., 2009. Controle biológico de nematoides: estudo de casos. *Zambolim, L.; Picanço, M.C. Controle biológico pragas e doenças exemplos práticos*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1, 41-82.
- Freitas, L.G.; Oliveira, R.D.L., Ferraz, S. 1999. *Introdução à nematologia*. Editora UFV, Viçosa, (Cadernos Didáticos, 58) 84p.
- Harman, G.E., 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant disease* 84, 377-393.
- Hidalgo-Díaz, L., Bourne, J.M., Kerry, B.R., Rodríguez, M.G., 2000. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. *International Journal of Pest Management* 46, 277-284.
- Howell, C.R., 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease* 87, 4-10.
- Jatala, P., 1986. Biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual review of phytopathology* 24, 453-489.

- Kerry, B. R., 1975. Fungi and the Decrease of Cereal Cyst-nematode Populations in Cereal Monoculture1. EPPO Bulletin, Paris, 5, 353-361.
- Kerry, B.R., Kirkwood, I.A., De Leij, F.A.A.M., Barba, J., Leijdens, M.B., Brookes, P.C., 1993. Growth and survival of *Verticillium chlamydosporium* Goddard, a parasite of nematodes, in soil. *Biocontrol Science and Technology* 3, 355-365.
- Kerry, B.R., 1990. An assessment of progress toward microbial control of plant-parasitic nematodes. *Journal of Nematology* 22, 621.
- Kerry, B.R., Bourne, J.M., 2002. A Manual for research on *Verticillium chlamydosporium*: a potential biological control agent for root-knot nematodes. Gent, Belgium. 84p.
- Kleifeld, O., Chet, I., 1992. *Trichoderma harzianum* - interaction with plants and effect on growth response. *Plant and Soil* 144, 267-272.
- Lemanceau, P., Alabouvette, C., 1991. Biological control of Fusarium diseases by *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Protection* 10, 279-286.
- Lopez-Llorca, L.V., Olivares-Bernabeu, C., Salinas, J., Jansson, H.B., Kolattukudy, P.E., 2002. Pre-penetration events in fungal parasitism of nematode aggs. *Mycological Research* 106, 499-506.
- Meyer, S.L., Roberts, D.P., 2002. Combinations of biocontrol agents for management of plant-parasitic nematodes and soilborne plant-pathogenic fungi. *Journal of Nematology* 34, 1.
- Monfort, E., Lopez-Llorca, L.V., Jansson, H.B., Salinas, J., Park, J.O., Sivasithamparam, K., 2005. Colonisation of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root-rot. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 1229-1235.
- Morton. O.C., Hirsch, P.R., Kerry, B.R., 2004. Infection of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi- a review of the application of molecular biology to understand infection process and to improve biological control. *Nematology* 6, 161-170.
- Moura, R.M., 1997. O gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose: parte II. Revisão annual de patologia de plantas 5, 281-315.
- Neves, W.S., Freitas, L.G., Lopes, E.A., Coutinho, M.M., Dallemole-Giaretta, R., Ferraz, S., 2008. Efeito, in vitro, do extrato de sementes de mamão sobre a eclosão e juvenis de *Meloidogyne* spp. *Revista Trópica Ciências Agrárias e Biológicas* 2,12.
- Papavizas, G.C., 1985. *Trichoderma* and *Gliocadium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual review of phytopathology* 23, 23-54.
- Reaves, J.L., Crawford, R.H., 1994. In vitro colony interactions among species of *Trichoderma* with inference toward biological control. Research paper PNW-RP (USA).8p.

Sasser, J.N., 1980. Root-knot nematodes [Meloidogyne]: a global menace to crop production [Includes activities and principal research findings of the International Meloidogyne Project (IMP)]. Plant Disease (USA).

Siddiqui, I.A., Shaukat, S.S., 2003. Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamydosporia* for Control of Root-Infecting Fungi in Tomato. Journal of Phytopathology 151, 215-222.

Siddiqui, I.A., Shaukat, S.S., 2002. Mixtures of plant disease suppressive bacteria enhance biological control of multiple tomato pathogens. Biology and Fertility of Soils 36, 260-268.

Singh, U.B., Sahu, A., Sahu, N., Singh, R.K., Prabha, R., Singh, D.P., Sarma, B., Manna, M.C., 2012. Co-inoculation of *Dactylaria brochopaga* and *Monacrosporium eudermatum* affects disease dynamics and biochemical response in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) to enhance bio-protection against *Meloidogyne incognita*. Crop Protection 35, 102-109.

Spiegel, Y., Chet, I., 1998. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agents against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. Integrated Pest Management Reviews 3, 169-175.

Stirling, G.R., 1991. Biological control of nematodes: progress, problems and prospects. CAB International, Wallingford, United Kingdom. 282p.

Sung, G.H., Hywel-Jones, N.L., Sung, J.M., Luangsa-ard, J.J., Shrestha, B., S patafora, J.W., 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. Studies in Mycology 57, 5-59.

Taylor, A.L., Sasser, J.N., 1983. Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz. Universidad de Carolina del Norte, 111p.

Tihohod, D., 1993. Nematología agrícola aplicada. Jaboticabal. Funep. 372p.

Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y., Chet, I., 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant and Soil 235, 235-242.

Zare, R, Gams, W., Evans, H.C., 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. Nova Hedwigia 73, 51-86.

CAPÍTULO 1: Compatibilidade entre *Pochonia chlamydosporia* e *Trichoderma* spp. em experimentos in vitro

Resumo

O controle biológico é uma estratégia de manejo que tem ganhado destaque nos últimos anos após a proibição do uso de vários nematicidas em alguns países. A combinação de antagonistas pode ser uma estratégia interessante para o controle de fitonematoides. Entretanto, é necessário realizar estudos sobre o comportamento desses organismos quando combinados, pois estes podem ser incompatíveis. O objetivo do trabalho foi avaliar a compatibilidade entre *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) e isolados de *Trichoderma* sp. em testes “in vitro”. Os isolados de *Trichoderma* sp. são componentes ativos de produtos formulados de empresas: o Ecotrich[®] WP, composto pelo fungo *Trichoderma harzianum*, empresa Ballagro; o Quality[®], *Trichoderma asperellum* do laboratório Farroupilha, e o terceiro produto, desenvolvido pela cooperativa Coopacer, será aqui denominado *Trichoderma* isolado C-1. O isolado T-1 de *Trichoderma* sp. pertencente à coleção do Departamento de Fitopatologia da UFV também foi testado. Foram realizados os seguintes testes: de antagonismo em confrontação direta, antibiose e produção de metabólitos voláteis. Os fungos foram compatíveis no teste de antagonismo em confrontação direta. Entretanto, no teste de antibiose, houve formação de halo de inibição em todos os tratamentos em que os isolados de *Trichoderma* sp. foram crescidos anteriormente no meio, indicando que eles produziram algum antibiótico tóxico à *P. chlamydosporia*. Formou-se halo de inibição para os tratamentos *P. chlamydosporia* x *T. asperellum* e *P. chlamydosporia* x *Trichoderma* isolado C-1, indicando que houve produção de antibióticos no meio de cultivo por *P. chlamydosporia* que inibiram o crescimento desses isolados. No teste de metabólitos voláteis, *P. chlamydosporia* não produziu compostos que influenciaram o crescimento micelial dos isolados de *Trichoderma* sp. Entretanto, os metabólitos voláteis produzidos por *T. harzianum* e *Trichoderma* isolado C-1 reduziram ($p < 0,05$) o crescimento das colônias de *P. chlamydosporia*. Já *Trichoderma* isolado T-1 e *T. asperellum* não influenciaram o crescimento micelial de *P. chlamydosporia*. A maior compatibilidade ocorreu entre os isolados Pc-10 de *P. chlamydosporia* e *Trichoderma* isolado T-1.

Palavras-chave: antibiose, confrontação direta, metabólitos voláteis.

Compatibility between *Pochonia chlamydosporia* and *Trichoderma* spp. in vitro experiments

Abstract

Biological control is a management strategy that has gained prominence in recent years after the ban of various nematicides use in some countries. The combination of antagonists can be an interesting strategy for the nematodes control. However, it is necessary to conduct studies on the behavior of these organisms when combined, as they may be incompatible. The objective was to evaluate the compatibility between *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) and *Trichoderma* sp. in tests "in vitro". The *Trichoderma* isolated are active components of formulated product companies: the Ecotrich® WP, composed by the fungus *T. harzianum*, Ballagro company; Quality®, *T. asperellum*, the Farroupilha laboratory and the third product developed by Coopacer cooperative will be referred as *Trichoderma* isolated C-1. The isolated T-1 of *Trichoderma*, belonging to the collection of Plant Pathology Department at UFV was also tested. The following tests were performed: antagonism in direct confrontation, antibiosis and production of volatile metabolites. The fungi were compatible in antagonism test in direct confrontation. However, the antibiosis test, there was inhibition halo development in all treatments where in the *Trichoderma* isolated were grown in the above medium, indicating they have produced some antibiotics toxic to *P. chlamydosporia*. It was formed inhibition zone for treatments *P. chlamydosporia* x *T. asperellum* and *P. chlamydosporia* x *Trichoderma* isolated C-1, indicating that there was production of antibiotics in the culture medium by *P. chlamydosporia* that inhibited the growth of these isolates. In the volatile metabolites test, *P. chlamydosporia* did not produce compounds that influenced the mycelia growth of *Trichoderma* sp. However, volatile metabolites produced by *T. harzianum* and *Trichoderma* isolated C-1 reduced ($p < 0.05$) the growth of colonies of *P. chlamydosporia*. Already *Trichoderma* isolated T-1 and *T. asperellum* did not affect the mycelia growth of *P. chlamydosporia*. The greater compatibility occurred among isolates Pc-10 (*P. chlamydosporia*) and *Trichoderma* isolated T-1.

Keywords: antibiosis, direct confrontation, volatile metabolites.

1- INTRODUÇÃO

Os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp. Goeldi) estão entre os fitopatógenos que mais causam perdas na agricultura, devido a sua agressividade, ampla distribuição geográfica, diversidade de hospedeiros e diferença biológica ligada ao parasitismo entre populações da mesma espécie (Carneiro, 2001). Devido à grande importância desse gênero de nematoide, o manejo tem sido feito empregando diferentes métodos de controle, como o uso de nematicidas, rotação de culturas, variedades de plantas resistentes, solarização do solo e controle biológico (Almeida et al., 2005).

A utilização de nematicidas sintéticos tem sido restrita em vários países, pois são produtos altamente tóxicos, poluidores do ambiente e nem sempre eficientes, além de possuírem preço elevado. Métodos alternativos têm sido propostos com o objetivo de reduzir, ou até mesmo, substituir o uso de agrotóxicos, como por exemplo, o uso de microrganismos antagonistas para o controle biológico (Ferraz & Freitas, 2004).

O fungo *Pochonia chlamydosporia* (sin. *Verticillium chlamydosporium*, teleomorfo *Metacordyceps chlamydosporia*) (Zare et al., 2001; Sung et al., 2007) é um parasita facultativo de ovos e fêmeas de nematoides, considerado um dos agentes mais promissores de controle biológico (Kerry, 1975). O fungo coloniza rapidamente ovos e fêmeas de nematoides, destruindo de uma só vez grande quantidade de indivíduos (Stirling, 1991). Há relatos de *P. chlamydosporia* como agente de controle biológico do nematoide das galhas e dos cistos (Kerry & Bourne, 2002; Lopes et al., 2007; Dallemole-Giaretta et al., 2012), nematoide reniforme, falso nematoide das galhas, nematoide das lesões radiculares, nematoide cavernícola e nematoide espiralado (Wang et al., 2005; Pérez-Rodrigues et al., 2007; Freitas et al., 2009).

Pochonia chlamydosporia possui várias características que fazem dele um bom agente de biocontrole. Além de parasitar ovos, o fungo também possui atividade saprofítica, logo, independe da presença de ovos de nematoides no solo para a sua sobrevivência, crescendo satisfatoriamente em matéria orgânica. Em função dessa característica, esse agente de controle biológico possui maior facilidade de se estabelecer no solo. A capacidade de produzir clamidósporos é outra característica interessante. Os clamidósporos são usados como fonte de inóculo e essas estruturas de reserva nutricional e de sobrevivência auxiliam o estabelecimento do fungo no solo (Stirling, 1991).

Os fungos do gênero *Trichoderma* são considerados agentes de biocontrole de doenças foliares (Elad & Kapat, 1999), de patógenos do solo (Papavizas, 1985), e de

nematoides (Spiegel & Chet, 1998). A produção de metabólitos antifúngicos, competição por espaço e nutrientes, micoparasitismo, promoção de crescimento e indução de respostas de defesa das plantas têm sido sugeridos como mecanismos para a atividade de antagonista desse fungo (Chet et al., 1997; Howell, 2003). Além disso, espécies de *Trichoderma* produzem enzimas quitinolíticas, e o aumento na concentração de proteases e quitinases é, provavelmente, o responsável pela redução de populações de nematoides no solo, através da inativação ou mesmo do parasitismo direto dos ovos, além da indução de resistência sistêmica na planta (Sharon et al., 2001; Suarez et al., 2004). Existem vários relatos do parasitismo de ovos por *Trichoderma* (Spiegel & Chet, 1998; Sharon et al., 2001; Suarez et al., 2004).

A combinação de antagonistas pode ser uma estratégia interessante para o controle de fitonematoides. Os microrganismos podem possuir diferentes modos de ação, aumentando o espectro de ação, e afetar estádios de vida diferentes do patógeno, ou apresentar atividade diferenciada durante épocas distintas do ano (Lemanceau & Alabouvette, 1991; Meyer et al., 2001; Roberts et al., 2005). Entretanto, a combinação de microrganismos nem sempre é viável, pois alguns são incompatíveis, inibindo o crescimento um do outro (Reaves & Crawford, 1994). Dessa forma, antes de implementar o manejo é necessário conhecer as características dos organismos de controle biológico, e a interação que ocorre entre eles. Estudos de compatibilidade entre antagonistas são necessários para o desenvolvimento e sucesso dessa estratégia de manejo.

