

THALITA SUELEN AVELAR MONTEIRO

**CONTROLE BIOLÓGICO DO NEMATOIDE DAS GALHAS,
Meloidogyne javanica, E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL
COM OS FUNGOS *Pochonia chlamydosporia* E *Duddingtonia flagrans***

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

VIÇOSA

MINAS GERAIS – BRASIL

2013

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

T

M775c
2013

Monteiro, Thalita Suelen Avelar, 1987-
Controle biológico do nematoide das galhas,
Meloidogyne javanica, e promoção de crescimento vegetal
com os fungos *Pochonia chlamydosporia* e
Duddingtonia flagrans / Thalita Suelen Avelar Monteiro.
– Viçosa, MG, 2013.
ix, 55 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. Fungos nematófagos. 2. Nematoide-das-galhas - Controle
biológico. 3. Tomate - Nutrição.

4. *Pochonia chlamydosporia*. 5. *Duddingtonia flagrans*.

6. *Meloidogyne javanica*. 7. *Lycopersicon sculentum*.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

II. Título.

CDD 22. ed. 579.55

THALITA SUELEN AVELAR MONTEIRO

**CONTROLE BIOLÓGICO DO NEMATOIDE DAS GALHAS,
Meloidogyne javanica, E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL
COM OS FUNGOS *Pochonia chlamydosporia* E *Duddingtonia flagrans***

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

APROVADA: 28 de fevereiro de 2013.



Everaldo Antônio Lopes



Jackson Victor de Araújo



Rosângela Dallemole Giaretta



Leandro Grassi de Freitas
(Orientador)

Aos meus pais Lia e Geraldo, meus grandes exemplos de caráter, dinamismo e amor.

Aos meus irmãos Priscila e João Luís pela força, amizade e compreensão.

Ao Samuel pelo amor, companheirismo, pela dedicação e paciência.

Aos meus avós João e Terezinha, por tudo, sobretudo o AMOR,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador professor Leandro Grassi de Freitas, pela orientação, atenção, confiança, amizade e pelos ensinamentos.

Ao professor Silamar Ferraz, pela colaboração, críticas e sugestões.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao professor Jackson Victor de Araújo, do Departamento de Veterinária, que gentilmente cedeu o isolado AC001 de *Duddingtonia flagrans*.

Aos professores Everaldo Antônio Lopes e Rosangela Dallemole Giaretta pelas sugestões na correção do trabalho.

Aos amigos e colegas do laboratório de nematologia Érica, Ingrid, Deisy, Flávia, Guilherme, Hugo, Paulo Afonso, Rosana, Paula, Augusto, Nara, Marilene, Fernanda, Leonardo e Raul pelo convívio, pela amizade e colaborações.

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

Aos meus colegas da turma de mestrado, pela amizade, apoio e pelos momentos de alegria vividos.

A toda a minha família, que esteve sempre ao meu lado.

Aos meus tios e primos, pelo amor, pela amizade e torcida para que tudo desse certo.

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

BIOGRAFIA

Dia 21 de janeiro de 1987 nasceu em Montes Claros a tão esperada THALITA SUELEN AVELAR MONTEIRO, filha primogênita de Geraldo Francisco Alkmim Monteiro e Maria da Conceição Pereira Avelar.

Iniciou os estudos ainda muito cedo. Aos dois anos, começou a estudar na escola Pingo de Gente, onde fez vários amiguinhos e também inimigos, já que tinha o hábito cruel de morder os coleguinhas. Em 1991 mudou-se para E. E. Genesco Augusto Caldeira Brant, onde viveu muitos bons momentos e fez lindas amizades ao longo dos oito anos vividos naquela encantada escola. Em 2004, concluiu o ensino médio no Colégio Professor Servelino Ribeiro, ali conquistou amizades verdadeiras e o carinho de muitos mestres, importante para a base dos estudos subsequentes.

Em 2005, ainda no norte de minas, começou os estudos em Agronomia em Janaúba. Longe de casa, tinha os amigos que deram-na suporte para superar a saudade de sua amada família. Em 2010 graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais.

Em fevereiro de 2011 deixou as fronteiras do norte de Minas e se instalou na Zona da Mata, onde iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, sob orientação do Professor Leandro Grassi de Freitas. Defendeu sua dissertação em fevereiro de 2013.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS.....	4
CAPÍTULO 1 – Compatibilidade de fungos nematófagos no controle de <i>Meloigyne javanica</i> <i>in vitro</i> e no solo em microcosmo	
Resumo	8
Abstract.....	9
Introdução	10
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	16
REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO 2 – Combinações de <i>Pochonia chlamydosporia</i> e <i>Duddingtonia flagrans</i> no controle do nematoide das galhas em tomateiro	
Resumo	27
Abstract.....	28
Introdução	29
Material e Métodos	30
Resultados e Discussão	33
REFERÊNCIAS.....	38
CAPÍTULO 3 – Aquisição de nutrientes minerais e promoção de crescimento em plantas de tomate induzidas pelos fungos nematófagos <i>Pochonia chlamydosporia</i> e <i>Duddingtonia flagrans</i>	
Resumo	42
Abstract.....	43
Introdução	44
Material e Métodos	45
Resultados e Discussão	47
REFERÊNCIAS.....	52
CONCLUSÕES GERAIS	55

RESUMO

MONTEIRO, Thalita Suelen Avelar, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Controle biológico do nematoide das galhas, *Meloidogyne javanica*, e promoção de crescimento vegetal com os fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia flagrans*.** Orientador: Leandro Grassi de Freitas. Coorientador: Silamar Ferraz.

Testes *in vitro* e em casa de vegetação foram realizados com os objetivos de: (i) avaliar a compatibilidade dos fungos nematófagos *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e *Duddingtonia flagrans* (Df); (ii) avaliar a influência do nematoide *Meloidogyne javanica* e de ambos os fungos nematófagos no desenvolvimento de plantas de tomate; (iii) estudar a ação dos fungos sobre o estado nutricional das plantas. Nos ensaios de compatibilidade de Pc e Df *in vitro*, com exceção do teste de antibiose, todos os testes de compatibilidade dos isolados indicaram que os organismos são compatíveis. No primeiro experimento no solo em microcosmo em que foi avaliado a predação de *M. javanica* por Df, houve redução no número de juvenis em até 72,7%. No segundo experimento em microcosmo, em que foram avaliadas doses dos fungos em conjunto e em separado, a aplicação em conjunto dos dois organismos aumentou o controle, reduzindo em até 81,35% o número de juvenis quando 10.000 clamidósporos de cada fungo foram aplicados por g de solo. Dois experimentos foram realizados em casa de vegetação para avaliar o efeito de diferentes concentrações dos fungos nematófagos Pc e Df, isoladamente ou em mistura, no controle de *M. javanica* e no crescimento do tomateiro. Foram avaliadas as variáveis: número de galhas g⁻¹ de raiz, número de ovos g⁻¹ de raiz, altura e massa seca das plantas. Em ambos os experimentos observou-se o efeito dos dois antagonistas na redução do número de galhas e de ovos do nematoide das galhas. Os tratamentos não influenciaram a altura das plantas nos dois experimentos. No experimento 1, a adição de Pc aumentou a massa seca das plantas, o que não ocorreu no experimento 2. Um ensaio em casa de vegetação também foi realizado para avaliar a promoção de crescimento e aquisição de nutrientes minerais no tomateiro em função da aplicação de ambos os fungos. Após 60 dias avaliou-se a massa seca das plantas e o conteúdo de N, P, K, Ca, Mg e S. Houve efeito positivo dos dois fungos aplicados sobre a massa seca total do tomateiro e conteúdo de nutrientes minerais nas plantas. Dos resultados obtidos, conclui-se que a ação conjunta dos dois antagonistas proporciona maior controle do nematoide das galhas, mostrando-se uma estratégia promissora no controle biológico de fitonematoides. Adicionalmente, a promoção de crescimento vegetal pelos dois fungos estudados, associada à melhoria do estado nutricional das plantas, indica o

potencial de uso agrícola desses organismos, não apenas para o controle de nematoides, mas também por sua ação direta no desenvolvimento do tomateiro e na economia de fertilizantes.

ABSTRACT

MONTEIRO, Thalita Suelen Avelar, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2013. **Biological control of the rot-knot nematode *Meloidogyne javanica* and plant growth promotion by the fungus *Pochonia chlamydosporia* and *Duddingtonia flagrans*.** Adviser: Leandro Grassi de Freitas. Co-adviser: Silamar Ferraz.

