

ÉRICA DAS GRAÇAS CARVALHO NASU

**TRATAMENTO DE SEMENTES DE SOJA E ALGODÃO COM *Pochonia
chlamydosporia* NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita* E
HISTOPATOLOGIA DA INTEIRAÇÃO TRITRÓFICA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

N269t
2013

Nasu, Érica das Graças Carvalho, 1981-
Tratamento de sementes de soja e algodão com
Pochonia chlamydosporia no controle de
Meloidogyne incognita e histopatologia da interação tritrófica /
Érica das Graças Carvalho Nasu. – Viçosa, MG, 2013.
89 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Leandro Grassi de Freitas.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Pochonia chlamydosporia*. 2. Nematóide-das-galhas -
Controle biológico. 3. Soja - Semente - Tratamento.
4. Algodão - Semente - Tratamento. 5. *Meloidogyne incognita*.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.
II. Título.

CDD 22. ed. 579.55

ÉRICA DAS GRAÇAS CARVALHO NASU

**TRATAMENTO DE SEMENTES DE SOJA E ALGODÃO COM
Pochonia chlamydosporia NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita*
E HISTOPATOLOGIA DA INTEIRAÇÃO TRITRÓFICA**

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

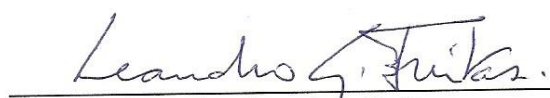
APROVADA: 28 de fevereiro de 2013.


Rosângela Dallemole Giaretta


Olinto Liparini Pereira


Everaldo Antônio Lopes


Marília Contin Ventrella


Leandro Grassi de Freitas
(Orientador)

Ao meu amado esposo Celso Kazuo Nasu,
Aos meus pais Dionísio e Francisca,
As minhas irmãs, Edirlene e Hellen,
À minha sobrinha Yasmin,
Aos familiares e amigos,
Dedico!!!

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao professor Leandro Grassi de Freitas, pela orientação, confiança, amizade, empenho, dedicação e profissionalismo.

Ao professor Silamar Ferraz pela experiência transmitida e amizade.

À professora Marília Contin Ventrella, pelo apoio e ensinamentos.

À Ana Claudia Ferreira da Cruz, pelo apoio fundamental nas caracterizações anatômicas e histoquímicas e pela amizade.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos transmitidos.

À Empresa Rizoflora Biotecnologia S.A., nas pessoas de Monique Brasiel e Juliana Almeida Costa, pela amizade e fornecimento do material utilizado neste estudo.

Aos Professores Rosângela Dallemole Giaretta, Olinto Liparini Pereira, Everaldo Antônio Lopes e Marília Contin Ventrella, pela contribuição com as correções do trabalho, críticas e sugestões.

Aos amigos e colegas do laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides, Deisy, Guilherme, Thalita, Fernanda, Paula, Rosane, Leonardo, Raul e Vanessa pelo convívio, pela amizade, pelas colaborações, pela troca de informação e experiência e pelas alegrias, sem a companhia de vocês tudo seria mais difícil.

Aos funcionários das casas de vegetação pelos serviços prestados.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, em especial a Sara, pela paciência e informações transmitidas.

Aos amigos do grupo GEAFIP, pelo aprendizado, amizade e pelos momentos de alegria vividos.

Aos meus colegas do Departamento pela amizade e apoio.

Aos meus pais Dionísio Roberto de Carvalho e Francisca de Fátima Carvalho, pela educação, pelo amor, carinho, compreensão, e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

As minhas irmãs Edirlene e Hellen, pelo amor, pelo apoio e amizade.

À minha sobrinha Yasmin, pelo amor e alegria transmitida.

Ao meu esposo Celso Kazuo Nasu, pela compreensão nos momentos de ausência, por estar sempre perto apesar da distância, pelo seu incentivo, pelo amor e amizade.

A todos os meus amigos em especial a Tânia, Renata, Deisy, Felipi, Cristina, Isabel, Eduardo e Ana, pelas risadas, pelo amor e amizade.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho. O meu muito Obrigada!

BIOGRAFIA

ÉRICA DAS GRAÇAS CARVALHO NASU, filha de Dionísio Roberto de Carvalho e Francisca de Fátima Carvalho, nasceu em 03 de maio de 1981, em Lavras, Minas Gerais.

Em fevereiro de 2006, graduou-se em Ciências biológicas pela Universidade Paranaense (UNIPAR).

Em março de 2006, iniciou o Curso de Mestrado em Agronomia na Universidade Estadual do Oeste Paranaense (UNIOESTE), concluindo-o em Abril de 2008.

Em março de 2009, iniciou o curso de Doutorado em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV).

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL	1
Literatura citada.....	5
ARTIGO 1 - Percolação e desenvolvimento de <i>Pochonia chlamydosporia</i> em solo arenoso ou argiloso quando aplicado via tratamento de sementes para o controle de <i>Meloidogyne incognita</i> em soja.....	8
Resumo	9
Abstract.....	10
Introdução.....	11
Material e Métodos.....	12
Resultados.....	16
Discussão.....	21
Literatura citada.....	25
ARTIGO 2 - <i>Pochonia chlamydosporia</i> no controle de <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3 em algodão	29
Resumo	30
Abstract.....	31
Introdução.....	31
Material e Métodos.....	34
Resultados e Discussão.....	36
Literatura citada.....	43
ARTIGO 3 - Compatibilidade de <i>Pochonia chlamydosporia</i> com agroquímicos no controle de <i>Meloidogyne incognita</i>	47
Resumo	48
Abstract.....	49
Introdução.....	50
Material e Métodos.....	52
Resultados.....	56
Discussão.....	63
Literatura citada.....	66
ARTIGO 4 - Colonização de raízes de soja pelo fungo nematófago <i>Pochonia chlamydosporia</i>	70
Resumo	71
Abstract.....	72

Introdução	72
Material e Métodos	74
Resultados.....	78
Discussão	81
Literatura citada.....	84
CONCLUSÕES GERAIS	88

RESUMO

NASU, Érica das Graças Carvalho, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Tratamento de sementes de soja e algodão com *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne incognita* e histopatologia da inteiração tritrófica.** Orientador: Leandro Grassi de Freitas. Coorientador: Silamar Ferraz.

Existe pouca informação disponível quanto ao desempenho e multiplicação do fungo *Pochonia chlamydosporia* quando utilizado no tratamento de sementes. Portanto, o presente trabalho teve por objetivos: a) verificar a distribuição e o desenvolvimento de *P. chlamydosporia* em solo arenoso ou argiloso, bem como avaliar o controle de *M. incognita* pelo tratamento de sementes de soja; b) avaliar a eficiência do fungo *P. chlamydosporia* nos tratamentos de solo, de sementes e tratamentos de semente e de solo, no intuito de viabilizar a sua aplicação no tratamento de sementes, visando ao controle de *M. incognita* raça 3 em algodoeiro; c) verificar a compatibilidade do fungo *P. chlamydosporia* para o controle de *M. incognita* com agroquímicos comumente utilizados em tratamento de sementes nas culturas da soja e do algodão e; d) verificar detalhes da colonização radicular e de fêmeas pelo fungo *P. chlamydosporia* em plantas de soja quando aplicado via tratamento de sementes, inoculadas ou não com *M. incognita*, com base em aspectos estruturais e histoquímicos. A colonização do solo por *P. chlamydosporia* aplicado via tratamento de sementes de soja foi considerada efetiva para os dois tipos de solos testados, tanto na sua distribuição no solo, sendo encontrados em profundidades de até 50 cm, como no controle do nematoide para os dois tipos de solo testados. Contudo, os melhores resultados foram alcançados em condições de solo arenoso. A eficiência do tratamento de sementes de algodão foi verificada tanto na redução no número de ovos por sistema radicular quanto no número de ovos.g⁻¹ de raiz. Esse

resultado demonstra a possível utilização do fungo *P. chlamydosporia* no tratamento de sementes de algodoeiro para o controle de *M. incognita* raça 3. Quanto à compatibilidade de *P. chlamydosporia* com agroquímicos utilizados nas culturas do algodão e soja, em testes *in vitro*, ficou evidente a sensibilidade de *P. chlamydosporia* com a aplicação dos diferentes produtos químicos utilizados sobre o crescimento micelial do fungo. Entretanto, em ensaios de casa de vegetação com as culturas de soja e algodão, a aplicação conjunta de *P. chlamydosporia* com os mesmos produtos químicos utilizados nos testes *in vitro* se mostrou compatível para maior parte dos produtos químicos testados. Quanto à colonização das raízes de soja por *P. chlamydosporia*, o tratamento de sementes de soja pelo fungo foi efetivo em colonizar o sistema radicular das plantas. Foi possível verificar a colonização dos tecidos das raízes de soja, tanto inoculados somente com *P. chlamydosporia*, como de raízes inoculadas com o fungo e *M. incognita*, sendo evidenciada a colonização do fungo em fêmeas e células gigantes.

ABSTRACT

NASU, Érica das Graças Carvalho, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **Treatment of soybean and cotton seeds with *Pochonia chlamydosporia* to control *Meloidogyne incognita* and histopathology of the tri-thropic interaction.** Adviser: Leandro Grassi de Freitas. Co-Adviser: Silamar Ferraz.

Little information is available regarding to the performance and multiplication of the fungus *Pochonia chlamydosporia* when used for seed treatment. Thus, this work had the objectives to: a) verify the distribution and development of *Pochonia chlamydosporia* in sandy and loamy soil as well as to evaluate control of *M. incognita* in soybean treated seeds; b) evaluate the efficiency of *P. chlamydosporia* in the treatment on soil, seeds, soil and seeds in order to enable its application on seeds to control *M. incognita* Race 3 in cotton; c) determine the compatibility of *P. chlamydosporia* used for *M. incognita* control in combination with chemicals usually used in soybean and cotton seeds; d) verify colonization details by the fungus on roots and nematode females in soybean plants, when used in seed treatment, inoculated and non-inoculated with *M. incognita*, based on structural and histochemical features. *P. chlamydosporia* applied through soybean treated seeds was efficient regarding to its distribution, being found until 50 cm depth, as well as in nematode control in both soil classes tested. However, best results were achieved in sandy soils. The efficiency of cotton seeds treatment was verified by a reduction in the number of eggs in the root system as well as by the number of eggs g⁻¹ of roots. The results show the possibility of using the fungus *P. chlamydosporia* in cotton seeds treatment to control *M. incognita* Race 3. Regarding compatibility of *P. chlamydosporia* with agrochemicals used in soybean and cotton crops, *in vitro* tests confirmed the sensibility of the fungus, concerning mycelium growth, when applied with such chemicals. However, green house experiments with soybean and cotton and combined application of *P. chlamydosporia* and the same chemical product used for *in vitro* tests, showed compatibility for most of the chemicals tested. Treatment

of soybean seeds with *P. chlamydosporia* was effective for plant's root colonization. Colonization of soybean root tissues, in plants inoculated only with *P. chlamydosporia* as well as in plants inoculated with the fungus and *M. incognita*, was verified, with fungal colonization being observed in nematode females and giant cells.

INTRODUÇÃO GERAL

Fitonematoides são vermes microscópicos que parasitam principalmente o sistema radicular de uma ampla gama de cultivos, levando a grandes perdas e até inviabilizar áreas de plantio. Estima-se que os fitonematoides sejam responsáveis por perdas agrícolas mundiais que chegam a U\$ 157 bilhões de dólares anualmente (Abad *et al.*, 2008).

Dentre os fitonematoides, os pertencentes ao gênero *Meloidogyne* spp. Goeldi são os mais importantes economicamente, por apresentar grande diversidade de hospedeiros e se encontrar amplamente disseminado nas mais diversas regiões do mundo (Taylor & Sasser, 1983; Wesemael *et al.*, 2010). Este gênero pode limitar a produção de culturas como algodão, batata, café, cana-de-açúcar, cenoura, tomate, soja, entre outras (Lordello, 1981).

A espécie *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood é uma das principais espécies do gênero, devido a sua habilidade em reduzir a produtividade de uma ampla gama de hospedeiros e causar perdas econômicas consideráveis em todo o mundo. Este nematoide causa sintomas variados em plantas. Na parte aérea, os sintomas mais comuns são, nanismo e amarelecimento de folhas, enquanto que a formação de galhas caracteriza o ataque do patógeno nas raízes.

Dentre as culturas agrônômicas que são afetadas por *M. incognita* destaca-se a cultura do algodão e soja. Ambas de grande importância econômica no Brasil. Na cultura do algodoeiro, *M. incognita* é a espécie de nematoide de maior importância para a cultura, possuindo quatro raças fisiológicas descritas, sendo que apenas as raças 3 e 4 são parasitas do algodoeiro (Suassuna *et al.*, 2006).

Os métodos utilizados para o controle de fitonematoides envolvem o uso de nematicidas, rotação de culturas, uso de variedade de plantas resistentes, a solarização do solo e o controle biológico (Almeida *et al.*, 2005).

O desenvolvimento e uso de genótipos com resistência genética seria um método efetivo de se limitar perdas de rendimento de soja e algodão causados por *M. incognita*. Entretanto, a maioria dos genótipos de soja (Roese *et al.*, 2004) e algodão (Mota *et al.*, 2012) cultivados no Brasil é suscetível a este nematoide.

A aplicação de nematicidas no solo por sua vez, pode causar a contaminação de lençóis freáticos e de alimentos, representando grande risco para o meio ambiente e para a saúde humana. Por essas razões, tais produtos vêm sofrendo restrições de uso em muitos países, tornando-se atrativo o desenvolvimento de métodos sustentáveis de manejo de fitonematoides, como por exemplo, o controle biológico (Ferraz & Valle, 2001).

Mais de 200 organismos são considerados inimigos naturais dos fitonematoides e, entre eles, destacam-se alguns fungos e bactérias (Kerry & Bourne 2002; Freitas *et al.*, 2009). O fungo *Pochonia chlamydosporia* (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard, teleomorfo *Metacordyceps chlamydosporia* H.C. Evans), e um dos mais promissores agentes de controle biológico de nematoides. O fungo é parasita facultativo de ovos e fêmeas de importantes espécies de nematoides como, por exemplo, o nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) (De Leij *et al.*, 1993, Hidalgo-Diaz *et al.*, 2000, Dallemole-Giaretta *et al.*, 2012) e o nematoide dos cistos (*Heterodera* spp. Schmidt) (Kerry & Crump, 1977) e (*Globodera* spp. (Skarbilovich) Behrens) (Tobin *et al.*, 2008).

Esse gênero foi primeiramente relatado no Brasil por Batista & Fonseca (1965), após isolar o fungo de amostras de solos de diferentes regiões do Nordeste, já o seu primeiro relato como parasita de ovos de nematoide foi por Willcox & Tribe (1974), após ter sido isolado de ovos de *Heterodera schachtii* Schmidt e *Heterodera avenae* Woll (Kerry, 1975). Em anos subsequentes, foi considerado o principal responsável pelo declínio da população de *H. avenae* em cultivares de cereais suscetíveis em sistema de monocultivo na Inglaterra (Kerry *et al.*, 1982).

O fungo *P. chlamydosporia* é caracterizado por colonizar o sistema radicular da planta hospedeira, se alimentar de matéria orgânica e por produzir clamidósporos, estrutura de armazenamento de reservas nutricionais e de sobrevivência, que auxiliam no estabelecimento desse organismo no solo. Além da produção de clamidósporos, possui muitas características desejáveis relacionadas ao controle biológico, como, sua atividade saprofítica, que permite o fungo sobreviver no solo mesmo na ausência do nematoide (Kerry *et al.*, 1982; Stirling, 2011).

Diferentes isolados de *P. chlamydosporia* mostram potencial de controle de *Meloidogyne* spp. acima de 75% (Lopes *et al.*, 2007; Dallemole-Giaretta *et al.*, 2012). Além do controle de nematoides, o fungo pode controlar outros patógenos habitantes do solo, a exemplo de *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Fusarium oxysporum* Schlechtend:Fr., *Phytophthora capsici* Leonian e *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx & Oliver var. *tritici* Walker (Kerry & Bourne, 2002; Jacobs *et al.*, 2003; Monfort *et al.*, 2005).

A introdução de *P. chlamydosporia* no solo de forma prática, eficiente e integrada ao sistema produtivo é um desafio (Viggiano *et al.*, 2012). É possível realizar a aplicação do fungo por meio de irrigação, com uso de formulações de suspensão aquosa de conídios ou de clamidósporos (Ferraz *et al.*, 2010; Dallemole-Giaretta *et al.*, 2012). Entretanto, esse tipo de aplicação em grandes culturas, como no caso do algodão e soja, pode ser dificultado pela quantidade de produto requerida e forma de aplicação, inviabilizando o uso do fungo. Embora vários estudos tenham mostrado a eficiência de *P. chlamydosporia* para o controle de *Meloidogyne* spp., há carência de pesquisas que comprovem o efeito desse agente aplicado via tratamento de sementes.

Considerando que o tratamento de sementes é um dos métodos mais convenientes de introdução de organismos no ambiente da raiz Cook & Baker (1983), espera-se que a aplicação de *P. chlamydosporia* dessa forma possa controlar nematoides e viabilizar a utilização do fungo nas cultivares de soja e algodão.

Assim, o presente trabalho teve como objetivos:

- a) Verificar a percolação e o desenvolvimento de *P. chlamydosporia* em solo arenoso ou argiloso, bem como avaliar o controle de *M. incognita* pelo tratamento de sementes de soja;
- b) Avaliar a eficiência do fungo *P. chlamydosporia* aplicado nos tratamentos de solo, de sementes e tratamentos de semente e de solo, no intuito de viabilizar a sua aplicação no tratamento de sementes, visando ao controle de *M. incognita* raça 3 em algodoeiro;
- c) Verificar a compatibilidade do fungo *P. chlamydosporia* para o controle de *M. incognita* com agroquímicos utilizados em tratamento de sementes nas culturas da soja e do algodão;
- d) Verificar detalhes da colonização radicular e de fêmeas pelo fungo *P. chlamydosporia* em plantas de soja, inoculadas ou não com *M. incognita*, com base em aspectos estruturais e histoquímicos.

Literatura citada

ABAD, P.; GOUZY, J.; AURY, J.M.; CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E.G.J.; DELEURY, E.; PERFUS-BARBEOCH, L.; ANTHOUARD, V.; ARTIGUENAVE, F. & BLOK, V.C. 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature biotechnology**, 26(8):909–915.

ALMEIDA, A. M. R.; KIMATI, H. & AMORIM, L. 2005. Doenças da soja. In: Kimati, H. et al. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres., p. 569-588.

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.

COOK, R.J. & BAKER, K.F. 1983. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathology Society, 539p.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A.; PEREIRA, O.L.; ZOOCA, R.J.F. & FERRAZ, S. 2012. Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. **Crop Protection**, 42: 102-107.

DE LEIJ, F.A.A.M. & KERRY, B.R. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as biological a potential control agent for *Meloidogyne arenaria*. **Revue Nematology**, 14(1): 157-164.

FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A. & DIAS-ARIEIRA, C.R. 2010. **Manejo sustentável de fitonematoides**. Viçosa: UFV, 304p.

FERRAZ, S. & VALLE, L.A. 2001. **Controle de fitonematoide por plantas antagônicas**. Viçosa – MG: UFV, 73p. Cadernos Didáticos

FREITAS, L.G.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FERRAZ, S.; ZOOCA, R.J.F. & PODESTÁ, G.S. 2009. Controle biológico de nematoides: estudos de casos. In: ZAMBOLIM, L. & PICANÇO, M.C.; (Eds) 122. **Controle biológico de pragas e doenças: exemplos práticos**. Viçosa. UFV-DFP. pp. 41- 82.

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 (4) 277-284.

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

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

KERRY, B.R. 2001. Exploitation of nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: BUTT, T.M.; JACKSON, C. & MAGAN, N. (Eds). **Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential**. CAB International, Wallingford, 380p.

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

KERRY, B.R. & CRUMP, D.H. 1977. Observations on fungal parasites of females and eggs of the cereal cyst-nematode, *Heterodera avenae*, and other cyst nematodes. *Nematologica* 23:193–201.

KERRY, B.R. 1975. Fungi and the decrease of cereal cyst-nematode populations in cereal monoculture. **EPPO Bulletin**, 5:353-361.

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**. 31:78-84.