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar a compatibilidade *in vitro* entre o isolado Pc-10 de *Pochonia chlamydosporia* e isolados de *Trichoderma* sp., por meio de testes de confrontação direta, antibiose e produção de metabólitos voláteis.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das culturas para testes “*in vitro*”

Para este estudo, foi utilizado o isolado Pc-10 de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, componente ativo do produto Rizotec, em desenvolvimento pela empresa Rizoflora Biotecnologia S.A. O produto é formulado em pó com concentração média de 4×10^7 clamidósporos por grama da formulação.

Os isolados de *Trichoderma*, são componentes ativos de produtos formulados de diferentes empresas. O Ecotrich[®] WP, cedido pela empresa Ballagro, é um biofungicida composto pelo fungo *Trichoderma harzianum*, com registro para uso no controle biológico do Mofo Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). O Quality[®] é um produto desenvolvido pelo laboratório Farroupilha, composto pelo fungo *T. asperellum*, com registro para utilização no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium spp.* e *Rhizoctonia solani*. O terceiro produto, desenvolvido pela Coopacer (Cooperativa de Agronegócios do Cerrado Brasileiro LTDA, São Gotardo, MG), está em fase de desenvolvimento e ainda não é comercializado, e será doravante denominado *Trichoderma* isolado C-1.

Além desses produtos comerciais, também foi testado o isolado T-1 de *Trichoderma sp.*, pertencente a coleção do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides, do Departamento de Fitopatologia da UFV. Esse isolado foi previamente selecionado por apresentar rápido crescimento em meio de cultura, alta produção de conídios, e pelo parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* (Ferreira et al., 2008). O isolado foi mantido a 4°C em geladeira, preservado através da técnica de conservação em pedaços de papel-filtro mantidos em tubos contendo sílica-gel (Smith & Onions, 1983) e aqui denominado *Trichoderma* isolado T-1.

2.2. Compatibilidade entre *Pochonia chlamydosporia* e *Trichoderma spp.* em experimentos “in vitro”

Os fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Trichoderma spp.* foram submetidos a testes de confrontação direta, antibiose e efeito de metabólitos voláteis (Martins-Corder, 1998), modificado pelo uso de meio de cultivo BDA (Ferreira et al., 2008).

2.3. Teste de antagonismo em confrontação direta

Discos de BDA de 5mm de diâmetro contendo estruturas de *P. chlamydosporia* foram colocados em placa de Petri (90 mm x 15 mm), contendo meio BDA, a uma distância de 1,0 cm da borda. As culturas foram incubadas por 10 dias, a 26°C, na ausência de luz. Após esse período de incubação, um disco de micélio dos diferentes isolados de *Trichoderma sp.* foi colocado na placa de Petri, em posição oposta à colônia de *P. chlamydosporia*. As colônias foram incubadas a 26°C durante 3 dias, na ausência de luz. A avaliação foi feita com base em escala de notas adaptada por Bell et al., (1982), onde:

- 1 – colonização completa da placa por *P. chlamydosporia*;
- 2 – colonização de 2/3 da placa por *P. chlamydosporia*;
- 3 – colonização de 50% da placa por cada fungo;
- 4 – colonização de 2/3 da placa por *Trichoderma* sp.;
- 5 – colonização completa da placa por *Trichoderma* sp.

O delineamento experimental inteiramente casualizado foi utilizado, com 5 repetições por tratamento.

2.4. Teste de antibiose

A superfície do meio de cultura BDA foi coberta assepticamente com discos de membrana celofane (9,0 cm de diâmetro). Depois disso, um disco de micélio de cada isolado de *Trichoderma* sp. ou de *P. chlamydosporia* foi colocado separadamente no centro da placa (Dennis & Webster, 1971). Os fungos foram incubados por 48 horas, a 26°C, na ausência de luz. Após esse período, o diâmetro médio das colônias foi demarcado na parte inferior da placa, e a cultura fúngica crescida sobre a membrana celofane foi removida, juntamente com a membrana. As placas de petri foram invertidas, e 1mL de clorofórmio foi adicionado na sua parte inferior, a fim de eliminar resíduos do fungo. Após a evaporação do produto, as placas foram colocadas em sua posição original e deixadas por 30 minutos sob irradiação direta de luz ultravioleta, no interior da câmara de fluxo laminar. Em seguida, uma suspensão aquosa de 1mL contendo conídios e clamidósporos de *P. chlamydosporia* foi adicionada sobre a superfície do meio de cultura nas placas onde cresceu cada isolado do fungo *Trichoderma* sp, e uma suspensão de conídios de cada isolado do fungo *Trichoderma* sp. foi adicionada onde havia crescido *P. chlamydosporia*. As suspensões foram espalhadas uniformemente sob o meio com auxílio da alça de Drigalsky. Essas suspensões foram obtidas de colônias previamente cultivadas em meio de cultivo BDA, por 10 dias, a 26°C. O mesmo procedimento foi realizado para os tratamentos controle, que consistiram do cultivo de *P. chlamydosporia* e subsequente adição da suspensão contendo estruturas de *P. chlamydosporia*, sendo igual para o controle *Trichoderma* sp.

As placas foram mantidas a 26°C, na ausência de luz por 5 dias, quando foi avaliada a presença ou ausência do halo de inibição ao crescimento de *P. chlamydosporia* formado pelos isolados de *Trichoderma* sp., ou vice-versa, e de *P. chlamydosporia* formado sobre *P. chlamydosporia*, e *Trichoderma* sp. formado sobre

Trichoderma sp. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento.

2.5. Efeito de metabólitos voláteis

O método consiste em posicionar duas tampas de placas de Petri uma sobre a outra (Bharat et al.,1980), após ter sido vertido o meio de cultivo BDA em cada uma delas. Na parte inferior da placa, foi colocado um disco de cultura BDA contendo micélio dos isolados de Trichoderma sp., e na superior, um disco de BDA contendo micélio de *P. chlamydosporia*. Também foi realizado o contrário, e para os tratamentos controle foi feito o cultivo de *P. chlamydosporia* na parte superior e inferior da placa, e o mesmo para cada controle dos diferentes isolados de Trichoderma sp. As placas foram vedadas lateralmente com membrana plástica e, em seguida, mantidas a 26°C, por 3 dias, na ausência de luz. O diâmetro das colônias foi medido, sendo comparado com o controle contendo somente um dos organismos nas placas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento.

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste Duncan a 5% de significância.

3- RESULTADOS

No teste de confrontação direta, avaliando-se a competição por espaço e nutrientes, *P. chlamydosporia* e *T. asperellum* colonizaram aproximadamente 50% da placa, sendo atribuída a nota 3 de acordo com a escala, ou seja, não houve crescimento de uma colônia sobre a outra, portanto, não foi observado o antagonismo direto entre elas. O mesmo padrão de crescimento foi observado para os outros tratamentos, *P. chlamydosporia* e *T. harzianum*, *P. chlamydosporia* e Trichoderma isolado C-1, e *P. chlamydosporia* e Trichoderma isolado T-1 (Figura 1).

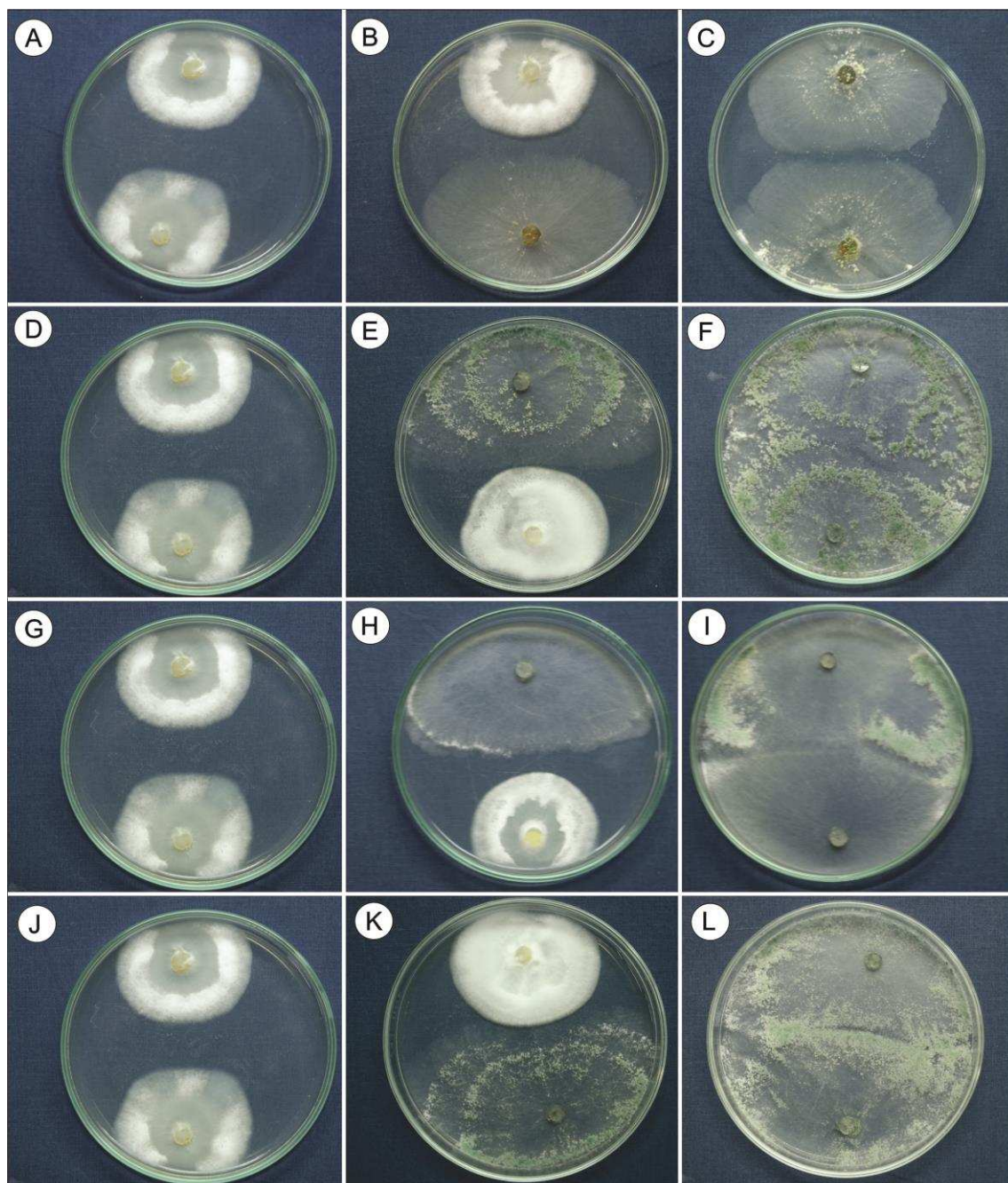


Figura 1- Teste de confrontação direta entre colônias. **A, D, G e J:** *Pochonia chlamydosporia* x *P. chlamydosporia*, **B:** *P. chlamydosporia* x *Trichoderma asperellum*, **C:** *T. asperellum* x *T. asperellum*, **E:** *P. chlamydosporia* x *Trichoderma* isolado T-1, **F:** *Trichoderma* isolado T-1 x *Trichoderma* isolado T-1, **H:** *P. chlamydosporia* x *Trichoderma* isolado C-1, **I:** *Trichoderma* isolado C-1 x *Trichoderma* isolado C-1, **K:** *P. chlamydosporia* x *T. harzianum*, **L:** *T. harzianum* x *T. harzianum*.

Os metabólitos voláteis de *P. chlamydosporia* não influenciaram significativamente ($p < 0,05$) o crescimento dos isolados de *Trichoderma* sp. (Tabela 1). Quanto aos metabólitos voláteis produzidos pelos isolados de *Trichoderma* sp. sobre Pc-10, os fungos *T. harzianum* e *Trichoderma* isolado C-1 reduziram ($p < 0,05$) o

crescimento das colônias de *P. chlamydosporia*. Entretanto, não houve efeito significativo dos compostos voláteis produzidos por *T. asperellum* e *Trichoderma* isolado T-1 sobre o crescimento micelial de *P. chlamydosporia* (Tabela 2).

Tabela 1- Média e desvio padrão dos valores da área de crescimento micelial dos isolados de *Trichoderma* sp., submetidos ao teste de produção de metabólitos voláteis produzidos pelo fungo *P. chlamydosporia*.

Trichoderma sp. (parte superior da placa)	
Tratamento	Área (cm ²)
Trichoderma Isolado T-1 x Trichoderma Isolado T-1	29,71 ± 5,17 ^{ns}
Trichoderma Isolado T-1 x <i>P. chlamydosporia</i>	41,15 ± 21,5 ^{ns}
<i>T. asperellum</i> x <i>T. asperellum</i>	17,34 ± 3,50 ^{ns}
<i>T. asperellum</i> x <i>P. chlamydosporia</i>	22,87 ± 7,29 ^{ns}
<i>T. harzianum</i> x <i>T. harzianum</i>	26,61 ± 7,68 ^{ns}
<i>T. harzianum</i> x <i>P. chlamydosporia</i>	21,77 ± 3,32 ^{ns}
Trichoderma Isolado C-1 x Trichoderma isolado C-1	25,22 ± 21,87 ^{ns}
Trichoderma Isolado C-1 x <i>P. chlamydosporia</i>	28,40 ± 7,27 ^{ns}
CV(%)	48,02

^{ns}: Não significativo pelo teste F, a 5 % de probabilidade.