In vitro and greenhouse tests were carried out in order to: (i) assess the compatibility of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Duddingtonia flagrans*; (ii) evaluate the control of *Meloidogyne javanica* by the nematophagous fungi applied together and separately; (iii) evaluate the development of tomato plants inoculated with the nematophagous fungi and study the action of the fungi on plant nutritional status. All the compatibility tests, with the exception of an antibiosis test, indicated that *P. chlamydosporia* and *D. flagrans* are compatible to be applied together. An experiment in microcosm soil, in which predation of *M. javanica* by *D. flagrans* was assessed, the number of juveniles reduced in up to 72.7%. In a second assay, in microcosm soil, with different doses of the fungi applied together and separately, the application of *P. chlamydosporia* and *D. flagrans* reduced in up to 81.35% the number of juveniles when 10.000 chlamydospores of each fungus were applied per g of soil. Two experiments were conducted in a greenhouse to evaluate the effect of different concentration of *P. chlamydosporia* and *D. flagrans* in the control *M. javanica* and growth of tomato. The number of galls, number of eggs, height and dry weight of plants were evaluated. In both experiments the antagonists reduced the number of galls and egg production of root-knot nematode and did not affect plant height. In the first experiment, the addition of *P. chlamydosporia* increased plant dry matter, what was not observed in second one. An assay, in greenhouse conditions, was also carried out to evaluate growth promotion and mineral nutrients content in the tomato plants depending on the application of *P. chlamydosporia* and *D. flagrans* in combination and separated. The content of N, P, K, Ca, Mg and S and dry matter of the plants were evaluated. The two fungi increased total dry matter and mineral nutrients content in tomato plants. The combination of the two antagonists provides greater control of root-knot nematode and proved to be a promising strategy in the biological control of plant nematodes. Growth promotion and the positive effect in the nutritional status of the plants inoculated with the studied fungi indicated the great potential of these organisms for agricultural use, not only for the control of

nematodes but also by its direct effect on plant growth and for providing better use of fertilizers.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os nematoides fitoparasitas causam prejuízos em diversas culturas agrícolas em todo o mundo com perdas estimadas em 12% (Sasser e Freckman, 1987). Os fitonematoides do gênero *Meloidogyne* Goeldi são os mais importantes por sua agressividade e por estarem amplamente disseminados (Moura, 1996; Whitehead, 1998). O controle desses patógenos pode ser obtido com a utilização de nematicidas, entretanto, esses produtos sofrem restrição de uso em vários países por apresentarem toxicidade elevada e persistência no ambiente (Ferraz e Freitas, 2004), demandando o desenvolvimento de novas medidas de controle. Assim, métodos alternativos de manejo têm sido propostos, em substituição ao emprego de nematicidas sintéticos (Campos et al., 1998; Barker, 2003; Ward et al., 2012), entre os quais o controle biológico tem ganhado destaque.

Vários organismos são antagonistas aos fitonematoides, como, por exemplo, nematoides predadores, tardígrados, vírus, artrópodes, ácaros, fungos e bactérias (Stirling, 1991), sendo os fungos, os mais estudados (Chen e Dickson, 2004).

Fungos predadores e parasitas de ovos e fêmeas estão entre os antagonistas mais promissores para o controle de fitonematoides, destacando-se por suas habilidades saprofíticas e facilidade de crescimento *in vitro* (Soares e Santos, 2004), que são importantes para sua produção massal. Dentre os fungos que parasitam fêmeas e ovos, *Pochonia chlamydosporia* Zare e Gams (sinonímia *Verticillium chlamydosporium* Goddard, teleomorfo *Metacordyceps chlamydosporia* [Zare et al., 2001; Sung et al., 2007]), espécie caracterizada por conidióforos produzindo fiálides e presença de dictioclamidósporos (Zare et al., 2001), tem se destacado por sua efetividade no controle de nematoides (Kerry e Jaffee, 1997; Freitas et al., 1999; Lopes et al., 2007; Podestá et al., 2009). Esse fungo é capaz de colonizar a superfície e o interior das raízes de muitas espécies de plantas e é capaz de eliminar grande quantidade de ovos produzidos pelos nematoides das galhas (Stirling, 1991). Outras características importantes são a capacidade de produção de clamidósporos (estruturas de resistência) e de promover o desenvolvimento das plantas (Freitas et al., 2009).

Os fungos predadores produzem estruturas especializadas de captura ao longo de suas hifas, a exemplo de nódulos adesivos, hifas adesivas, redes adesivas, anéis constritores ou não constritores, que são formadas em resposta do fungo à presença do

nematoide (Ferraz et al., 2010). Após a adesão dos fungos à superfície do nematoide, as hifas penetram a cutícula, atravessam a hipoderme e obtêm o alimento na cavidade pseudocelomática da presa (Lopez-Llorca et al., 2006). Fungos desse grupo possuem pouca especificidade de hospedeiros, embora as espécies de nematoides possam diferir em sua habilidade de escapar das armadilhas produzidas por diferentes isolados e espécies de fungos (Kerry, 2000).

Duddingtonia flagrans Cooke, um fungo produtor de armadilhas do tipo redes adesivas, vem sendo estudado no controle de helmintos, importantes na área veterinária (Jobim et al., 2008; Maciel, et al. 2010; Braga, et al. 2011). Essa espécie é caracterizada pela produção de conídios na extremidade de conidióforos, com formato elíptico a ovóide, septo mediano e medindo 25-50 µm de comprimento por 10-15 µm de largura (Cooke e Godfrey, 1964; Van Oorschot, 1985); e pela produção de numerosos clamidósporos intercalados às hifas vegetativas (Scholler e Rubner, 1994). Além disso, destaca-se por ter boa capacidade saprofítica, o que facilita sua multiplicação *in vitro* e o seu estabelecimento no solo. Entretanto, pouco se sabe da ação desse fungo sobre nematoides fitopatogênicos.

O fato de *P. chlamydosporia* parasitar ovos e fêmeas do nematoide das galhas e *D. flagrans* os nematoides na fase de juvenil, sugere que o segundo pode complementar a ação do primeiro e que esses podem agir sinergisticamente, aumentando a eficiência do controle.

Pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando mais de um agente de biocontrole no manejo de fitonematoides (Mendoza e Sikora, 2009; Chaves et al., 2009; Singh et al., 2012). Esses trabalhos tem evidenciado melhor efetividade das medidas de controle quando utilizadas de forma integrada, porém, alguns antagonistas podem ser incompatíveis. Assim, estudos de compatibilidade entre agentes de biocontrole são imprescindíveis para o desenvolvimento de novas ferramentas de manejo de nematoides.

É interessante que o agente de biocontrole, além de reduzir a população do patógeno, atue na promoção de crescimento das plantas, de modo a alterar direta e positivamente a produtividade da cultura de interesse. Diversos são os mecanismos de promoção de crescimento. Há relatos de aumento da superfície radicular, mineralização de matéria orgânica ou melhoria na aquisição de nutrientes (Falih e Wainwright, 1996; Kandeler et al., 1999; Badr et al., 2006). A promoção de crescimento pela aplicação de *P. chlamydosporia* foi observada em pesquisas (Hidalgo-Diaz et al., 2000; Monfort et al., 2005; Dallemole-Giaretta, 2008). A proliferação desse fungo é maior em raízes infectadas com nematoides, o que tem sido atribuído à maior liberação de exsudatos radiculares que

esses patógenos induzem durante o seu parasitismo (De Leij e Kerry, 1991; Bourne et al., 1996). Apesar de não haver relatos da ação de *D. flagrans* como promotor de crescimento vegetal, aumento de massa total de plantas de tomate com a utilização desse fungo foi observada em testes preliminares desenvolvidos no Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides da Universidade Federal de Viçosa (dados não publicados).

Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivos:

- Avaliar a compatibilidade dos fungos nematófagos *P. chlamydosporia* e *D. flagrans in vitro* e em casa de vegetação;
- Avaliar a influência do nematoide *Meloidogyne javanica* Treub e de ambos os fungos nematófagos no desenvolvimento de plantas de tomate;
- Estudar a ação dos fungos nematófagos sobre o estado nutricional das plantas.

REFERÊNCIAS

- BADR, M. A.; SHAFEI, A. M.; SHARAF EL-DEEN, S. H. 2006. The dissolution of K and P-bearing minerals by silicate dissolving bacteria and their effect on sorghum growth. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 2(1): 5-11.
- BARKER, K. R. Perspectives on plant and soil nematology. 2003. *Annual Review of Phytopathology*, 41:1-25.
- BARRON, G. L. The nematode-destroying fungi. 1977. Ontario, Canadá: Canadian Biological Publications Ltd., 140p.
- BOURNE, J. M.; KERRY, B. R.; DE LEIJ, F. A. A. M. 1996. The importance of the host plant in the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Biocontrol Science and Technology*, 6:539-48.
- BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R. ; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; TAVELA, A. O.; SILVA, M. E.; FERNANDES, F. M.; MELO, A. L. 2011. Destruição de larvas infectantes de *Strongyloides venezuelensis* pelos fungos *Duddingtonia flagrans*, *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium sinense*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44:389-391.
- CAMPOS, V. P.; SOUZA, J. T.; SOUZA, R. M. 1998. Controle de fitonematóides por meio de bactérias. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 6:285-327.
- CHAVES, N. P.; POCASANGRE, L. E.; ELANGO, F.; ROSALES, F. E.; SIKORA, R. 2009. Combining endophytic fungi and bacteria for the biocontrol of *Radopholus similis* (Cobb) Thorne and for effects on plant growth. *Scientia Horticulturae*, 122:472-478.
- CHEN, S.; DICKSON, D. W. 2004. Biological control of nematodes by fungal antagonists. In: CHEN, Z.; CHEN, S.; DICKSON, D. W. (Eds.). *Nematology – Advances and perspectives*, v. 2: Nematodes Management and utilization. Tsinghua: University Press; CABI Publishing, 979-1039.
- COOKE, R. C.; GODFREY, B. E. S. 1964. A key of nematode-destroying fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 47:61-74.

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

DE LEIJ, F. A. A. M.; KERRY, B. R. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard, as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood. *Revue Nematol*, 14:157–64.

FALIH ABDULLAH, M. K.; WAINWRIGHT, M. 1996. Microbial and enzyme activity in soils amended with a natural source of easily available carbon. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, 21:177-183.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; DIAS-ARIEIRA, C. R. 2010. Controle Biológico. In: _____. Manejo sustentável de fitonematoides. Viçosa: Editora UFV, 139-169.

FREITAS, L. G.; DALEMOLLE-GIARETTA, R.; ZOOCA, R. J. F.; PODESTÁ, G.S.; FERRAZ, S. 2009. Controle biológico de nematóides: estudo de casos. In: ZAMBOLIM, L. & M.C. PICANÇO. (Eds.). Controle biológico pragas e doenças exemplos práticos. Editora UFV, Viçosa, 41-82.

FERRAZ, S.; FREITAS, L.G. 2004. Use of antagonistic plants and natural products. In: CHEN, Z.; CHEN, S.; DICKSON, D.W. *Nematology – Advances and Perspectives*. Volume II: Nematode Management and Utilization. Wallingford: CABI Publishing, 931-978.