LORDELLO, L.G.E. 1981. **Nematoides das plantas cultivadas**. São Paulo: Nobel, 314p.

MONFORT, E.; LOPEZ-LLORCA, L.V.; JANSSON, H.B.; SALINAS, J.; PARK, J.O. & SIVASITHAMPARAM, K. 2005. Colonization of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root-rot. **Soil Biology and Biochemistry**, 37:1229-1235.

MOTA, F. C.; ALVES, G. C. S.; GIBAND, M.; GOMES, A. C. M. M. ; SOUSA, F. R.; MATTOS, V.S.; BARBOSA, V.H.S.; BARROSO, P.A.V.; NICOLE, M.; PEIXOTO, J.R.; ROCHA, M.R. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2012. New sources of resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in wild cotton accessions and histological characterization of the defence mechanisms. **Plant Pathology**, 62(3):1-11 p.

ROESE, A. D.; OLIVEIRA, R.D.L. & LANES, F.F. 2004. Reação de cultivares de soja (*Glycine max* L. Merrill) a *Meloidogyne paranaensis*. **Nematologia Brasileira**, 28(1):131-135.

STIRLING, G.R. 2011. Biological control of plant-parasitic nematodes: An ecological perspective, a review of progress and opportunities for further research. In DAVIES, K. & SPIEGEL, Y. **Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Building coherence between microbiological ecology and molecular mechanisms**. 11:1–38.

SUASSUNA, N. D.; CHITARRA, L.G.; ASMUS, G.L. & INOMOTO, M.M. 2006. Manejo de Doenças do Algodoeiro. **EMBRAPA**, Campina Grande (PB), p. 1-24. (Circular Técnica 97).

TAYLOR, D.T. & SASSER, J. N.1983. **Biologia identificação y control de los nematodos de nódulo de la raíz (*Meloidogyne* species)**. A Coop. Public of the Depart. Pl. Pathology, N. Carolina St. Univ. and USAID. 111p.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 473p.

TOBIN, J. D.; HAYDOCK, P. P. J; HARE, M. C.; WOODS, S. R. & CRUMP, D. H. The compatibility of the fungicide azoxystrobin with *Pochonia chlamydosporia*, a biological control agent for potato cyst nematodes (*Globodera* spp.). **Annals of Applied Biology**, v.33, p.301-305, 2008.

VIGGIANO, J.R.; FREITAS, L.G. & FERREIRA, P.A. 2012. Resíduo da produção de *Pochonia chlamydosporia* no desenvolvimento de mudas e plantas de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 47(7): 983-990.

WESEMAEL, W.M,L.; VIAENE, N.; MOENS, M. 2010. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe. **Nematology**, 13(1): 3–16.

WILLCOX, J. & TRIBE, H. T.1974. Fungal parasitism in cysts of *Heterodera*. I Preliminary investigations. **Transactions of the British Mycological Society**, 62(3):585-594.

ARTIGO 1 - Percolação e desenvolvimento de *Pochonia chlamydosporia* em solo arenoso ou argiloso quando aplicado via tratamento de sementes para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja

Percolação e desenvolvimento de *Pochonia chlamydosporia* em solo arenoso ou argiloso quando aplicado via tratamento de sementes para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja

Resumo

Objetivou-se avaliar a percolação de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* em solos arenoso e argiloso no controle de *Meloidogyne incognita* em soja. Para este estudo foram utilizados tubos de PVC de 55 cm de altura e 100 mm de diâmetro, os quais foram seccionados de 12,5 em 12,5 cm, formando quatro secções por tubo (0,0-12,5; 12,5-25,0; 25,0-37,5; 37,5-50,0 cm). Dois tipos de solos foram testados, sendo um classificado como arenoso e o outro como argiloso, ambos previamente tratados com brometo de metila na dosagem de 80 cm³/m³. Os solos nos tubos receberam os diferentes tratamentos: semente de soja tratada com o fungo *P. chlamydosporia* (2 g de produto à base de clamidósporos para 100g de sementes); semente de soja tratada com *P. chlamydosporia* + 3000 ovos de *M. incognita*; semente de soja não tratada + 3000 ovos de *M. incognita*. Após sessenta dias do semeio, o experimento foi avaliado. Para isso, os tubos foram seccionados nos quatro compartimentos, separando as diferentes profundidades. Para avaliar a distribuição vertical de *P. chlamydosporia* nos dois tipos de solo, coletou-se 1g de solo de cada compartimento para determinação da população do fungo no solo, a qual foi feita através da quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC). A planta de cada compartimento foi avaliada quanto à massa das raízes frescas (MRF), número de ovos por sistema radicular, número de ovos g⁻¹ de raiz, número de galhas por sistema radicular, e número de galhas g⁻¹ de raiz. O experimento foi conduzido duas vezes. Sessenta dias após o semeio, foi possível verificar a colonização do solo por *P. chlamydosporia* em todo o perfil do solo, para ambos os solos testados. O fungo se mostrou efetivo no controle de *M. incognita* tanto no solo arenoso como no solo argiloso. No

solo arenoso o fungo apresentou maiores colonização, percolação e controle do nematoide. A aplicação de *Pochonia chlamydosporia* no tratamento de sementes de soja é viável, resulta na colonização de todo o sistema radicular e promove o controle do nematoide *Meloidogyne incognita*. *Pochonia chlamydosporia*, utilizada no tratamento de sementes de soja pode percolar no solo até, pelo menos, a profundidade de 50 cm, tanto em solo arenoso como em solo argiloso. O fungo desenvolve melhor no solo arenoso e, conseqüentemente, é mais eficiente em controlar o nematoide quando aplicado em solo arenoso.

Palavras chaves: controle biológico, fungo, nematoide, *Glicine Max*

Abstract

Percolation and development of *Pochonia chlamydosporia* in sandy or loamy soil when applied through seed treatment to control *Meloidogyne incognita* in soybean

The objective of this work was to evaluate percolation of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* in sandy and loamy soils to control *Meloidogyne incognita* in soybean. Tubes with 55 cm height and 100 mm diameter made with PVC were used in the experiments. Tubes were sectioned at 12,5 cm distance interval, resulting in four sections for each tube (0,0-12,5; 12,5-25,0; 25,0-37,5; 37,5-50,0 cm). Two soil classes were tested, a sandy and a loamy soil, both were previously treated with methyl bromate at 80 cm³/m³ dosage. Soil within the tubes were submitted to the following treatments: a- soybean seeds treated with the fungus *P. chlamydosporia* (2 g of a product based in chlamydospores for each 100 g of seeds); b- soybean seeds treated with *P. chlamydosporia* + 3000 eggs of *M. incognita*; c- soybean seeds without treatment + 3000 eggs of *M. incognita*. Sixty days after sowing the experiment was evaluated. The four compartments of the tubes were sectioned, thus separating tubes in different depths. In order evaluate vertical distribution of *P. chlamydosporia* in both soil classes, 1 g of soil was collected within each compartment to determine fungus population by

quantifying colony-forming-units (CFU). Each compartment was also evaluated regarding the mass of fresh roots (MFR), number of eggs in root system, number of eggs g⁻¹ of roots, number of root knots in root systems, number of root knots g⁻¹ of roots. The experiment was performed twice. Seventy days after sowing colonization of soil by *P. chlamydosporia* was observed in the whole soil profile for both soil classes tested. The fungus was efficient in controlling *M. incognita* in both soil classes. In sandy soil the fungus showed higher colonization, percolation and control of the nematode. Application of *P. chlamydosporia* in the treatment with soybean seeds was efficient, with colonization of the whole radicular system and promoting control of the nematode *M. incognita*. The fungus *P. chlamydosporia* used for the treatment of soybean seeds is able to percolate in soil at least until 50 cm depth, in sandy as well as in loamy soil. The fungus showed better development in sandy soil, consequently, it is more efficient to control the nematode when applied in sandy soil. .

Keywords: Biological control, fungus, nematode, *Glicine Max*

Introdução

O fungo *Pochonia chlamydosporia* Zare & Gams & Evan (sin. *Verticillium chlamydosporium*), parasita de ovos e fêmeas de nematoides é considerado um dos mais promissores agente de controle biológico desses patógenos. Nas últimas décadas, esse antagonista tem sido isolado e relatado, como um importante agente de controle biológico de nematoides em diversos países, incluindo *Heterodera avenae* na Europa (Kerry, 1975) e na Austrália (Stirling & Kerry, 1983), *Heterodera schachtii* na Holanda (Heijbroek, 1983), *Meloidogyne* spp. na China (Sun *et al.*, 2006), em Cuba (Hidalgo-Díaz *et al.*, 2000) e no Paquistão (Zaki & Maqbool, 1993), *Meloidogyne arenaria* no Alabama (Godoy *et al.*, 1983), *Meloidogyne javanica* no Brasil (Dallemole-Giaretta *et al.*, 2012) e *Nacobbus aberrans* no México (Flores-Camacho *et al.*, 2007) .

O fungo *P. chlamydosporia* possui muitas características desejáveis relacionadas ao controle biológico, como, por exemplo, boa capacidade saprofítica, que permite o fungo sobreviver no solo mesmo na ausência do nematoide (Kerry *et al.*, 1982; Stirling, 1991), produção de clamidósporos, estruturas de sobrevivência, capacidade de colonizar raízes, tanto superficialmente como endofiticamente, o que favorece o seu estabelecimento no solo e promove o crescimento das plantas (Freitas *et al.*, 2009).

Existe pouca informação disponível sobre o desempenho e multiplicação de *P. chlamydosporia* quando aplicado no tratamento de sementes visando ao controle de nematoides. Nos poucos trabalhos existentes, foram utilizados suspensões de conídios deste agente para tratar as sementes, como realizado por Nunes *et al.*(2010), ao tratarem sementes de soja (*Glycine max* L.) com *P. chlamydosporia* para o controle de *M. incognita*, verificando a eficácia do tratamento de sementes somente quando aplicado em conjunto com o tratamento do solo em pós-emergência das plantas.

Considerando que o tratamento de sementes é um dos métodos mais convenientes de introdução de organismos no ambiente da raiz Cook & Baker (1983), espera-se que a aplicação de *P. chlamydosporia* dessa forma possa controlar nematoides e viabilizar a utilização do fungo em grandes culturas como a soja.

Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar a percolação e o desenvolvimento de *P. chlamydosporia* em solo arenoso ou argiloso, bem como avaliar o controle de *M. incognita* pelo tratamento de sementes de soja (*Glycine max* L.).

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 casas de vegetação pertencentes ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

Obtenção do inóculo de *Pochonia chlamydosporia* PC-10

Para este estudo utilizou-se o isolado Pc-10 de *P. 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.

Tratamento das sementes de soja por *P. chlamydosporia*

Cem sementes de soja cultivar M-9144 RR, foram acondicionadas em tubos do tipo Falcon de 50 mL, contendo 1 mL de solução aquosa com 0,5% de sacarose. Em seguida foram adicionados 2g de produto a base de clamidósporo de *P. chlamydosporia* por tubo, quantidade suficiente para recobrir todas as sementes. Os tubos foram agitados até que os clamidósporos se aderissem às sementes.

Obtenção e preparo do inóculo de *Meloidogyne incognita*

O inóculo de *M. incognita* foi composto por ovos obtidos de população pura do nematoide, mantida em raízes de tomateiros (*Solanum lycopersicum* L.), em casa-de-vegetação. Os ovos foram extraídos das raízes conforme técnica de extração de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981).

Montagem dos experimentos

Para o estudo da distribuição vertical de *P. chlamaydosporia* no solo foram utilizados tubos de PVC (Poli cloreto de vinila) de 55 cm de altura e 100 mm de diâmetro. Os tubos plásticos foram seccionados de 12,5 em 12,5 cm, formando quatro secções por tubo de 55 cm de comprimento (0,0-12,5; 12,5-25,0; 25,0-37,5; 37,5-50,0 cm), que foram vedadas com fita

plástica para que não houvesse extravasamento de solo e de água. Um espaço vazio de 5 cm de altura foi deixado na parte superior de cada cilindro para facilitar a irrigação, e a extremidade inferior de cada cilindro foi fechada com plástico de polietileno, o qual foi perfurado para passagem de água (Figura 1 A).

Os tubos foram preenchidos com solo arenoso (83% de areia, 13% de argila e 4% de silte) ou argiloso (25% de areia, 59% de argila, e 16% de silte), sendo ambos previamente fumigados com brometo de metila na dosagem de 80 cm³/m³. Em seguida sementes de soja tratadas ou não com *P. chlamydosporia* foram semeadas em solo infestado ou não com 3000 ovos de *M. incognita*. O tratamento de sementes foi realizado utilizando 2 g do produto para cada 100 sementes.

O experimento foi conduzido duas vezes. O delineamento experimental adotado foi do tipo inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4x2 (profundidade x textura do solo), com cinco repetições por tratamento. Em ambos os experimentos, as plantas foram adubadas quatro vezes durante o ciclo com NPK + micronutrientes (Ouro Verde[®] 3 g/L, 30 mL/planta); e irrigadas quando necessário.

O primeiro experimento foi conduzido entre 15 de março a 13 de maio de 2012. Durante este período, a temperatura média do ar foi de 24 °C, a média das máximas igual a 32 °C e a média das mínimas, 18 °C. O segundo experimento foi conduzido de 01 de outubro a 29 de novembro de 2012. A temperatura média foi 29 °C, a média das máximas igual a 36 °C e a média das mínimas, 20 °C.



Figura 1 – Montagem e avaliação dos experimento realizados em casa de vegetação. (A) tubos de PVC (Poli cloreto de vinila) de 55 cm de altura e 100 mm de diâmetro, seccionados de 12,5 em 12,5 cm, formando quatro secções po tubo (0,0-12,5; 12,5-25,0; 25,0-37,5; 37,5-50,0 cm), (B) corte da parte aerea das plantas de soja após 60 dias o semeio, (C) e (D) separação dos compartimentos dos tubos em secções.

O experimento foi avaliado aos 60 dias após o semeio da soja. Para isso, retirou-se a parte aérea das plantas, e as secções dos tubos foram cuidadosamente separadas utilizando-se uma faca afiada de modo a seccionar o sistema radicular e manter o conteúdo de cada compartimento o mais intacto possível, o que resultou em amostras de solo com raízes, fungo e nematoides pertencentes a cada determinada profundidade (Figura 1 B, C e D).

Visando avaliar a distribuição vertical de *P. chlamydosporia* nos dois tipos de solo, coletou-se 1g de solo de cada compartimento para determinação da população do fungo no solo, a qual foi feita através da quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC), após

o plaqueamento em meio semi-seletivo (Gaspard *et al.*, 1990), totalizando seis repetições por tratamento.

Em cada compartimento foram avaliados a massa fresca das raízes (MFR), o número de ovos das raízes, o número de ovos g⁻¹ de raiz, o número de galhas das raízes da secção, e o número de galhas g⁻¹ de raízes da secção. Os ovos foram extraídos pela técnica de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981) e o número de ovos foi determinado com o uso de microscópio ótico e de uma câmara de contagem de Peters.

A análise estatística foi realizada com o auxílio do pacote estatístico Statistica (Statsoft, 2001). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e, quando necessário, ao teste de comparação de médias de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados

Distribuição vertical de *P. chlamydosporia* no solo

Sessenta dias após o plantio das sementes de soja tratadas com *P. chlamydosporia* foi possível verificar interações significativas ($P \leq 0,05$), entre a distribuição do fungo no perfil do solo e o tipo de solo testado (arenoso ou argiloso). A distribuição de *P. chlamydosporia*, observada pelo número de unidades formadoras de colônia (UFC) no solo, foi maior no solo arenoso que no argiloso, nas diferentes profundidades testadas e em ambos os experimentos exceto de 0-12,5 cm no experimento I e de 12,5-25 cm no experimento II (Tabela 1). A colonização de *P. chlamydosporia* em ambos os solos e experimentos, decresceu ao longo do perfil do solo da menor para a maior profundidade (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição vertical de *Pochonia chlamydosporia* no perfil de solo arenoso ou argiloso com presença de raízes de soja infectadas por *Meloidogyne incognita*

Profundidade (cm)	Número de unidades formadoras de colônia.g ⁻¹ de solo					
	Experimento I			Experimento II		
	Solo arenoso	Solo argiloso	Média	Solo arenoso	Solo argiloso	Média
0,0 - 12,5	3.090,0 Aab	2.950,0 Aa	4.565,0	10.500,0 Aa	7.333,3 Ba	8.916,5
12,5 - 25,0	5.630,0 Aa	2.800,0 Bab	4.215,0	10.000,0 Aab	6.250,0 Ab	4.062,5
25,0 - 37,5	3.900,0 Aab	1.400,0 Bb	2.650,0	6.666,6 Ab	6.166,6 Bbc	6.416,0
37,5 - 50,0	1.920,0 Ab	720,0 Bc	1.320,0	3.083,3 Ac	1.250,0 Bc	2.166,5
Média	3.630,0	1.967,5		7.562,2	5.249,7	

*Média de cinco repetições; médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha são iguais pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Distribuição de *P. chlamydosporia* na presença e na ausência de *Meloidogyne incognita*

Pela avaliação da população do fungo no solo, medida em unidades formadoras de colônia (UFC) de *P. chlamydosporia*, verificou-se que a colonização do fungo foi maior na presença do nematoide do que na ausência, para ambos os solos testados (Tabela 2). A presença de *M. incognita* em solo arenoso aumentou a concentração de *P. chlamydosporia* no solo em 38,7%, já para o solo argiloso esse aumento foi de 54,5% (Tabela 2).

Controle de *M. incognita* em soja por *P. chlamydosporia*

Quanto à massa de raízes fresca (MRF) de plantas de soja inoculadas com *M. incognita*, houve diferença estatística apenas no primeiro experimento para o solo arenoso tratado com *P. chlamydosporia* (Tabela 3), com incremento de 78,94%, quando comparado com o controle.

Não houve interações significativas entre a aplicação de *P. chlamydosporia* e o tipo de solo para o número de galhas no primeiro experimento. Somente o tipo de solo teve influência sobre o número de galhas de *M. incognita* por sistema radicular onde, no solo arenoso as raízes apresentaram menor número de galhas quando comparado ao solo argiloso (Tabela 4).

Contudo, no segundo experimento, tanto o tipo de solo quanto *P. chlamydosporia* influenciaram o número de galhas nas raízes de soja inoculadas com *M. incognita*. A aplicação de *P. chlamydosporia* no solo arenoso proporcionou as maiores reduções do número de galhas por sistema radicular (Tabela 4)

Quanto ao número de galhas por grama de raiz de soja no primeiro experimento, somente *P. chlamydosporia* teve influência no controle de *M. incognita*, com redução de 57,2% no número de galhas por grama de raiz para o solo arenoso, e de 33,2% pra o solo argiloso, quando comparados ao controle (Tabela 5). Já para o segundo experimento, houve

Tabela 2 – População de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) em solo arenoso ou argiloso na presença de *Meloidogyne incognita* (Mi)

Tratamentos	Número de unidades formadoras de colônia .g ⁻¹ de solo					
	Experimento I			Experimento II		
	Solo arenoso	Solo argiloso	Média	Solo arenoso	Solo argiloso	Média
Pc -10	11.290,0 b	5.190,0 b	8.240,0	20.916,7 b	12.833,0 b	16.874,8
Pc -10 + Mi	14.540,0 a	8.020,0 a	11.280,0	30.250,0 a	21.000,0a	25.625,0
Média	12.915,0	6.605,0		25.583,3	16.916,7	
CV %	12,3	20,9		20,1	4,9	

Média de cinco repetições; médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna são iguais pelo teste F a 5% de probabilidade;

Tabela 3 - Massa fresca de raiz de plantas de soja tratadas ou não com *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) e inoculadas com *Meloidogyne incognita* (Mi) em solo arenoso e argiloso

Tipo de Solo	Experimento I		Experimento II	
	Pc-10 + Mi	Mi	Pc-10 + Mi	Mi
Solo arenoso	6,8 Aa	3,8 Ba	29,5 ^{ns}	29,5 ^{ns}
Solo argiloso	6,7 Aa	5,3 Aa	35,9	33,7

Média de cinco repetições; médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna ou maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade.

Tabela 4 – Efeito do tratamento de semente por *P. chlamydosporia* (Pc-10) sobre o número de galhas de *Meloidogyne incognita* (Mi) por sistema radicular de soja, aos 60 dias após o semeio.