Tabela 2- Média e desvio padrão dos valores da área de crescimento micelial de *P. chlamydosporia* submetida ao teste de produção de metabólitos voláteis produzidos pelos fungos: *Trichoderma* isolado T-1, *T. asperellum*, *T. harzianum* e *Trichoderma* isolado C-1.

<i>P. chlamydosporia</i> (parte superior da placa)	
Tratamento	Área (cm ²)
<i>P. chlamydosporia</i> x <i>T. harzianum</i>	0,87 ± 0,239 a
<i>P. chlamydosporia</i> x <i>Trichoderma</i> isolado C-1	0,89 ± 0,159 a
<i>P. chlamydosporia</i> x <i>Trichoderma</i> isolado T-1	1,07 ± 0,393 ab
<i>P. chlamydosporia</i> x <i>T. asperellum</i>	1,23 ± 0,105 b
<i>P. chlamydosporia</i> x <i>P. chlamydosporia</i>	1,23 ± 0,053 b
CV(%)	24,46

Médias de cinco repetições; médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan, a 5 % de probabilidade.

No teste de antibiose formou-se halo de inibição nos tratamentos *Trichoderma asperellum* x *P. chlamydosporia*, *Trichoderma harzianum* x *P.*

chlamydosporia, Trichoderma isolado C-1 x *P. chlamydosporia* e Trichoderma isolado T-1 x *P. chlamydosporia* (Figura 2). O crescimento prévio de *P. chlamydosporia* no meio não resultou em inibição do crescimento dos isolados *T. harzianum* e Trichoderma isolado T-1, porém *P. chlamydosporia* inibiu o crescimento de *T. asperellum* e Trichoderma isolado C-1 (Figura 2).

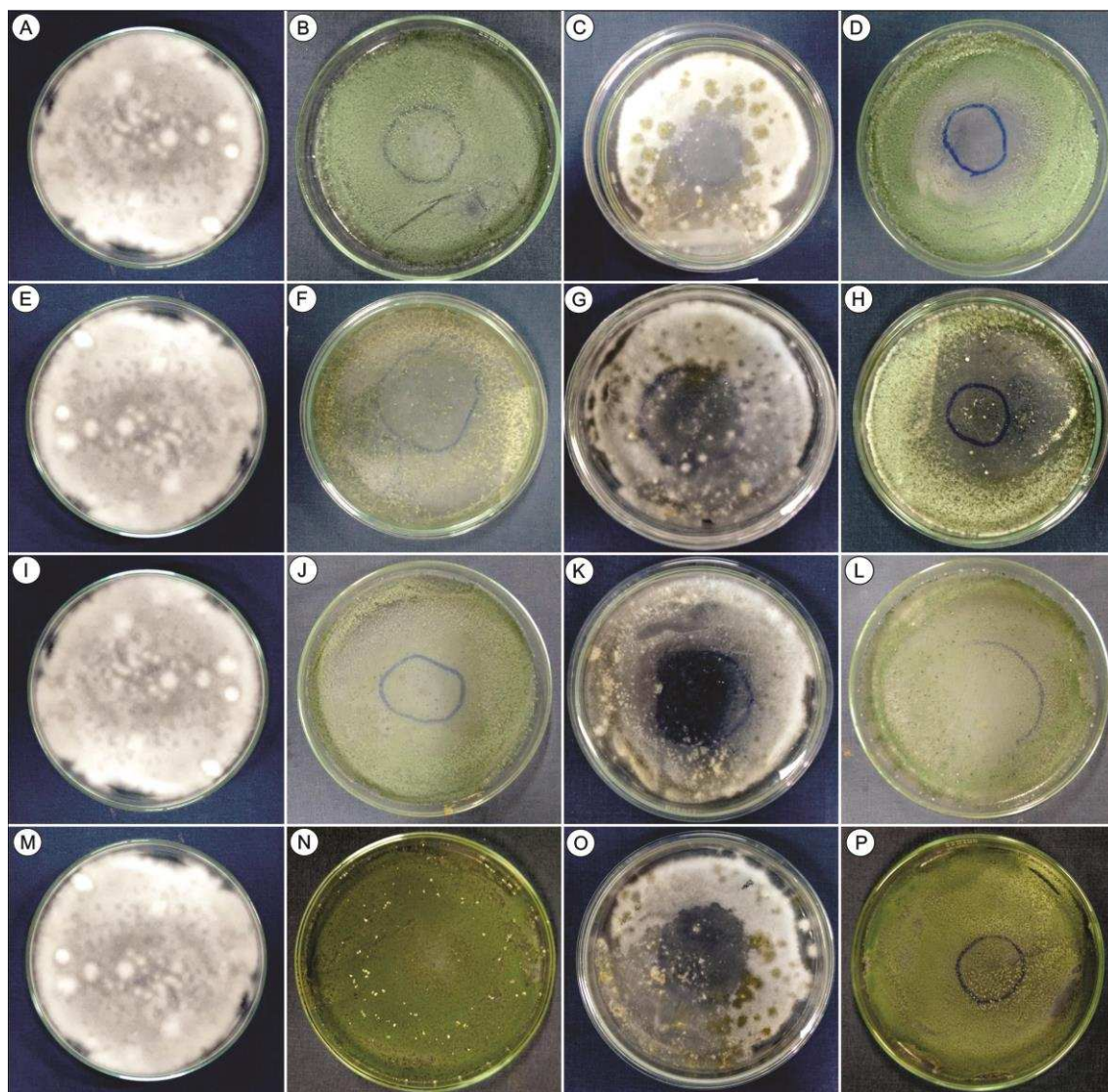


Figura 2- Teste de antibiose. **A, E, I e M:** *Pochonia chlamydosporia* x *P. chlamydosporia*, **B:** *Trichoderma asperellum* x *T. asperellum*, **C:** *T. asperellum* x *P. chlamydosporia*, **D:** *P. chlamydosporia* x *T. asperellum*, **F:** Trichoderma isolado C-1 x Trichoderma isolado C-1, **G:** Trichoderma isolado C-1, x *P. chlamydosporia*, **H:** *P. chlamydosporia* x Trichoderma isolado C-1, **J:** Trichoderma isolado T-1 x Trichoderma isolado T-1, **K:** Trichoderma isolado T-1 x *P. chlamydosporia*, **L:** *P. chlamydosporia* x Trichoderma isolado T-1, **N:** *T. harzianum* x *T. harzianum*, **O:** *T. harzianum* x *P. chlamydosporia*, **P:** *P. chlamydosporia* x *T. harzianum*. Os círculos nas placas são a demarcação do crescimento das colônias fúngicas, cultivadas anteriormente.

4- DISCUSSÃO

No teste de confrontação direta, não foi observado antagonismo direto entre *Pochonia chlamydosporia* e os isolados de *Trichoderma* sp., e nem entre os isolados de *Trichoderma* sp. e *P. chlamydosporia*. Resultados semelhantes foram encontrados por Ferreira et al. (2008), em que *Trichoderma* sp. e *P. chlamydosporia* não influenciaram o crescimento um do outro em testes de confronto direto. Essa compatibilidade não foi observada por Jacobs & Crump (2003), que relataram que *P. chlamydosporia* foi capaz de inibir o crescimento radial de *Paecilomyces lilacinus* e *Trichoderma harzianum*, e o seu crescimento foi o menos inibido pelos outros fungos, e por Martins-Corder (1998), que relatou a capacidade de isolados do fungo *Trichoderma* sp. em reduzir o crescimento de colônias de *Verticillium dahliae*.

Os compostos voláteis de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma* isolado C-1 reduziram ($p < 0,05$) o crescimento das colônias de *P. chlamydosporia*. Entretanto, não houve efeito dos compostos produzidos por *Trichoderma* isolado T-1 e *T. asperellum* sobre o crescimento micelial de *P. chlamydosporia* (Tabela 2). *P. chlamydosporia* também não produziu compostos que influenciaram o crescimento micelial dos isolados de *Trichoderma* sp. (Tabela 1). Apesar de Ferreira et al. (2008) terem observado a redução do crescimento micelial desse mesmo isolado de *P. chlamydosporia* devido a ação de metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* sp., essa diferença pode ser resultado de alguma mudança fenotípica ocorrida entre os oitos anos de repicagem que separam os dois experimentos, ou pelo tempo maior em que os dois fungos ficaram em ambiente hermeticamente fechado no estudo de Ferreira et al. (2008), de 7 dias de incubação e o desse estudo, que foi de apenas 3 dias.

É importante salientar que o solo é um ambiente arejado e o efeito de compostos voláteis de um fungo sobre o outro deve ser bem menor do que em testes *in vitro*, ou muito possivelmente nulo. Em estudos realizados por Monteiro (2013), não houve efeito dos metabólitos produzidos por *P. chlamydosporia* sobre *Duddingtonia flagrans* e nem dos metabólitos voláteis de *D. flagrans* sobre *P. chlamydosporia*.

Em trabalhos de Martins-Corder (1998) a produção de compostos voláteis de isolados do fungo *Trichoderma* reduziram o crescimento de colônias de *Verticillium dahliae*. Fungos como *T. viride* e *T. koningii* produzem metabólitos voláteis em meio de cultura, que atuam sobre fungos suscetíveis inibindo o crescimento micelial (Dennis & Webster, 1971). Estudos com isolados de *Trichoderma* sp. e *Paecilomyces lilacinus*

mostraram que os fungos são compatíveis pelos testes de confronto direto e de produção de metabólitos voláteis (Santin, 2008).

No teste de antibiose, o crescimento de *P. chlamydosporia* foi inibido por todos os isolados de *Trichoderma* sp. *P. chlamydosporia* inibiu o crescimento de *T. asperellum* e *Trichoderma* isolado C-1. De acordo com os resultados, os isolados de *Trichoderma* sp. produziram antibióticos que impediram o desenvolvimento de *P. chlamydosporia*, sendo este também capaz de produzir substâncias antibióticas que inibissem o crescimento dos dois isolados de *Trichoderma* sp. Monteiro (2008) relatou a inibição do crescimento de *Duddingtonia flagrans* por *P. chlamydosporia* em testes de antibiose. Martins-Corder (1998) encontrou resultados em que os isolados de *Trichoderma* sp. produziram antibióticos que inibiram o crescimento de *V. dahliae*. Os mesmos resultados foram encontrados por Ethur et al. (2005), em que isolados de *T. virens* foram capazes de promover maior porcentagem de inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* em testes de antibiose e de confrontação direta.

Existem relatos de micoparasitismo de *Pochonia chlamydosporia* sobre fungos fitopatogênicos (Jacobs & Crump, 2003; Monfort et al., 2005; Khan et al., 2011). *P. chlamydosporia* produz várias enzimas, e dentre elas, as quitinases, necessárias para a degradação de quitina, componente da parede celular de suas hifas, o que promove o desenvolvimento micelial (Takaya et al., 1998). Essas enzimas são também produzidas por fungos antagonistas a outros micoparasitas fúngicos, ou seja, a ação das enzimas quitinolíticas produzidas por *P. chlamydosporia* podem ter afetado o crescimento dos isolados de *Trichoderma* sp. neste estudo. As enzimas quitinolíticas desse fungo atuam no parasitismo de ovos de nematoides após a ação da enzima protease serina tipo subtilisina, que remove a membrana proteica vitelínica do ovo e expõe as camadas de quitina. O fungo *Trichoderma* também produz quitinases e sua função na infecção de outros fungos já foi comprovada (Chet et al., 1997; Zeilinger et al., 1999). A presença de uma protease serina tipo subtilisina foi relatada em *T. atroviridae* como uma das enzimas envolvidas no micoparasitismo (Seidl et al., 2009).

Trichoderma spp. são fungos de ampla distribuição natural nos solos, com habilidade de parasitar outros fungos, e de produzir várias substâncias antibióticas, sendo estas voláteis e não-voláteis. Além disso, competem com outros organismos por espaço e nutrientes. Porém, nesse estudo, os isolados de *Trichoderma* sp. não interferiram no crescimento de *P. chlamydosporia* nos testes de confrontação direta. Entretanto, no teste de metabólitos voláteis, apenas os isolados *T. harzianum* e *Trichoderma* isolado C-1 afetaram o crescimento das colônias de *P. chlamydosporia*. Os

resultados dos testes de antibiose indicam que os isolados de *Trichoderma* sp. produziram algum antibiótico no meio, que impediu o crescimento de *P. chlamydosporia*. O mesmo aconteceu para alguns isolados de *Trichoderma* sp. nas placas em que *P. chlamydosporia* foi cultivada previamente.

O manejo de pragas e doenças no campo tem sido realizado através da utilização de várias práticas de controle. Os produtos biológicos têm se destacado nos últimos anos como alternativa ao uso de agrotóxicos. Vários produtos são utilizados em uma mesma cultura para o controle de diversas pragas e doenças. Existem produtos a base de *Trichoderma* que já são vendidos no mercado, sendo que a maioria é registrada para controle de doença fúngicas. Para que outro produto de origem biológica seja aplicado em conjunto é necessário saber se estes são compatíveis. Testes *in vitro*, casa de vegetação e depois em campo são muito importantes para comprovar a eficiência de antagonistas combinados.

Pochonia chlamydosporia e *Trichoderma* isolado T-1 foi a combinação mais compatível, pois apesar de todos os isolados de *Trichoderma* sp. terem afetado o crescimento de *P. chlamydosporia* nos testes de antibiose, *P. chlamydosporia* não produziu antibiótico contra *Trichoderma* isolado T-1, além disso, *Trichoderma* isolado T-1 não produziu metabólitos voláteis contra *P. chlamydosporia*, e vice-versa. Não foi observado antagonismo direto entre os fungos em nenhuma das combinações estudadas.