FREITAS, L. G.; FERRAZ, S.; ALMEIDA, A. M. S. 1999. Controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro pela produção de mudas em substrato infestado com *Paecilomyces lilacinus*. *Nematologia Brasileira*, 23:65-73.

HIDALGO-DIAZ, L.; BOURNE, J. M.; KERRY, B. R.; RODRIÁGUEZ, 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.

JOBIM, M. B.; SANTURIO, J. M.; DE LA RUE, M. L. 2008. *Duddingtonia flagrans*: controle biológico de nematodes de bovinos a campo. *Ciência Rural*, 38(8): 2256-2263.

KANDELER, E., LUXHOI, J. TSCHERKO, D.; MAGID, J. 1999. Xylanase, invertase and protease at the soil-litter interface of a loamy sand. *Soil Biology and Biochemistry*, 31:1171-1179.

KERRY, B. R. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 38:423–441.

KERRY, B. A.; JAFFEE, B. A. 1997. Fungi as biological control agents for plant parasitic nematodes. In: WICKLOW, D. T.; SÖDERSTRÖM, B. (Eds.). *The Mycota IV Environmental and Microbial Relationships*. New York, USA: Springer-Verlag, 203–218.

LOPES, E. A.; FERRAZ, S.; FERREIRA, P. A.; FREITAS, L. G.; DHINGRA, O. D.; GARDIANO, C. G.; CARVALHO, S. L. 2007. Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira*, 31(2):78-84.

LOPEZ-LLORCA, L. V.; JANSSON, H-B.; VICENTE, J. G. M.; SALINAS, J. 2006. Nematophagous fungi as root endophytes. In: SCHULZ, B. J. E.; BOYLE, C. J. C.; SIEBER, T. N. (Eds.). *Microbial root endophytes*. Berlin: Springer-Verlag, 191–206.

MACIEL, A. S.; FREITAS, L. G.; CAMPOS, A. K.; LOPES, E. A.; ARAUJO, J. V. 2010. The biological control of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by *Duddingtonia flagrans* in a soil microcosm. *Veterinary Parasitology*, 173: p. 262-270.

MENDOZA, A. R.; SIKORA, R. A. 2009. Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. *BioControl*, 54:263–272.

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

MOURA, R. M. Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. 1996. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 4: 209-244.

PODESTÁ, G. S.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; FERRAZ, S.; ZOOCA, R. J. F. 2009. Atividade nematófaga de *Pochonia chlamydosporia* em solo natural ou autoclavado sobre *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira*, 33(2): 191-193.

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*. Maryland: Society of Nematologists, p. 7-14.

SCHOLLER, M.; RUBNER, A. 1994. Predacious activity of the nematode-destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* in dependence of the medium composition. *Microbiological Research*, 149(2):145–149.

SINGH, U. B. ; SAHU, A.; SAHU, N.; SINGH, R. K.; RENU; PRABHA, R.; SINGH, D. P.; SARMA, B. K.; MANNA, M. C. 2012. Co-inoculation of *Dactylaria brochopaga* and *Monacrosporium eudermatum* affects disease dynamics and biochemical responses in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) to enhance bio-protection against *Meloidogyne incognita*. *Crop Protection*, 35:102-109.

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

SOARES, P. L. M.; SANTOS, J. M. 2004. Fungos contra nematoides. *Revista Cultivar Hortalıças e Frutas*, 27.

SUNG, G. H.; HYWEL-JONES, N. L.; SUNG, J-M.; LUANGSA-ARD, J.; SHRESTHA, B.; SPATAFORA, J. W. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*, 57: 5–59.

VAN OORSCHOT, C. A. N. 1985. Taxonomy of the *Dactylaria* complex. A review of *Arthrobotrys* and allied genera. *Studies in Mycology*. 26:61-96.

WARD, E.; KERRY, B. R.; MANZANILLA-LO'PEZ, R. H.; MUTUA, G; DEVONSHIRE, J.; KIMENJU, J.; HIRSCH, P. R. 2012. The *Pochonia chlamydosporia* serine protease gene *vcp1* is subject to regulation by carbon, nitrogen and pH: implications for nematode biocontrol. *PLoS ONE*, 7(4): 12p.

WHITEHEAD, A. D. Plant nematode control. Wallingford,UK: CAB International, 1998.

ZARE, R.; GAMS, W.; EVANS, H. C. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata* V. The genus *Pochonia* with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwiga*, 73: 51–86.

CAPÍTULO 1

Compatibilidade de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica* in vitro e no solo em microcosmo

Resumo: Testes *in vitro* de compatibilidade entre *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e *Duddingtonia flagrans* (Df) e dois ensaios para avaliara predação de *Meloidogyne javanica* em solo utilizando concentrações crescentes de Df e combinações dos dois fungos nematófagos foram realizados. Os testes de compatibilidade foram: teste de antagonismo em confrontação direta, de antibiose e do efeito de metabólitos voláteis. No primeiro ensaio de predação no solo em microcosmo, o solo de cada pote foi infestado com 1.500 ovos de *M. javanica* e com clamidósporos de Df nas concentrações de 0, 2.500, 5.000, 10.000, 15.000, 20.000 ou 25.000 g⁻¹ de solo. O segundo experimento foi realizado como o primeiro, com modificações nos tratamentos, que foram compostos por três concentrações de Pc (0, 5.000 ou 10.000 clamidósporos g⁻¹ de solo) e três concentrações de Df (0, 5.000 ou 10.000 clamidósporos g⁻¹ de solo) combinadas em arranjo fatorial completo (3x3). Todos os testes de compatibilidade dos isolados fúngicos, exceto o de antibiose, indicaram que os organismos são compatíveis. Isso indica que Pc produz um composto que inibe o crescimento posterior de Df, quando cultivados no mesmo meio. No entanto, isso não consiste em limitação para o crescimento conjunto dos dois agentes (conforme foi evidenciado nos outros testes). No primeiro experimento em solo microcosmo, a aplicação de Df ao solo reduziu o número de juvenis em até 72,7%. No segundo experimento, houve efeito de controle do nematoide por ambos os agentes, em conjunto e separado. A aplicação conjunta dos dois organismos aumentou o controle, havendo, no melhor tratamento (10.000 Pc + 10.000 Df), redução de 81,35% do número de juvenis. Dessa forma, evidencia-se o potencial do uso combinado dos dois agentes de biocontrole no manejo de *M. javanica*.

Palavras-chave: *Pochonia chlamydosporia*, *Duddingtonia flagrans* nematoide das galhas, controle biológico.

Compatibility of nematophagous fungi to control *Meloidogyne javanica* in vitro and in soil microcosm

Abstract: The compatibility between *Pochonia chlamydosporia* (Pc) and *Duddingtonia flagrans* (Df) was evaluated *in vitro*. Predation of *Meloidogyne javanica* by Pc and Df was evaluated in microcosm soil using different concentrations and/or combinations of Pc and Df. The compatibility tests used were: direct confrontation (antagonism), antibiosis and effect of volatile metabolites. In the first assay of predation in microcosm soil, the soil in each pot was infested with 1.500 eggs of *M. javanica* and inoculated with chlamydospores of Df at the following concentrations: 0, 2.500, 5.000, 10.000, 15.000, 20.000 and 25.000 chlamydospores g⁻¹ of soil. The second experiment was similar to the first, except that the treatments were: three concentrations of Pc (0, 5.000 or 10.000 chlamydospores g⁻¹ soil) and three concentrations of Df (0, 5.000 or 10.000 chlamydospores g⁻¹ soil) combined in a full factorial arrangement (3x3). With the exception of antibiosis test, all compatibility tests indicated that the organisms are compatible. This suggests that the two fungi are compatible, but that Pc produce a compound that inhibits further growth of Df grown in the same medium. However, this is not limiting for the growth of both agents together (what was observed in other tests). In the first experiment in microcosm soil, the application of Df reduced the number of juveniles in up to 72.7%. In the second experiment both agents controlled the nematode and its joint application increased the control. In the best treatment (10.000 Pc + 10.000 Df) a reduction of 81.35% in the number of juveniles was observed. Thus, it is evident the potential of the combined use of the two biocontrol agents in the management of *M. javanica*.

Keywords: *Pochonia chlamydosporia*, *Duddingtonia flagrans*, root-knot nematode, biological control.

1. INTRODUÇÃO

Entre os nematoides parasitas de plantas, os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp. Goeldi) estão entre os fitopatógenos que causam maiores perdas na agricultura (Perry et al., 2009). Com o propósito de reduzir os prejuízos causados por esses patógenos, o controle biológico vem ganhando destaque por ser utilizado com outros métodos de controle, não deixar resíduos nos alimentos e, na maioria dos casos, não gerar impactos ao meio ambiente.

Diversos antagonistas têm sido estudados para o controle de nematoides. No entanto, não basta que o organismo reduza a população desses fitopatógenos. É necessário, dentre outras características, que o antagonista se adapte aos ambientes de cultivo agrícola e seja de fácil reprodução em larga escala.

Pochonia chlamydosporia Zare e Gams (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard) é um fungo parasita de ovos e fêmeas de nematoides com potencial de biocontrole confirmado por vários estudos (Wang et al., 2005; Siddiqui et al., 2009; Moosavi et al., 2010; Dallemole-Giaretta et al., 2012). Esse fungo possui muitas características interessantes para o uso no controle biológico, destacando-se a produção de clamidósporos, estruturas de resistência, que facilitam a sua sobrevivência e estabelecimento no solo (Kerry e Bourne, 2002).