	Galhas Totais							
	Experimento I				Experimento II			
	Solo arenoso	Solo argiloso	Média	CV(%)	Solo arenoso	Solo argiloso	Média	CV(%)
Pc-10 + Mi	360,0 Ba	432,4 Aa	396,2	27,9	1.170,7Bb	1.739,5 Ab	1.455,1	31,4
Mi	348,0 Ba	613,4 Aa	480,7	46,9	1.709,2 Ba	2.232,7 Aa	1.970,9	25,4
Média	354,0	522,9			1.439,9	1.986,0		
CV(%)	41,9	32,4			35,2	21,6		

Média de cinco repetições; médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha são iguais pelo teste F a 5% de probabilidade.

Tabela 5 – Efeito do tratamento de semente por *P. chlamydosporia* (Pc-10) sobre o número de galhas por grama de raiz, de *Meloidogyne incognita* (Mi) por grama de raiz de soja, aos 60 dias após o semeio.

	Número de galhas por grama de raiz							
	Experimento I				Experimento II			
	Solo arenoso	Solo argiloso	Média	CV(%)	Solo arenoso	Solo argiloso	Média	CV(%)
Pc-10 + Mi	49,9 b	69,4 b	59,7	31,0	39,6 Bb	50,8 Ab	45,2	26,6
Mi	116,6 a	103,9 a	110,3	37,9	57,6 Ba	67,2 Aa	62,4	17,6
Média	83,3 ^{ns}	86,7			48,6	59,0		
CV(%)	63,6	30,4			27,4	23,4		

Média de cinco repetições; ^{ns} não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade; ¹ valores obtidos pela divisão do número de galhas pela massa da raiz; médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna são iguais pelo teste F a 5% de probabilidade.

interações significativas, quanto ao solo utilizado e a aplicação de *P. chlamydosporia* onde o fungo teve maior eficácia quando aplicado em solo arenoso (Tabela 5).

O tipo de solo utilizado e a aplicação de *P. chlamydosporia*, influenciaram o número de ovos de *M. incognita* por sistema radicular, em ambos os experimentos (Tabela 6). A aplicação de *P. chlamydosporia* no tratamento de sementes de soja, reduziu o número de ovos por sistema radicular de plantas de soja nos dois tipos de solo testados. Entretanto, o controle de *M. incognita* foi maior quando se fez a aplicação do agente de biocontrole em solo arenoso, com redução de 48,2% e 65,9% no número de ovos por sistema radicular de plantas, comparado como solo argiloso com redução de 43,4% e 26,8% para o primeiro e segundo experimento respectivamente (Tabela 6).

Quanto ao número de ovos por grama de raiz de soja no primeiro experimento somente o fungo *P. chlamydosporia* teve influência sobre o controle de *M. incognita* (Tabela 7). No primeiro e segundo experimento *P. chlamydosporia*, reduziu em 81% e 64,4% o número de ovos por grama de raiz de soja quando aplicado em solo arenoso, e em 46,9% e 29,8% quando aplicado em solo argiloso. No segundo experimento *P. chlamydosporia* foi mais efetiva no controle do nematoide quando aplicada em solo arenoso, comparado ao solo argiloso (Tabela 7).

Discussão

A percolação de *Pochonia chlamydosporia* no solo pelo tratamento de sementes de soja foi considerada efetiva para os dois tipos de solos testados. O fungo foi detectado até cerca de 50 cm de profundidade, tanto no solo arenoso quanto no solo argiloso. Esses resultados corroboram com os obtidos por De Leij *et al.*, (1993), que estudando o efeito da água na percolação de *P. chlamydosporia* em uma mistura de areia e turfa, verificaram que o agente de biocontrole foi capaz de colonizar o solo até uma profundidade de 55 cm.

Tabela 6 – Efeito do tratamento de semente por *P. chlamydosporia* (Pc-10) sobre o número de ovos por sistema radicular de soja inoculada com *Meloidogyne incognita* (Mi), aos 60 dias após o semeio.

Número de ovos por sistema radicular								
Tratamentos	Experimento I				Experimento II			
	Solo arenoso	Solo argiloso	Média	CV(%)	Solo arenoso	Solo argiloso	Média	CV(%)
Pc-10 + Mi	135.564,0 Bb	332.704,0Ab	234.134,0	62,16	30.007,1Bb	115.991,7Ab	72.999,4	73,30
Mi	261.652,0 Ba	588.101,6Aa	424.876,8	53,43	88.117,5Ba	158.454,0Aa	123.285,8	33,90
Média	198.608,0	460.402,8			59.062,3	137.222,8		
CV(%)	74,9	39,3			60,2	27,20		

Média de cinco repetições; ^{ns} não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade; médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna são iguais pelo teste F a 5% de probabilidade

Tabela 7 – Efeito do tratamento de semente por *P. chlamydosporia* (Pc-10) sobre o número de ovos de *Meloidogyne incognita* (Mi) por grama de raiz de soja, aos 60 dias após o semeio.

Número de ovos por grama de raiz								
Tratamentos	Experimento I				Experimento II			
	Arenoso	Argiloso	Média	CV(%)	Arenoso*	Argiloso	Média	CV(%)
Pc-10 + Mi	19.304,0 b	53.325,4 b	36.314,7	65,80	1.078,9 Bb	3.407,3 Ab	2.243,1	73,30
Mi	1.011.696,0 a	100.379,1 a	101.037,6	53,60	3.024,7 Ba	4.852,6 Aa	3.938,6	32,40
Média	60.500,0 ^{ns}	76.852,3			2.051,9 B	4.129,9 A		
CV(%)	114,5	38,6			60,0	34,5		

Média de cinco repetições; ^{ns} não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade; ¹ valores obtidos pela divisão do número de ovos pela massa da raiz; médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna são iguais pelo teste F a 5% de probabilidade*Dados transformados para log(x)

O desenvolvimento de *P. chlamydosporia* foi melhor em solo arenoso em todas as profundidades estudadas. A estrutura do solo parece ser um importante fator para percolação e multiplicação desse agente no solo. Comparando a estrutura dos dois tipos de solo estudados, o solo arenoso possui maior porosidade, maior aeração, conseqüentemente, maior oxigenação. O fungo *P. chlamydosporia* é um organismo aeróbio, com isso, níveis menores de oxigênio podem fazer com que seu estabelecimento no solo e na superfície radicular sejam menores (De Leij *et al.*, 1993), fato este, que pode estar relacionado ao menor desenvolvimento do fungo em solos argilosos. Além disso, o conídio de *P. chlamydosporia* mede cerca de 2-4µm (Gams, 1988), assim em solos com maior porosidade a sua percolação pode ser facilitada.

Outro agente de controle biológico que se estabelece melhor em solos arenosos são os fungos micorrízicos arbusculares. Em solos arenosos, desde que não muito lixiviados, as associações micorrízicas são maiores, havendo maior concentração de esporos neste tipo de solo (Sieverding, 1991). Em solos argilosos a abundância de fungos micorrízicos arbusculares é menor, devido à sua maior compactação e menor aeração (Sieverding, 1991).

O sistema radicular das plantas de soja se desenvolveu mais no segundo experimento, mesmo sendo utilizadas as mesmas práticas culturais em ambos os experimentos. Esse fato pode estar relacionado à época de plantio e, conseqüentemente, as altas temperaturas ocorridas nos meses de outubro e novembro, uma vez que a temperatura e o fotoperíodo são uns dos fatores mais importantes para o desenvolvimento da soja (Câmara, 1998).

A colonização dos solos arenoso e argiloso por *P. chlamydosporia* foi maior na presença do que na ausência de *M. incognita*. Este maior número de unidades formadoras de colônia nos solos contendo raízes parasitadas por nematoide está relacionado à presença dos ovos e fêmeas, e à liberação dos exsudatos pelas raízes. Assim, raízes infectadas por nematoides liberam maior quantidade de exsudatos radiculares, que estimulam o crescimento do fungo (De Leij *et al.*, 1993; Bourne *et al.*, 1996; Bourne & Kerry, 2000).

A presença do nematoide aumentou em mais de 35% a colonização do fungo no solo (Tabela 2). O fungo pode aumentar sua concentração no solo de 10^4 para 10^5 UFC por g^{-1} solo, ao longo de um período de 30 dias, especialmente em raízes com presença de galhas (De Leij & Kerry, 1991).

O nematoide *M. incognita* causa maiores danos quando presente em solos arenosos, como observado nos resultados obtidos para massa fresca de raiz no primeiro experimento. Contudo, a aplicação e o bom desenvolvimento de *P. chlamydosporia* neste tipo de solo reduziu o efeito causado pelo nematoide (Tabela 3).

O tratamento de sementes de soja com *P. chlamydosporia* foi capaz de reduzir a população do nematoide nos dois tipos de solos testados, contudo, as reduções foram maiores quando o fungo foi aplicado em solos arenosos. Esse fato está relacionado ao maior desenvolvimento e percolação do fungo neste tipo de solo como relatado neste trabalho.

Nunes *et al.* (2010), avaliaram o controle de *M. incognita* em soja, pela aplicação de conídios de *P. chlamydosporia* no tratamento de sementes, no tratamento em pós-emergência e na junção de ambos tratamentos. Estes autores verificaram que somente a utilização do tratamento de sementes juntamente com aplicação em pós-emergência das plantas, foram eficientes no controle de *M. incognita* (Nunes *et al.*, 2010).

O fato deste experimento não ter tido os mesmos resultados obtidos neste trabalho, onde o tratamento de sementes com *P. chlamydosporia* foi efetivo para o controle do mesmo nematoide e na mesma cultura, pode estar relacionado ao fato da utilização de suspensão de conídios para tratar as sementes, ao invés da aplicação de clamidósporos (estruturas de resistência), como foram utilizados neste estudo.

O presente estudo comprova a eficiência do tratamento de sementes com *P. chlamydosporia* no controle de *M. incognita* em soja, além de ter sido verificado que os propágulos do fungo podem percolar pelo solo, sendo encontrados em profundidades de até

50 cm em solo arenoso ou argiloso. Contudo, os melhores resultados foram alcançados em solo arenoso.

Os resultados obtidos tornam possível a aplicação deste fungo via tratamento de sementes, o que reduz a quantidade do produto biológico requerida por hectare, viabilizando economicamente sua utilização para grandes culturas, a exemplo da soja. Entretanto, deve-se tomar cuidado ao se aplicar o fungo em sementes tratadas com fungicidas, pois esses produtos podem inibir o desenvolvimento fúngico. A compatibilidade deste fungo com os fungicidas usualmente utilizados em tratamento de sementes é assunto de outro estudo.

Literatura citada

AMER, Z.; ZAKI, M.J.; ABID, M.; GOWEN, S.R. & KERRY, B.R.. 2004. Management of root- knot nematode (*Meloidogyne javanica*) by biocontrol agents in two crop rotations. **International Journal of Biology and Biotechnology**, 1(1): 67-73.

BONETI, J.I.S & FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, 6(3): 533. (Resumo).

BOURNE, J.M. & KERRY, B.R.. 2000. Observations on the survival and competitive ability of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* in soil. **International Journal of Nematology**, 10 (1): 9-18.

BOURNE, J.M.; KERRY, B.R. & DE LEIJ, F.A.A.M. 1996. The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. **Biocontrol Science and Technology**, 6: 539-548.

CÂMARA, G.M.S. 1998. Ecofisiologia da soja e rendimento. In: CÂMARA, G.M.S. (Ed.) **Soja: tecnologia da produção**. Piracicaba: s.ed., 256-277 p.

COOK, R.J. & BAKER, K.F. 1983. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathology Society, 539p.

CRUMP, D. & F, IRVING. 1992. Selection of isolates and methods of culturing *Verticillium chlamydosporium* and its efficacy as a biological control agent of beet and potato cyst nematodes. **Nematologica**, 38: 367-374.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A.; PEREIRA, O. L.; ZOOCA, R.J.F. & FERRAZ, S. 2012. Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. **Crop Protection**, 42: 102-107.

DE LEIJ, F.A.A.M. & KERRY, B.R. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as biological a potential control agent for *Meloidogyne arenaria*. **Revue de Nematologie** 14(1): 157-164.

DE LEIJ, F.A.A.M.; KERRY, B.R. & DENNHY, J.A. 1993. The effect of fungal application rate and nematode density on the effectiveness of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita*. **Nematologica**, 38: 112-122.

FLORES-CAMACHO, R.; ATKINS, S.D.; MAZANILLA-LÓPEZ.; PRADO-VERA, I. C. Del.; MARTÍNEZ-GARZA, A. 2008. Caracterización de Aislamientos Mexicanos de *Pochonia Chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare para El control Biológico de *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorney Allen. **Revista Mexicana de Fitopatología**, 26(2): 93-104.

FREITAS, L.G.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FERRAZ, S.; ZOOCA, R.J.F. & PODESTÁ, G.S. 2009. Controle biológico de nematoides: estudos de casos. In: Zambolim, L.; Picanço, M.C. (Eds) 122 **Controle biológico de pragas e doenças: exemplos práticos**. Viçosa. UFV-DFP. pp. 41- 82.

GAMS, W. 1988. A contribution to the knowledge of nematophagus species of *Verticillium*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, 94: 123-148.

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

GODOY, G.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. & MORGAN-JONES, G. 1983. Fungal parasites of *Meloidogyne arenaria* eggs in an Alabama soil. A mycological survey and greenhouse studies. **Nematopica**, 13: 201-213.

HEIJBROEK, W. 1983. Some effects of fungal parasites on the population development of the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm.). **Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent**, 48:433-439.

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 (4) 277-284.

HUSSEY, R. S. & BARKER, K. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, 57:1025–1028.

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 eggs and females. **Annals of Applied Biology**, 100: 489-499.

KERRY.B.R. 1975. Fungi and the decrease of cereal cyst-nematode populations in cereal monoculture. **EPPO Bulletin**, 5:353-361.

NUNES, A.C.; MONTEIRO, A.C. & POMELA, A.W.V. 2010. Uso de agentes microbianos e químico para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja. **Acta Scientiarum Agronomy**, 32(3): 403-409.

SIEVERDING E. 1991. **Vesicular-Arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems**. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH, Federal Republic of Germany. 371 p.

SOSNOWSKA, D. & SIKORA. R. 2001. The role of fungi in reduction of sugar beet nematode (*Heterodera schachtii* Schmidt) population. **Bulletin-OILB-SROP**, 24(1): 151-156.

STATSOFT, Inc. 2001. Statistica for Windows (computer program manual). Tulsa, OK: Statsoft Inc. (<http://www.statsoft.com>).

STIRLING, G. R. & KERRY. B. R. 1983. Antagonists of the cereal cyst nematode *Heterodera avenae* Woll in Australian soils. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, 23: 318-324.

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

SUN, M. H.; GAO, L.; SHI, Y. X.; LI, B. J. & LIU, X. Z. 2006. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. **Journal of Invertebrate Pathology**, 93: 22-28.

WILLCOX, J. & TRIBE, H. T. 1974. Fungal parasitism in cysts of *Heterodera*. I Preliminary investigations. **Transactions of the British Mycological Society**, 62(3):585-594.

ZAKI, M.J. & MAQBOOL, M.A. 1993. Effect of temperature and culture media on the growth of *Verticillium chlamydosporium*, an egg parasite of root-knot nematode and cyst nematodes. Pak. Journal Phytopathology, 86: 102–105.

ZARE, R.; GAMS, W. & EVANS, H.C. 2001. A revision of *Verticillium* section *V. Prostrata*. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthra*. **Nova Hedwigia**, 73(1-2): 51-86.

ARTIGO 2 - *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne incognita* raça 3 em algodão

***Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne incognita* raça 3 em algodão**

Resumo

Objetivou-se avaliar a eficiência de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* para o controle de *Meloidogyne incognita* raça 3 em algodoeiro, quando aplicado em tratamento de sementes e em tratamento de solo. O experimento constou de três tratamentos: 1) tratamento de sementes com 0,9 g de produto à base de clamidósporos do fungo *P. chlamydosporia* (Rizotec) para cada 100 sementes; 2) tratamento de solo, com aplicação de 5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo e; 3) tratamento de sementes e de solo, com ambos na dose inteira. O experimento foi conduzido duas vezes. Para o crescimento das plantas foram utilizados vasos contendo a mistura de terra de barranco e areia, na proporção 1:1 (p: p). O solo de cada vaso foi infestado com 3.000 ovos de *M. incognita*. Em seguida, adicionou-se uma semente de algodão, tratada ou não, por vaso. Ao final do experimento, foram avaliados a altura da parte aérea, massa da parte aérea fresca, massa da raiz fresca, número total de galhas por planta, número de galhas.g⁻¹ de raiz, número de ovos e ovos.g⁻¹ de raiz. Para a variável ovos.g⁻¹ de raiz, todos os tratamentos diferiram do controle, tanto no primeiro quanto no segundo experimento. Quando comparados com as parcelas que com sementes não tratadas, o tratamento de sementes com *Pochonia chlamydosporia* reduziu, no primeiro e segundo experimento, respectivamente, em 80,5% e 68,7% a reprodução do nematoide. Para o tratamento de solo as reduções foram de 83,7% e 56,6%, e, para o tratamento solo+semente as reduções foram na ordem de 77,5% e 43,8%. Assim, a aplicação de *P. chlamydosporia* no tratamento de sementes de algodão é viável, promovendo o controle de *M. incognita*.

Palavras-chave: controle biológico, nematoide das galhas, *Gossypium hirsutum* L., tratamento de sementes.

Abstract

Control of *Meloidogyne incognita* Race 3 in cotton with *Pochonia chlamydosporia*

The aim of this work was to evaluate control efficiency of *Meloidogyne incognita* Race 3 in cotton with the use of *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* in cotton seeds and soil. Three treatments were tested: 1) seeds treated with 0,9 g of a commercial product based on chlamydospores of *P. chlamydosporia* (Rizotec) for each 100 cotton seeds, 2) soil treatment by the use of 5.000 chlamydospores g⁻¹ of soil, 3) seed and soil treatment, with both, the commercial product and chlamydospores at whole dosage. The experiment was performed twice. Pots containing a mixture of common soil and sand, 1:1 (w/w) were used. Each pot was infested with 3.000 eggs of *M. incognita* before planting one cotton seed, treated or not. Height of the aerial portion, mass of the aerial fresh portion, mass of dry roots, total number of knots per plant, number of knots g⁻¹ of roots and number of eggs g⁻¹ of roots were evaluated at the end of the experiment. All treatments differed from the control, regarding the variable eggs g⁻¹ of roots, in both, the first and second experiment. Treatment of seeds with *P. chlamydosporia* reduced nematode reproduction, in 80,5% and 68,7% in the first and second experiment respectively, when compared with the experimental units without treatment. In the case of soil treatment the reduction was of 83,7 % and 56,6 %, while treatment of soil + seeds had a reduction of 77,5 % and 43,8 % of nematode reproduction in the first and second experiment respectively. Therefore, application of *P. chlamydosporia* on cotton seeds is feasible to promote control of *M. incognita*.

Keywords: Biological control, root knot nematode, *Gossypium hirsutum* L., seed treatment.

Introdução

O algodão (*Gossypium hirsutum* L.) é uma cultura economicamente importante no Brasil, e atualmente a produção ocorre predominantemente em três estados, Mato Grosso, Bahia e Goiás (Mapa, 2012). Dentre as doenças que afetam a cultura do algodoeiro destacam-se as causadas por fitonematoides. Os nematoides estão frequentemente associados à baixa produtividade da cultura, contribuindo também para o aumento do custo de produção (Machado *et al.*, 2003).

Os principais nematoides que afetam a cultura do algodoeiro são o nematoide das galhas [*Meloidogyne incognita* ((Kofoid e White) Chitwood)], o nematoide reniforme (*Rotylenchulus reniformis* Linford e Oliveira, 1940) e o nematoide das lesões radiculares [*Pratylenchus brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev e Sch. Stekhoven, (1941), (Goulart *et al.*, 1997; Inomoto, 2001; Asmus, 2004)].

Dos nematoides associados à cultura do algodoeiro, *M. incognita* é o que apresenta maior importância econômica no Brasil, possuindo quatro raças fisiológicas descritas, sendo que apenas as raças 3 e 4 são parasitas do algodoeiro (Suassuna *et al.*, 2006). Essa espécie de patógeno pode causar sérios danos à cultura do algodão e em altas populações pode inviabilizar a cultura, com relatos de abandono de áreas infestadas nos estados de São Paulo e Goiás (Ide, 2000), além de agravar doenças relacionadas ao sistema radicular, com destaque para a murcha de Fusarium causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (Mota *et al.*, 2012).