Vários organismos sobrevivem e interagem entre si nos diferentes solos, sob a influência de fatores como teor de matéria orgânica, pH, macro e micronutrientes, umidade, textura, estrutura, micro e macroporosidade e trocas gasosas, que influenciam significativamente o crescimento dos fungos no solo. Apesar desses estudos *in vitro* não levarem em consideração esses fatores que podem alterar o comportamento desses organismos quando em conjunto, os resultados observados são indicativos de compatibilidade no ambiente solo.

5- CONCLUSÕES

- Todos os isolados de *Trichoderma* sp. produziram antibióticos que inibiram o crescimento de Pc-10;
- Pc-10 produziu antibióticos tóxicos à *T. asperellum* e *Trichoderma* isolado C-1.;
- Pc-10 não produziu metabólitos voláteis tóxicos contra os isolados de *Trichoderma*;
- Os metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma* isolado C-1 inibiram o crescimento de Pc-10;
- Não houve antagonismo entre os fungos nos testes de confrontação direta.
- A maior compatibilidade ocorreu entre os isolados Pc-10 e *Trichoderma* isolado T-1.

6- REFERÊNCIAS

- Almeida, A. M. R.; Kimati, H. & Amorim, L. 2005. Doenças da soja. In: Kimati, H. et al. Manual de fitopatologia. São Paulo: Agronômica Ceres, 569-588.
- Bell, D.K., Wells, H.D., Markham, C.R., 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72, 379-382.
- Bharat, R., Singh, V.N., Singh, D.B., 1980. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. *Plant and Soil*, 57(1), 131-135.
- Carneiro, R.M.D.G, 2001. Principios e Tendências do Controle Biológico de Nematoides com Fungos Nematófagos. *Pesquisa agropecuária brasileira* 27, 133-121.
- Chet, I., Inbar, J., Hadar, I., 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Springer-Verlag, Berlin, 165-184.
- Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L.G., Lopes, E.A., Pereira, O.L., Zooca, R.J., Ferraz, S., 2012. Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. *Crop Protection* 42, 102-107.
- Dennis, C., Webster, J., 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society* 57, 41-IN44.
- Eapen, S.J., Beena, B., Ramana, K.V., 2005. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88(3), 218-225.
- Elad, Y., Kapat, A., 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 105, 177-189.
- Ethur, L.Z., Blume, E., Muniz, M., Silva, A.D., Stefanelo, D.R., Rocha, E.D., 2005. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. *Fitopatologia Brasileira*, 30, 127-133.
- Ferraz, S., Freitas, L.G., 2004. Use of antagonistic plants and natural products. *Nematology-Advances and perspectives* 2, 931-97.
- Ferreira, P.A., Ferraz, S., Lopes, E.A., Freitas, L.G., 2008. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. *Rev. Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas* 2,15.
- Freitas, L.G., Dallemole-Giaretta, R., Ferraz, S., Zooca, R.J.F., Podestá, G.S., 2009. Controle biológico de nematoides: estudo de casos. Zambolim, L.; Picanço, M.C. Controle biológico pragas e doenças exemplos práticos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1, 41-82.

Howell, C.R., 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease* 87, 4-10.

Jacobs, H., Crump, D.H., 2003. Interactions between nematophagous fungi and consequences for their potential as biological agents for the control of potato cyst nematodes. *Mycological Research* 107, 47-56.

Kerry, B.R., 1975. Fungi and the Decrease of Cereal Cyst-nematode Populations in Cereal Monoculture1. *EPPO Bulletin* 5, 353-361.

Kerry, B.R., Bourne, J.M. 2002. A Manual for research on *Verticillium chlamydosporium*: a potential biological control agent for root-knot nematodes. Gent, Belgium. 84p.

Khan, M.R., Majid, S., Mohidin, F.A., Khan, N., 2011. A new bioprocess to produce low cost powder formulations of biocontrol bacteria and fungi to control fusarial wilt and root-knot nematode of pulses. *Biological Control* 59, 130-140.

Lemanceau, P., Alabouvette, C., 1991. Biological control of Fusarium diseases by *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Protection* 10, 279-286.

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*. *Nematologia Brasileira*, 31(2), 78-84.

Martins-Corder, M.P., 1998. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. *Scientia Agricola* 55, 1-7.

Meyer, S.L., Roberts, D.P., Chitwood, D.J., Carta, L.K., Lumsden, R.D., 2001. Application of *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma virens*, alone and in combinations, against *Meloidogyne incognita* on bell pepper. *Nematropica* 31, 75-86.

Monfort, E., Lopez-Llorca, L.V., Jansson, H.B., Salinas, J., Park, J.O., Sivasithamparam, K., 2005. Colonisation of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root-rot. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 1229-1235.

Monteiro, T.S.A. 2013. Controle biológico do nematoide das galhas, *Meloidogyne javanica*, e promoção de crescimento vegetal com os fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia flagrans*. Dissertação (Mestrado do Programa de pós graduação em fitopatologia) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 16p.

Papavizas, G.C., 1985. *Trichoderma* and *Gliocadium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual review of phytopathology* 23, 23-54.

Pérez-Rodríguez, I., Doroteo-Mendoza, A., Franco-Navarro, F., Santiago-Santiago, V., Montero-Pineda, A., 2007. Isolates of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* from Mexico as potential biological control agents of *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 37, 127-140.

Reaves, J.L., Crawford, R.H., 1994. In vitro colony interactions among species of *Trichoderma* with inference toward biological control. Research paper PNW-RP (USA).8p.

Santin, R.C.M., 2008. Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris*. 2008, 91 f. Tese (Doutorado do programa de pós graduação em fitotecnia, área de concentração fitossanidade) Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.36p.

Seidl, V., Song, L., Lindquist, E., Gruber, S., Koptchinskiy, A., Zeilinger, S., Schmoll, M., Martínez, P., Sun, J., Grigoriev, I., 2009. Transcriptomic response of the mycoparasitism fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. *BMC genomics* 10, 1.

Sharon, E., Bar-Eyal, M., Chet, I., Herrera-Estrella., A., Kleifeld, O., Spiegel, Y., 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 91, 687-693.

Smith, D., Onios, A.H., 1983. The preservation and maintenance of living fungi in soil. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 51 p.

Spiegel, Y., Chet, I., 1998. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agents against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. *Integrated Pest Management Reviews* 3, 169-175.

Stirling, G.R., 1991. Biological control of nematodes: progress, problems and prospects. CAB International, Wallingford, United Kingdom. 282p.

Suarez, B., Rey, M., Castillo, P., Monte, E., Lobell, A., 2004. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. *Applied microbiology and biotechnology* 65, 46-55.

Sung, G.H., Hywel-Jones, N.L., Sung, J.M., Luangsa-ard, J.J., Shrestha, B., S patafora, J.W., 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology* 57, 5-59.

Takaya, N., Yamazaki, D., Horiuchi, H., Ohta, A., Takagi, M., 1998. Intracellular chitinase gene from *Rhizopus oligosporus*: molecular cloning and characterization. *Microbiology* 144, 2647-2654.

Wang, K., Riggs, R.D., Crippen, D. 2005. Isolation, selection, and efficacy of *Pochonia chlamydosporia* for control of *Rotylenchulus reniformis* on cotton. *Phytopathology*, 95(8), 890-893.

Zare, R, Gams, W., Evans, H.C., 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia* 73, 51-86.

Zeiling, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S.L., Mach, R.L., Fekete, C., Lorito, M., Kubicek, C.P., 1999. Chitinase Gene Expression during Mycoparasitic Interaction of *Trichoderma harzianum* with Its Host. *Fungal Genetics and Biology* 26, 131-140.

CAPÍTULO 2: Compatibilidade entre *Pochonia chlamydosporia* e *Trichoderma* spp. no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro

Resumo

Foram realizados dois experimentos em casa de vegetação, cujo objetivo foi avaliar a compatibilidade entre *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) e isolados de *Trichoderma* sp. no controle de *Meloidogyne javanica* e na promoção de crescimento do tomateiro. Os tratamentos consistiram do uso isolado e combinado de Pc-10 com diferentes isolados de *Trichoderma* sp., componentes ativos de produtos formulados, de diferentes empresas: Ecotrich® WP, *T. harzianum*, empresa Ballagro; Quality®, *T. asperellum* do laboratório Farroupilha, e o terceiro produto foi desenvolvido pela cooperativa Coopacer, sendo denominado *Trichoderma* isolado C-1. O isolado T-1 de *Trichoderma* sp. pertencente à coleção do Departamento de Fitopatologia da UFV também foi testado. Foram utilizados 5.000 clamidósporos g⁻¹ de solo de Pc-10 e 200.000 conídios g⁻¹ de solo dos isolados de *Trichoderma* sp. Os experimentos foram realizados no delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 7 repetições por tratamento. Foi avaliado: número de ovos e galhas g⁻¹ de raiz, altura da parte aérea (APA), massa da parte aérea fresca (MPAF), massa da parte aérea seca (MPAS), massa da raiz fresca (MRF) e massa da raiz seca (MRS) das plantas. Não houve efeito ($p < 0,05$) para APA, MPAF, MPAS, MRF e MRS para os dois experimentos. No experimento 1, os tratamentos Pc-10 + *Trichoderma* isolado T-1, Pc-10 + *Trichoderma* isolado C-1, *T. harzianum* e *Trichoderma* isolado T-1 reduziram o número de ovos g⁻¹ de raiz em relação ao controle ($p < 0,05$). Não houve diferença quanto ao número de galhas g⁻¹ de raiz. Já no experimento 2, Pc-10 + *T. asperellum* e Pc-10 + *T. harzianum* reduziram o número de ovos g⁻¹ de raiz em 62 e 55% respectivamente. Avaliando-se o número de unidades formadoras de colônia (UFC) de Pc-10 g⁻¹ de solo, em ambos experimentos, *Trichoderma* isolado T-1 foi o isolado que menos influenciou o crescimento de Pc-10 no solo. Um segundo ensaio foi realizado para avaliar a combinação de Pc-10 com *Trichoderma* isolado T-1 na presença e ausência de *M. javanica*. Não houve promoção de crescimento das plantas. O tratamento Pc-10 foi o mais eficiente em reduzir o número de ovos g⁻¹ de raiz. Conclui-se que, a combinação de Pc-10 com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. tem potencial para o controle do nematoide das galhas.

Palavras-chave: controle biológico, fungo nematófago, nematoide das galhas.

Compatibility between *Pochonia chlamydosporia* and *Trichoderma* spp. in control of *Meloidogyne javanica* in tomato

Abstract

Two experiments were conducted in a greenhouse, whose objective was to evaluate the compatibility between *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) and *Trichoderma* sp. in the *Meloidogyne javanica* control and tomato growth promoting. The treatments consisted of isolated and combined use of Pc-10 with different isolated of *Trichoderma* sp., active components of formulated products from different companies: Ecotrich[®] WP, *T. harzianum*, Ballagro company; Quality[®], *T. asperellum*, Farroupilha laboratory and the third product was developed by cooperative Coopacer, being named *Trichoderma* isolated C-1. The isolated T-1 of *Trichoderma* sp., belonging to the collection of UFV Plant Pathology Department was also tested. 5,000 chlamydospores g⁻¹soil of Pc-10 and 200,000 conidia g⁻¹ soil isolated of *Trichoderma* sp.were used. The experiments were conducted in a completely randomized design with 7 replicates. It was evaluated: number of eggs and galls g⁻¹ root, aerial part height (APH), mass of fresh shoots (MFS), mass of dry shoot (MDS), mass of fresh root (MFR) and mass of dried root (MDR) plants. There was not effect ($p < 0.05$) for APH, MFS, MSD, MRF and MDR for the two experiments. In experiment 1, the treatments Pc-10 + *Trichoderma* isolated T-1, Pc-10 + *Trichoderma* isolated C-1, *T. harzianum* and *Trichoderma* isolated T-1, reduced the number of eggs g⁻¹ root compared to the control ($p < 0.05$). There was no difference in the number of galls g⁻¹ root. In the experiment 2, Pc-10 + *T. asperellum* and P-10 + *T. harzianum* reduced the number of eggs g⁻¹ root in 62 and 55% respectively. Evaluating the number of colony former units (CFU) Pc-10 g⁻¹ soil, in both experiments, *Trichoderma* isolated T-1 was isolated that less influenced the growth of Pc-10 in the soil. A second assay was conducted to evaluate the combination between Pc-10 with isolated *Trichoderma* T-1 in the presence and absence of *M. javanica*. There was not growth promotion of plants. Pc-10 was the most effective treatment in reducing the number of eggs g⁻¹ root. In conclusion, the Pc-10 combination with different isolate of *Trichoderma* sp. has the potential for root-knot nematode control.

Keywords: biological control, nematophagous fungus, root-knot nematode.

1- INTRODUÇÃO

Fitonematoides são responsáveis por grandes perdas agrícolas mundiais que totalizam um valor estimado de U\$ 157 bilhões de dólares anualmente (Abad et al., 2008). Os nematoides do gênero *Meloidogyne* spp. Goeldi são considerados um dos patógenos de maior importância econômica, além de causar sérios danos às culturas, se encontra amplamente disseminados e apresentam grande diversidade de hospedeiros (Taylor & Sasser, 1983).

O uso de nematicidas químicos é uma das estratégias de manejo para o controle de nematoides. Entretanto, sua utilização está cada vez mais restrita, e já foi proibida em vários países. Apesar de moderadamente eficientes, são produtos altamente tóxicos ao meio ambiente e ao ser humano. Devido ao grande risco que esses produtos oferecem, surgiu a necessidade de desenvolver estratégias sustentáveis de manejo contra esses patógenos, como por exemplo, o controle biológico (Abad et al., 2008).

Vários organismos são considerados inimigos naturais dos fitonematoides, sendo que os fungos e as bactérias são os que apresentam maior potencial como agente de biocontrole (Jatala, 1986; Kerry, 1990; Stirling, 1991).