Recentemente, diversos trabalhos têm sido publicados com fungo *Duddintonia flagrans* Cooke no controle de nematoides parasitas de animais (Peña et al., 2002; Gronvold et al., 2004; De Gives et al., 2006; Santurio et al., 2009; Maciel et al., 2010; Assis et al., 2012; Tavela et al., 2012). Esse agente de controle biológico também produz clamidósporos (Gronvold et al., 1996a) e sua atividade nematófaga é garantida por meio de hifas adesivas e redes tridimensionais adesivas (Barron, 1977; Larsen, 2000). Além disso, os metabólitos do fungo podem prejudicar significativamente a motilidade de larvas de nematoides (Bogum et al., 2005).

Tanto *P. chlamydosporia* quanto *D. flagrans* são fáceis de produzir *in vitro*, o que facilita a sua multiplicação e a aplicação no ambiente de cultivo agrícola. Além disso, por terem modos de ação distintos (*P. chlamydosporia* parasitar ovos e fêmeas e *D. flagrans* parasita nematoides em fases de juvenil), esses antagonistas podem apresentar ação complementar, com maior efetividade de controle de nematoides quando aplicados conjuntamente.

O uso combinado de agentes de biocontrole é uma opção interessante, pois, a utilização de diferentes organismos que, muitas vezes, possuem mecanismos de controle distintos, pode implicar em efeitos sinérgicos que favorecem o manejo de fitopatógenos (Hallmann et al., 2009). Nesse aspecto, trabalhos têm destacado que o uso de mais de um organismo pode proporcionar maior eficiência de controle comparativamente a sua utilização isolada (Chaves et al., 2009; Silva et al., 2010; Muthulakshmi et al., 2012). Singh et al. (2012) observaram que *Dactylaria brochopaga* Drechsler e *Monacrosporium eudermatum* Drechsler em combinação exerceram maior controle sobre *Meloidogyne incongnita* (Kofoid e White) Chitwood em relação as suas aplicações em separado. Todavia, alguns antagonistas podem ser incompatíveis. É importante, portanto, conhecer, antes de implementar as estratégias de manejo, as interações entre os agentes de biocontrole. Assim, estudos de compatibilidade entre antagonistas são de grande utilidade para o desenvolvimento de novas ferramentas de manejo de fitonematoides.

Diante do exposto, o trabalho teve como objetivo o estudo da compatibilidade entre *P. chlamydosporia* e *D. flagrans* *in vitro* e predação de *Meloidogyne javanica* Treub Chitwood no solo em microcosmo utilizando diferentes concentrações de *D. flagrans* e combinações dos fungos nematófagos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

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

O inóculo do nematoide foi composto por ovos e juvenis de *M. javanica*, coletados de raízes de tomateiro, cultivados em casa-de-vegetação. Os ovos foram extraídos segundo a técnica de Hussey e Barker (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981), raízes infectadas pelo nematoide foram lavadas cuidadosamente em água de torneira, cortadas em fragmentos de aproximadamente 2 cm de comprimento, e trituradas em solução de hipoclorito de sódio de 0,5% utilizando liquidificador em baixa velocidade por 20 segundos. A suspensão aquosa contendo os ovos e juvenis do nematoide foi vertida em duas peneiras granulométricas sobrepostas, a superior com abertura de malha de 0,074 mm (200 mesh) e a inferior com abertura de 0,025 mm (500 mesh). Os ovos e juvenis do

nematoide retidos na última peneira foram lavados com água de torneira e, com uma pisseta, recolhidos em um frasco tipo béquer com capacidade de 250 mL. A suspensão aquosa contendo ovos do nematoide foi calibrada em câmara de Peters e microscópio esteroscópico para 1.500 ovos/mL inoculada em cada pode (unidade experimental).

2.2. Obtenção e produção dos inóculos dos fungos

O isolado do fungo *P. chlamydosporia* (Pc-10) utilizado nos ensaios faz parte da coleção do Laboratório de Controle de Fitonematoides da Universidade Federal de Viçosa e do fungo *D. flagrans* (AC001) da coleção do Laboratório de Parasitologia, do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Para produção dos clamidósporos de ambos os fungos, discos de meio de cultura de 5 mm de diâmetro, contendo micélio foram transferidos separadamente para placa de Petri contendo ágar-água (AA) a 2%. Estas placas foram armazenadas por sete dias a 26 °C no escuro. Após o crescimento micelial, um disco de 5 mm de diâmetro foi transferido para placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro contendo o meio de cultivo Batata-dextrose-ágar a 2% (BDA). As placas foram mantidas a 26 °C, em ambiente escuro, por 10 dias e em seguida os fungos foram repicados para sacos plásticos contendo milho triturado ou arroz, com a finalidade de produção dos inóculos fúngicos.

O inóculo de *D. flagrans* foi produzido em milho triturado (canjiquinha), conforme descrito por Dalla Pria (1992). Os grãos do cereal foram depositados em sacos plásticos com filtro microbiológico de ar, na quantidade de 300 gramas mais 80 mL de água destilada, e foram autoclavados por 20 minutos a 120 °C. Cada saco plástico, após atingir a temperatura ambiente, em condições assépticas recebeu seis discos de micélio de 9 mm de diâmetro da cultura fúngica descrita anteriormente, permanecendo por 15 dias no escuro, a 25 °C. O inóculo de *P. chlamydosporia* foi produzido em arroz beneficiado conforme descrito por Freitas et al. (1999). O processo de produção foi semelhante ao anterior, com exceção do período de crescimento fúngico que foi de 21 dias.

2.3. Compatibilidade dos fungos nematófagos *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia flagrans*

Os fungos *P. chlamydosporia* e *D. flagrans* foram submetidos a testes de antagonismo em confrontação direta, antibiose e avaliação do efeito de metabólitos voláteis, como descrito por Martins-Corder e Melo (1998), modificado pelo uso de meio de cultivo BDA (Ferreira et al., 2008).

2.3.1 Teste de antagonismo em confrontação direta

Em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio de cultivo BDA foi colocado separadamente um disco de 5 mm de diâmetro contendo micélio e conídios de *P. chlamydosporia* a uma distância de 1 cm da borda da placa. As placas foram armazenadas por 10 dias, a 26 °C, na ausência de luz. Em seguida, foi colocado um disco de micélio de *D. flagrans* nas placas de Petri, em posição oposta à colônia de *P. chlamydosporia*, sendo que para o controle foram confrontadas as colônias entre si. As colônias foram incubadas a 26 °C por cinco dias em fotoperíodo de 12 horas. Nas avaliações, foi utilizada uma escala de notas adaptada, proposta por Bell et al. (1982), sendo 1 – colonização completa da placa por *P. chlamydosporia*; 2 – colonização de 2/3 da placa por *P. chlamydosporia*; 3 – colonização de 50% da placa por cada fungo; 4 – colonização de 2/3 da placa por *D. flagrans*; 5 – colonização completa da placa por *D. flagrans*. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

2.3.2. Teste de antibiose

Discos de membrana de celofane (9 cm de diâmetro) foram colocados em placas de Petri na superfície do meio de cultura BDA. A seguir, discos de micélio de *D. flagrans* ou de *P. chlamydosporia* foram colocados separadamente no centro da placa (Dennis e Webster, 1971). As colônias foram mantidas por 48 horas a 26 °C, sob luz

contínua. O diâmetro médio das colônias foi demarcado e o papel celofane (juntamente com a respectiva colônia) foi removido da placa. As placas foram invertidas e 1 mL de clorofórmio foi adicionado na sua parte inferior, a fim de eliminar possíveis estruturas do fungo. Após a evaporação do produto, as placas foram mantidas na posição original e deixadas por 30 minutos sob irradiação direta de luz ultravioleta, no interior de câmara de fluxo laminar. Em seguida, uma suspensão aquosa contendo micélio e conídios de *P. chlamydosporia* foi adicionada sobre a superfície do meio de cultura nas placas onde cresceu o fungo *D. flagrans* e uma suspensão de *D. flagrans* onde cresceu *P. chlamydosporia*. Essas suspensões foram obtidas de colônias previamente cultivadas em meio de cultivo BDA, por 10 dias, a 26 °C. O mesmo procedimento foi realizado para os tratamentos controle, consistindo de cultivo de *P. chlamydosporia* e subsequente cultivo de suspensão contendo estruturas de *P. chlamydosporia*, sendo igual para o controle de *D. flagrans*. As placas foram mantidas a 26 °C, fotoperíodo de 12 horas, por cinco dias quando foi avaliada a presença ou ausência do halo de inibição ao crescimento de *P. chlamydosporia* formado por *D. flagrans*, ou vice-versa, e de *P. chlamydosporia* formado sobre *P. chlamydosporia* e *D. flagrans* sobre *D. flagrans*. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

2.3.3. Efeito de compostos voláteis

O método, baseado em Bharat et al. (1980), consiste em posicionar tampas de placas de Petri umas sobre as outras, após ter sido vertido o meio de cultivo BDA em cada uma delas. Na parte inferior da placa, foi colocado um disco de cultura BDA contendo micélio de *D. flagrans*, e na superior, contendo micélio de *P. chlamydosporia*. Também foi realizado o contrário e para os tratamentos controle foi feito o cultivo de *P. chlamydosporia* na parte inferior e posterior da placa e o mesmo para o controle de *D. flagrans*. As placas foram vedadas lateralmente com membrana plástica e mantidas a 26°C, por 15 dias, sob luz contínua.

As avaliações foram realizadas por meio da medição da área das colônias e comparação com o controle contendo somente um dos organismos nas placas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

2.4. Predação

2.4.1. Predação em solo microcosmo 1

Neste experimento a capacidade predatória do fungo nematófago *D. flagrans*, aplicado em diferentes concentrações, sobre *M. javanica* foi testada *in vitro*.

Potes de polipropileno de 200 mL de capacidade foram preenchidos com 50 g de solo estéril (microcosmos), infestados com 1.500 ovos de *M. javanica* e, em seguida, cada pote recebeu 0, 2.500, 5.000, 10.000, 15.000, 20.000 ou 25.000 clamidósporos de *D. flagrans* por grama de solo e foi incubado por 15 dias a 26 °C. Ao final do período de incubação, os juvenis foram recuperados a partir do solo do microcosmo, pela técnica de funil de Baermann (Baermann, 1917). O volume foi transferido para a câmara de contagem Peters e o número de juvenis quantificados sob um microscópio de luz (40 ×). Os tratamentos foram repetidos quatro vezes e dispostos em delineamento inteiramente casualizado.