Os métodos utilizados para o controle de fitonematoides envolvem o uso de nematicidas, rotação de culturas, uso de variedade de plantas resistentes, a solarização do solo e o controle biológico (Almeida *et al.*, 2005). O desenvolvimento e uso de genótipos com resistência genética seria um método efetivo de se limitar perdas de rendimento de algodão

causadas por *M. incognita*. Entretanto, a maioria dos genótipos de algodão cultivados no Brasil é suscetível a este nematoide (Mota *et al.*,2012).

Dentre os métodos de controle utilizados, o controle biológico de fitonematoides tem ganhado destaque, isso se deve a busca de novos métodos de controle sustentáveis os quais não são prejudiciais ao homem e o meio ambiente.

O agente de controle biológico *Pochonia chlamydosporia* Zare Gams & Evans (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard), parasita facultativo de ovos e fêmeas, tem merecido grande destaque pelo seu potencial no controle de nematoides das galhas. Esse agente de biocontrole apresenta a vantagem de colonizar o sistema radicular da planta hospedeira, se alimentar de matéria orgânica e por produzir clamidósporos, que auxiliam no estabelecimento desse organismo no solo (Stirling, 1991).

A introdução de *P. chlamydosporia* no solo de forma prática, eficiente e integrada ao sistema produtivo é um desafio (Viggiano *et al.*, 2012). É possível realizar a aplicação do fungo por meio de irrigação, com uso de formulações de suspensão aquosa de conídios ou de clamidósporos (Ferraz *et al.*, 2010; Dallemole-Giaretta *et al.*, 2012). Contudo, esse tipo de aplicação em grandes culturas, como no caso do algodão, pode ser dificultado pela quantidade de produto requerida e forma de aplicação, inviabilizando o uso do fungo. Embora vários estudos tenham mostrado a eficiência de *P. chlamydosporia* para o controle de *Meloidogyne* spp. Goeldi, há carência de pesquisas que comprovem o efeito desse agente aplicado via tratamento de sementes.

Considerando que o tratamento de sementes é um dos métodos mais convenientes de introdução de organismos no ambiente da raiz Cook & Baker (1983), espera-se que a aplicação de *P. chlamydosporia* dessa forma possa controlar nematoides e viabilizar a utilização do fungo nas cultivares de algodão.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência do fungo *Pochonia chlamydosporia* aplicado no tratamento de solo, sementes e tratamento de semente e de solo,

no intuito de viabilizar a sua aplicação no tratamento de sementes, visando o controle de *Meloidogyne incognita* raça 3 em algodoeiro.

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 casas de vegetação pertencentes ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

Obtenção do inóculo de *Pochonia chlamydosporia* PC-10

Para este estudo utilizou-se o isolado Pc-10 de *P. 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.

Obtenção e preparo do inóculo de *Meloidogyne incognita* raça 3

O inóculo de *M. incognita* foi composto por ovos obtidos de população pura do nematoide, mantida em raízes de tomateiros (*Solanum lycopersicum* L.), em casa-de-vegetação. Os ovos foram extraídos das raízes conforme técnica de extração de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981).

Montagem dos experimentos

Para o controle de *M. incognita* em algodoeiro foram testados dois métodos de aplicação do produto à base fungo *P. chlamydosporia*. Os tratamentos utilizados nos experimentos foram: T1- Tratamento de sementes com clamidósporos de *P. chlamydosporia*,

na dosagem de 0,9 g de clamidósporos para 100 sementes; T2- Solo tratado com 5000 clamidósporos de *P. chlamydosporia* por grama de solo; T3- Tratamento de sementes+tratamento de solo, ambos em dose total; T4- Testemunha, sem tratamento de sementes ou de solo. Em todos os tratamentos o solo foi infestado com o nematoide *M. incognita*.

Vasos de plástico de 2 L de capacidade foram preenchidos com a mistura de terra e areia, na proporção 1:1 (p/p), tratado com brometo de metila na dosagem de 80 cm³/m³ de solo. Cem sementes de algodão da cultivar Fibermax 966, foram acondicionadas em tubos do tipo Falcon de 50 mL, contendo 0,6 mL de solução aquosa com 0,5% de sacarose. Em seguida foram adicionados 0,9 g de produto a base de clamidósporo de *P. chlamydosporia* por tubo, quantidade suficiente para recobrir todas as sementes. Os tubos foram agitados manualmente até que os clamidósporos se aderissem às sementes.

Para o tratamento de solo com *P. chlamydosporia*, incorporou-se 5.000 clamidósporos por grama de solo. Para tal, os clamidósporos foram adicionados a 2 kg de solo e homogeneizados em um saco plástico de 5 L de capacidade. Após o solo foi acondicionado em vaso de plástico.

Para a realização dos experimentos, o solo de cada vaso foi infestado com 3.000 ovos de *M. incognita* raça 3. Uma semente de algodão da cultivar Fibermax-966, tratada ou não com *P. chlamydosporia*, foi semeada em cada vaso. O experimento foi conduzido duas vezes. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Cada tratamento foi repetido seis vezes e a parcela experimental foi constituída por um vaso com uma planta de algodoeiro.

O primeiro experimento foi conduzido entre 27 de fevereiro e 25 de maio de 2011. Durante este período, a temperatura média do ar foi de 25 °C, a média das máximas igual a 32 °C e a média das mínimas, 19 °C. O segundo experimento foi conduzido de 03 de setembro a

02 de dezembro de 2011. A temperatura média foi 27 °C, a média das máximas igual a 35 °C e a média das mínimas, 19 °C.

Noventa dias após a inoculação e semeio das sementes de algodoeiro, as plantas foram extraídas e foram avaliadas a: altura da parte aérea, massa da parte aérea fresca e da raiz, número de galhas por sistema radicular e por grama de raiz, número de ovos por sistema radicular e por grama de raiz. Os ovos foram extraídos pela técnica de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981) e o número de ovos foi estimado em microscópio óptico com o auxílio de lâmina de Peters.

Ao final do experimento, coletou-se 1g de solo de cada vaso para determinação da população do fungo no solo, a qual foi feita através da quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC). Foi feito o plaqueamento em meio semi-selitivo conforme descrito por Gaspard *et al.* (1990), totalizando seis repetições por tratamento.

A análise estatística foi realizada com o auxílio do pacote estatístico Statistica (Statsoft, 2001). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

No primeiro experimento não foi observado aumento na altura, massa da parte aérea fresca da e massa de raízes fresca de algodoeiro quando comparado com a testemunha nematoide (Tabela 1). Entretanto, no segundo experimento, os tratamentos de sementes e de sementes + tratamento de solo aumentaram a altura da planta (49%, 52%), na massa da parte aérea fresca (97,4%, 102,5%) e na massa de raízes fresca (79%, 121%), quando comparado ao tratamento controle, (Tabela 1).

Foi possível verificar que houve maior população de *M. incognita* no segundo experimento, e, conseqüentemente, um menor desenvolvimento das plantas em relação ao

Tabela 1 – Desenvolvimento de plantas de algodão tratadas com diferentes formas de aplicação de *Pochonia chlamydosporia* (Pc- 10) no controle de *Meloidogyne incognita* (Mi), aos 90 dias após a semeadura das sementes.

Tratamento	APA		MPAF		MRF	
	Exp I	Exp II	Exp I	Exp II	Exp I	Exp II
Semente tratada com Pc-10	56,1 ^{ns}	31,1 a	34,0 ^{ns}	15,2 a	16,2 ^{ns}	7,7 ab
Solo tratado com Pc-10	56,6	24,4 ab	35,6	8,7 b	17,5	5,7 b
Semente + solo tratados com Pc-10	55,3	31,8 a	35,5	15,6 a	15,2	9,5 a
Testemunha (Mi)	52,0	20,9 b	31,4	7,7 b	11,1	4,3 b
Médias	55,0	27,0	34,1	11,8	15,0	6,8
CV (%)	14,3	24,2	21,3	43,1	28,3	38,2

Média de seis repetições; ^{ns} não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade; APA=Altura da parte aérea, MPAF=Massa da parte aérea fresca, MRF=Massa de raiz fresca; Médias seguidas da mesma letra são iguais pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

primeiro experimento, em todos os tratamentos (Tabela 2). Entretanto, as plantas de algodoeiro tratadas com o fungo se desenvolveram mais que as do tratamento testemunha, apenas com o nematoide.

Esse fato pode estar relacionado à maior colonização radicular de *P. chlamydosporia* ocorrida em raízes infectadas pelo nematoide, do que em raízes sadias. As raízes infectadas por nematoides liberam maior quantidade de exsudatos radiculares, os quais estimulam o crescimento do fungo (De Leij *et al.* (1992), Bourne *et al.*, (1996) e Bourne & Kerry, 2000).

O tratamento de sementes com *P. chlamydosporia* estimulou o crescimento das plantas, provavelmente pela colonização do fungo já nos primórdios radiculares onde a liberação de exsudatos de semente durante a germinação (Tabela 1). Os exsudatos produzidos pela germinação das sementes são estímulos primários para promover a germinação de propágulos de alguns fungos habitantes do solo (Nelson, 1990).

A aplicação de *P. chlamydosporia* reduziu o número de ovos de *M. incognita* por sistema radicular de algodoeiro, independente da forma de aplicação do fungo no primeiro experimento, e o número de ovos.g⁻¹ de raiz em ambos os experimentos (Tabela 2). No segundo experimento, a redução no número de ovos por sistema radicular foi maior quando se fez o uso do tratamento de sementes. Os demais tratamentos não diferiram do controle (Tabela 2).

O tratamento de sementes com *Pochonia chlamydosporia* reduziu em 80,5% e 68,7% a reprodução do nematoide em relação à testemunha não tratada. Para o tratamento de solo as reduções foram de 83,7% e 56,6%, e, para o tratamento solo + semente as reduções foram na ordem de 77,5% e 43,8%, no primeiro e no segundo experimento, respectivamente (Tabela 2).

Nenhum dos tratamentos estudados reduziu o número de galhas por sistema radicular ou o número de galhas.g⁻¹ de raiz de algodoeiro (Tabela 2). Esse fato pode ter ocorrido devido os juvenis da população inicial do nematoide terem eclodido e penetrado nas raízes antes da colonização do fungo no solo.

Tabela 2 – Efeito dos tratamentos de semente, solo, tratamento de sementes + solo por *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) sobre o número de galhas, galhas/g raiz⁻¹, número de ovos e ovos/g raiz⁻¹ de *Meloidogyne incognita* (Mi) por sistema radicular de algodoeiro, aos 90 dias após o semeio das sementes.

Tratamento	Número de galhas por sistema radicular		Número de ovos por sistema radicular		Número de galhas/g raiz ⁻¹		Número de ovos/g raiz ⁻¹	
	Exp I	Exp II	Exp I	Exp II	Exp I	Exp II	Exp I	Exp II
Semente tratada com Pc-10	964,8 ^{ns}	587,9 ^{ns}	16.387,6 b	147.192,9 b	53,1 ^{ns}	81,9 ^{ns}	953,2 b	25.346,8 b
Solo tratado com Pc-10	869,4	474,0	11.723,6 b	203.525,0 ab	50,3	83,4	793,9 b	35.138,0 b
Semente + solo tratados com Pc-10	845,2	855,1	16.536,0 b	336.000,0 a	55,8	86,6	1.100,4 b	35.527,3 b
Testemunha (Mi)	760,2	620,3	45.792,0 a	315.000,0 a	73,1	174,9	4.895,5 a	81.082,3 a
Médias	859,9	634,3	22.609,8	250.429,4	58,1	106,7	1.935,7	44273, 6
CV%	45,7	49,7	65,5	47,25	35,3	62,7	75,7	62,5

Média de seis repetições; ^{ns} não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade; ¹ valores obtidos pela divisão do número de galhas ou de ovos pela massa da raiz; médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna são iguais pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A eficiência de *P. chlamydosporia* em parasitar os ovos presentes no solo e, portanto, reduzir o número de nematoides que irão penetrar nas raízes do hospedeiro, está relacionada com a temperatura, o estágio de desenvolvimento do embrião dentro do ovo, e o período no qual os ovos e fungo ficam no solo antes do aparecimento do sistema radicular (Lopes *et al.*, 2007).

A faixa de temperatura ótima para a eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognitade* é entre 25 a 30°C (Tihohod, 1993), e as temperaturas médias registradas foram de 25 e 27°C no primeiro e segundo experimento, respectivamente. Assim, as médias de temperaturas registradas neste experimento podem ter influenciado a formação das galhas nos tratamentos, com a eclosão dos juvenis (J2) dos ovos presentes no solo, antes que os mesmos fossem colonizados pelo fungo. Os juvenis conseguem penetrar na planta hospedeira, já que os nematoides móveis não são parasitados por *P. chlamydosporia* (Kerry & Bourne, 2002).

Podestá (2010), obsevou que a eficiência de *P. chlamydosporia* (Pc-10), em reduzir galhas aumentou com o período entre a aplicação do fungo no solo e o transplante de mudas de tomate. No caso do tratamento de sementes, o fungo é aplicado ao solo durante a semeadura, e o período para que o fungo colonize os ovos antes do aparecimento das raízes é reduzido, não impedindo a penetração dos juvenis nas raízes, e por consequência, não houve redução de galhas nos 90 dias de condução do experimento.

Mesmo não havendo redução no número de galhas em raízes de algodoeiro em ambos os experimentos, houve redução significativa quanto ao número de ovos. A concentração de *P. chlamydosporia* no solo pode aumentar de 10^4 para 10^5 UFC por g^{-1} solo, ao longo de um período de 30 dias, especialmente em raízes com presença de galhas (De Leij & Kerry, 1991). Assim, num período de cinco meses, tempo em que a cultura do algodão permanece no campo, a população do nematoide já estaria reduzida, e esse fato

poderia influenciar na diminuição significativa do número de galhas, ao final do ciclo e para o plantio subsequente.

A fase de ovo no gênero *Meloidogyne* sp. é o estágio do ciclo de vida mais vulnerável ao ataque de antagonistas, por estarem os ovos geralmente localizados sobre a superfície da raiz e ficarem expostos ao parasitismo de fungos um agente de controle como *P. chlamydosporia* pode se estabelecer na vizinhança e eliminar muitos ovos produzidos por um único nematoide (Stirling, 1991).

Lopez-Llorca *et al.* (2002), ao avaliarem a colonização de *P. chlamydosporia* na rizosfera de plantas de cevada e de tomate, constataram que o antagonista foi capaz de colonizar o sistema radicular desenvolvendo-se no rizoplane das raízes, com grande crescimento micelial na região intercelular, onde a colonização é particularmente alta, com grande formação de clamidósporos após três semanas de inoculação. Os autores também observaram claramente a penetração direta do fungo nas células da raiz, mantendo-se nas células epidermais e corticais do sistema radicular (Lopez-Llorca *et al.*, 2002). Tais resultados vêm confirmar que a rizosfera é uma importante fonte de inóculo, garantindo assim a persistência do fungo no solo.

Na avaliação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *P. chlamydosporia* por grama de solo, ficou evidente o seu estabelecimento no solo tanto no tratamento de sementes, quanto no tratamento de solo e na integração de ambos os tratamentos (Tabela 3). Pela determinação da população do fungo no solo, baseado na contagem do número de UFC de *P. chlamydosporia* por grama de solo, é possível fazer um indicativo do estabelecimento do fungo no solo, resultante não só de seu desenvolvimento sobre a matéria orgânica e colonização dos ovos do nematoide, mas também de sua proliferação nas rizosferas de diferentes espécies de plantas (Dallemole-Giaretta, 2008).

A eficiência do tratamento de sementes foi verificada tanto na redução no número de ovos por sistema radicular quanto no número de ovos.g⁻¹ de raiz. Esse resultado

demonstra a possível utilização do fungo *P. chlamydosporia* no tratamento de sementes de algodoeiro para o controle de *M. incognita* raça 3.

Tabela 3 - Número médio de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (isolado Pc-10) no solo, 60 dias após a aplicação dos tratamentos, tratamento de sementes com Pc-10, tratamento de solo com Pc-10 e tratamento de sementes + solo com Pc-10

UFC/g de solo		
Tratamento	Exp I	Exp II
Semente tratada com Pc-10	171.666,66 b	105.000,00 b
Solo tratado com Pc-10	256.666,66 a	170.000,00 a
Sementes + solo tratados com Pc-10	216.666,66 ab	130.000,00 ab
Média	22,71	20,55
CV%	215.000,00	135.000,00

Média de seis repetições; médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna são iguais pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Geralmente, o fungo é introduzido no solo na forma de suspensão aquosa de conídios ou pó de clamidósporos, podendo ser incorporado ao solo ou aplicado por meio de irrigação. Contudo, o uso desses dois métodos de controle pode se tornar dispendioso quando se trata de grandes culturas, como o caso do algodão. O tratamento de sementes com o fungo pode facilitar e viabilizar a aplicação do bionemático à base de *P. chlamydosporia* no algodoeiro. Além de diminuir os gastos no custeio do produto, reduzindo a quantidade de produto a ser aplicada, entretanto a definição da menor dose em tratamento de sementes que reduz os danos do nematoide na cultura há de ser realizada em estudos posteriores.

A aplicação de *P. chlamydosporia* no tratamento de sementes de algodão é viável, resulta na colonização de todo o sistema radicular e promove o controle do nematoide *M. incognita*;

Literatura citada

ALMEIDA, A. M. R.; KIMATI, H. & AMORIM, L. 2005. Doenças da soja. In: Kimati, H. et al. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres., p. 569-588.

AMER, Z.; ZAKI, M.J.; ABID, M.; GOWEN, S.R. & KERRY, B.R.. 2004. Management of root- knot nematode (*Meloidogyne javanica*) by biocontrol agents in two crop rotations. **International Journal of Biology and Biotechnology**, 1(1): 67-73.

ASMUS, G.L. 2004. Ocorrência de nematoides fitoparasitos em algodoeiro no estado de Mato Grosso do Sul. **Nematologia Brasileira**, 28(1): 77-86.

BONETI, J.I.S & FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira** 6(3): 533.

BOURNE, J.M. & KERRY, B.R. 2000. Observations on the survival and competitive ability of the nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium* in soil. **International Journal of Nematology**, 10(1): 9-18.

BOURNE, J.M.; KERRY.; B.R. & DE LEIJ, F.A.A.M.. 1996. The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus, *Verticillium chlamyosporium* Goddard. **Biocontrol Science and Technology**, 6: 539-548.

CRUMP, D. & IRVING, F. 1992. Selection of isolates and methods of culturing *Verticillium chlamyosporium* and its efficacy as a biological control agent of beet and potato cyst nematodes. **Nematologica**, 38: 367-374.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A.; PEREIRA, O.L.; ZOOCA, R.J.F. & FERRAZ, S. 2012. Screening of *Pochonia chlamyosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. **Crop Protection**, 42: 102-107.

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 chlamyosporia* var. *chlamyosporia* no controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, 32:327-332.

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

DE LEIJ, F.A.A.M.; KERRY, B.R. & DENNHY, J.A.. 1992. The effect of fungal application rate and nematode density on the effectiveness of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita*. **Nematologica**, 38: 112-122.

DE LEIJ, F.A.A.M. & KERRY, B.R. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as biological a potential control agent for *Meloidogyne arenaria*. **Revue de Nematologie**, 14(1): 157-164.

FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A. & DIAS-ARIEIRA, C.R. 2010. **Manejo sustentável de fitonematoides.** Viçosa: UFV, 304p.

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

GOULART, A.M.C.; INOMOTO, M.M. & MONTEIRO, A. R.1997. Hospedabilidade de oito cultivares de algodoeiro a *Pratylenchus brachyurus*. **Nematologia Brasileira**, 21: 111-118.

HUSSEY, R. S. & BARKER, K. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, 57:1025–1028.

IDE, M.A. 2000. Experiências no manejo de nematoides na cultura do algodoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 23, 2000, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia, Universidade Federal de Uberlândia, p. 30-31.

INOMOTO, M.M.; GOULART, A.M.C.; MACHADO, A.C.Z. & MONTEIRO, A.R. 2001. Effect of population densities of *Pratylenchus brachyurus* on the growth of cotton plants. **Fitopatologia Brasileira**, 26:192-196.