Pochonia chlamydosporia (sin. *Verticillium chlamydosporium*, teleomorfo *Metacordyceps chlamydosporia*) (Zare et al., 2001; Sung et al., 2007) é um fungo parasita facultativo de fêmeas, cistos e ovos de nematoides, e mostrou ser um potencial agente de controle biológico em vários trabalhos (De Leij et al., 1993; Kerry et al., 1993; Atkins et al., 2003; Wang et al., 2005; Dallemole-Giaretta et al., 2012; Viggiano et al., 2014). Esse fungo possui várias características que o tornam um bom agente de controle biológico. O fungo produz clamidósporos, estruturas multicelulares de parede grossa que possuem armazenamento de reservas nutricionais e permitem a sua sobrevivência e estabelecimento no solo. Geralmente essas estruturas são utilizadas como fonte de inóculo (Kerry & Bourne, 2002). Além disso, o fungo possui boa atividade saprofítica, portanto, não depende da presença de ovos de nematoide no solo para sua sobrevivência (Kerry et al., 1982). Outra característica interessante é que *P. chlamydosporia* pode colonizar o sistema radicular das plantas hospedeiras, promovendo o crescimento vegetal (Bourne et al., 1994; Lopez-Llorca et al., 2002; Dallemole-Giaretta, 2015).

Os fungos do gênero *Trichoderma* foram reconhecidos como agente de controle biológico de doenças de plantas pela primeira vez em 1930 (Weindling, 1932). Existem trabalhos que relatam o antagonismo desse gênero a patógenos que causam doenças

foliares (Elad & Kapat, 1999) e doenças do solo (Papavizas, 1985), inclusive a nematoides (Spiegel & Chet, 1998).

O principal modo de ação de *Trichoderma* spp. sobre os nematoides é a produção de metabólitos tóxicos, porém há relatos desse fungo parasitando ovos (Spiegel & Chet, 1998; Eapen et al., 2005; Khattak, 2008; Mukhtar et al., 2012; Szabó et al., 2012). O fungo produz quitinases, característica que o torna eficaz contra patógenos que possuem quitina. O aumento da atividade de protease e quitinase é, provavelmente, a responsável pela redução da infestação de nematoides, através do parasitismo direto de ovos (Sharon et al., 2001; Suarez et al., 2004). A ação de *Trichoderma* também pode ocorrer no hospedeiro. A colonização de raízes das plantas promove o crescimento, aumenta a produtividade, e melhora a resistência a estresses abióticos (Harman et al., 2004).

O controle biológico que ocorre naturalmente resulta da ação de vários microrganismos (Siddiqui & Shaukat, 2002; Siddiqui & Shaukat, 2003). A combinação de organismos pode favorecer o controle de nematoides, pois os antagonistas podem possuir modos de ação diferentes, podendo afetar fases distintas do ciclo de vida do patógeno (Lemanceau & Alabouvette, 1991; Meyer & Roberts, 2002). Porém, é necessário conhecer a interação entre os organismos, pois essa combinação pode ser incompatível ou ter propriedades antagônicas (Reaves & Crawford, 1994). Portanto, é necessário realizar estudos sobre a compatibilidade de microrganismos antes de fazer o uso conjunto desses antagonistas.

O presente trabalho teve como objetivo, estudar a compatibilidade entre *Pochonia chlamydosporia* e isolados de *Trichoderma* sp. no controle de *Meloidogyne javanica* em condições de casa-de-vegetação para possível aplicação conjunta desses organismos no campo.

2- MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agricultura (BIOAGRO), e em casa de vegetação pertencentes ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

2.1. Obtenção e preparo do inóculo de *Meloidogyne javanica*

O inóculo de *M. javanica* foi obtido através de ovos de população pura do nematoide, mantidos em raízes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), cultivados em casa de vegetação. A extração dos ovos foi realizada através da técnica de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981). Raízes infestadas foram lavadas cuidadosamente em água corrente, cortadas em fragmentos de aproximadamente 2 cm de comprimento, e trituradas em liquidificador em baixa velocidade por 20 segundos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 %. A suspensão aquosa contendo ovos e juvenis de nematoide foi vertida em duas peneiras granulométricas sobrepostas, a superior com abertura de malha de 0,074 mm (200 mesh) e a inferior com abertura de 0,025 mm (500 mesh). Os ovos e juvenis retidos na última peneira foram lavados com água de torneira e, com o auxílio de uma pisseta, recolhidos em um béquer. Essa suspensão contendo ovos do nematoide foi calibrada em câmara de Peters e microscópio estereoscópio.

2.2. Preparo das mudas de tomate

Mudas de tomateiro cultivar Santa Clara foram semeadas em bandejas de isopor com 128 células, contendo substrato organo-mineral inerte (Plantmax®). Essas mudas foram utilizadas para a montagem dos experimentos, manutenção e multiplicação da população de *M. javanica*, sendo transplantadas aos 21 dias de idade.

2.3. Obtenção e produção dos inóculos fúngicos

Para este estudo foram utilizados os fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Trichoderma* sp. O isolado Pc-10 de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, componente ativo do produto Rizotec, ainda em desenvolvimento, foi fornecido pela

empresa Rizoflora Biotecnologia S.A. O produto é formulado em pó com concentração média de 4×10^7 clamidósporos por grama da formulação.

Os isolados do fungo *Trichoderma* sp., são componentes ativos de produtos formulados, obtidos de algumas empresas. O Ecotrich[®] WP, cedido pela empresa Ballagro, é um biofungicida composto pelo fungo *Trichoderma harzianum*, com registro para uso no controle biológico do Mofo Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). O Quality[®] é um produto desenvolvido pelo laboratório Farroupilha, composto pelo fungo *T. asperellum*, com registro para utilização no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* spp. e *Rhizoctonia solani*. O terceiro produto a base de *Trichoderma* sp. está sendo desenvolvido pela cooperativa Coopacer (Cooperativa de Agronegócios do Cerrado Brasileiro LTDA, São Gotardo, MG), e será dorovante denominado *Trichoderma* isolado C-1. Além desses produtos comerciais, também foi testado o *Trichoderma* isolado T-1, pertencente à coleção do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides, do Departamento de Fitopatologia da UFV. Esse isolado foi previamente selecionado por apresentar rápido crescimento em meio de cultura, alta produção de conídios, e pelo parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* (Ferreira et al., 2008). O isolado mantido a 4°C em geladeira, preservado através da técnica de conservação em pedaços de papel-filtro mantidos em tubos contendo sílica-gel (Smith & Onions, 1983) foi reativado após ser colocado para crescer em meio de cultivo BDA. O inóculo de *Trichoderma* isolado T-1 foi produzido em grãos de arroz beneficiado. Em sacos de polipropileno de capacidade de 6L foram colocados 100 g de arroz e 80mL de água destilada. Os sacos foram autoclavados por 20 minutos a 120°C. Cada saco, recebeu dois discos de micélio de 9mm de diâmetro de cultura fúngica em BDA, após o arroz atingir a temperatura ambiente. O fungo cresceu no substrato por 15 dias a 25°C. Foi feita uma suspensão aquosa de cada produto, e a concentração de conídios foi calibrada com auxílio da câmara de Neubauer.

2.4. Condução dos experimentos

2.4.1. Ensaio 1: Compatibilidade entre *Pochonia chlamydosporia* Pc-10 e *Trichoderma* spp. em casa de vegetação no controle de *Meloidogyne javanica*

Foram realizados dois experimentos, conduzidos em épocas diferentes do ano. O primeiro foi conduzido no período de 17/04/2015 a 28/07/2015, com temperatura média na casa de vegetação de 27°C (temperatura média máxima: 37°C, média mínima: 17°C).

O segundo experimento foi conduzido no período de 04/11/2015 a 29/12/2015, com temperatura média na casa de vegetação de 29,5°C (temperatura média máxima: 39°C, média mínima: 20°C).

Para o primeiro experimento, foram utilizados vasos de plástico de 4L de capacidade, preenchidos com substrato constituído de uma mistura de terriço e areia, na proporção 1:1 (v:v), previamente tratado com o biocida 3,5-dimethyl-1,3,5-thiadiazinane-2-thione (DAZOMETE), na dose de 50 g/cm². Já para o segundo experimento, vasos de 2L de capacidade foram utilizados. Em ambos os experimentos, o solo de cada vaso foi infestado com 3.000 ovos de *M. javanica*, adicionados em quatro cavidades de 5 cm de profundidade equidistantes 5 cm na parte central do vaso. Em cada vaso, foi colocada uma suspensão aquosa contendo conídios dos isolados de *Trichoderma* sp., na concentração de 200.000 conídios g⁻¹ de solo ou 5.000 clamidósporos g⁻¹ de solo de *P. chlamydosporia*. Foi feita também a combinação entre *P. chlamydosporia* com os isolados de *Trichoderma* sp. Após 7 dias da infestação do solo, mudas de tomate 'Santa Clara' com 21 dias de idade foram transplantadas.

Os tratamentos avaliados para ambos os experimentos foram:

- 1- Testemunha negativa (apenas planta);
- 2- Testemunha positiva (planta + nematoide);
- 3- *Pochonia chlamydosporia* Pc-10 + nematoide;
- 4- *Trichoderma asperellum* + nematoide;
- 5- *Trichoderma harzianum* + nematoide;
- 6- *Trichoderma* isolado C-1 + nematoide;
- 7- *Trichoderma* isolado T-1 + nematoide;
- 8- Pc-10 + *Trichoderma asperellum* + nematoide;
- 9- Pc-10 + *Trichoderma harzianum* + nematoide;
- 10- Pc-10 + *Trichoderma* isolado C-1+ nematoide;
- 11- Pc-10 + *Trichoderma* isolado T-1 + nematoide.

Defensivos de contato foram aplicados na parte aérea sempre que necessário para o controle de insetos e fungos foliares. As plantas foram adubadas de acordo com a disponibilidade de nutrientes no solo, estimada por meio da análise de solo em ambos os experimentos (Tabelas 1 e 2) e a necessidade da cultura. O primeiro experimento foi conduzido por 90 dias, já o segundo permaneceu em casa de vegetação por 60 dias.

Ao final de cada experimento foram avaliadas as seguintes variáveis: altura da parte aérea das plantas (APA), massa da parte aérea fresca (MPAF), massa da parte

aérea seca (MPAS), massa da raiz fresca (MRF), massa da raiz seca (MRS), número de galhas e número de ovos de nematoide por grama de sistema radicular. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Cada tratamento foi repetido sete vezes e a parcela experimental foi constituída por um vaso com uma planta de tomate.

A extração dos ovos do primeiro experimento foi realizada através da técnica de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981). A extração dos ovos no segundo experimento foi realizada através da metodologia de Hussey & Barker (1973). Os ovos foram armazenados em tubos plásticos em geladeira a 7°C até o momento da avaliação. Os ovos foram contados com o auxílio de câmara de Peters e microscópio estereoscópio.

Para avaliar se o fungo *Pochonia chlamydosporia* foi capaz de crescer nos vasos em que os isolados de *Trichoderma* sp. foram aplicados, foi feita uma amostra composta do solo dos vasos de cada tratamento e 1g de solo de cada amostra foi coletado para determinar a população do fungo no solo, realizada através da quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC), após o plaqueamento em meio semi-seletivo (Gaspard et al., 1990), totalizando cinco repetições por tratamento.

2.4.2. Ensaio 2: Compatibilidade entre *Pochonia chlamydosporia* Pc-10 e *Trichoderma* isolado T-1.

Foram utilizados vasos de plástico de 2L de capacidade, que foram preenchidos com substrato constituído de uma mistura de terriço e areia, na proporção 1:1 (v:v), previamente tratado com 3,5-dimethyl-1,3,5-thiadiazinane-2-thione (DAZOMETE), na dose de 50 g/cm². O solo de cada vaso foi infestado com 3.000 ovos de *M. javanica*, o inóculo foi adicionado em quatro cavidades equidistantes 5 cm na parte central do vaso. Em cada vaso, foi colocada uma suspensão aquosa contendo conídios de *Trichoderma* isolado T-1 na concentração de 200.000 conídios g⁻¹ de solo ou 5.000 clamidósporos g⁻¹ de solo de *P. chlamydosporia*. Foi feito também a combinação entre *P. chlamydosporia* e o isolado T-1. Após 7 dias da infestação do solo, mudas de tomate ‘Santa Clara’ com 21 dias de idade foram transplantadas.

Os tratamentos avaliados foram:

- 1- Testemunha positiva (planta + nematoide);
- 2- *Pochonia chlamydosporia* Pc-10 + nematoide;
- 3- *Trichoderma* isolado T-1 + nematoide;
- 4- *Pochonia chlamydosporia* Pc-10 + *Trichoderma* isolado T-1 + nematoide;

- 5- Testemunha negativa (apenas planta);
- 6- Pochonia chlamydosporia Pc-10;
- 7- Trichoderma isolado T-1;
- 8- Pc-10 + Trichoderma isolado T-1.

Tratos culturais foram aplicados sempre que necessário. As plantas foram adubadas de acordo com a disponibilidade de nutrientes no solo, estimada por meio da análise de solo (Tabela 2) e a necessidade da cultura.

Após aproximadamente 60 dias foram avaliadas as seguintes variáveis: altura da parte aérea das plantas (APA), massa da parte aérea fresca (MPAF), massa da raiz seca (MRS), massa da raiz fresca (MRF), número de galhas e número de ovos de nematoide por grama do sistema radicular. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Cada tratamento foi repetido sete vezes e a parcela experimental foi constituída por um vaso com uma planta de tomate.

Os dados foram submetidos à análise de variância, e ao teste de médias de Duncan, quando necessário, ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 1- Análise química do solo: ensaio 1- experimento 1.

pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	(t)	(T)	V	m	MO	P-rem
H ₂ O	mg /dm ³		cmol _c /dm ³	cmol _c /dm ³%....		dag/Kg	mg/L
6,7	290,1	480	7,2	1,2	0	0,49	9,63	9,63	10,1	95	0	1,97	27,1

Análise realizada no Laboratório de Análise de Solo de Viçosa Ltda.