2.4.2. Predação em solo microcosmo 2

Nesse experimento, avaliou *in vitro* a predação de *M. javanica* pelos isolados de *P. chlamydosporia* (Pc) e *D. flagrans* (Df), separados e em combinações.

O experimento também foi realizado em potes de polipropileno com 50 g de solo estéril (microcosmos). O solo foi artificialmente infestado com o nematoide (1.500 ovos). Os tratamentos consistiram de três concentrações de *P. chlamydosporia* (0, 5.000 e 10.000 clamidósporos g⁻¹ de solo) e três concentrações de *D. flagrans* (0, 5.000 e 10.000 clamidósporos g⁻¹ de solo) combinadas no arranjo fatorial completo (3x3). Os potes foram fechados com suas tampas plásticas próprias e incubados por 15 dias a 26 °C. No final do período de incubação, os juvenis foram recuperados do solo através da técnica de funil de Baermann (Baermann, 1917) e a contagem foi feita conforme descrito anteriormente. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com cinco repetições.

2.5. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância. Nos testes “Efeito de compostos voláteis” e “Predação no solo em microcosmo 2” as médias foram comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade.

Para “Predação no solo em microcosmo 1” os fatores quantitativos foram avaliados por meio de regressão, a 1% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Compatibilidade dos fungos nematófagos

No teste de confrontação direta, *P. chlamydosporia* e *D. flagrans* colonizaram aproximadamente 50% da placa (equivalente a nota 3), em todos os tratamentos, ou seja, não houve crescimento da colônia de um fungo sobre a outra, conforme Figura 1, portanto, não foi constatado antagonismo direto entre eles.

No teste de antibiose formou-se um halo de inibição no tratamento *Pochonia* x *Duddingtonia* (Figura 2 B), indicando que *P. chlamydosporia* produz algum antibiótico ou compete por nutrientes com *D. flagrans*, impedindo seu desenvolvimento, o que é corroborado com relatos de controle de doenças fúngicas por *P. chlamydosporia* (Ehteshamul et al., 1994; Monfort, 2005). Esse agente de biocontrole produz, dentre outras, uma proteína denominada serina, do tipo subtilisina. Essa enzima remove a membrana proteica vitelina externa dos ovos dos nematoides, favorecendo a penetração e infecção das hifas (Segers et al., 1994;1996, Ward et al., 2012). A presença desse mesmo tipo de proteína tem sido relatada em espécies de *Trichoderma* como uma das enzimas envolvidas no biocontrole de fungos (Seidl et al., 2009; Druzhinina et al., 2011). Por outro lado, o crescimento prévio de *D. flagrans* no meio não resultou em inibição de crescimento de *P. chlamydosporia*, isto é, não houve formação de halo de inibição, indicando que *D. flagrans* não afeta o crescimento de *P. chlamydosporia* (Figura 2 D).

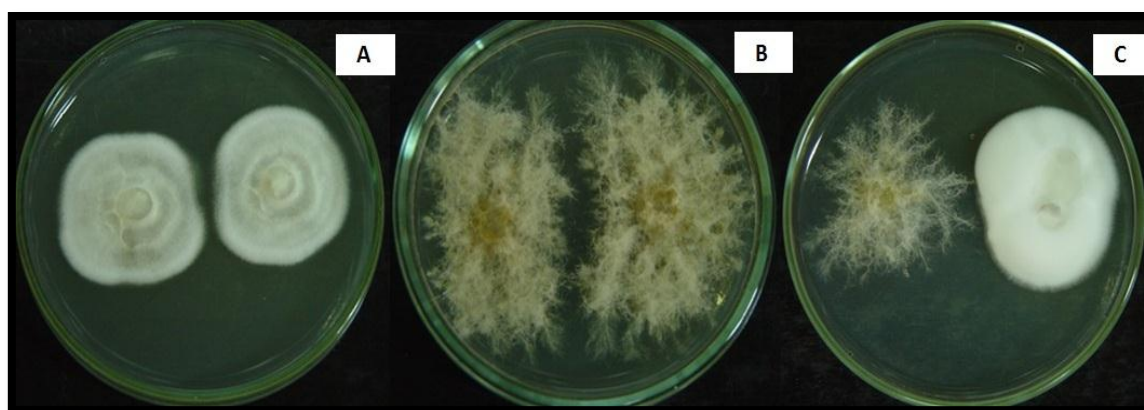


FIGURA 1 - Confronto direto de colônias. **A:** *Pochonia chlamydosporia* x *Pochonia chlamydosporia*. **B:** *Duddingtonia flagrans* x *Duddingtonia flagrans*. **C:** *Duddingtonia flagrans* x *Pochonia chlamydosporia*, crescidas em BDA, a 26 °C, na ausência de luz.

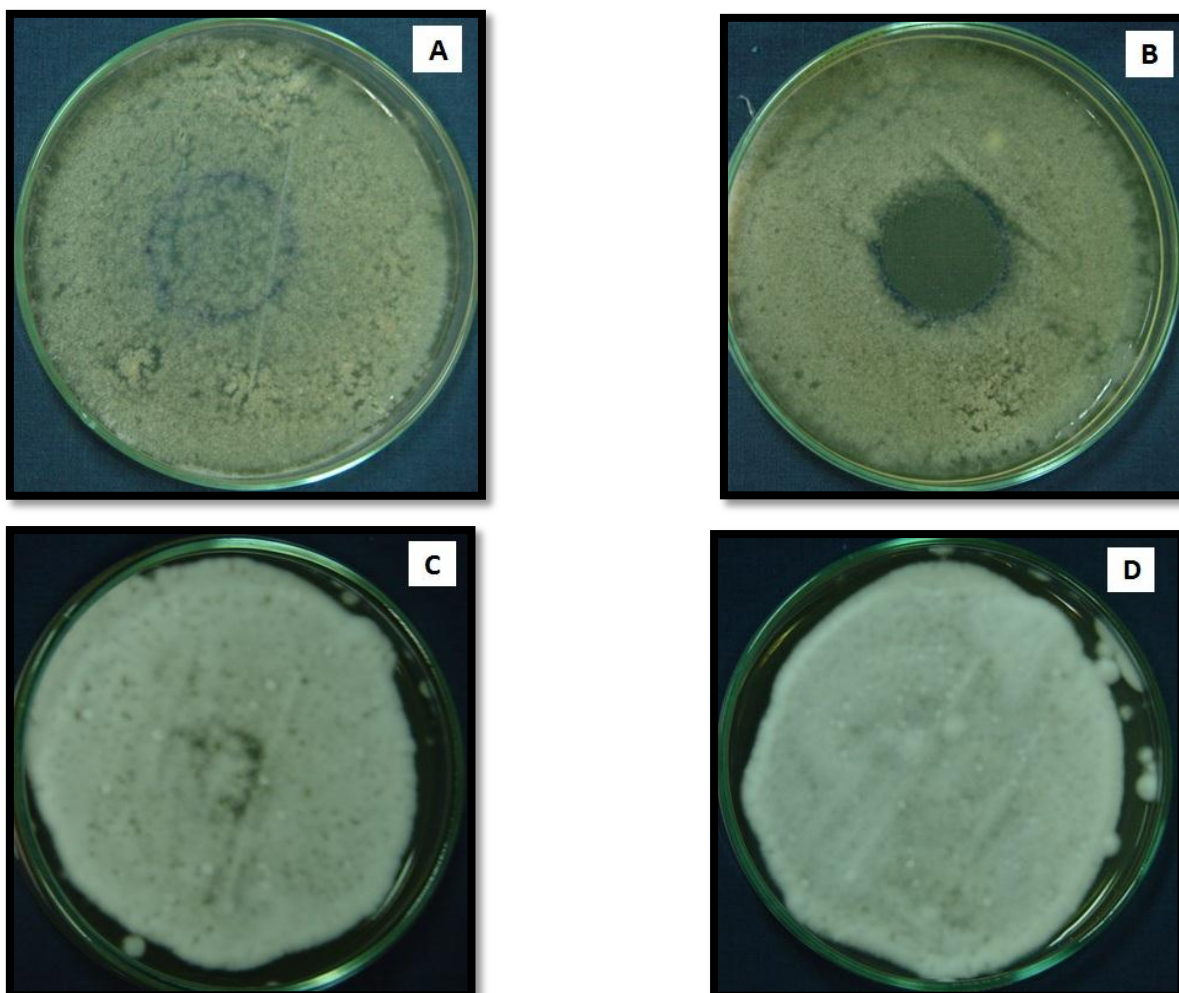


FIGURA 2 - Teste de antibiose. **A:** *Duddingtonia flagrans* x *Duddingtonia flagrans*; **B:** *Pochonia chlamydosporia* x *Duddingtonia flagrans*; **C:** *Pochonia chlamydosporia* x *Pochonia chlamydosporia*; **D:** *Duddingtonia flagrans* x *Pochonia chlamydosporia*, crescidas em BDA, a 26 °C, sob luz contínua.

Não houve efeito dos compostos voláteis produzidos por *P. chlamydosporia* sobre *D. flagrans* e nem dos compostos voláteis produzidos por *D. flagrans* sobre *P. chlamydosporia* (Tabela 1). Ferreira et al. (2008) também não observaram a produção de compostos voláteis de *P. chlamydosporia* contra *Trichoderma* spp.. Entretanto, esses mesmos autores relataram que *Trichoderma* spp. reduziu o crescimento de *P. chlamydosporia* por meio da produção de compostos voláteis, apesar de em teste de antibiose e de confronto direto os fungos terem se mostrado compatíveis.