KERRY, B.R. & BOURNE, J.M. 2002. **A manual for research on *Verticillium chlamydosporium*, a potential biological control agent for root-knot nematodes.** International Organization for Biological and Integrated Control for Noxious Animals and Plants, Gent, Belgium, 84 p.

KERRY, B.R. 2001. **Exploitation of nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.)**. In: BUTT, T.M.; ACKSON, C. J & MAGAN, N. (Eds). Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential. CAB International, Wallingford, 380p.

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

KERRY.B.R. 1975. Fungi and the decrease of cereal cyst-nematode populations in cereal monoculture. **EPPO Bulletin**, 5:353-361.

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**. 31:78-84.

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

MACHADO, A. C. Z.; BELUTTI, D. B.; & INOMOTO, M. M. 2003. **Efeito de densidade populacionais iniciais de *Pratylenchus brachyurus* no crescimento do algodoeiro cv. Delta Opal**. In 4º Congresso Brasileiro de Algodão. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Goiânia, GO, CD-ROM.

MINISTERIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO (MAPA). 2012. Brasil Projeções do Agronegócio 2011/2012 a 2021/2022. Acesso em dezembro de 2012 [www.agricultura.gov.br /arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao).

MOTA, F. C.; ALVES, G. C. S.; GIBAND, M.; GOMES, A. C. M. M. ; SOUSA, F. R.; MATTOS, V.S.; BARBOSA, V.H.S.; BARROSO, P.A.V.; NICOLE, M.; PEIXOTO, J.R.; ROCHA, M.R. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2012. New sources of resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in wild cotton accessions and histological characterization of the defence mechanisms. **Plant Pathology**, 62(3):1-11 p.

NELSON, E. B. Exudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots. **Plant and Soil**, 129 (1): 61-73.

PODESTÁ, G.S. 2010. **Aplicação de *Pochonia chlamydosporia* em pré-plantio para potencializar o controle de *Meloidogyne javanica* em tomate e alface**. Universidade Federal de Viçosa. Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. Viçosa. 83 p.

RUANO, O.; CARNEIRO, R. G.; BRITO, J. A.; SILVA, J. F. V. & JULIATTI, F. C. 1997. **Algodão (*Gossypium hirsutum* L.)**. In: VALE, F. X. R. & ZAMBOLIM, L. Controle de doenças de plantas. Viçosa: UFV, 2:583-603.

SASSER, J. N. & FRECKMAN, D. W. 1987. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J. A. & DICKSON, D. W. (Eds.). Vistas on Nematology. **Society of Nematologists**, p.7-14.

SOSNOWSKA, D. & SIKORA, R. 2001. The role of fungi in reduction of sugar beet nematode (*Heterodera schachtii* Schmidt) population. **Bulletin-OILB-SROP**, 24(1): 151-156.

STATSOFT, Inc. 2001. Statistica for Windows (computer program manual). Tulsa, OK: Statsoft Inc. (<http://www.statsoft.com>).

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

SUASSUNA, N. D.; CHITARRA, L.G.; ASMUS, G.L. & INOMOTO, M.M. 2006. Manejo de Doenças do Algodoeiro. **EMBRAPA**, p. 1-24. (Circular Técnica 97).

VIGGIANO, J.R.; FREITAS, L.G. & FERREIRA, P.A. 2012. Resíduo da produção de *Pochonia chlamydosporia* no desenvolvimento de mudas e plantas de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 47(7): 983-990.

ZARE, R.; GAMS, W. & EVANS, H.C. 2001. A revision of *Verticillium* section *V. Prostrata*. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthra*. **Nova Hedwigia**, 73(1-2): 51-86.

ARTIGO 3 - Compatibilidade de *Pochonia chlamydosporia* com agroquímicos no controle de *Meloidogyne incognita*

Compatibilidade de *Pochonia chlamydosporia* com agroquímicos no controle de *Meloidogyne incognita*

Resumo

Objetivou-se avaliar a compatibilidade do fungo *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* com agroquímicos visando a aplicação conjunta em tratamento de sementes de soja e algodão. Para tal, foram realizados testes *in vitro* e em casa de vegetação. Nos testes *in vitro*, discos de micélio de 4 mm de diâmetro do isolado Pc - 10 de *P. chlamydosporia* foram transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo BDA fundido com os diversos agroquímicos nas concentrações finais de 0, 10, 100, 1000 e 1500 ppm. As placas foram mantidas em fotoperíodo de 12 horas, a 25 °C por 21 dias. As avaliações foram feitas por meio de medições dos diâmetros (cm) das colônias em dois sentidos perpendiculares entre si, fazendo-se a média das duas medidas. Ao todo foram feitas três medições, realizadas uma a cada sete dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 10 produtos químicos em cinco concentrações, totalizando 50 tratamentos com quatro repetições cada, sendo que cada placa de Petri representou uma repetição. Para verificar a compatibilidade de *P. chlamydosporia* com produtos químicos no solo, realizou-se o tratamento das sementes de algodão e soja com o fungo junto com um agroquímico por vez, em casa de vegetação. Vasos de 2 L de capacidade foram preenchidos com a mistura solo de barranco e areia, na proporção 1:1 (v:v). O solo de cada vaso foi infestado com 3.000 ovos de *M. incognita* raça 3 para a cultura do algodão e de *M. incognita* raça 2 para a cultura da soja. Após isto, cada vaso recebeu uma semente de algodão ou de soja, previamente tratada com um produto químico e com *P. chlamydosporia*. Sementes de algodão ou de soja tratadas somente com *P. chlamydosporia* foram utilizadas como controle positivo, enquanto que, semente de soja ou de algodão sem

tratamento com fungo ou produto químico, foram usadas como controle negativo. Ao final do experimento, foram avaliados, massa da parte aérea fresca, massa da raiz fresca, número de galhas por sistema radicular, número de galhas.g⁻¹ de raiz, número de ovos por sistema radicular e ovos.g⁻¹ de raiz. Nos testes *in vitro*, o fungo *P. chlamydosporia* se mostrou sensível a todos agroquímicos utilizados. Por sua vez somente o inseticida Fipronil foi incompatível com o fungo *P. chlamydosporia* em experimento com algodoeiro em casa de vegetação. Nos experimentos com soja, somente o fungicida Carbendazim+Tiram se mostrou incompatível com *P. chlamydosporia*.

Palavras-chave: controle biológico, nematoide das galhas, algodão, soja.

Abstract

This study aimed to assess the compatibility of the fungus *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* with chemicals commonly used in crops of cotton and soybeans. Such tests were performed in vitro and in the greenhouse. For the in vitro test, disks of 4 mm in diameter isolate of *P. chlamydosporia* Pc - 10 were transferred into Petri dishes of 9 cm diameter containing agricultural chemicals and BDA at final concentrations of 0, 10, 100, 1000 and 1500 ppm. The plates were incubated for 12 hours photoperiod at 25 °C for 21 days. The evaluations were performed by measuring the diameter (cm) of the colonies in two directions perpendicular to each-other, taking the average of the two measures. The measurements were made three times at 7 days intervals. The experimental design was completely randomized with 10 chemicals at 5 concentrations, performing 50 treatments, replicated four times. To evaluate the compatibility of *P. chlamydosporia* with chemicals in the soil, a greenhouse experiment tested the seed treatment for cotton and soybeans with the fungus and one chemical at the time. Seeds treated only with *P. chlamydosporia* were also prepared. Two liter pots were filled with the mixture of soil and sand, 1:1 (v:v). For

the experiments with cotton and soybean, the soil of each pot was infested with 3,000 eggs of *M. incognita* race 3 for cotton and 3,000 eggs of *M. incognita* race 2 to soybean. After that, each pot received one seed of cotton or soybean pretreated with one chemical and *P. chlamydosporia*. For the positive control treatment, the seed was treated only with *P. chlamydosporia* and for the negative control treatment, only the seed, without chemical or fungus, was used. At the end of the experiment, there were evaluated the shoot height, shoot fresh weight, root fresh weight, number of galls per plant, number of galhas.g⁻¹ root, number of eggs per plant and per gram of root. In *in vitro* tests, the fungus *P. chlamydosporia* was sensitive to all agrochemicals used. In the greenhouse experiment for cotton, only the insecticide Fipronil was incompatible with the fungus *P. chlamydosporia* and for soybean, only the fungicide Carbendazim+Thiram proved incompatible with *P. chlamydosporia*.

Keywords: biological control, pesticides, nematode galls, cotton, soybeans.

Introdução

Fitonematoides são vermes microscópicos que parasitam principalmente o sistema radicular de quase todas as plantas cultivadas, levando a grandes perdas e até inviabilizar áreas de plantio. Dentre os fitonematoides, os pertencentes ao gênero *Meloidogyne* spp. Goeldi são os mais importantes economicamente, por apresentar grande diversidade de hospedeiros e se encontrar amplamente disseminado nas mais diversas regiões do mundo (Taylor & Sasser, 1983; Wesemael *et al.*, 2010). Este gênero pode limitar a produção de culturas como tomate, algodão, café, cana-de-açúcar, cenoura, soja, batata, entre outras (Lordello, 1981).

São conhecidos mais de 200 microrganismos considerados inimigos naturais dos fitonematoides e, entre eles, destacam-se alguns fungos e bactérias (Kerry, 1991; Freitas *et*

al., 2009). O fungo *Pochonia chlamydosporia* Zare Gams & Evans (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard), é considerado um dos mais promissores agentes de controle biológico de nematoides.

Este fungo é tido como parasita facultativo de ovos e fêmeas, e tem merecido grande destaque pelo seu potencial no controle de nematoides de cistos (Crump & Irving, 1992, Sosnowska e Sikora, 2001) e de nematoides das galhas (De Leije e Kerry, 1991; Amer *et al.*, 2004, Lopes *et al.*, 2007, Dallemole-Giaretta *et al.*, 2012). Sua efetividade foi comprovada também no controle de outros gêneros de fitonematoides, chegando a causar a supressão destes organismos em campos de produção.

Diferentes isolados de *P. chlamydosporia* mostram potencial de controle de *Meloidogyne* spp. acima de 75% (Lopes *et al.*, 2007; Dallemole-Giaretta *et al.*, 2012). Além do controle de nematoides, o fungo pode controlar outros patógenos habitantes do solo, a exemplo de *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Fusarium oxysporum* Schlechtend:Fr., *Phytophthora capsici* Leonian e *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx & Oliver var. *tritici* Walker (Kerry & Bourne, 2002; Jacobs *et al.*, 2003; Monfort *et al.*, 2005).

Pochonia chlamydosporia possui muitas características desejáveis como agente de controle biológico. Em vista de sua atividade saprofítica, o fungo pode sobreviver no solo mesmo na ausência do nematoide (Kerry *et al.*, 1982; Stirling, 1991). Além disso, é capaz de colonizar a superfície das raízes de muitas espécies de plantas, eliminando grande quantidade de ovos produzidos pelos nematoides das galhas (Stirling, 1991).

A redução de populações de fitonematoides requer a combinação de várias estratégias de controle, como medidas de exclusão, utilização de plantas antagonistas, controle químico, adubação verde, cultivares resistentes, rotação de culturas, pousio e controle biológico (Barker & Koenning, 1998). Para o sucesso do manejo integrado, os diferentes métodos devem ser compatíveis entre si, isto é, um tratamento não pode ter

efeito deletério sobre o outro, e de preferência devem apresentar efeito sinérgico no controle dos nematoides.

Nos últimos anos, relativamente poucos trabalhos tem sido realizados para determinar os efeitos de produtos químicos sobre microrganismos do solo (Tobin *et al.*, 2008). Entretanto, produtos químicos utilizados no controle de doenças podem ter efeitos antagônicos, nulos ou sinérgicos sobre a atividade de fungos utilizados no controle biológico (Benz, 1987).

A integração de agentes químicos e biológicos pode contribuir para a redução na quantidade utilizada de produtos químicos, e, assim, reduzir os riscos para o homem e o meio ambiente.

Considerando o exposto acima, o presente estudo teve por objetivo verificar a compatibilidade do fungo *Pochonia chlamydosporia* para o controle de *Meloidogyne incognita* com agroquímicos comumente utilizados em tratamento de sementes nas culturas da soja (*Glycine max* L.) e do algodão (*Gossypium hirsutum* L.).

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 casas de vegetação pertencentes ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

Obtenção do inóculo de *Pochonia chlamydosporia* PC-10

Para este estudo utilizou-se o isolado Pc-10 de *P. 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.

Obtenção e preparo do inóculo de *Meloidogyne incognita* raças 2 e 3

Para os experimentos envolvendo plantas de algodão, foram utilizados ovos de *M. incognita* raça 3, já para os experimentos com soja foram utilizados ovos de *M. incognita* raça 2, ambos os inóculos foram coletados de raízes de tomateiros (*Solanum lycopersicum* L.), previamente mantidos em casa-de-vegetação. Os ovos de *M. incognita* raça 2 e 3 foram extraídos das raízes conforme técnica de extração de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981).

Compatibilidade de *Pochonia chlamydosporia* com agroquímicos

Para verificar a compatibilidade do fungo *P. chlamydosporia* com agroquímicos utilizados nas culturas de algodão e de soja, foram utilizados os produtos químicos listados a seguir, conforme a sua aplicação para cada cultura (Tabela 1).

Tratamento de sementes de algodão e soja com agroquímicos e *Pochonia chlamydosporia*

Para verificar a compatibilidade de *P. chlamydosporia* com produtos químicos (Tabela 1) em sementes, realizou-se o tratamento das sementes de algodão e de soja com os produtos químicos e biológicos. Em cada tubo plástico do tipo Falcon de 50 mL foram adicionados 20 mL da solução de um de cada produto químico na dose recomendada e 100 sementes de algodão ou de soja. Os tubos foram agitados até que as suspensões fossem homogêneas.

Após, as sementes foram colocadas sobre um papel filtro para secarem, e permaneceram em temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida, as sementes foram

Tabela 1- Relação dos produtos químicos utilizados para as culturas de algodão e soja

Produto	Princípio ativo	Dose recomendada	Cultura
Avicta 500 FS [®]	Abamectina	3ml/ kg semente	Algodão
		60-125 ml/100 kg sementes	Soja
Captan [®] SC	Captan	350 ml/100 kg sementes	Algodão
		250 ml/100 kg sementes	Soja
Cropstar [®]	Imidacloprido + Tiodicarbe	1,5-2,4 L/100 kg sementes	Algodão
		0,2-0,7 L/100 kg sementes	Soja
Cruiser [®] 350 FS	Thiamethoxam	400-600 ml/100 kg sementes	Algodão
		50-300 ml/100 kg sementes	Soja
Derosal Plus [®]	Carbendazim + Tiram	600 ml/100 kg sementes	Algodão
		200 ml/100 kg sementes	Soja
Maxim [®]	Fludioxonil	200 ml/100 kg sementes	Algodão
		200 ml/100 kg sementes	Soja
Standak Top [®]	Piraclostrobina+Tiofanato metílico+ Fipronil	200 ml/100 kg sementes	Soja
Spectro [®]	Difenoconazol	33,4 ml/100 kg sementes	Algodão
		33,4 ml/100 kg sementes	Soja
Standak [®]	Fipronil	250-300 ml/100 kg sementes	Algodão
		80-200 ml/100 kg sementes	Soja

aconditionadas novamente nos tubos tipo Falcon e foram umedecidas com 0,8 mL de solução aquosa de 0,5% de sacarose e adicionados 2,0 g do produto contendo clamidósporos de *P. chlamydosporia* para 100 sementes de soja e 0,9 g do produto para algodão.

Os tubos foram novamente agitados até que os clamidósporos de *P. chlamydosporia* se aderissem às sementes. Sementes de algodão ou de soja tratadas somente com *P. chlamydosporia* foram utilizadas como controle positivo, enquanto que, semente de soja ou de algodão sem tratamento com fungo ou produto químico, foram usadas como controle negativo.

Experimentos *in vitro*

Ação dos agroquímicos sobre o crescimento micelial de *P. chlamydosporia* Pc -10

Discos de 4 mm de diâmetro do isolado de *P. chlamydosporia* Pc - 10 foram removidos das bordas das colônias, crescidos em meio batata-dextrose-água (BDA), e foram transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo BDA + agroquímicos nas concentrações finais de 0, 10, 100, 1000 ou 1500 ppm. Os produtos químicos testados estão descritos na Tabela 1. Os produtos foram incorporados ao meio de cultura fundente (± 45 °C), e o fungo sobre o meio foi incubado em fotoperíodo de 12 horas, a 25 °C por 21 dias. A avaliação do crescimento micelial foi feita por meio de medições dos diâmetros (cm) das colônias em dois sentidos perpendiculares entre si, fazendo-se a média das duas medidas. Ao todo foram feitas três medições, uma a cada sete dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 10 x 5 (tratamentos x concentrações). Com quatro repetições por tratamento. Cada placa de Petri representou uma unidade experimental.

Potencial de *Pochonia chlamydosporia* para o controle de *Meloidogyne incognita* e sua compatibilidade com agroquímicos em casa de vegetação

Vasos de 2 L de capacidade foram preenchidos com a mistura terra de barranco e areia, na proporção 1:1 (v:v), previamente tratada com brometo de metila na dosagem de 80 cm³/m³ de solo. A seguir, o solo foi infestado com 3.000 ovos de *M. incognita* raça 2 ou 3 por vaso.

Para o experimento com algodão, cada vaso previamente inoculado com *M. incognita* raça 3 recebeu uma semente de algodão previamente tratada com um dos produtos químicos e *P. chlamydosporia*, conforme descrito anteriormente. Sementes de algodão ou de soja tratadas somente com *P. chlamydosporia* foram utilizadas como

controle positivo, enquanto que, semente de soja ou de algodão sem tratamento com fungo ou produto químico, foram usadas como controle negativo. A mesma metodologia foi utilizada para o experimento com soja, porém, com o nematoide *M. incognita* raça 2. Ambos os experimentos foram conduzidos por 60 dias e seguiram o delineamento experimental inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento.

Sessenta dias após a inoculação e semeio das sementes de algodão ou soja para os vasos, as plantas foram avaliadas quanto às seguintes variáveis: massa fresca da parte aérea, massa fresca da raiz, número de galhas por sistema radicular e por grama de raiz, número de ovos por sistema radicular e por grama de raiz. A contagem do número de galhas foi realizada em microscópio estereoscópio com fonte de luz acessória. Os ovos foram extraídos pela técnica de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981), o número de ovos foi estimado em microscópio ótico com o auxílio de uma lâmina de Peters.

Ao final do experimento coletou-se 1g de solo de cada vaso para determinação da população do fungo no solo, através da quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC). Foi feito o plaqueamento em meio semi-seletivo conforme Gaspard *et al.* (1990), totalizando seis repetições por tratamento.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Statistica (Statsoft, 2001). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelos testes de Skott-Knott ou Duncan, ambas à 5% de probabilidade.

Resultados

Ação de produtos químicos sobre o crescimento micelial de *P. chlamydosporia* Pc-10

Nos testes *in vitro*, comparando os efeitos de diferentes concentrações dos produtos químicos sobre o crescimento micelial de *P. chlamydosporia*, foi possível verificar que,

todos os produtos nas concentrações testadas reduziram o desenvolvimento do fungo em relação ao tratamento controle, com *P. chlamydosporia* crescendo na ausência de produtos químicos no meio de cultura (Tabela 2).

Nenhum dos produtos químicos testados causou a morte de *P. chlamydosporia*, nem mesmo na maior concentração utilizada (1500 ppm); contudo, todos os produtos retardaram, em diferentes intensidades, o crescimento do fungo (Tabela 2).

No geral, os produtos químicos que apresentaram os maiores efeitos inibitórios sobre o crescimento de *P. chlamydosporia* foram Carbendazim+Tiram e Fludioxonil (fungicidas) e Imidacloprido+Tiodicarbe (inseticida) (Tabela 2). Não houve crescimento micelial de *P. chlamydosporia*, na presença de Carbendazim+Tiram em todas as concentrações testadas aos sete dias de incubação, contudo o fungo voltou a crescer aos quatorze e vinte e um dias.

Compatibilidade de *P.chlamydosporia* com agroquímicos aplicados na cultura do algodão em casa de vegetação

Não houve diferença estatística para as variáveis altura da parte aérea (APA) e massa da parte aérea fresca (MPAF) entre os tratamentos com químicos e o controle apenas com *P. chlamydosporia* (Tabela 3).