Tabela 2- Análise química do solo: ensaio 1- experimento 2 e ensaio 2.

pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	(t)	(T)	V	m	MO	P-rem
H ₂ O	mg /dm ³		cmol _c /dm ³	cmol _c /dm ³%....		dag/Kg	mg/L
5,64	120,1	626	4,66	0,60	0	2,4	7,11	7,11	9,51	74,8	0	3,50	30,4

Análise realizada no Laboratório de Análise de Solo, Tecido Vegetal e Fertilizante.

3- RESULTADOS

Ensaio 1: Compatibilidade entre *Pochonia chlamydosporia* e *Trichoderma* spp. em casa de vegetação no controle de *Meloidogyne javanica*

No experimento 1, a aplicação conjunta ou separadamente de *Pochonia chlamydosporia* e isolados de *Trichoderma* sp. não alterou ($p < 0,05$) a altura da parte aérea das plantas (APA), massa da parte aérea fresca (MPAF), massa da parte aérea seca (MPAS), e massa da raiz fresca (MRF) quando comparadas as testemunhas (Tabela 3). As variáveis APA, MPAF, MRF e MRS (massa da raiz seca) também não diferiram estatisticamente no experimento 2 (Tabela 4).

Tabela 3. Efeito da aplicação dos fungos *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) e *Trichoderma* spp. no desenvolvimento de plantas de tomateiro infectadas com *Meloidogyne javanica* (Mj), 90 dias após o transplante das mudas.

Experimento 1				
Tratamento	APA(cm)	MPAF(g)	MPAS(g)	MRF(g)
Testemunha negativa (apenas planta)	141,43 ^{ns}	240,26 ^{ns}	33,00 ^{ns}	75,53 ^{ns}
Testemunha positiva (Mj)	144,67	187,55	24,08	142,32
Pc-10 + Mj	132,85	177,55	24,58	135,06
T. asperellum + Mj	139,23	224,69	30,12	139,85
T. harzianum + Mj	148,23	202,11	28,36	115,72
Trichoderma isolado C-1 + Mj	140,67	195,16	26,64	108,05
Trichoderma isolado T-1 + Mj	137,00	207,39	27,64	116,15
Pc-10 + T. asperellum + Mj	121,43	207,37	27,93	167,89
Pc-10 + T. harzianum + Mj	139,71	215,00	29,30	127,23
Pc-10 + Trichoderma isolado C-1 + Mj	139,71	236,21	33,65	126,10
Pc-10 + Trichoderma isolado T-1 + Mj	131,14	194,86	26,37	123,40
CV (%)	13,70	20,45	24,46	39,69

Média de 7 repetições; ^{ns} não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; APA= altura da parte aérea; MPAF= massa da parte aérea fresca; MPAS= massa da parte aérea seca; MRF= massa da raiz fresca.

No experimento 1, todos os tratamentos foram capazes de reduzir o número de ovos g^{-1} de raiz em pelo menos 31%. Os tratamentos mais eficientes foram Pc-10 + Trichoderma isolado T-1, Pc-10 + Trichoderma isolado C-1, T. harzianum e Trichoderma isolado T-1, que diferiram ($p < 0,05$) quando comparados ao controle

(planta + nematoide), e reduziram o número de ovos g^{-1} de raiz em 58, 48, 47 e 43% respectivamente (Tabela 5). No experimento 2, as combinação Pc-10 + *T. asperellum*, e Pc-10 + *T. harzianum*, reduziram o número de ovos em 62 e 55% respectivamente, quando comparados ao tratamento controle (planta + nematoide) (Tabela 5). Apesar de a aplicação de Pc-10 ter reduzido o número de ovos em 37% no experimento 1 e em 42% no experimento 2 essa diferença não foi significativa ($p < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 4. Efeito da aplicação dos fungos *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) e *Trichoderma* spp. no desenvolvimento de plantas de tomateiro infectadas com *Meloidogyne javanica* (Mj), 60 dias após o transplântio das mudas.

Experimento2				
Tratamento	APA(cm)	MPAF(g)	MRF(g)	MRS(g)
Testemunha negativa (apenas planta)	84,57 ^{ns}	125,22 ^{ns}	51,51 ^{ns}	5,16 ^{ns}
Testemunha positiva (Mj)	94,85	121,48	38,96	2,83
Pc-10 + Mj	89,79	120,11	39,28	2,88
<i>T. asperellum</i> + Mj	79,28	120,37	45,01	3,56
<i>T. harzianum</i> + Mj	91,43	118,50	40,03	2,66
<i>Trichoderma</i> isolado C-1 + Mj	95,23	117,88	40,60	1,77
<i>Trichoderma</i> isolado T-1 + Mj	90,50	121,74	53,95	2,54
Pc-10 + <i>T. asperellum</i> + Mj	81,14	116,57	49,62	3,05
Pc-10 + <i>T. harzianum</i> + Mj	83,50	116,98	53,17	2,79
Pc-10 + <i>Trichoderma</i> isolado C-1 + Mj	92,29	128,52	38,43	3,03
Pc-10 + <i>Trichoderma</i> isolado T-1 + Mj	84,93	118,78	36,00	2,07
CV (%)	15,37	11,36	32,63	41,68

Média de 7 repetições; ^{ns} não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; APA= altura da parte aérea; MPAF= massa da parte aérea fresca; MRF= massa da raiz fresca; MRS= massa da raiz seca.

Quanto à redução do número de galhas g^{-1} de raiz, nenhum dos tratamentos do experimento 1 diferiu do controle ($p < 0,05$), porém, no experimento 2, os tratamentos Pc-10 + *T. harzianum* e *T. asperellum* resultaram em maior redução no número de galhas g^{-1} de raiz, sendo estas de 68 e 60% respectivamente, quando comparadas ao tratamento controle. *Trichoderma* isolado C-1, Pc-10 + *T. asperellum*, Pc-10 + *Trichoderma* isolado C-1, *T. harzianum* e *Trichoderma* isolado T-1 reduziram o número de galhas g^{-1} de raiz em 58, 58, 48, 47 e 35% respectivamente, diferindo do controle (Tabela 5).

Na avaliação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *P. chlamydosporia* por grama de solo, verificou-se a presença do fungo em todos os tratamentos em que foi utilizado em conjunto com os isolados de *Trichoderma* sp.,

Tabela 5. Efeito da aplicação de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) e isolados de *Trichoderma* sp. sobre o número de galhas e ovos g⁻¹ de raiz de *M. javanica* em tomateiro.

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 1	Experimento 2
Tratamento	Nº Ovos g ⁻¹ raiz	Nº Ovos g ⁻¹ raiz	Nº Galhas g ⁻¹ raiz	Nº Galhas g ⁻¹ raiz
Só planta	0 a	0 a	0 a	0 a
Pc-10+ <i>Trichoderma</i> isolado T-1	7285,71 b	9258,33 de	72,27 b	26,24 de
Pc-10+ <i>Trichoderma</i> isolado C-1	9078,57 b	8647,36 de	67,24 b	16,49 bc
<i>T. harzianum</i>	9160,71 b	11058,90 e	100,28 b	17,04 bc
<i>Trichoderma</i> isolado T-1	9939,29 b	8025,53 cde	97,53 b	20,86 cd
Pc-10	10960,71 bc	5600,36 bcd	79,74 b	29,85 e
Pc-10 + <i>T. harzianum</i>	11135,71 bc	4280,21 bc	86,37 b	10,25 b
<i>T. asperellum</i>	11585,71 bc	7339,43 bcde	86,65 b	12,79 b
<i>Trichoderma</i> isolado C-1	11971,43 bc	10845,61 e	83,52 b	13,47 b
Pc-10 + <i>T. asperellum</i>	12032,14 bc	3632,57 ab	77,44 b	13,47 b
Testemunha	17487,50 c	9577,99 de	96,37 b	32,14 e
CV(%)	54	47	41	33

Média de 7 repetições; médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. ^{ns}: não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. ¹ Valores obtidos pela divisão do número de galhas e ovos pela massa de raiz.

porém, em ambos os experimentos, ocorreu uma maior redução no número de UFC de *P. chlamydosporia* no solo por *Trichoderma* isolado C-1. Dos isolados de *Trichoderma* estudados, *Trichoderma* isolado T-1 foi o que teve menor ação sobre o crescimento de *P. chlamydosporia* (Tabela 6).

Tabela 6. Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) no solo, em amostras contendo inóculo do fungo isoladamente ou em conjunto com isolados de *Trichoderma* sp.

Tratamento	UFC g ⁻¹ de solo	
	Experimento 1	Experimento 2
Pc-10	20000 a	25600 a
Pc-10 + <i>Trichoderma</i> isolado T-1	9500 b	12960 a
Pc-10 + <i>T. asperellum</i>	8666 b	4800 b
Pc-10 + <i>T. harzianum</i>	7000 b	4480 b
Pc-10 + <i>Trichoderma</i> isolado C-1	1333 c	800 d
CV(%)	26,41	43,4

Média de cinco repetições, médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Duncan, a 5% de probabilidade.

Ensaio 2: Compatibilidade entre *Pochonia chlamydosporia* Pc-10 e *Trichoderma* isolado T-1.

Os fungos *Pochonia chlamydosporia* Pc-10 e *Trichoderma* isolado T-1 foram testados na ausência e presença do nematoide. Não houve efeito ($p < 0,05$) dos tratamentos para as variáveis APA e MPAF (Tabela 7).

Houve diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos para a variável massa da raiz fresca (MRF). Os tratamentos Pc-10 + *Trichoderma* isolado T-1, Pc-10 e *Trichoderma* isolado T-1, na ausência do nematoide, induziram incrementos na MRF de 62, 60, 57% respectivamente quando comparados ao controle positivo (planta + nematoide) (Tabela 7), entretanto, esses tratamentos não diferiram do controle negativo (apenas planta). Os resultados da MRS também foram significativos ($p < 0,05$). Os tratamentos Pc-10, *Trichoderma* isolado T-1 e Pc-10 + *Trichoderma* isolado T-1, na ausência do nematoide, diferiram do controle positivo, porém, não houve diferença comparando-se ao controle negativo (apenas planta) (Tabela 7). Os tratamentos que receberam a aplicação de fungo e nematoide não tiveram diferença em relação ao controle positivo ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Na avaliação do número de ovos g^{-1} de raiz, somente o tratamento Pc-10 diferiu do tratamento controle, reduzindo em 41% o número de ovos g^{-1} de raiz. Os tratamentos Pc-10 + Trichoderma isolado T-1 e Trichoderma isolado T-1 não foram capazes de reduzir o número de ovos g^{-1} de raiz (Tabela 8). Não houve diferença para o número de galhas g^{-1} de raiz (Tabela 8).

Tabela 7. Efeito da aplicação dos fungos *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) e *Trichoderma* isolado T-1 sobre as plantas de tomateiro na presença e na ausência do nematoide *Meloidogyne javanica* (Mj), 60 dias após o transplantio das mudas.

Tratamento	APA(cm)	MPAF(g)	MRF(g)	MRS(g)
Testemunha negativa (apenas planta)	84,57 ^{ns}	125,22 ^{ns}	51,51ab	5,16 a
Pc-10	84,75	138,71	62,44 a	6,88 a
Trichoderma isolado T-1	78,13	121,74	61,14 a	6,87 a
Pc-10 + Trichoderma isolado T-1	81,17	135,3	63,14 a	6,26 a
Pc-10 + Mj	89,78	120,11	39,28 b	2,88 b
Trichoderma isolado T-1 + Mj	90,50	121,74	59,95ab	2,54 b
Pc-10 + Trichoderma isolado T-1 + Mj	84,93	118,78	36,00 b	2,08 b
Testemunha positiva (Mj)	94,85	121,48	38,96 b	2,83 b
CV (%)	16,00	11,00	29,50	38,00

Média de sete repetições, médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade, ^{ns}: não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. APA= altura da parte aérea, MPAF= massa da parte aérea fresca, MRF= massa da raiz fresca, MRS= massa da raiz seca.

Tabela 8. Efeito da aplicação dos fungos *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) e *Trichoderma* isolado T-1 sobre o número de galhas e ovos g^{-1} de raiz de *M. javanica* em tomateiro.

Tratamento	Ovos g^{-1} raiz	Galhas g^{-1} raiz
Pc-10 + Mj	5600,35 a	29,85 ^{ns}
Trichoderma isolado T-1 + Mj	8025,33 ab	20,86
Pc-10 + Trichoderma isolado T-1 + Mj	9258,33 b	22,49
Planta + Mj	9577,98 b	32,14
CV(%)	36	32

Média de sete repetições, médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade, ^{ns}: não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

4- DISCUSSÃO

No experimento 1, do primeiro ensaio, a aplicação conjunta ou separadamente de *Pochonia chlamydosporia* e isolados de *Trichoderma* sp. não alterou ($p < 0,05$) a altura da parte aérea das plantas (APA), massa da parte aérea fresca (MPAF), massa da parte aérea seca (MPAS) e massa da raiz fresca (MRF) quando comparadas as testemunhas (Tabela 3). Também não houve diferença para as variáveis APA, MPAF, MRF e MRS (massa da raiz seca) no experimento 2 (Tabela 4). As variáveis APA e MPAF do ensaio 2, em que apenas *Trichoderma* isolado T-1 e *P. chlamydosporia* foram utilizados, também não diferiram do controle ($p < 0,05$) (Tabela 7). No ensaio 2, apenas as variáveis MRF e MRS tiveram valores estatisticamente diferentes dos controles (positivo e negativo) (Tabela 7). Esses resultados corroboram os encontrados por Coutinho et al. (2009), que relataram que *P. chlamydosporia* não influenciou significativamente o desenvolvimento de plantas de tomate, e de Podestá et al. (2009), que não observaram aumento na altura da parte aérea de plantas de tomateiro quando foram aplicados 5.000 clamidósporos g^{-1} em solo natural ou autoclavado. Porém, Dias-Arieira et al. (2011) encontraram resultados diferentes, em que a aplicação de *P. chlamydosporia* em campos de baixa fertilidade foi capaz de aumentar a massa da parte aérea seca das plantas.