Os resultados obtidos *in vitro* podem não representar a realidade no campo, pois nesse ambiente, o crescimento dos fungos pode ser influenciado por diversos fatores, como: teor de matéria orgânica; pH; macro e microporosidade; umidade; textura e estrutura do solo; troca de gases. A atmosfera do solo está sujeita a troca de gases enquanto que *in vitro* isso é limitado, o que pode alterar o relacionamento entre esses organismos. Entretanto, os resultados obtidos são um indicativo preliminar da compatibilidade desses fungos, que deve ser melhor investigada.

TABELA 1 - Valores médios e desvio padrão da área de crescimento micelial de *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia flagrans* submetidos ao teste de produção de compostos voláteis.

<i>Pochonia chlamydosporia</i> (parte superior da placa)		<i>Duddingtonia flagrans</i> (parte superior da placa)	
Tratamentos	Área (cm ²)	Tratamentos	Área (cm ²)
<i>P. chlamydosporia</i>	3,6 ± 0,38 ns	<i>D. flagrans</i>	23,8 ± 1,36 ns
X		X	
<i>D. flagrans</i>		<i>P. chlamydosporia</i>	
<i>P. chlamydosporia</i>	3,8 ± 0,65	<i>D. flagrans</i>	23,4 ± 1,80
X		X	
<i>P. chlamydosporia</i>		<i>D. flagrans</i>	
CV (%)	13,6		6,4

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

3.2. Predação

O incremento nas doses de *D. flagrans* causou redução do número de juvenis de segundo estágio de *M. javanica* até a concentração de 8.201,4 clamidósporos g⁻¹ de solo (valor estimado por meio do modelo de regressão utilizado), para a qual houve redução de 72,7% no número de juvenis (Figura 3). A redução do número de juvenis com a aplicação de *D. flagrans* pode ser explicada pela capacidade desse fungo formar armadilhas em resposta à presença e migração de nematoides ou a substâncias secretadas por eles (Scholler e Rubner, 1994; Gronvold et al., 1996b). Resultados semelhantes foram encontrados por Maciel et al. (2010), que observaram redução de 73,2% no número de larvas de *Ancylostoma* spp., recuperadas aos 15 dias, após infestação de 10.000 clamidósporos de *D. flagrans* por grama de solo em microcosmo. A partir da dose em que houve maior redução, o aumento da concentração de *D. flagrans* diminuiu a efetividade do controle de *M. javanica*, o que se deve à redução da atividade predatória do agente de biocontrole em decorrência do excesso de inóculo. Possivelmente ocorreu autoinibição, como relatado por Robinson et al. (1989) que, ao cultivarem artrósporos de *Geotrichum candidum* Link em meio de cultura, observaram redução da germinação desse fungo em concentrações mais elevadas.

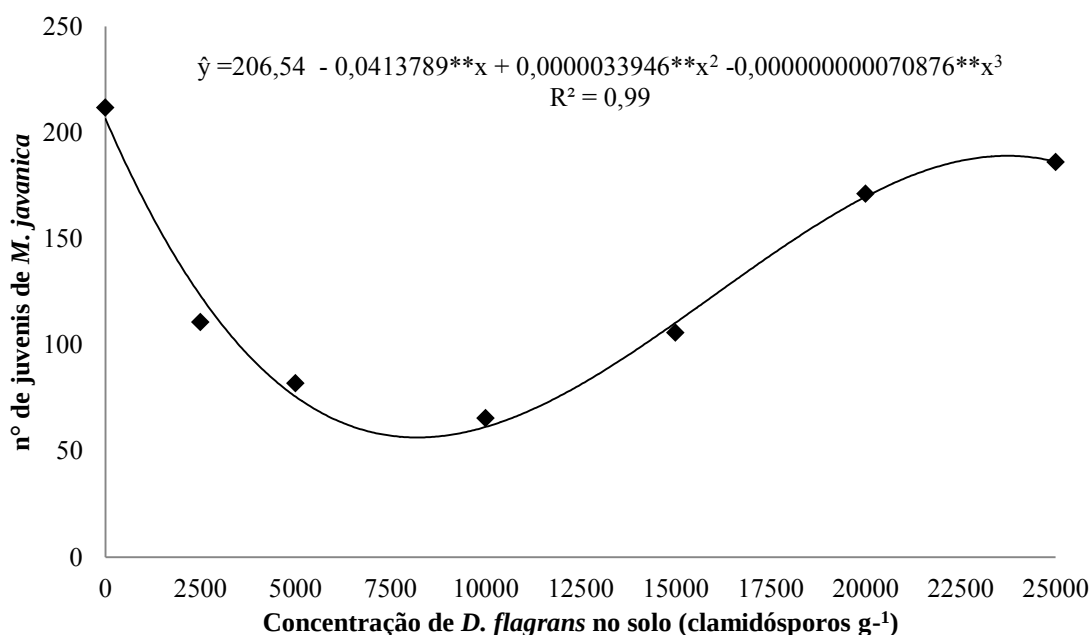


FIGURA 3 - Número de juvenis de *Meloidogyne javanica* 15 dias após a aplicação de diferentes concentrações de clamidósporos de *Duddingtonia flagrans* em solo infestado com 1.500 ovos. ** significativo a 1% pelo teste F.

No segundo experimento com solo em microcosmo, constatou-se que a aplicação conjunta de *P. chlamydosporia* e *D. flagrans*, ambos na concentração de 10.000 clamidósporos g⁻¹ de solo, promoveu o maior controle de *M. javanica* em relação aos demais tratamentos (Tabela 2). Isso demonstra a ação complementar desses dois antagonistas que deve estar relacionada com seus mecanismos de ação, uma vez que *P. chlamydosporia* é parasita de ovos e de fêmeas, enquanto que, *D. flagrans* é predador de juvenis. O mesmo foi observado por D'Angieri Filho e Campos (1997), quando utilizaram *Arthrobotrys conoides* Dreschesler, *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson e *Pochonia chlamydosporia*, e verificaram que a aplicação conjunta foi mais efetiva no controle de *M. javanica* em jaborandi, com redução de 32,8% na população total desse nematoide.

TABELA 2 - Predação de *M. javanica* por *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e *Duddingtonia flagrans* (Df) em diferentes concentrações e combinações.

Tratamentos	Concentrações de Pc no solo (clamidósporos g ⁻¹)		
Concentrações de Df no solo (clamidósporos g ⁻¹)	0	5.000	10.000
0	203,8 Cc	87,0 Bb	68,2 Ba
5.000	87,0 Bb	48,6 Aa	49,0 Aa
10.000	69,4 Ab	55,2 Aab	38,0 Aa

Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, e minúscula, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Apesar dos resultados obtidos, estudos *in vivo* são necessários para avaliar a compatibilidade entre esses agentes no controle de *M. javanica*, visto que nestas condições ocorrem múltiplas interações, notadamente, pela presença da planta e seus exsudados.

REFERÊNCIAS

- ASSIS, R. C. L.; LUNS, F. D.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; ASSIS, R. L.; MARCELINO, J. L.; FREITAS, P. C.; ANDRADE, M. A. S. 2012. Comparison between the action of nematode predatory fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* in the biological control of bovine gastrointestinal nematodiasis in tropical southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, 1-7.
- BAERMANN, G. 1917. Eine einfache methode zur auffindung von *Ancylostomum* (Nematoden) larven in erdproben, *Gennesk. Tijds. Ned. Ind.* 57, 131–137.
- BARRON, G.L. 1977. The Nematode-destroying Fungi. *Topics in Mycobiology*, vol. I. Guelph: Canadian Biological Publications, 140p.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHABELL, D. K.; WELLS, C. R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72: 379-382.
- BHARAT, R.; SINGH, V. N.; SINGH, D. B. 1980. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp.. *Plant and Soil*, 57: 131-135.
- BOGUM, M. I.; CZYGIER, M.; KDDRA, E.; SAMBORSKI, J. 2005. In vitro assessment of the influence of nutrition and temperature on growing rates of five *Duddingtonia Xagrans* isolates, their insecticidal properties and ability to impair *Heligmosomoides polygyrus* motility. *Experimental Parasitology*, 109: 115–123.
- BONETI, J.I.S.; FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, p.553.
- CHAVES, N. P.; POCASANGRE, L. E.; ELANGO, F.; ROSALES, F. E.; SIKORA, R. 2009. Combining endophytic fungi and bacteria for the biocontrol of *Radopholus similis* (Cobb) Thorne and for effects on plant growth. *Scientia Horticulturae*, 122: 472–478.
- D'ANGIERI FILHO, C. N.; CAMPO, V. P. 1997. Controle de *Meloidogyne javanica* em jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) com *Arthrobotrys conoides*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium*. *Nematologia Brasileira*, 21 (2): 23-30.

DALLA PRIA, M. 1992. Controle biológico de *Meloidogyne incognita*, raça 3, pelos fungos *Verticillium chlamydosporium* e espécies de *Monacrosporium*, isolados ou combinados (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 101 p.

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 GIVES, P. M.; NIETO, C. Z.; HERNÁNDEZ, E. L.; ARELLANO, M. E. L.; RODRÍGUEZ, D. H.; GARDUNO, R. G. 2006. biological control of gastrointestinal parasitic nematodes using *Duddingtonia flagrans* in sheep under natural conditions in Mexico. Annals of the New York Academy of Sciences, 1081:355 -359.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I - Production of non-volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society, 57: 25-39.

DRUZHININA, I. S., SEIDL-SEITBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P. K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I. V.; KUBICEK, C. P. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. Nature Reviews Microbiology 9: 749–759.

EHTESHAMUL, H. S.; ZAKI, M. J.; ABID, M.; GHAFAR, A. 1994. Use of *Verticillium chlamydosporium* in the biological control of root-rot disease of chickpea. Pakistan Journal of Botany, 26 (2): 229–233.