Quanto à massa de raízes fresca (MRF), apenas o inseticida Thiamethoxam diferiu dos demais tratamentos (Tabela 3), com um incremento de 66,6% de massa de raízes fresca de algodoeiro, quando comparado com o tratamento controle com sementes tratadas somente com o fungo.

Na avaliação do número de galhas por sistema radicular e do número de galhas.g⁻¹ de raízes de algodoeiro, somente o tratamento com o inseticida Fipronil diferiu do controle positivo contendo somente o fungo *P. chlamydosporia*, com um aumento do

Tabela 2 - Efeito de agroquímicos nas concentrações de 10, 100, 500, 1000 e 1500 ppm sobre o crescimento micelial (cm) de *Pochonia chlamydosporia*, ao longo dos 21 dias em testes *in vitro*

Produtos	Diâmetro de colônia de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (cm)														
	Concentração 10 ppm			Concentração 100 ppm			Concentração 500ppm			Concentração 1000 ppm			Concentração 1500 ppm		
	7 dias	14dias	21dias	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias
Abamectina	2,12 c	3,35 c	5,46 c	1,41 c	2,03 c	4,07 c	0,80 b	1,62 b	2,11 a	1,12 b	1,57 b	2,55 a	0,80 b	1,62 b	2,11 a*
Captan	2,12 c	3,21 c	5,25 c	1,97 d	3,11 d	4,98 d	1,73 e	0,70 a	4,32 d	1,48 b	2,88 c	4,61 c	1,73 e	0,70 a	4,32 d
Imidacloprido+ Tiodicarbe	1,20 b	1,87 a	2,80 a	1,00 b	1,70 b	2,42 a	1,00 c	1,35 b	2,18 a	1,00 b	1,48 b	2,38 a	1,00 c	1,35 b	2,18 a
Thiamethoxam	2,16 c	3,18 c	4,83 c	2,08 d	3,07 d	4,81 d	1,90 e	2,63 c	4,16 d	1,88 c	2,95 c	4,91 c	1,90 e	2,63 c	4,16 d
Carbendazim+ Tiram	0,00 a	1,91 a	3,53 b	0,00 a	0,41 a	2,16 a	0,00 a	0,95 a	2,06 a	0,00 a	0,31 a	1,90 a	0,00 a	0,95 a	2,06 a
Fludioxonil	1,53 b	2,05 a	3,33 b	0,28 a	1,71 b	2,71 b	0,00 a	0,00 a	1,81 a	0,00 a	1,22 b	2,07 a	0,00 a	0,00 a	1,81 a
Difenoconazol	1,25 b	2,50 b	3,77 b	1,48 c	2,41 c	3,87 c	1,17 c	2,05 b	3,58 c	1,15 b	1,67 b	3,08 b	1,17 c	2,05 b	3,58 c
Fipronil	2,12 c	3,25 c	5,12 c	2,18 d	3,28 d	4,83 d	1,95 e	2,93 c	4,43 d	1,88 c	2,93 c	4,47 c	1,95 e	2,93 c	4,43 d
Piraclostrobina + Tiofanato metílico+ Fiproni	1,58 b	2,13 a	2,52 a	1,57 c	2,12 c	3,01 b	1,43 d	1,91 b	2,65 b	1,47 b	2,01 b	3,32 b	1,43 d	1,91 b	2,65 b
Pc – 10	2,80 d	4,36 d	7,05 d	2,80 e	4,36 e	7,05 e	2,80 f	4,36 d	7,05 e	2,80 d	4,36 d	7,05 d	2,80 f	4,36 d	7,05 e
Médias	1,69	2,78	4,37	1,48	2,42	3,49	1,28	1,85	3,43	1,48	2,78	4,37	1,28	1,85	3,43
CV	17,57	10,78	15,18	14,53	13,87	10,24	15,07	33,57	8,09	14,53	13,87	10,24	15,07	33,57	8,09

* Média de quatro repetições; Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna são iguais pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade.

número de galhas por sistema radicular e número de galhas.g⁻¹ na ordem de 254,09 e 330,9 % (Tabela 3).

Para as variáveis número de ovos por sistema radicular e número de ovos.g⁻¹ de raízes de algodoeiro, somente tratamento com o produto Fipronil e o tratamento contendo somente nematoide diferiram do tratamento controle, apenas com *P. chlamydosporia* (Tabela 3).

O fungo *P. chlamydosporia*, único componente do tratamento controle positivo, reduziu o número de ovos por sistema radicular e o número de ovos.g⁻¹ de raízes de soja em 96,9% e 97,0% respectivamente, quando comparado ao controle negativo contendo somente nematoide (Tabela 3).

Na avaliação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *P. chlamydosporia*, verificou-se a presença de *P. chlamydosporia* em todos os tratamentos contendo agroquímicos. Contudo, no tratamento com Fipronil, a colonização do solo pelo fungo foi visivelmente reduzida, apresentando o menor valor de UFC (Tabela 3).

Compatibilidade de *P. chlamydosporia* com agroquímicos utilizados para o tratamento de sementes de soja

O tratamento de sementes de soja com *P. chlamydosporia* aplicado conjuntamente com diferentes produtos químicos não teve influência sobre massa da parte aérea fresca (MPAF), quando comparados com o tratamento controle só com *P. chlamydosporia* (Tabela 4).

Para a variável massa de raízes fresca (MRF), apenas o tratamento com o inseticida Imidacloprido+tiodicarbe aplicado juntamente com *P. chlamydosporia* foi significativamente menor do que os demais tratamentos com diminuição de 34,4% de massa de raízes de soja fresca, quando comparados com o controle com sementes tratadas somente com o fungo (Tabela 4).

Tabela 3- Compatibilidade de *Pochonia chlamydosporia* com agroquímicos utilizados para a cultura do algodão em experimentos em casa de vegetação, 60 dias após a inoculação de *Meloidogyne incognita* raça 3 e semeadura do algodão tratadas com agroquímicos e *P. chlamydosporia*.

Tratamento	APA	MPAF	MRF	Número de galhas	Número de ovos	Galhas/g raiz	Ovos/g raiz	UFC**
Abamectina	19,4	6,6	5,4	60,0	325,0	10,5	57,4	97.500,00
Captan	20,8	6,2	5,4	31,2	850,0	5,9	153,5	120.000,00
Imidacloprido+Tiodicarbe	20,4	7,4	5,7	116,4	1.150,0	22,3	205,5	52.500,00
Thiamethoxam	19,3	6,8	9,5 *	30,0	200,0	3,5	23,2	57.500,00
Carbendazim+Tiram	19,2	7,5	5,2	109,2	2.050,0	19,6	380,3	57.500,00
Fludioxonil	20,8	6,4	5,5	130,4	2.325,0	24,5	432,2	60.000,00
Difenoconazol	19,4	7,0	6,2	96,4	1.150,0	15,8	189,0	140.000,00
Fipronil	19,9	7,0	5,2	172,8 *	4.475,0 *	36,2 *	1036,9 *	5.000,00
Nematoide	19,8	6,7	5,7	141,6	7.275,0 *	24,6	1371,8 *	0
Pc – 10	19,4	6,2	5,7	48,8	225,0	8,4	37,8	137.500,00

*Média de seis repetições; APA=Altura parte aérea, MPAF=Massa fresca da parte aérea, MRF=Massa fresca de raiz; médias seguidas por asterisco diferem do controle pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.**Dados do número de Unidades formadoras de colônias por grama de solo, sem análise estatística.

Na avaliação número de galhas por sistema radicular, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 4). Para o número de galhas.g⁻¹ de raiz, somente o tratamento testemunha negativo sem o fungo (contendo apenas *M. incognita*) diferiu do controle positivo com *P. chlamydosporia*, com aumento de 56% no número de galhas.g⁻¹ em raízes de soja. O controle positivo (*P. chlamydosporia*) reduziu o número de galhas.g⁻¹ em raízes de soja em 72,4 %, quando comparado com o controle negativo sem *P.chlamydosporia*.

Para a variável número de ovos por sistema radicular, somente o tratamento sem o fungo (contendo apenas o nematoide) diferiu estatisticamente do tratamento controle positivo, só com *P. chlamydosporia*. Em relação à inoculação somente do nematoide, o tratamento de sementes com *P. chlamydosporia* reduziu o número de ovos do nematoide por sistema radicular em 70,43% quando comparado ao tratamento controle negativo, no qual as sementes não foram tratadas (Tabela 4).

Apenas o tratamento no qual Carbendazim+tiram foi aplicado juntamente com *P. chlamydosporia*, o número de ovos.g⁻¹ de raiz não diferiu do tratamento testemunha negativa, com sementes não tratadas (Tabela 4). O tratamento controle positivo, apenas *P. chlamydosporia*, reduziu em 62% o número de ovos.g⁻¹ de raiz de soja, em relação ao tratamento Carbendazim+tiram, e para o tratamento sem o fungo, contendo somente o nematoide, a redução do número de ovos.g⁻¹ de raízes promovida por *P. chlamydosporia* (controle positivo) foi de 72% (Tabela 4).

Quanto ao número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *P. chlamydosporia*, verificou-se a presença de *P. chlamydosporia* em todos os tratamentos contendo agroquímicos. Contudo, no tratamento com Carbendazim + Tiram (fungicida), a colonização do solo pelo fungo foi visivelmente reduzida, apresentando o menor valor de UFC (Tabela 4).

Tabela 4 - Compatibilidade de *Pochonia chlamydosporia* com agroquímicos utilizados para a cultura da soja em experimentos em casa de vegetação, 60 dias após a inoculação de *Meloidogyne incognita* raça 2 e semeadura do algodão tratadas com agroquímicos e *Pochonia chlamydosporia*.

Tratamento	MPAF	MRF	Número de galhas	Número de ovos	Galhas/g	Ovos/g	UFC**
Abamectina	4,8	3,0	308,8	8.683,5	105,2	3.113,1	65.000,00
Captan	5,1	2,6	256,0	10.350,0	103,5	3.540,7	85.000,00
Imidacloprido+Tiodicarbe	3,4	1,9*	206,8	8.350,0	107,6	4.392,3	50.000,00
Thiamethoxam	4,8	2,9	312,8	14.725,0	107,6	5.029,8	47.500,00
Carbendazim+Tiram	3,8	2,2	275,0	15.050,0	124,6	7.071,1*	2.500,00
Fludioxonil	4,2	3,0	302,2	13.575,0	102,9	4.567,4	50.000,00
Difenoconazol	4,0	2,3	216,4	6.875,0	93,0	2.937,0	60.000,00
Piraclostrobina+Tiofanato Metílico+Fipronil	5,6	3,0	354,2	16.425,0	119,3	5.342,6	60.000,00
Fipronil	4,1	2,2	197,0	5.025,0	86,3	1.974,8	75.000,00
Nematoide	4,0	2,7	365,4	26.550,0*	136,5*	9.727,0*	0
PC – 10	4,9	2,9	251,2	7.850,0	87,5	2.688,5	77.500,00

Média de cinco repetições; MFPA=Massa fresca da parte aérea; MSPA= Massa seca da parte aérea; MFR=Massa fresca de raiz; médias seguidas por asterisco diferem do Controle *Pochonia* pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade. **Dados do número de unidades formadoras de colônias por grama de solo, sem análise estatística.

Discussão

Em testes *in vitro* ficou evidente a sensibilidade de *P.chlamydosporia* com a aplicação de diferentes produtos químicos sobre o crescimento micelial do fungo. Entretanto, em ensaios de casa de vegetação com as culturas de soja e algodão, a aplicação conjunta de *P. chlamydosporia* com os mesmos produtos químicos utilizados nos testes *in vitro*, se mostrou compatível, para maior parte dos produtos químicos testados.

Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foi relatado por Jacobs *et al.* (2003). Os autores avaliaram a aplicação conjunta do fungicida azoxistrobina e *P. chlamydosporia*, no controle do nematoide do cisto (*Globodera* spp.) em batata. Em ensaios *in vitro*, verificou-se redução significativa para o crescimento das hifas e germinação dos clamidósporos. Contudo, em ensaios de microcosmo e casa de vegetação, houve a recuperação do fungo com o passar do tempo em resposta à aplicação do fungicida, indicando que a compatibilidade do fungo e azoxistrobina podem ser efetivas em alguns casos.

No experimento com plantas de algodão, o inseticida Thiamethoxam aumentou a massa das raízes fresca quando comparado ao controle (*P. chlamydosporia*) (Tabela 2). Este ingrediente ativo, que é um inseticida sistêmico do grupo neonicotinóide, possui efeito bioativador, atuando na expressão dos genes responsáveis pela síntese e ativação de enzimas metabólicas, relacionadas ao crescimento da planta, aumentando a produção de aminoácidos precursores de hormônios vegetais (Castro, 2006).

O principio ativo tiametoxam regula produção de proteínas envolvidas em numerosos mecanismos de defesa da planta, melhorando a expressão do seu potencial genético quando expostas a fatores adversos (Castro, 2007). O aumento do sistema radicular com o uso do tiametoxam já foi verificado para outras culturas como para soja (Tavares *et al.*,2007), cenoura (Almeida *et al.*, (2009), arroz (Grohs *et al.*, 2012) e algodão (Lauxen *et al.*, 2010).

Foi possível verificar o estabelecimento do fungo no solo para grande parte dos produtos químicos testados, demonstrando a sua compatibilidade com *P. chlamydosporia*. Pela determinação da população do fungo no solo, baseado na contagem do número de unidades formadora de colônia de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* por grama de solo, é possível fazer um indicativo do estabelecimento do fungo no solo, resultante não só de seu desenvolvimento sobre a matéria orgânica e colonização dos ovos do nematoide, mas também de sua proliferação nas rizosferas de diferentes espécies de plantas (Dallemele-Giaretta, 2008).

Em casa de vegetação, os agroquímicos utilizados podem ter influenciado o crescimento inicial de *P. chlamydosporia*. Contudo, com passar do tempo o mesmo pode ter se estabelecido no solo e colonizado as raízes. Neste presente trabalho, as plantas de soja e algodão permaneceram por 60 dias em casa de vegetação, e este tempo pode ter sido suficiente para o desenvolvimento de *P. chlamydosporia* no solo.

Pochonia chlamydosporia tem se mostrado compatível com diferentes nematicidas como, por exemplo, aldicarb (De Leij *et al.*, 1993), fosthiazate (Tobin *et al.*, 2008 a), carbofuran (Dhawan & Singli, 2009; Muthulakshmi *et al.*, 2012). Neste trabalho, o nematicida Avicta à base de Abamectina, foi compatível com *P. chlamydosporia*, em casa de vegetação para ambas as culturas testadas.

De forma geral o tratamento de sementes com nematicidas, protege a cultura durante um período de tempo relativamente curto. Portanto, o tratamento de sementes com nematicidas e *P. chlamydosporia* pode prolongar o período de proteção, já que depois do estabelecimento do fungo no solo, *P. chlamydosporia* pode atuar no controle do nematoide por um longo período de tempo.

De Leij *et al.* (1993) constataram efeito sinérgico da aplicação de aldicarb com *P. chlamydosporia* para o manejo da população de *M. incognita*, obtendo 100% de controle. No manejo integrado do nematoide do cisto *Globodera pallida* e *G. rostochiensis* na cultura da

batata foram utilizados o agente de controle biológico *P. chlamydosporia* e o nematicida fosthiazate. Os experimentos foram avaliados por dois anos consecutivos (2006 e 2007). Em ambos os experimentos, houve o controle do nematoide do cisto pelo tratamento *P. chlamydosporia* + fosthiazate, não diferindo estatisticamente dos controles *P. chlamydosporia* e nematicida em separado (Tobin *et al.*, 2008 a).

Pelos testes de compatibilidade de produtos químicos com *P. chlamydosporia* em algodão, é recomendável a utilização conjunta dos produtos químicos, Abamectina (nematicida), Captan, Difeconazol (fungicidas) e Thiamethoxam (inseticida), pois foram as médias mais próximas das observadas no tratamento controle, apenas com o fungo. Alguns dos produtos químicos testados podem ser recomendados, mas com restrições, pois mesmo não diferindo estatisticamente do controle (apenas *P. chlamydosporia*), na redução do número de ovos do nematoide (Tabela 3), as médias dos números de ovos nos tratamentos com esses produtos foram cerca de dez vezes maiores do que no tratamento apenas com o fungo. Dentre os produtos estão o inseticida Imidacloprido+Tiodicarbe e os fungicidas Carbendazim+tiram, e Fludioxonil. Não é recomendável a utilização do inseticida Fipronil no tratamento de sementes de algodão juntamente com *P. chlamydosporia*, pois este reduziu drasticamente os números de unidades formadoras de colônias do fungo no solo.

Para cultura da soja é recomendável a utilização conjunta dos seguintes produtos químicos: Abamectina (nematicida), Captan e Difenconazol (fungicidas), além do Fipronil (inseticida). Os produtos químicos testados que poderiam ser recomendados, com restrições, são os inseticidas Imidacloprido+Tiodicarbe, Thiamethoxam e Piraclostrobin+Tiofanato metílico+Fipronil, e o fungicida Fludioxonil. Não é recomendável a utilização do fungicida Carbendazim+Tiram, no tratamento de sementes de Soja juntamente com *P. chlamydosporia*, pois este inibe o crescimento do fungo, medido pelo número de unidades formadoras de colônia.

O presente estudo comprova a possibilidade da utilização combinada de fungicidas, inseticidas e nematicidas com *P. chlamydosporia*, sem comprometer a atividade do agente biológico, tornando possível a aplicação deste via tratamento de sementes. Esse método de aplicação reduz a quantidade do produto biológico requerida por hectare, viabilizando economicamente sua utilização para grandes culturas, a exemplo da soja e algodão.

Literatura citada

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 4th ed. San Diego: Academic Press: 1997. 635 p.

ALMEIDA, A.S.; TILLMANN, M.A.A.; VILLELA, F. A. & PINHO, M.S. 2009. Bioativador no desempenho fisiológico de sementes de cenoura. **Revista Brasileira de Sementes**. 31(3): 87-95.

AMER, Z.; ZAKI, M.J.; ABID, M.; GOWEN, S.R. & KERRY. B.R. 2004. Management of root- knot nematode (*Meloidogyne javanica*) by biocontrol agents in two crop rotations. **International Journal of Biology and Biotechnology**, 1(1): 67-73.

BARKER, K. R. & KOENNING, S. R. 1998. Developing sustainable systems for nematode management. **Annal Review of Phytopathology**, 36:165-205.

BENZ, G. Environment. In. FUXA, R.; TANADA, Y. (Eds.).1987. **Epizootiology of insect Baracoa**, 22:31-39.

BONETI, J.I.S. & FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira** 6(3): 533.

CASTRO, P. R. C.; PITELLI, A. M. C. M.; PERES, L. E. P.; ARAMAKI, P. H. 2007. Análise da atividade reguladora decrescimento vegetal de tiametoxam através de biotestes. **Publicatio UEPG ciências exatas e da terra ciências agrárias e engenharias**, 13 (3):25-29.

CASTRO, P.R.C. **Agroquímicos de controle hormonal na agricultura tropical**. Piracicaba: ESALQ, 2006. 46p. (Série Produtor Rural, 32).

CRUMP D. & IRVING, F. 1992. Selection of isolates and methods of culturing *Verticillium chlamydosporium* and its efficacy as a biological control agent of beet and potato cyst nematodes. **Nematologica**. 38: 367-374.

DHAWAN, S. C. & SATYENDRA, S. 2009. Compatibility of *Pochonia chlamydosporia* with nematicide and neem cake against root knot nematode, *Meloidogyne incognita* infesting okra. **Indian Journal of Nematology**, 39: 85-89.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A.; PEREIRA, O. L.; ZOOCA, R.J.F. & FERRAZ, S. 2012. Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. **Crop Protection**, 42: 102-107.

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

DE LEIJ, F.A.A.M.; KERRY, B.R.; DENNEBY, J.A. 1993. *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and microplot tests. **Nematologica** 39:115–126.

DE LEIJ, F.A.A.M. & KERRY, B.R. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as biological a potential control agent for *Meloidogyne arenaria*. **Revue de Nematologie** 14(1): 157-164.

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

GROHS, M.; MARCHESAN, E.; ROSO, R.; FORMENTINI, T.C. & OLIVEIRA, M.L. 2012. Desempenho de cultivares de arroz com uso de reguladores de crescimento, em diferentes sistema de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 47 (6):776-783.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, 57:1025–1028.