Hidalgo-Diaz et al. (2000) relataram a promoção de crescimento de plantas de tomateiro induzida por diferentes isolados de *P. chlamydosporia*. Monfort et al. (2005) observaram essa ação do fungo em plântulas de trigo. Segundo Lopez-Llorca et al. (2002), o fungo *P. chlamydosporia* possui a habilidade de colonizar endofiticamente as células da epiderme e do córtex de raízes de plantas de cevada e tomate, formando um emaranhado de hifas semelhantes aqueles de fungos micorrizicos. Dallemole-Giaretta et al. (2015) também documentaram a ação endofítica de *P. chlamydosporia*. Os autores observaram que o fungo penetra as células epidérmicas das raízes de tomateiro.

Quanto ao fungo *Trichoderma*, algumas estirpes são consideradas por alguns autores como sendo organismos oportunistas, simbiontes avirulentos de plantas, que assim como *P. chlamydosporia*, também colonizam as raízes por mecanismos similares aos dos fungos micorrízicos de plantas, estimulando o crescimento, respostas de defesa e absorção e utilização de nutrientes pelas plantas (Benítez Fernandez et al., 2004; Harman et al., 2004). Yedidia et al. (1999) observaram a capacidade de *Trichoderma harzianum* penetrar e colonizar a epiderme e córtex das raízes de plantas de pepino, além disso, foi possível observar o maior desenvolvimento das plantas tratadas com

Trichoderma em relação as não tratadas. Esses mesmos autores relataram que, em cultivos hidropônicos de pepino, *T. harzianum* foi capaz de aumentar em 25 e 40% a massa da raiz seca e parte aérea das plantas (Yedidia et al., 2001). Segundo Cai et al. (2015) *T. harzianum* pode estimular o crescimento das plantas através da produção de fitohormônios e pelo fornecimento de fósforo (P), que promove o desenvolvimento do sistema radicular e crescimento das plantas.

Trabalhos na literatura relatam que os fungos *Pochonia chlamydosporia* (Hidalgo-Díaz et al., 2000; Monfort et al., 2005; Dallemole-Giaretta et al., 2015) e *Trichoderma* spp. (Baker & Cook, 1974; Chang et al., 1986; Harman, 2000) atuam na promoção de crescimento de plantas. Entretanto, neste estudo, tanto no primeiro quanto no segundo ensaio, não foi observada ação desses fungos na promoção de crescimento das plantas de tomateiro. O uso combinado dos agentes de controle biológico é uma estratégia promissora para promover crescimento das plantas. Apesar da maioria das variáveis estudadas não ter indicado diferença em relação aos controles (negativo e positivo), os tratamentos em que *P. chlamydosporia* foi aplicado juntamente com algum isolado de *Trichoderma* sp. foram os que mostraram maiores incrementos em relação a essas variáveis.

No ensaio 1, os resultados mais expressivos quanto à redução do número de ovos e de galhas g^{-1} de raiz foram obtidos através da combinação de *P. chlamydosporia* com algum dos isolados do fungo *Trichoderma*. No primeiro experimento do ensaio 1, os tratamentos que tiveram diferença ($p < 0,05$) em relação ao controle foram Pc-10 + *Trichoderma* isolado T-1, Pc-10 + *Trichoderma* isolado C-1, *T. harzianum* e *Trichoderma* isolado T-1, que reduziram o número de ovos g^{-1} de raiz em 58, 48, 47 e 43% respectivamente (Tabela 5). No experimento 2, a combinação de Pc-10 + *T. asperellum*, seguida por Pc-10 + *T. harzianum* foram as que obtiveram maior redução no número de ovos g^{-1} de raiz. Entretanto, apesar de Pc-10 ter reduzido essa variável em ambos os experimentos em 37 e 42%, esses resultados não diferiram do tratamento controle (Tabela 5). Em relação ao número de galhas, no experimento 1, nenhum dos tratamentos foi capaz de obter uma redução significativa ($p < 0,05$). Já o número de galhas g^{-1} de raiz das plantas do experimento 2, foi reduzido pelos tratamentos Pc-10 + *T. harzianum* e *T. asperellum* (Tabela 5).

Entretanto, no segundo ensaio realizado, em que *P. chlamydosporia* foi testado isoladamente ou em conjunto com *Trichoderma* isolado T-1, os resultados foram diferentes, sendo que apenas o tratamento Pc-10 foi capaz de reduzir o número de ovos

g^{-1} de raiz quando comparado ao controle. Entretanto, não houve redução do número de galhas g^{-1} de raiz por nenhum dos tratamentos (Tabela 8).

No primeiro ensaio, o tratamento Pc-10 + Trichoderma isolado T-1 estava entre as combinações mais eficientes na redução do número de ovos. O experimento permaneceu em casa de vegetação no período do inverno, e este tratamento se destacou no controle de *M. javanica*. Já o segundo experimento permaneceu em casa de vegetação no período de verão, e os tratamentos mais eficientes foram Pc-10 + *T. asperellum* e Pc-10 + *T. harzianum*. O segundo ensaio foi montado neste mesmo período, e apenas os isolados Pc-10 e T-1 foram testados. O tratamento Pc-10 se destacou no controle do número de ovos g^{-1} de raiz, e os tratamentos Pc-10 + Trichoderma isolado T-1 e Trichoderma isolado T-1 não diferiram do controle. Estes resultados sugerem que a combinação de Pc-10 + Trichoderma isolado T-1 pode ser mais eficiente no controle de nematoides no período de inverno. Entretanto para fazer uma afirmação mais conclusiva é necessário que o ensaio 2 seja repetido em épocas mais frias do ano.

O pH é uma variável importante para o crescimento e desenvolvimento dos organismos no solo. Além disso, é um fator que regula a atividade enzimática. Cada enzima possui um pH ótimo para ação, sendo ativas apenas em determinadas faixas de pH (Peñalva et al., 2008). O solo utilizado para o experimento 1 do ensaio 1, possui um pH de 6,7, já o solo do experimento 2 do ensaio 1 e do ensaio 2 tem um pH mais ácido, de 5,64. O pH é um dos principais fatores do solo que afetam a atividade de Trichoderma. Segundo Harman et al. (1981) um pH ácido favorece a atividade do fungo Trichoderma no controle de fitopatógenos. Já *P. chlamydosporia* cresce em pH variando de 4 a 7, e seu desenvolvimento é comprometido em pH acima de 8. Entretanto, segundo Ward et al. (2012), valores de pH mais alcalinos são mais favoráveis a expressão da enzima VCP1, envolvida no parasitismo de ovos de nematoide. Mo et al. (2005) relataram que um valor de pH entre 3,5 e 4,5 é ótimo para a esporulação de *P. chlamydosporia*. O pH ácido também é ideal para o parasitismo de *P. chlamydosporia* a *M. incognita*. Entretanto, o fungo pode crescer e esporular dentro de uma ampla faixa de pH. Para *P. chlamydosporia* não há um consenso sobre faixas de pH. No ensaio 1, o primeiro experimento, em que o pH do solo foi de 6,7, os tratamentos Pc-10 + Trichoderma isolado T-1, Pc-10 + Trichoderma isolado C-1 foram os mais promissores. O experimento 2, foi realizado em um solo de pH diferente, e os tratamentos Pc-10 + *T. asperellum* e Pc-10 + *T. harzianum* se destacaram. Apesar do pH do solo utilizado no ensaio 2 ter sido mais ácido, Trichoderma não teve ação de controle

sobre *Meloidogyne javanica*, sendo que o tratamento Pc-10, foi o mais eficiente na redução de ovos.

Outro fator que pode ter influenciado os resultados, foi o teor de matéria orgânica dos solos utilizados. O solo do experimento 1 possui um teor de matéria orgânica menor do que o solo utilizado no experimento 2 e no ensaio 2. No ensaio 1, tanto *P. chlamydosporia* quanto *Trichoderma* exibiram uma boa ação sobre *M. javanica*. Já no ensaio 2, o tratamento Pc-10 foi o que se destacou no controle de ovos. A presença de material orgânico melhora as características físicas e químicas do solo, tornando-o um ambiente propício para o melhor desenvolvimento das plantas (Stirling, 1991). Fungos nematófagos possuem maior potencial de crescimento e de controle quando aplicados ao solo juntos a uma fonte de matéria orgânica (Canayane & Rajendran, 2001). Segundo Dallemole-Giaretta et. al. (2010) a combinação de antagonistas com matéria orgânica tem efeito positivo sobre o controle de nematoides. Resultados semelhantes foram observados por Podestá et. al. (2013).

O maior efeito da combinação dos antagonistas no primeiro ensaio pode ser explicado pelo fato dos fungos possuírem diferentes modos de ação. *Pochonia chlamydosporia* parasita ativamente ovos e fêmeas de nematoides para nutrir-se, enquanto *Trichoderma* pode ter inativado os nematoides pela produção de compostos tóxicos, podendo até colonizá-los posteriormente. *P. chlamydosporia* produz várias enzimas, dentre elas a protease serina (VCP1), tipo subtilisina, que é capaz de remover a camada vitelínica da casca dos ovos e expor a camada de quitina, que é então dissolvida (Kerry & Bourne, 2002). *Trichoderma* spp. produz várias enzimas, dentre elas quitinases, glucanases e proteases que podem digerir a cutícula do J₂ de *Meloidogyne* levando-o a morte (Sharon et al., 2001; Huang et al., 2004). Entretanto, a ação de *Trichoderma* pode se estender aos ovos, pois alguns isolados desse gênero produzem enzimas quitinolíticas, que podem degradar a camada de quitina de ovos imaturos, expondo-o ao parasitismo e ação de compostos tóxicos (Chet et al., 1997).

Monteiro (2013) avaliou o fungo *P. chlamydosporia* juntamente com *Duddingtonia flagrans*, aplicados isoladamente e em conjunto, no controle de *M. javanica*, e encontrou reduções de 37 e 40% no número de ovos nos tratamentos em que apenas *P. chlamydosporia* foi utilizado, porém, a combinação entre os fungos resultou na redução de até 70% de ovos de *M. javanica*. A aplicação combinada de *Trichoderma harzianum* e *Paecilomyces lilacinus* causou maior mortalidade de J₂ de *Meloidogyne incognita* quando comparado aos tratamentos que receberam apenas um dos fungos (Munawar et al., 2015). *P. chlamydosporia*, *Pseudomonas fluorescens*, *T. viride* e

carbofuran resultou em maior crescimento das plantas de batata e menor população do nematoide do cisto do que a aplicação isolada de cada um (Muthulakshmi et al., 2012). *Paecilomyces lilacinus*, *P. chlamyosporia*, *T. harzianum* e rizobacterias promotoras de crescimento utilizadas em conjunto mostraram ser mais eficazes no controle de *M. incognita* e na promoção de crescimento das plantas do que sua aplicação isolada (Siddiqui & Akhtar, 2009).

Solos supressivos ocorrem quando o fitonematoide e planta hospedeira suscetível estão presentes em uma área em que favorece ocorrência da doença, entretanto a doença não ocorre, ou ocorre em baixa intensidade. A presença de vários antagonistas é um dos fatores que contribuem para a supressividade dos solos (Lemanceua e Alabouvette, 1991; Stirling 1991). Os fungos *Pochonia chlamyosporia* e *Nematophthora gymnophila*, foram responsáveis pela redução da população de *Heterodera avenae* em cultivo de aveia na Inglaterra entre os anos de 1955 e 1968 (Kerry, 1975).

A aplicação dos fungos, em ambos os experimentos, foi realizada 7 dias antes do transplântio das mudas de tomate. Existem trabalhos em que a aplicação de *P. chlamyosporia* foi feita 15 dias antes do transplântio das mudas, portanto, o fungo permaneceu mais tempo no solo em contato com os ovos de nematoide (Dallemole-Giaretta et al., 2008; Coutinho et al., 2009). Esse maior período de contato entre *P. chlamyosporia* e ovos no solo proporciona melhor atuação do fungo, pois ele poderá colonizar o solo e encontrar maior número de ovos, impedindo que o juvenil de segundo estágio (J_2) se forme, ou ecloda (Dallemole-Giaretta et al., 2008). Talvez se a aplicação dos clamidósporos de *P. chlamyosporia* nesses experimentos tivesse sido realizada 15 dias antes de transplantar as mudas, a ação do fungo sobre os ovos poderia ser maior, reduzindo os ovos e galhas⁻¹ de raiz.

Temperaturas próximas a 30°C favorecem a infecção da planta pelo nematoide. A taxa de eclosão dos J_2 aumenta nessa faixa, sendo assim, os ovos ficam expostos por um período de tempo menor aos antagonistas, e muitos ovos não são colonizados, escapando da infecção (Kerry & Bourne, 2002). Esses experimentos foram montados em épocas em que as temperaturas médias foram 27 e 29,5°C. Temperaturas altas favorecem o ciclo do nematoide e desfavorece o fungo *Pochonia chlamyosporia* (Kerry & Bourne, 2002).

Uma característica interessante que pode ser levada em consideração na escolha do agente de controle biológico é a capacidade de promover o crescimento das plantas, dessa forma, ele atuará no controle da doença mascarando os danos causados por ela.

Alguns microrganismos que colonizam a rizosfera das plantas possuem a habilidade de formar uma barreira inicial contra vários patógenos como os nematoides (Weller, 1988). Segundo Papavizas (1985), os fungos antagonistas na rizosfera possuem grande potencial para suprimir patógenos.