FERREIRA, P. A.; FERRAZ, S.; LOPES, E. A.; FREITAS, L. G. 2008. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas, 2 (3): 15-21.

FREITAS, L. G.; FERRAZ, S.; ALMEIDA, A.M.S. 1999. Controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro pela produção de mudas em substrato infestado com *Paecilomyces lilacinus*. Nematologia Brasileira, 23: 65-73.

GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S. A.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J. 1996a. Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. Veterinary Parasitology, 64: 47-64.

GRONVOLD, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S. A.; LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; BRESCIANI, J.; RAWAT, H.; FRIBERT, L. 1996b. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. Journal of Helminthology, 70(4):291-297.

GRONVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A.; GIACOMAZZI, F. 2004. Interspecific competition between the nematode-trapping fungus, *Duddingtonia flagrans*, and selected microorganisms and the effect of spore concentration on the efficacy of nematode trapping. Journal of Helminthology, 78: 41–46.

HALLMANN, J.; DAVIES, K. G.; SIKORA, R. 2009. Biological control using microbial pathogens, endophytes and antagonists. In: Perry, R. N.; Moens, M.; Starr, J. L. Root-knot nematodes. CAB International, Wallingford, p. 380-401.

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.

LARSEN, M. 2000. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. Parasitology 120:121-131.

MACIEL, A. S.; FREITAS, L. G.; CAMPOS, A. K.; LOPES, E. A.; ARAÚJO, J. V. 2010. The biological control of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by *Duddingtonia flagrans* in a soil microcosm. Veterinary Parasitology, 173: 262–270.

MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. 1998. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. Scientia Agricola, v.55, p.01-08.

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

MOOSAVI, M-R.; ZARE, R.; ZAMANIZADEH, M-R.; FATEMY, S. 2010. Pathogenicity of *Pochonia* species on eggs of *Meloidogyne javanica*. Journal of Invertebrate Pathology, 104:125–133.

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

PEÑA, M. T.; MILLER, J. E.; FONTENOT, M. E.; GILLESPIE, A.; LARSEN, M. 2002. Evaluation of *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of *Haemonchus contortus* in feces of sheep. *Veterinary Parasitology*, 103: 259–265.

PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. 2009. Root-knot nematodes. CAB International, Wallingford, 531p.

ROBINSON, P. M.; McKEE, N. D.; THOMPSON, L. A. A. 1989. Autoinhibition of germination and growth in *Geotrichum candidum*. *Mycological Research*, 93(2):214-222.

SANTURIO, J. M.; ZANETTE, R. A.; SILVA, A. S.; DE LA RUE, M. L.; MONTEIRO, S. G.; ALVES, S. H. 2009. Improved method for *Duddingtonia flagrans* chlamydospores production for livestock use. *Veterinary Parasitology*, 164: 344–346.

SCHOLLER, M.; RUBNER, A. 1994. Predacious activity of the nematode-destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* in dependence of the medium composition. *Microbiological Research*, 149(2):145–149.

SEGERS, R.; BUTT, T. M.; KERRY, B. R.; PEBERDY, J. F. 1994. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* produces a chymoelastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins in situ. *Microbiology*, 140: 2715–2723.

SEGERS, R.; BUTT, T. M.; KERRY, B. R.; BECKETT, 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: 421–428.

SEIDL, V.; SONG, L.; LINDQUIST, E.; GRUBER, S.; KOPTCHINSKIY, A.; ZEILINGER, S.; SCHMOLL, M.; MARTÍNEZ, P.; SUN, J.; GRIGORIEV, I.; HERRERA-ESTRELLA, A.; BAKER, S. E.; KUBICEK, C. P. 2009. Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. *BMC Genomics*, 1: 13.

SIDDIQUI, I. A.; ATKINS, S. D.; KERRY, B. R. 2009. Relationship between saprotrophic growth in soil of different biotypes of *Pochonia chlamydosporia* and the infection of nematode eggs. *Annals of Applied Biology*, 155:131–141.

SILVA, A. R.; MARTINELLI, P. R. P.; SANTOS, J. M.; SHIMOYAMA, N. Y. 2010. Controle biológico de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* com uma formulação de fungos nematófagos na cultura da batata. *Nematologia Brasileira*, 24 (01): 41-47.

SINGH, U. B. ; SAHU, A.; SAHU, N.; SINGH, R. K.; RENU; PRABHA, R.; SINGH, D. P.; SARMA, B. K.; MANNA, M. C. 2012. Co-inoculation of *Dactylaria brochopaga* and *Monacrosporium eudermatum* affects disease dynamics and biochemical responses in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) to enhance bio-protection against *Meloidogyne incognita*. *Crop Protection*, 35: 102-109.

TAVELA, A. O. ; ARAÚJO, J. V. ; BRAGA, F. R ; SILVEIRA, W. F ; SILVA, V. H. D. ; JUNIOR, M. C ; ARAUJO, J. M. ; BENJAMIN, L. A ; CARVALHO, G. R ; PAULA, A. T. 2012. Coadministration of sodium alginate pellets containing the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on cyathostomin infective larvae after passing through the gastrointestinal tract of horses. *Research in Veterinary Science*, 1-5.

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

WARD, E.; KERRY, B. R.; MANZANILLA-LO'PEZ, R. H.; MUTUA, G; DEVONSHIRE, J.; KIMENJU, J.; HIRSCH, P. R. 2012. The *Pochonia chlamydosporia* serine protease gene *vcp1* is subject to regulation by carbon, nitrogen and pH: implications for nematode biocontrol. *PLoS ONE*, 7(4): 12p.

CAPÍTULO 2

Combinações de *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia flagrans* no controle do nematoide das galhas em tomateiro

Resumo: O uso combinado de agentes de biocontrole é uma opção interessante no manejo de fitopatógenos, principalmente quando os agentes possuem mecanismos de ação sinérgicos. Dois experimentos foram realizados em casa de vegetação com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes concentrações dos fungos nematófagos *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e *Duddingtonia flagrans* (Df), isoladamente ou em mistura, no controle de *Meloidogyne javanica* e no crescimento de tomateiro. Nos dois ensaios os tratamentos foram compostos por três concentrações de Pc (0, 5.000 ou 10.000 g⁻¹ de solo) e três concentrações de Df (0, 5.000 ou 10.000 g⁻¹ de solo) combinadas no arranjo fatorial completo (3x3). Os experimentos foram realizados no delineamento inteiramente casualizado com oito repetições por tratamento. Foram avaliadas as variáveis: número de galhas e ovos g⁻¹ de raiz, altura e massa seca das plantas. Em ambos os experimentos observou-se o efeito dos dois antagonistas na redução do número de galhas e de ovos do nematoide das galhas. Os tratamentos não influenciaram a altura das plantas nos dois ensaios. No experimento 1, a adição de Pc aumentou a massa seca das plantas, o que não ocorreu no experimento 2. A ação conjunta dos dois antagonistas proporcionou maior controle do nematoide das galhas, mostrando-se como estratégia promissora no controle biológico de fitonematoides.

Palavras-chave: *Meloidogyne javanica*, fungos nematófagos, controle biológico.

Combinations of *Pochonia chlamydosporia* and *Duddingtonia flagrans* to control root-knot nematode in tomato plants

Abstract: The combined use of biocontrol agents is an interesting option in plant pathogens management, especially when agents have synergistic action mechanisms. Two experiments were conducted in greenhouse conditions to evaluate the control of *Meloidogyne javanica* and growth of tomato plants as a function of different concentrations of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia* (Pc) and *Duddingtonia flagrans* (Df). In both trials, treatments consisted of three Pc and Df concentrations (0, 5.000 and 10.000 chlamydospores g⁻¹ of soil) combined in a complete factorial arrangement (3x3). The experiments were carried out in a completely randomized design with eight replications. The following variables were evaluated: number of galls, number of eggs, height and dry weight of plants. Both the antagonists reduced the number of galls and egg production of root-knot nematode and did not affect plant height. In experiment 1, the addition of Pc increased plant dry matter, which was not observed in experiment 2. The combined action of two antagonists provided greater control of root-knot nematode, proving to be a promising strategy for the biological control of plant parasitic nematodes.

Keywords: *Meloidogyne javanica*, nematophagous fungi, biological control.

1. INTRODUÇÃO

Nematoides são parasitas obrigatórios, altamente adaptados, estão amplamente distribuídos pelo mundo e parasitam uma vasta gama espécies de plantas (Moens et al., 2009). A infecção por esses organismos afeta a absorção e translocação de água e nutrientes, alterando a fisiologia do hospedeiro, predispondo-o à infecção por outros patógenos e a estresses ambientais, o que resulta em redução do rendimento da cultura e da qualidade do produto.

Com o intuito de minimizar as perdas causadas por esses patógenos, a utilização do controle biológico no manejo integrado dos fitonematoides tem ganhado importância no Brasil e no mundo (Guo et al., 2004; Dabiré et al., 2007; Dallemole-Giaretta et al., 2012).

Pochonia chlamydosporia Zare e Gams é um fungo parasita facultativo de ovos e fêmeas com conhecido potencial no biocontrole de nematoides (Kerry e Bourne, 2002), por suas características favoráveis à multiplicação massal e aplicação em campo, como sua capacidade saprofítica, produção de estruturas de resistência e capacidade de colonizar raízes de plantas (Kerry, 2000). Sua eficácia foi comprovada em vários trabalhos (Coutinho et al., 2009; Moosavi et al., 2010; Dallemole-Giaretta et al., 2011; Yang et al., 2012), com eficiência de controle, por vezes, superior a 75% (Lopes et al., 2007).