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

JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter** 48 (9):692-5.

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. 1991. Methods for studying the growth and survival of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard, in soil. **Bulletin SROP**, 14 (2): 34-38.

KERRY, B.R. & BOURNE, J.M. 2002. **A manual for research on *Verticillium chlamydosporium*, a potential biological control agent for root-knot nematodes**. IOBC, OILB, WPRS/SROP, 84 p.

LAUXEN, L.R.; VILLELA, F.A. & SOARES, R.C. 2010. Desempenho fisiológico de sementes de algodoeiro tratadas com tiametoxam. **Revista Brasileira de Sementes**, 32:61-68.

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**. 31:78-84.

LORDELLO, L.G.E. 1981. **Nematoides das plantas cultivadas**. São Paulo: Nobel, 314p.

MONFORT, E.; LOPEZ-LLORCA, L.V.; JANSSON, H.B.; SALINAS, J.; PARK, J.O. & SIVASITHAMPARAM, K. 2005. Colonization of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root-rot. **Soil Biology & Biochemistry**, 1-17.

MUTHULAKSHMI, M.; KUMAR, S.; SUBRAMANIAN S.; & ANITA B. 2012. Compatibility of *Pochonia chlamydosporia* with other biocontrol agents and carbofuran. **JBiopest**, 5: 243 -245.

SOSNOWSKA, D. & SIKORA, R. 2001. The role of fungi in reduction of sugar beet nematode (*Heterodera schachtii* Schmidt) population. **Bulletin-OILB-SROP** 24(1): 151-156.

STATSOFT, Inc. 2001. Statistica for Windows (computer program manual). Tulsa, OK: Statsoft Inc. (<http://www.statsoft.com>).

STIRLING, G.R. 1991. **Biological control of plant parasitic nematodes**. Wallingford: C.B.A. International. 282p.

TAVARES, S.; CASTRO, P.R.C.; RIBEIRO, R.V.; ARAMAKI, P.H. 2007. Avaliação dos efeitos fisiológicos de tiametoxam no tratamento de sementes de soja. **Revista de Agricultura**, 82:47-54.

TOBIN, J.D.; HAYDOCK, P.P.J; HARE, M.C.; WOODS, S.R & CRUMP, D.H. 2008. The compatibility of the fungicide azoxystrobin with *Pochonia chlamydosporia*, a biological control agent for potato cyst nematodes (*Globodera* spp.). **Annals of Applied Biology**, 33: 301-305.

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

WESEMAEL, W.M,L.; VIAENE, N.; MOENS, M. 2010. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe. **Nematology**, 13(1): 3–16.

ARTIGO 4 - Histopatologia da interação tritrófica entre o fungo *Pochonia chlamydosporia*, nematoide *Meloidogyne incognita* e raízes de soja (*Glicine max* L.)

Artigo 4 – Histopatologia da interação tritrófica entre o fungo *Pochonia chlamydosporia*, nematoide *Meloidogyne incognita* e raízes de soja (*Glicine max* L.)

Resumo

O comportamento endofítico de *Pochonia chlamydosporia* já foi demonstrado em diversos trabalhos, mas até o momento não foi documentada em detalhes a colonização de fêmeas de *Meloidogyne* spp. por *Pochonia chlamydosporia* no interior das raízes. Sendo assim, este trabalho se propôs a investigar detalhes da colonização radicular pelo fungo *P. chlamydosporia* em plantas de soja, inoculadas ou não com *M. incognita*, abrangendo os aspectos anatômicos e histoquímicos. Pela caracterização estrutural das raízes das plantas de soja, foi possível verificar a colonização do sistema radicular e de fêmeas de *M. incognita* pelo fungo nematófago *P. chlamydosporia*, aplicado via tratamento de sementes. O fungo colonizou tanto o rizoplane das raízes de soja como as células da epiderme radicular. Foram visualizados clamidósporos e hifas fora e dentro das células. Em raízes de soja inoculadas com o nematoide *M. incognita* foi evidenciada a colonização do fungo em fêmeas e em células gigantes. Há caracterização histoquímica das raízes de soja colonizadas somente por *P. chlamydosporia* não houve diferenças na estrutura quando comparada às raízes do tratamento controle, sem inoculação do fungo. Somente nas raízes de soja inoculadas com *M. incognita* foi possível verificar reações histoquímicas positivas para a presença do nematoide, nas quais os corantes sudan black B, sudan IV e vermelho neutro coraram intensamente o corpo das fêmeas de *M. incognita*, evidenciando a presença de lipídios. O mesmo ocorreu para o corante xylydine Ponceau, indicando a presença de proteínas no corpo do nematoide. Em todos os tratamentos estudados foi possível verificar a presença de amido nas raízes de soja, com coloração positiva com lugol. Hifas do fungo *P. chlamydosporia* puderam ser observadas no interior de fêmeas do nematoide *M. incognita* e das células gigantes, o que comprova mais

um modo de ação deste fungo nematófago sobre o nematoide das galhas, além da destruição de seus ovos pelo parasitismo no exterior das raízes.

Palavras chave: colonização, testes histoquímicos, análises estruturais

Abstract

Histopathology of the tri-trophic interaction between the fungus *Pochonia chlamydosporia*, nematode *Meloidogyne incognita* and *Glicine max* L. roots.

Several research works had previously demonstrated the endophytic behavior of *Pochonia chlamydosporia*, but colonization of *Meloidogyne* spp. females inside plant roots is still in lack of detailed data. This work had the purpose of investigate details of the root colonization by the fungus *P. chlamydosporia* in soybean plants inoculated or non-inoculated with *M. incognita*, with an anatomic as well as a histochemical approach. Colonization of the plant root system and *M. incognita* females by the nematophagous fungus *P. chlamydosporia*, applied via seed treatment, was verified by means of the structural characterization of soybean roots. The fungus colonized soybean roots' rhizoplane as well as epidermal root cells. Chlamidospores and hyphae were observed outside and inside root cells. Colonization of *M. incognita* females and giant cells was observed in soybean roots inoculated with the nematode. No difference was observed by the histochemical characterization of colonized soybean roots, inoculated and non-inoculated with *P. chlamydosporia*. Only in roots inoculated with *M. incognita* a positive histochemical reaction towards presence of the nematode was observed, with an intense staining of the females' body when using Sudan Black B, Sudan IV and Neutral red dyes, thus evidencing presence of lipids. The same occurred with the Xylidine Ponceau dye, evidencing presence of proteins in the nematodes bodies. Starch was observed in soybean roots with a positive reaction to Lugol's solution in

all the treatments tested. Hyphae of the fungus *P. chlamydosporia* were observed inside females of the nematode *M. incognita* and giant cells, evidencing that further than destroy nematode's eggs this fungus can act by parasitism outside plant roots.

Keywords: colonization, histochemical tests, structural analysis.

Introdução

A rizosfera é uma importante zona de atividade de fungos nematófagos. A habilidade desses fungos em colonizar a rizosfera tem sido apontada como uma característica importante no controle biológico de nematoides (Maia *et al.*, 2001; Bordallo *et al.*, 2002).

Dentre os fungos utilizados no controle biológico e que colonizam a rizosfera de plantas destaca-se o fungo *Pochonia chlamydosporia* (*Clavicipitaceae*) Zare Gams & Evans 2001 (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard) (Zare *et al.*, 2001). O fungo é parasita de ovos e fêmeas de importantes espécies de nematoides como por exemplo, o nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) (De Leij & Kerry., 1993, Hidalgo-Diaz *et al.*, 2000, Dallemole-Giaretta *et al.*, 2012) e nematoide dos cistos (*Heterodera* spp) e (*Globodera* spp.) (Kerry & Crump, 1977).

Pochonia chlamydosporia é caracterizado por ser um saprófita facultativo, isto é, altera sua atividade saprofítica por parasítica na presença de ovos de nematoides, produzindo a enzima VPC1, que o torna capaz de degradar a parede dos ovos do nematoide (Segers *et al.*, 1996). Além disso, ele é capaz de colonizar o sistema radicular da planta hospedeira tanto superficialmente como endofiticamente, e de produzir clamidósporos, que auxiliam no estabelecimento desse organismo no solo. Sua atividade saprofítica possibilita que o fungo sobreviva no solo mesmo na ausência do nematoide (Kerry *et al.*, 1982; Stirling, 1991; Bourne & Kerry 2000).

No entanto, a habilidade do microrganismo em colonizar a rizosfera depende da planta hospedeira (Kerry e Bourne , 2002). Repolho, crotalária, couve, milho, feijão guandu, feijão,

batata e tomate por exemplo são considerados bons hospedeiros do fungo, enquanto que batata doce, capim elefante, milho, fumo e algodão são hospedeiros médios e berinjela, quiabo, soja, sorgo e aveia são hospedeiros fracos do fungo (Kerry & Bourne, 2002).

O comportamento endofítico de *P. chlamydosporia* já foi demonstrado (Bordallo *et al.*, 2002; Lopes-Llorca *et al.*, 2002; Dallemole-Giaretta, 2008; Maciá-vicente *et al.*, 2009; Escudero & Lopes-Llorca., 2012), mas até o momento não foi documentada em detalhes por imagens de fotomicrografias a colonização de células gigantes e fêmeas de *Meloidogyne* spp. por *P. chlamydosporia* no interior das raízes.

Outro aspecto importante e inovador deste trabalho é a investigação da possibilidade de ocorrer colonização radicular pelo fungo, quando este é aplicado via tratamento de sementes, o que se caracteriza como um desafio maior, quando se leva em consideração a menor concentração do fungo no solo, mesmo antes do sistema radicular vir a existir. O fato que a semente libera grande quantidade de exudatos de sementes durante a germinação foi um dos motivadores deste estudo.

Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar detalhes da colonização radicular e de fêmeas pelo fungo *P. chlamydosporia* em plantas de soja, inoculadas via tratamento de sementes ou não inoculadas com *Meloidogyne incognita*, com base em aspectos estruturais e histoquímicos.

Material e Métodos

Obtenção do inóculo de *Pochonia chlamydosporia* PC-10

Para este estudo utilizou-se o isolado Pc-10 de *P. 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.

Para garantir que não havia contaminação do produto por outros fungos, retirou-se 0,05 g do fungo do lote utilizado e fez-se o plaqueamento em placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA). As placas foram mantidas em fotoperíodo de 12 horas, a 25 °C por cerca de sete dias. Após este período observou-se que o produto estava livre de contaminação, com o crescimento de somente *P. chlamydosporia*.

Desinfestação das sementes de soja e tratamento com *Pochonia chlamydosporia*

Visando à produção de material axênico, sementes de soja (*Glycine max* L.) foram esterilizadas através da descontaminação à gás. Para tanto utilizaram-se 100 mL de hipoclorito de sódio 05% e 3 mL de ácido clorídrico a 37% 1N. As sementes permaneceram por 6 horas, em uma caixa fechada, em contato com o gás liberado. Após este período as sementes foram lavadas por três vezes em água destilada e autoclavada, e dispostas sobre papel filtro estéril para secagem.

Para o tratamento das sementes de soja utilizaram-se tubos do tipo Falcon com capacidade para 50 mL, onde foram adicionados 100 sementes umedecidas com 4 mL de água estéril. Em seguida, acrescentou-se *P. chlamydosporia* na dosagem de 2 g clamidósporos para 100 sementes. Os tubos foram agitados até que os clamidósporos de *P. chlamydosporia* aderissem às sementes. Após, as sementes foram colocadas sobre um papel filtro para secagem.

Crescimento *in vitro* de plantas de soja a partir de sementes inoculadas com *P. chlamydosporia* para estudos anatômicos e histoquímicos

Para confirmar que o fungo a ser observado em estudos anatômicos e histoquímicos fosse realmente *P. chlamydosporia*, esse teste foi montado axenicamente *in vitro*.

Sementes de soja axenizadas e tratadas com *P. chlamydosporia* foram colocadas para germinar em frasco estéril de 600 mL com tampa, contendo 100 mL de meio composto pelos

sais básicos de MS $^{1/2}$ força (Murashige & Skoog, 1962), acrescido com 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, vitaminas de Nitsch e Nitsh 20g L⁻¹ de sacarose 0,3 %. O pH foi ajustado a 5,7 ± 0,01 antes da autoclavagem. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro).

Obtenção de raízes de soja infectadas ou não por *M. incognita* e *P. chlamydosporia* provenientes de tratamento de sementes para estudos anatômicos e histoquímicos

O inóculo de *M. incognita* foi composto por ovos obtidos de população pura do nematoide, mantida em raízes de tomateiros (*Solanum lycopersicum* L.), em casa-de-vegetação. Os ovos foram extraídos das raízes conforme técnica de extração de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981).

Para a axenização dos juvenis de *M. incognita* utilizou-se a técnica proposta por Mountain (1955), modificada por Gonzaga (2006). Vasos de 1,5 L de capacidade foram preenchidos com uma mistura de terriço e areia, na proporção 1:1 (p/p), previamente tratados com brometo de metila na dosagem de 80 cm³/m³ de solo. A seguir, o solo foi inoculado com 1.000 juvenis de *M. incognita* por vaso. Cada vaso recebeu os seguintes tratamentos: sementes de soja tratadas com *P. chlamydosporia* e 1000 J₂ de *M. incognita*; semente de soja sem tratamento+1000 J₂ de *M. incognita* e, sementes de soja sem tratamento. Ao todo foram utilizados três vasos para cada tratamento, que permaneceram em casa de vegetação por cinco semanas. Quando necessário os vasos foram irrigados com água destilada.

Microscopia de luz

Análise estrutural - Para os experimentos *in vitro* foram escolhidos aleatoriamente dois frascos de vidro de cada tratamento contendo plantas de soja, inoculadas ou não com *P.*

chlamydosporia. O mesmo foi feito para os experimentos em vasos contendo os diferentes tratamentos.

Fragmentos de raízes com 5 cm de comprimento de cada tratamento foram fixados em FAA₅₀, por 24 horas, e estocados em etanol 70% (Johansen, 1940). Posteriormente, amostras de 0,4 cm de comprimento foram desidratadas em série etílica e incluídas em 2-hidroxietilmetacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. O material emblocado foi cortado transversal e longitudinalmente em micrótopo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA), com 5 µm de espessura, corado com azul de toluidina pH 4,0 (O'Brien & McCully, 1981) para caracterização estrutural e montado com resina sintética (Permout).

Para a confirmação da presença do fungo foi utilizado material clarificado e corado com azul de aman. Foram utilizados fragmentos de raízes fixados em FAA₅₀, reidratados, imersos em solução de KOH 5% e aquecidos por 20 min, para clareamento. Posteriormente, as raízes foram lavadas em água destilada para remoção da solução, imersas em solução de HCl 1%, por 5 minutos, e corados com azul de aman (Araújo & Stadinik, 2011), por 5 minutos. Finalmente, as raízes coradas foram lavadas em água destilada e montadas entre lâmina e lamínula com água.

Análise histoquímica- Foram utilizadas amostras de raízes de cada tratamento fixadas em FAA₅₀ e seccionadas em micrótopo de mesa, e também amostras fixadas, incluídas e seccionadas para a análise estrutural. As secções foram submetidas aos seguintes reagentes: sudan black B (Pearse, 1980), sudan IV (Johansen, 1940) e vermelho neutro (Kirk, 1970) para lipídios; lugol (Johansen, 1940) para amido, e xyloidine Ponceau (XP) (Vidal, 1970) para proteínas. O controle foi conduzido simultaneamente para cada teste, de acordo com a especificação de cada autor.

As imagens das análises estrutural e histoquímica foram realizadas em microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) acoplado à câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger Alemanha) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision. A análise com fluorocromo (vermelho neutro) foi realizada no mesmo microscópio, utilizando o sistema de epifluorescência com filtro UV (WV: 340-380 nm), espelho dicróico (400 nm) e filtro de barreira (420 nm).

Resultados

No tratamento controle foi possível verificar que não houve contaminação das raízes por *P. chlamydosporia* (Figura 1 A). As raízes de soja foram rapidamente colonizadas pelo fungo, sendo possível verificar sua colonização nas raízes *in vitro* aos quinze dias após o semeio da soja tratada com *P. chlamydosporia* (Dados não publicados).

O rizoplane das raízes foi amplamente colonizado pelo fungo, demonstrado pela abundância de hifas presentes na superfície das raízes (Figura 1 B). Embora sendo pouco encontrado, houve a formação de clamidósporos do tipo dictioclamidósporos na superfície das raízes (Figura 1B-C).

Na epiderme, principalmente no interior dos pelos radiculares, foi possível verificar a presença de clamidósporos em diferentes estádios de desenvolvimento (Figura 1 D). A presença de hifas no interior dos pelos foi vista constantemente e em grande quantidade (Figura 1D).

Nas células comuns da epiderme e no córtex havia uma grande quantidade de hifas fortemente coradas pelo azul de aman, formando um emaranhado de hifas, como os encontrados por micorrizas arbusculares (Figura 1 E). Hifas individuais presentes na epiderme também foram visualizadas (Figura 1 F).

Na análise estrutural das plantas de soja inoculadas com *M. incognita* verificou-se alterações na estrutura anatômica usual da raiz, quando comparadas ao tratamento controle (somente planta de soja), (Figura 2 A–B). As diferenças estruturais foram mais evidenciadas nos tecidos vasculares.

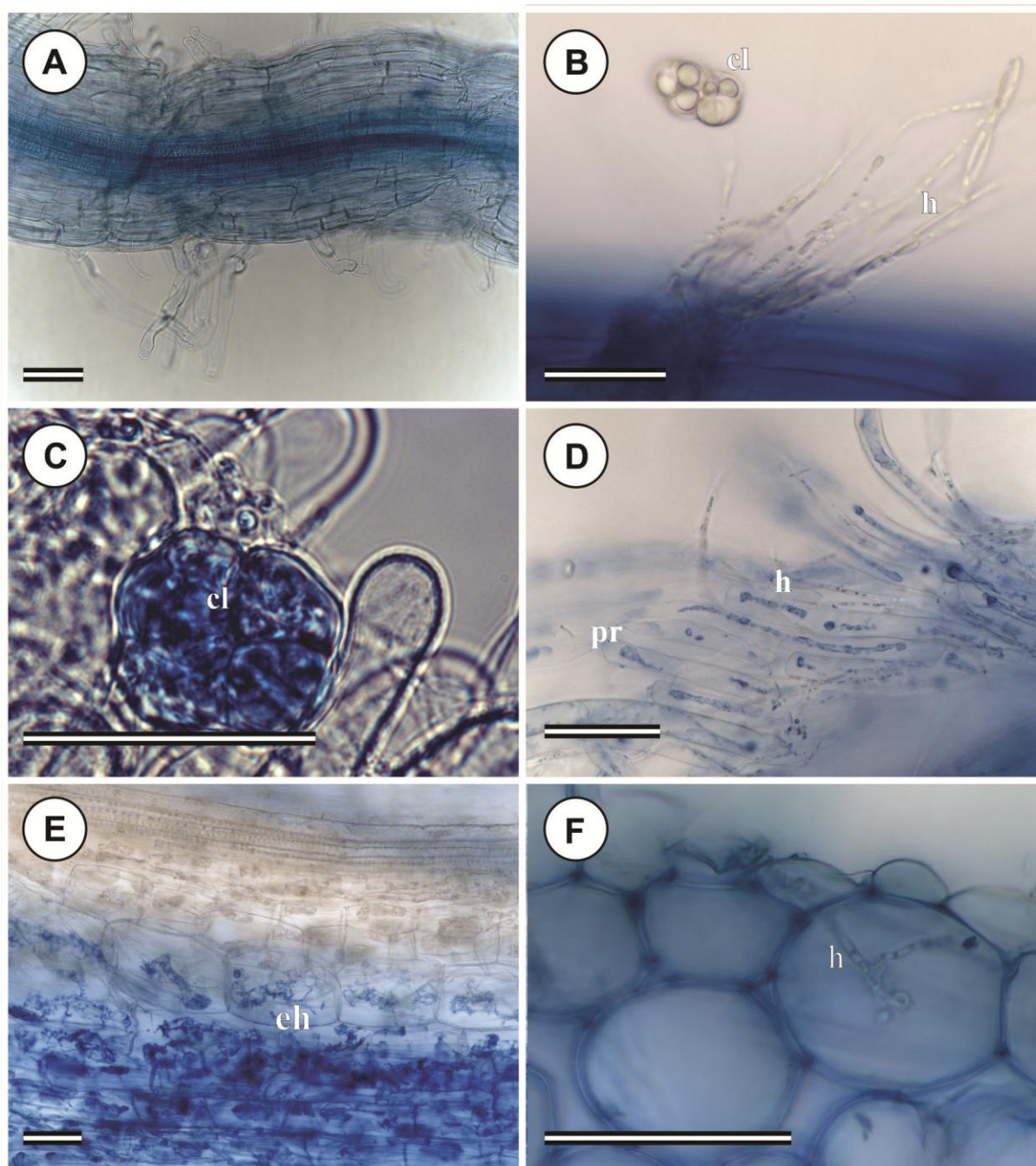


Figura 1 – Raízes de soja coradas com azul de aman (fotomicrografias). (A) aspecto geral do segmento radicular de raiz de soja sem a presença do fungo *P. chlamydosporia* e do nematoide *M. incognita*; (B) hifas e clamidósporo presentes na superfície da raiz; (C) clamidósporos do tipo dictioclamidosporos na superfície das raízes; (D) clamidósporos em formação e hifas no interior dos pêlos radiculares; (E) hifas fortemente coradas, formando um emaranhado de hifas e (F) hifa individualizada na epiderme e no córtex das raízes. cl, clamidósporo; eh, emaranhado de hifas; h, hifa; pr, pêlos radiculares;. Barras = 50 µm.