A aplicação dos antagonistas isoladamente ou em conjunto não foi eficiente em promover o crescimento das plantas. No ensaio 1, os tratamentos em que *P. chlamydosporia* foi aplicado juntamente com os isolados do fungo *Trichoderma* foram os que tiveram maior ação sobre o número de ovos e galhas de *M. javanica*. Os resultados observados nos levam a crer que os produtos comerciais cujos componentes ativos são isolados de *Trichoderma*, quando combinados com *P. chlamydosporia*, apresentam potencial para controlar o nematoide das galhas. Entretanto, os resultados do ensaio 2, indicam que o tratamento em que Pc-10 foi aplicado isoladamente foi o mais eficiente no controle de nematoides. Quanto à interação dos fungos, avaliando o número de UFC g⁻¹ de solo, a maioria dos isolados de *Trichoderma* sp. mostrou-se compatível a *P. chlamydosporia*, sendo que, apenas *Trichoderma* isolado C-1 foi capaz de reduzir seu crescimento em maior intensidade em ambos os experimentos, e *Trichoderma* isolado T-1 foi o mais compatível dentre os isolados testados. Estes resultados de número de UFC, associados aos resultados dos testes de compatibilidade “*in vitro*” do capítulo 1, indicam que o uso de *P. chlamydosporia* e *Trichoderma* isolado T-1 é a combinação mais compatível.

5- CONCLUSÕES

- Os fungos não promoveram o crescimento das plantas;
- Ensaio I:
 - ✓ Pc-10 + T. harzianum e T. asperellum: maior redução do nº galhas g⁻¹ raiz;
 - ✓ Pc-10 + Trichoderma isolado T-1, Pc-10 + Trichoderma isolado C-1, T. harzianum e Trichoderma isolado T-1: Maior redução de ovos no experimento I;
 - ✓ Pc-10 +T. asperellum e Pc-10 + T. harzianum: Maior redução de ovos no experimento II;
 - ✓ Combinação mais compatível: Pc-10 + Trichoderma isolado T-1;
- Ensaio II: Aplicação de Pc-10 e Trichoderma isolado T-1:
 - ✓ O uso isolado de Pc-10 foi mais eficiente no controle de ovos de M. javanica.

6- REFERÊNCIAS

- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J.M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E.G., Deleury, E.G., Perfus-Barbeoch, L., Anthouard, V., Artiguenave, F., Blok, V.C., 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature biotechnology* 26, 909-915.
- Altomare, C., Tringovska, I., 2011. Beneficial soil microorganisms, an ecological alternative for soil fertility management. *Genetics, biofuels and local farming systems*. Springer, pp. 161-214.
- Atkins, S.D., Hidalgo-Diaz, L., Kalisz, H., Mauchline, T.H., Hirsch, P.R., Kerry, B.R., 2003. Development of a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. *Pest Management Science* 59, 183-189.
- Baker, K.F., Cook, R.J., 1974. *Biological control of plant pathogens*. WH Freeman and Company. 433p.
- Benítez, T., Rincon, A.M., Límon, M.C., Codón, A.C., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7, 249-260.
- Boneti, J.I.S, Ferraz, S., 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 6, 553.
- Bourne, J.M., Kerry, B.R., De Leij, F.A.A.M., 1994. Methods for the study of *Verticillium chlamyosporium* in the rhizosphere. *Journal of Nematology* 26, 587.
- Cai, F., Chen, W., Wei, Z., Pang, G., Li, R., Ran, W., Shen, Q., 2015. Colonization of *Trichoderma harzianum* strain SQR-T037 on tomato roots and its relationship to plant growth, nutrient availability and soil microflora. *Plant and Soil* 388, 337-350.
- Cannayane, I., Rajendran, G., 2001. Application of biocontrol agents and oil cakes for the management of *Meloidogyne incognita* in brinjal (*Solanum melongena* L.). *Curr. Nematol* 12, 51-55.
- Chang, Y.C., Chang, Y.C., Baker, R., Kleifeld, O., Chet, I., 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant disease* 70, 145-148.
- Chet, I., Inbar, J., Hadar, I., 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Springer-Verlag, Berlin, 165-184.
- 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. *Nematologia Brasileira* 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*. *Nematologia Brasileira* 32, 327-332.

Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L.G., Lopes, E.A., Pereira, O.L., Zooca, R.J., Ferraz, S., 2012. Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. *Crop Protection* 42, 102-107.

Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L.G., Lopes, E.A., Silva, M.d.C.S.d., Kasuya, M.C.M., Ferraz, S., 2015. *Pochonia chlamydosporia* promotes the growth of tomato and lettuce plants. *Acta Scientiarum. Agronomy* 37, 417-423.

De Leij, F.A.A.M., Kerry, B.R., Dennehy, J.A., 1993. *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and micro-plot tests. *Nematologica* 39, 115-126.

Delgado-Jarana, J., Pintor-Toro, J.A., Benítez, T., 2000. Overproduction of β -1, 6-glucanase in *Trichoderma harzianum* is controlled by extracellular acidic proteases and pH. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1481, 289-296.

Delgado-Jarana, J., Rincon, A.M., Benítez, T., 2002. Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. *Microbiology* 148, 1305-1315.

Dias-Arieira, C.R., Santana, S.D.M., de Freitas, L.G., Cunha, T.P., Biela, F., Puerari, H.H., Chiamolera, F.M., 2011. Efficiency of *Pochonia chlamydosporia* in *Meloidogyne incognita* control in lettuce crop (*Lactuca sativa* L.). *J. Food Agric. Environ* 9, 561-563.

Eapen, S.J., Beena, B., Ramana, K.V., 2005. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology* 88, 218-225.

Elad, Y., Kapat, A., 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 105, 177-189.

Ferreira, P.A., Ferraz, S., Lopes, E.A., Freitas, L.G., 2008. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. *Rev. Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas* 2,15.

Gaspard, T., Jaffee, B.A., Ferris, H., 1990. Association of *Verticillium chlamydosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with root-knot nematode infested soil. *Journal of Nematology* 22, 207.

Harman, G.E., Chet, I., Baker, R., 1981. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biocontrol agent. *Phytopathology*. 71,569-572.

Harman, G.E., 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant disease* 84, 377-393.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology* 2, 43-56.

Hidalgo-Díaz, L., Bourne, J.M., Kerry, B.R., Rodríguez, M.G., 2000. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. *International Journal of Pest Management* 46, 277-284.

Huang, X., Zhao, N., Zhang, K., 2004. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. *Research in Microbiology* 155, 811-816.

Hussey, R.S., Barker, K.R., 1973. Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant disease reporter* 57, 1025-1028.

Jatala, P., 1986. Biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual review of phytopathology* 24, 453-489.

Kerry, B. R., 1975. Fungi and the Decrease of Cereal Cyst-nematode Populations in Cereal Monoculture1. *EPPO Bulletin, Paris*, 5, 353-361.

Kerry, B R., Crump, D.H., Mullen, L.A., 1982. Studies of the cereal cyst-nematode, *Heterodera avenae* under continuous cereals, 1975–1978. II. Fungal parasitism of nematode females and eggs. *Annals of Applied Biology* 100, 489-499.

Kerry, B.R., Kirkwood, I.A., De Leij, F.A.A.M., Barba, J., Leijdens, M.B., Brookes, P.C., 1993. Growth and survival of *Verticillium chlamyosporium* Goddard, a parasite of nematodes, in soil. *Biocontrol Science and Technology* 3, 355-365.

Kerry, B.R., 1990. An assessment of progress toward microbial control of plant-parasitic nematodes. *Journal of Nematology* 22, 621.

Kerry, B.R., Bourne, J.M., 2002. A Manual for research on *Verticillium chlamyosporium*: a potential biological control agent for root-knot nematodes. Gent, Belgium. 84p.

Khattak, B., 2008. Biological Management of Root Knot Nematode *Meloidogyne javanica* (Treub) with *Trichoderma harzianum* Rifai in Tomato. Peshawar, Pakistan: Khyber Pakhtunkhwa Agricultural (KPK) University. PhD Thesis (Nematology).157p.

Lemanceau, P., Alabouvette, C., 1991. Biological control of *Fusarium* diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Protection* 10, 279-286.

Lopez-Llorca, L.V., Bordallo, J.J., Salinas, J., Monfort, E., Lopez-Serna, M.L., 2002. Use of light and scanning electron microscopy to examine colonisation of barley rhizosphere by the nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium*. *Micron* 33, 61-67.

- Meyer, S.L., Roberts, D.P., 2002. Combinations of biocontrol agents for management of plant-parasitic nematodes and soilborne plant-pathogenic fungi. *Journal of Nematology* 34, 1.
- Mo, M., Xu, C., Zhang, K., 2005. 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* 159, 381-387.
- Monfort, E., Lopez-Llorca, L.V., Jansson, H.B., Salinas, J., Park, J.O., Sivasithamparam, K., 2005. Colonisation of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root-rot. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 1229-1235.
- Monteiro, T.S.A. 2013. Controle biológico do nematoide das galhas, *Meloidogyne javanica*, e promoção de crescimento vegetal com os fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia flagrans*. Dissertação (Mestrado do Programa de pós graduação em fitopatologia) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 16p.
- Mukhtar, T., Hussain, M.A., Kayani, M.Z., 2012. Biocontrol potential of *Pasteuria penetrans*, *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* and *Trichoderma harzianum* against *Meloidogyne incognita* in. *Phytopathologia Mediterranea* 52, 66-76.
- Munawar, M., Khan, S.A., Javed, N., Haq, I.U., Gondal, A.S., 2015. Bio-management of tomato wilt complex caused by *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Nematology* 17, 479-485.
- Muthulakshmi, M., Kumar, S., Subramanian, S., Anita, B., 2012. Compatibility of *Pochonia chlamydosporia* with other biocontrol agents and carbofuran. *Journal of Biopesticides* 5, 243-245.
- Papavizas, G.C., 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual review of phytopathology* 23, 23-54.
- Peñalva, M.A., Tilburn, J., Bignell, E., Arst, H.N., 2008. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends in microbiology* 16, 291-300.
- 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*. *Nematologia Brasileira* 33, 191-193.
- Podestá, G.S., Freitas, L.G., Dallemole-Giaretta, R., Zooca, R.J.F., Caixeta, L.B., Ferraz, S., 2013. *Meloidogyne javanica* control by *Pochonia chlamydosporia*, *Gracilibacillus dpsosauri* and soil conditioner in tomato. *Summa Phytopathologica* 39, 122-125.
- Reaves, J.L., Crawford, R.H., 1994. In vitro colony interactions among species of *Trichoderma* with inference toward biological control. Research paper PNW-RP (USA). 8p.

Sharon, E., Bar-Eyal, M., Chet, I., Herrera-Estrella, A., Kleifeld, O., Spiegel, Y., 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 91, 687-693.

Siddiqui, I.A., Shaukat, S.S., 2003. Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamydosporia* for Control of Root-Infecting Fungi in Tomato. *Journal of Phytopathology* 151, 215-222.

Siddiqui, I.A., Shaukat, S.S., 2002. Mixtures of plant disease suppressive bacteria enhance biological control of multiple tomato pathogens. *Biology and Fertility of Soils* 36, 260-268.

Siddiqui, Z.A., Akhtar, M.S., 2009. Effects of antagonistic fungi and plant growth-promoting rhizobacteria on growth of tomato and reproduction of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Australasian Plant Pathology* 38, 22-28.

Smith, D., Onions, A.H.S., 1983. The preservation and maintenance of living fungi. *Commonwealth Agricultural Bureaux*. 51p.

Spiegel, Y., Chet, I., 1998. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. *Integrated Pest Management Reviews* 3, 169-175.

Stirling, G.R., 1991. Biological control of nematodes: progress, problems and prospects. *CAB International, Wallingford, United Kingdom*. 282p.

Suarez, B., Rey, M., Castillo, P., Monte, E., Llobell, A., 2004. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. *Applied microbiology and biotechnology* 65, 46-55.

Sung, G.H., Hywel-Jones, N.L., Sung, J.M., Luangsa-ard, J.J., Shrestha, B., Spatafora, J.W., 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology* 57, 5-59.

Szabó, M., Csepregi, K., Gálber, M., Virányi, F., Fekete, C., 2012. Control plant-parasitic nematodes with *Trichoderma* species and nematode-trapping fungi: The role of *chi18-5* and *chi18-12* genes in nematode egg-parasitism. *Biological Control* 63, 121-128.

Taylor, A.L., Sasser, J.N., 1983. *Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz*. Universidad de Carolina del Norte, 111p.

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

Wang, K., Riggs, R.D., Crippen, D., 2005. Isolation, selection, and efficacy of *Pochonia chlamydosporia* for control of *Rotylenchulus reniformis* on cotton. *Phytopathology* 95, 890-893.

Ward, E., Kerry, B.R., Manzanilla-López, R.H., Mutua, G., Devonshire, J., Kimenju, J., Hirsch, P.R., 2012. The *Pochonia chlamydosporia* serine protease gene *vcp1* is subject

to regulation by carbon, nitrogen and pH: implications for nematode biocontrol. *PloS one* 7, 1-12.

Weindling, R., 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* 22, 837-845.

Weller, D.M., 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual review of phytopathology* 26, 379-407.

Yedidia, I., Benhamou, N., Chet, I., 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and environmental microbiology* 65, 1061-1070.

Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y., Chet, I., 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil* 235, 235-242.

Zare, R., Gams, W., Evans, H.C., 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia*, 51-86.

7- CONCLUSÕES GERAIS

Pochonia chlamydosporia e isolados de *Trichoderma* sp. são compatíveis.

A utilização conjunta desses organismos tem potencial para controlar o nematoide das galhas.

Resultados *in vitro* e em casa de vegetação indicam que os isolados Pc-10 e *Trichoderma* isolado T-1 foi a combinação mais compatível.