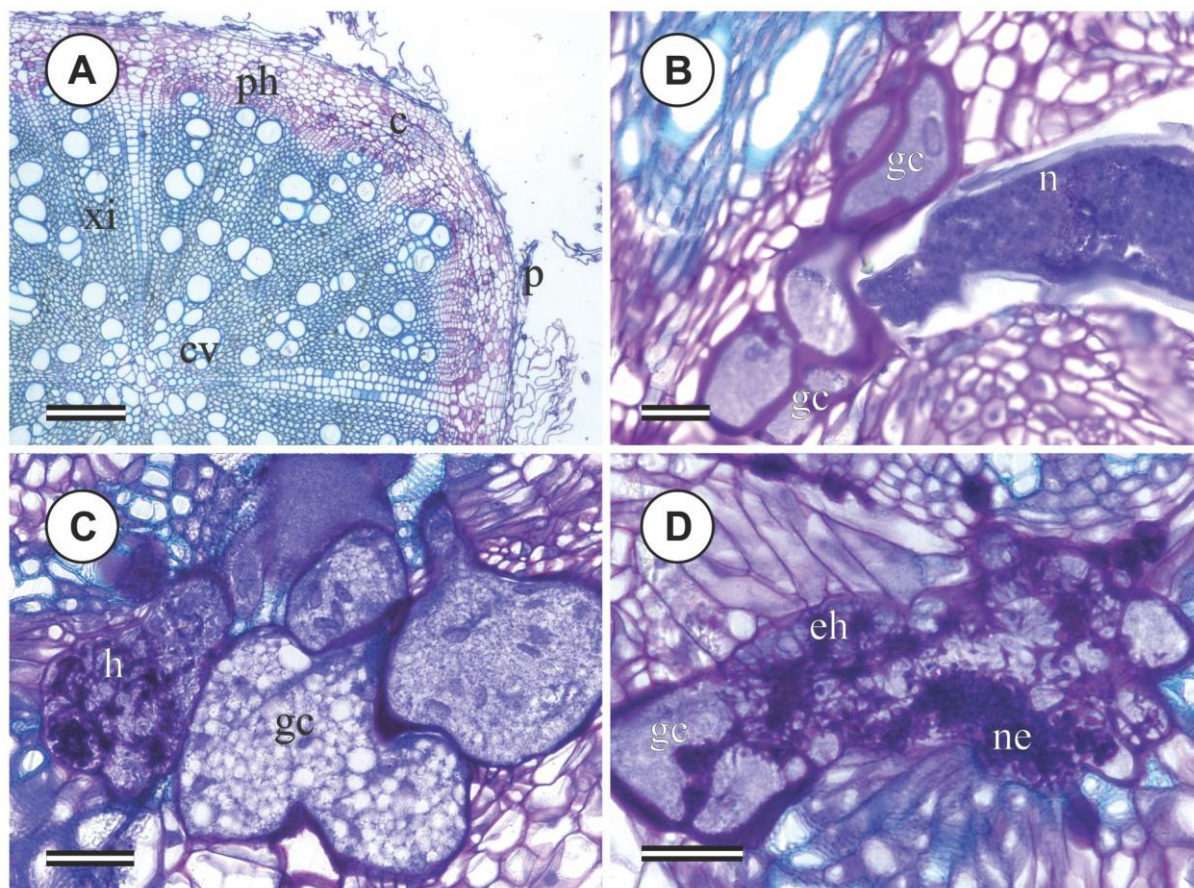


Figura 2 – Raízes de soja colonizadas ou não com nematoide *M. incognita* e pelo fungo *Pochonia chlamydosporia* (Fotomicrografias de material incluído em metacrilato e corado com azul de toluidina). (A) raízes de soja sem inoculação, (B) raízes de soja inoculadas somente com *M. incognita*, evidenciando a presença do nematoide e formação de células gigantes, (C) e (D) raízes de soja inoculadas com *P. chlamydosporia* e *Meloidogyne incognita*, evidenciando a colonização pelo fungo nas fêmeas e células gigante. Cv, cilindro vascular; c, córtex; gc, célula gigante.; eh, emaranhado de hifas; ne, nematoides; h, hifa; p, parênquima; ph, floema; xl, xilema. Barras = 200 μ m (A e B), 100 μ m (C e D), 50 μ m (E e F).

As raízes das plantas de soja inoculadas com *M. incognita* apresentaram número elevado de células gigantes, multinucleadas, com citoplasma denso. Houve compressão de células do córtex e dos tecidos vasculares, devido à presença dos sítios de alimentação em desenvolvimento, com interrupções e distorções dos elementos traqueais (Figura 2 B).

As plantas de soja inoculadas com *M. incognita* e *P. chlamydosporia*, apresentaram os mesmos aspectos estruturais descritos para as plantas inoculadas somente com *M. incognita*. Contudo foi possível verificar a presença de *P. chlamydosporia* colonizando fêmeas e células gigantes (Figuras 2 C-D). As células gigantes foram altamente colonizadas pelo fungo.

Formou-se um emaranhado de hifas sobre as fêmeas e células gigantes, sendo fortemente coradas por azul de toluidina (Figuras 2 C- D).

Esse aspecto de colonização pelas hifas já havia sido observado na colonização do fungo nas células da epiderme e do córtex (Figura 1 E). Não foi possível verificar a formação de conídios e clamidósporos nas fêmeas e células gigantes colonizadas por *P. chlamydosporia*.

As análises histoquímicas realizadas permitiram distinguir as estruturas fúngicas de substâncias ergásticas produzidas nas células radiculares, como grãos de amido, gotas lipídicas e proteínas. Por outro lado, as estruturas relacionadas ao nematoide apresentaram conteúdo proteico e lipídico evidente.

Discussão

Este trabalho mostrou claramente a efetividade do tratamento de sementes de soja pelo fungo *P. chlamydosporia* em colonizar o sistema radicular de plantas de soja. Foi possível verificar a colonização dos tecidos das raízes de soja, tanto inoculados somente com *P. chlamydosporia*, como de raízes inoculadas com o fungo e *M. incognita*, sendo evidenciada a colonização do fungo em fêmeas e células gigantes. Este é o primeiro relato de imagens microscópicas da colonização de *P. chlamydosporia* nas células gigantes e em fêmeas de *M. incognita*.

Os testes histoquímicos utilizados neste trabalho foram fundamentais para caracterização estrutural das plantas inoculadas com *P. chlamydosporia*, esclarecendo dúvidas sobre estruturas que podiam estar relacionadas ao fungo ou a planta, como a distinção entre estruturas fúngicas e substâncias ergásticas.

Pochonia chlamydosporia foi capaz de crescer sobre as raízes de soja, sendo visualizadas hifas e clamidósporos. Essa capacidade do fungo em crescer na rizosfera das

plantas já foi relatada em algumas culturas, a exemplo de couve, batata, repolho (Bourne *et al.*, 1996), cevada (Lopez-Llorca *et al.*, 2002), e tomateiro (Bordallo *et al.*, 2002; Dallemole-Giaretta, 2008).

Em cevada, por exemplo, a colonização do rizoplano foi particularmente alta, com crescimento micelial na região das junções celulares, onde se tem grande concentração de exsudatos, proporcionando a formação de muitos clamidósporos, após três semanas de inoculação (Lopez-Llorca *et al.*, 2002).

Hifas e clamidósporos de *P. chlamydosporia* foram encontrados em abundância nos pelos radiculares de soja (Figura 1 C). Lopez-Llorca *et al.*, (2002), por sua vez observaram hifas nos pelos radiculares de cevada, mas não relataram a presença de clamidósporos. A grande quantidade de hifas e clamidósporos encontrados nos pelos radiculares pode estar relacionada à penetração do fungo nas raízes, uma vez que o rizoplano das plantas de soja foram altamente colonizados.

Pochonia chlamydosporia, ao colonizar as raízes de soja, se comportou como fungo endofítico, colonizando as células epidérmicas e corticais, com produção de hifas e clamidósporos. Este tipo de crescimento já foi observado por outros autores em raízes de cevada e tomate (Bordallo *et al.*, 2002; Lopez-Llorca *et al.*, 2002; Maciá-Vicente *et al.*, 2009; Escudero & Lopez-Llorca, 2012). Uma vantagem do endofitismo é que o endófito ocorre no mesmo nicho ecológico do nematoide endoparasitas e, assim, não está sujeito à concorrência de outros microrganismos presentes no solo (Stirling, 2011).

O fungo formou um emaranhado de hifas ao penetrar nas células da epiderme e do córtex. Essas estruturas foram semelhantes às encontradas próximas as células do córtex. A formação de emaranhados de hifas é uma característica visualizada em plantas com micorriza arbuscular (Smith & Read, 1997). Essas estruturas podem estar relacionadas a fatores nutricionais, podendo promover o crescimento das plantas, além de aumentar a tolerância a

estresses abióticos, aumentando a resistência a doenças (Stancato & Silveira, 2006; Schreiner, 2007).

Provavelmente, a colonização interna dos tecidos radiculares por *P. chlamydosporia* pode beneficiar as plantas, pois alguns isolados de *P. chlamydosporia* já foram relatados como promotores de crescimento de plantas de alface, (Viggiano *et al.*; 2012) tomate, (Hidalgo-Diaz *et al.*, 2000; Dallemole-Giaretta, 2008) e de trigo (Monfort *et al.*, 2005).

Nas plantas de soja inoculadas com *M. incognita* e *P. chlamydosporia* foi observada grande quantidade de hifas parasitando as células gigantes e as fêmeas. Essa quantidade de micélio fúngico encontrada nas células gigantes pode não estar relacionada somente ao parasitismo do nematoide por este agente de controle biológico, mas também pelo elevado teor de nutrientes contidos nessas células. Além disso, as células gigantes contêm mais proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos do que células normais (Bird & Bird, 1991), que podem servir como fonte de nutrientes para o crescimento fúngico ao colonizar as fêmeas do nematoide.

Pelas observações das fotomicrografias das plantas de soja inoculadas com *P. chlamydosporia*, ficou evidente a colonização do sistema radicular das plantas de soja pelo fungo tanto na presença como na ausência do nematoide. A eficácia no controle do nematoide *M. incognita* pelo antagonista pode ser explicada pela extensa colonização das fêmeas e células gigantes, que seria outra forma de ação deste fungo sobre o nematoide além do parasitismo de ovos no exterior das raízes da planta hospedeira. A efetividade desse microorganismo já foi constatada em muitos estudos sendo classificado como um dos mais promissores agentes de biocontrole para o nematoide das galhas (De Leij & Kerry, 1991; Hidalgo-Diaz *et al.*, 2000; Verdejo-Lucas *et al.*, 2003; Dallemole-Giaretta *et al.*, 2012).

Pelas observações das fotomicrografias das plantas de soja provenientes de sementes inoculadas com *P. chlamydosporia*, ficou evidente a colonização do sistema radicular das plantas de soja, tanto na presença como na ausência do nematoide.

Literatura citada

- ARAÚJO, L. & STADINIK, M.J. 2011. Processo infeccioso e atividade de enzimas em plântulas de macieira de genótipo resistente ou suscetível à mancha foliar de *Glomerella* causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. **Tropical Plant Pathology**, 36(4): 241-248.
- BIRD, A. F. & BIRD, J. 1991. **The Structures of Nematodes** (2nd ed). Academic Press, NY. 316 pp.
- BONETI, J.I.S & FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, 6(3): 533.
- BORDALLO, J.J.; LOPEZ-LLORCA, L.V.; JANSSON, H.B.; SALINAS, J.; PERSMARK, L.; ASENSIO, L. 2002. Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. **New Phytologist**, 154:491-499.
- BOURNE, J.M. & KERRY, B. R. 2000. Observations on the survival and competitive ability of the nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium* in soil. **International Journal of Nematology**, 10 (1): 9-18.
- BOURNE, J.M.; KERRY, B.R. & DE LEIJ, F.A.A.M. 1996. The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus, *Verticillium chlamyosporium* Goddard. **Biocontrol Science and Technology**, 6: 539-548.
- DALLEMOLE-GIARETTA, R. 2008. Isolamento, identificação e avaliação de *Pochonia chlamyosporia* no controle de *Meloidogyne javanica* e na promoção de crescimento de tomateiro. Universidade Federal de Viçosa. Tese de Doutorado em Fitopatologia. Viçosa. 83 p.
- DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A.; PEREIRA, O. L.; ZOOCA, R.J.F. & FERRAZ, S. 2012. Screening of *Pochonia chlamyosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. **Crop Protection**, 42: 102-107.
- DE LEIJ, F.A.A.M. & KERRY, B.R. 1993. The nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium* as biological a potential control agent for *Meloidogyne arenaria*. **Revue de Nématologie**, 14(1): 157-164.

ESCUADERO, N. & LOPEZ-LLORCA, L.V. 2012. Effects on plant growth and root-knot nematode infection of an endophytic GFP transformant of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. **Symbiosis**, 57 (1):33-42.

FREITAS, L.G.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FERRAZ, S.; ZOOCA, R.J.F. & PODESTÁ, G.S. 2009. Controle biológico de nematoides: estudos de casos. In: Zambolim L, Picanço MC (Eds) 122 **Controle biológico de pragas e doenças: exemplos práticos**. Viçosa. UFV-DFP. pp. 41- 82.

GONZAGA, V. 2006. **Caracterização morfológica, morfométrica e multiplicação in vitro das seis espécies mais comuns de *Pratylenchus* Filipjev, 1936 que ocorrem no Brasil**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 79p.

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 (4): 277-284.

HUSSEY, R. S. & BARKER, K. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, 57:1025–1028.

JOHANSEN, D. A. 1940. **Plant microtechnique**. Mc Graw-Hill Book Co. Inc., New York. 523p.,

KERRY, B.R. & J.M. BOURNE. 2002. **A manual for research on *Verticillium chlamydosporium*, a potential biological control agent for root-knot nematodes**. International Organization for Biological and Integrated Control for Noxious Animals and Plants, Gent, Belgium, 84 p.

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 eggs and females. **Annals of Applied Biology**, 100: 489-499.

KERRY, B.R. & CRUMP, D.H. 1977. Observations on fungal parasites of females and eggs of the cereal cyst-nematode, *Heterodera avenae*, and other cyst nematodes. **Nematologica**, 23:193–201

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

MAIA, A. S.; SANTOS, J. M. & DI MAURO, A. O. 2001. Estudo *in vitro* da habilidade predatória de *Monacrosporium robustum* sobre *Heterodera glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, 26 (4):732-736.

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

MONFORT, E.; LOPEZ-LLORCA, L.V.; JANSSON, H.B.; SALINAS, J.; PARK, J.O. & SIVASITHAMPARAM, K. 2005. Colonization of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root-rot. **Soil Biology and Biochemistry**, 37:1229-1235.

MOUNTAIN, W. B. 1955. A method of culturing plant parasitic nematodes under sterile conditions. **Proceeding of the Helminthological Society of Washington**, Washington, 22 (1): 49-52.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497.

O'BRIEN, T.P. & McCULLY, M.E. 1981. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne – Australia: Termarcarphi Pty Ltd., 45 p.

PEARSE, A. G. E. 1980. **Histochemistry: theoretical and applied**. V. II. London: Longman Group.

SCHREINER, R.P. 2007. Effects of native and nonnative arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of 'Pinot noir' (*Vitis vinifera* L.) in two soils with contrasting levels of phosphorus. **Applied Soil Ecology**, 36: 205-215.

SEGERS, R.; BUTT, T.M.; KERRY, B.R.; BECHETT, A. & PEBERDY, J.F. 1996. The role of the proteinase VCP1 produced by the nematophagous *Verticillium chlamydosporium* in the infection process of nematode eggs. **Mycological Research**. 100 (4): 421-428.

SMITH, S.E. & READ, D.J. 1997. **Mycorrhiza Symbiosis**. Academic Press, London, 605p.

STANCATO, G.C. & SILVEIRA, A.P. 2006. Associação de fungos micorrízicos arbusculares e cultivares micropropagadas de antúrio. **Bragantia**, 65 (3): 511-516.

STIRLING, G.R. 2011. Biological control of plant-parasitic nematodes: An ecological perspective, a review of progress and opportunities for further research. In DAVIES, K. & SPIEGEL, Y. **Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Building coherence between microbiological ecology and molecular mechanisms**. 11:1–38.

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

TOBIN, J. D.; HAYDOCK, P. P. J; HARE, M. C.; WOODS, S. R. & CRUMP, D. H. 2008. The compatibility of the fungicide azoxystrobin with *Pochonia chlamydosporia*, a biological control agent for potato cyst nematodes (*Globodera* spp.). **Annals of Applied Biology**, 33:301-305.

VERDEJO-LUCAS, S.; SORRIBAS, F.J.; ORNAT, C. & GALEANO, M. 2003. Evaluating *Pochonia chlamydosporia* in a double-cropping system of lettuce and tomato in plastic houses infested with *Meloidogyne javanica*. **Plant Pathology**, 52:521-528.

VIGGIANO, J.R.; FREITAS, L.G. & FERREIRA, P.A. 2012. Resíduo da produção de *Pochonia chlamydosporia* no desenvolvimento de mudas e plantas de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 47(7): 983-990.

ZARE, R.; GAMS, W. & EVANS, H.C. 2001. A revision of *Verticillium* section . V. *Prostrata*. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthra*. **Nova Hedwigia**, 73(1-2): 51-86.

CONCLUSÕES GERAIS

- A aplicação de *Pochonia chlamydosporia* no tratamento de sementes de soja e de algodão é viável, resulta na colonização de todo o sistema radicular e promove o controle do nematoide *Meloidogyne incognita*;
- *Pochonia chlamydosporia* utilizada no tratamento de sementes de soja pode percolar no solo até, pelo menos, a profundidade de 50 cm, tanto em solos arenosos como em solos argilosos. O fungo desenvolve melhor no solo e conseqüentemente é mais eficiente em controlar o nematoide quando aplicado em solo arenoso.
- A maioria dos produtos químicos utilizados no tratamento de sementes de soja e algodão foi compatível com *P. chlamydosporia* em tratamento de sementes, comprovando a possibilidade da utilização combinada de fungicidas, inseticidas e nematicidas com *P. chlamydosporia* em tratamento de sementes, sem comprometer a atividade deste agente biológico.
- Não é recomendável a utilização do inseticida Fipronil no tratamento de sementes de algodão juntamente com *P. chlamydosporia*, pois este reduziu drasticamente os números de unidades formadoras de colônias do fungo no solo.
- Para a cultura da soja, não é recomendável a utilização do fungicida Carbendazim + Tiram no tratamento de sementes de juntamente com *P. chlamydosporia*, pois este reduziu drasticamente os números de unidades formadoras de colônias do fungo no solo.
- Pelas observações das fotomicrografias das plantas de soja provenientes de sementes inoculadas com *P. chlamydosporia*, ficou evidente a colonização do sistema radicular das plantas de soja, tanto na presença como na ausência do nematoide. A eficácia do tratamento de sementes com *P. chlamydosporia* no controle de *M. incognita* se

justifica pela resultante extensa colonização das fêmeas e células gigantes, além do parasitismo de ovos.