O fungo predador de nematoides em estágio juvenil *Duddingtonia flagrans* Cooke é a espécie mais estudada no controle das helmintoses gastrintestinais de animais domésticos (Waller et al., 2006; Ojeda-Robertos et al., 2009; Paraud et al., 2012). Esse fungo preda nematoides por meio de hifas adesivas e produz grande quantidade de clamidósporos (Mota et al., 2003), entretanto sua ação no controle de nematoides fitoparasitas foi pouco investigada (Alves e Campos, 2003; Maciel, 2009).

Uma vez que complexos de microrganismos são mais estáveis e tendem a um maior equilíbrio biológico, quando comparados com organismos sozinhos, a maioria dos casos de controle biológico natural provavelmente se dá a partir de misturas de antagonistas e não por grandes populações de um único agente (Cook e Baker, 1983). Assim, quando variações ambientais produzem condições desfavoráveis para um antagonista, mas não para o outro, aquele então promove o controle biológico e vice-versa (Cook e Baker, 1983).

Este trabalho visou avaliar o controle biológico de *Meloidogyne javanica* Treub com *P. chlamydosporia* e *D. flagrans*, aplicados isoladamente e em conjunto, bem como a influência do nematoide e dos fungos nematófagos no crescimento de plantas de tomate.

2. MATERIAL E MÉTODOS

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

O inóculo do nematoide utilizado foi constituído de ovos de *M. javanica*, coletados de raízes de tomateiro mantidos em casa-de-vegetação. As raízes foram trituradas em liquidificador em baixa velocidade por 20 segundos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % de cloro ativo. A suspensão aquosa passou por duas peneiras granulométricas sobrepostas [aberturas de malha de 0,074 mm (200 mesh) e de 0,025 mm (500 mesh)]. Os ovos do nematoide retidos na última peneira foram recolhidos em um frasco tipo béquero com capacidade de 250 mL. A suspensão aquosa contendo ovos do nematoide, foi calibrada para 1.000 ovos/ mL em câmara de Peters, sob microscópio estereoscópio.

2.2. Preparo das mudas de tomate

Para a montagem dos experimentos, foram utilizadas mudas de tomate cultivar Santa Clara, previamente crescidas em bandejas de isopor com 128 células, contendo o substrato organo-mineral inerte (Plantmax®). As mudas de tomate foram transplantadas com 21 dias de idade.

2.3. Obtenção dos fungos e produção do inóculo fúngico

O isolado do fungo *P. chlamydosporia* (Pc-10) utilizado nos ensaios faz parte da coleção do Laboratório de Controle de Fitonematoides da Universidade Federal de Viçosa e o isolado de *D. flagrans* (AC001) pertence à coleção do Laboratório de Parasitologia, do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Ambos isolados são mantidos a 4 °C em geladeira.

Discos de cultura dos isolados foram transferidos para placa de Petri contendo ágar-água (AA) a 2%. Estas placas foram armazenadas por sete dias, a 26 °C, no escuro. Após o crescimento micelial, um disco de 5 mm de diâmetro foi transferido para placa de Petri contendo meio de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA). Estas placas foram armazenadas a 26 °C, em ambiente escuro, por 10 dias, com a finalidade de obter conídios e clamidósporos para produção do inóculo fúngico.

O inóculo de *D. flagrans* (Df) foi produzido em milho triturado (canjiquinha), conforme descrito por Dalla Pria (1992). Os grãos do cereal foram depositados em sacos plásticos com um filtro biológico, para permitir a troca gasosa, na quantidade de 300 gramas, 80 mL de água e, posteriormente, os sacos foram autoclavados por 20 minutos a 120 °C. Cada frasco, após atingir a temperatura ambiente, recebeu seis discos de micélio de 9 mm de diâmetro da cultura fúngica de *D. flagrans* descrita anteriormente, permanecendo por 15 dias no escuro, a 25 °C. O inóculo de *P. chlamydosporia* foi produzido em arroz beneficiado conforme descrito por Freitas *et al.* (1999). O processo de produção foi semelhante ao anterior, com exceção do período de crescimento fúngico que foi de 21 dias.

2.4. Condução dos experimentos

Dois experimentos foram realizados em épocas distintas. O primeiro foi conduzido no verão entre 15/01/2012 e 30/03/2012, com temperatura média na casa de vegetação de 29 °C (média das máximas 36 °C e média das mínimas 22 °C). O segundo experimento foi realizado no período de 16/06/2012 a 31/08/2012, com temperatura média

na casa de vegetação de 27 °C, sendo que a média das máximas foi 33 °C e a média das mínimas 21 °C.

Vasos de plástico de 2 L de capacidade foram preenchidos com substrato constituído de mistura de terriço e areia, na proporção 1:1 (v:v), previamente tratada com brometo de metila. Cada vaso recebeu os tratamentos, compostos por três concentrações de *P. chlamydosporia* (0, 5.000 ou 10.000 clamidósporos g⁻¹ de solo) e três concentrações de *D. flagrans* (0, 5.000 ou 10.000 clamidósporos g⁻¹ de solo) combinadas no arranjo fatorial completo (3x3), e foi infestado com 5.000 ovos de *M. javanica*. Após 15 dias da infestação foram transplantadas mudas de tomate.

As plantas foram adubadas de acordo com a disponibilidade de nutrientes no solo, estimada por meio da análise de solo (Tabela 1), e com a necessidade da cultura. No primeiro experimento não foi realizada a correção da acidez do solo, porém no segundo a correção foi efetuada de modo a elevar a saturação por bases a 70%. O calcário utilizado foi o dolomítico.

O cultivo foi conduzido por 60 dias após o transplântio e, ao fim desse período, foram avaliados a massa das plantas secas, altura, número de galhas e o número de ovos do nematoide.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Cada tratamento foi repetido oito vezes e a parcela experimental foi constituída por um vaso com uma planta de tomate. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 1 – Análise química e física do solo.

pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	(t)	(T)	V	m	MO	P-rem
H ₂ O	mg/dm ³		cmlo _c /dm ³				cmlo _c /dm ³			%.....		dag/kg	mg/L
4,75	175,6	22	4,33	0,24	0,10	5,5	4,63	4,73	10,1	45,7	2,1	1,49	40,2

Classe Textural - Franco-Argilo-Arenosa

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos dois experimentos, houve efeito da adição de ambos antagonistas testados no controle de *M. javanica*, com redução do número de galhas e de ovos desse fitonematoide (Tabela 2 e 3). Esses resultados corroboram muitos trabalhos em que a utilização de *P. chlamydosporia* promoveu controle de fitonematoides (Coutinho et al., 2009; Moosavi et al., 2010; Dallemole-Giaretta et al., 2011; Yang et al., 2012). Diferentemente, Alves e Campos (2003) não observaram redução de ovos e galhas de *M. javanica* em tomateiro com o uso de *D. flagrans*.

Quando aplicados separadamente, cada fungo promoveu redução do número de galhas (Pc 5.000 – 56,2% no experimento 1 e Pc 10.000 – 35,0% no experimento 2; Df 5.000 – 25,8% no experimento 1 e Df 10.000 – 38,5% no experimento 2). Entretanto, a combinação dos antagonistas diminuiu a efetividade do controle no experimento 1 e aumentou no experimento 2. Desse modo, no primeiro ensaio, onde as condições de solo eram menos favoráveis ao desenvolvimento dos fungos, pois a correção da acidez do solo não havia sido feita, a competição entre os antagonistas pode ter sido mais intensa, prejudicando sua ação conjunta. Esse resultado confirma as observações preliminares obtidas no capítulo 1, em que o cultivo prévio de *P. chlamydosporia* inibiu o crescimento posterior de *D. flagrans*. Isso evidencia ainda que o controle biológico deve estar sempre integrado a outras práticas de manejo, como, nesse caso, a calagem.

Deve se destacar que *D. flagrans* não tolera ambientes muito ácidos, sendo valores ótimos de pH para seu desenvolvimento entre 5,5-7,5 (Gardner et al., 2000). Desse modo, a correção do solo, realizada no experimento 2, pode ter favorecido os tratamentos com esse fungo, que apresentou maior eficácia na redução de galhas nesse ensaio em todas as concentrações e combinações testadas.

Apesar do fungo *P. chlamydosporia* ser pouco influenciado pelas condições de solo (Kerry et al., 1982; Stirling, 1991), sua ação no biocontrole também pode ter sido afetada pelo pH, conforme sugere o estudo de Ward et al. (2012) em que a maioria dos isolados de *P. chlamydosporia* produziu mais protease quando cultivados em meio com pH alcalino. Essa enzima é uma das proteínas relacionadas com a patogenicidade, importante nos estágios iniciais de infecção do ovo (Segers et al., 1996).

TABELA 2 - Número de galhas de *Meloidogyne javanica* g⁻¹ de raiz em função da aplicação de *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia flagrans* (Df).

Experimento 1			
Tratamentos		Concentrações de Pc no solo (clamidósporos g ⁻¹)	
Concentrações de Df no solo (clamidósporos g ⁻¹)	0	5.000	10.000
0	1.243,6 Bb	544,3 Aa	617,3 Aa
5.000	922,5 Aa	1.054,9 Ab	991,4 Ab
10.000	1.049,2 Aab	979,4 Ab	972,2 Ab
CV (%)	20,6		
Experimento 2			
0	265,4 Bb	202,1 ABb	172,5 Aa
5.000	177,0 Aa	112,3 Aa	186,3 Aa
10.000	163,1 Aa	158,8 Aab	149,1 Aa
CV (%)	31,6		

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Nos dois experimentos, apenas o fungo *P. chlamydosporia* reduziu o número de ovos de *M. javanica* quando aplicado isoladamente, com redução máxima de 37,2% no experimento 1 e 40,4% no experimento 2. No entanto, nos dois experimentos houve efeito da interação entre os dois fungos e no segundo a aplicação conjunta de 5.000 clamidósporos reduziu em 70,2% o número de ovos do nematoide. O efeito sinérgico obtido no segundo experimento, para ovos e galhas, pode ser explicado por esses agentes de biocontrole apresentarem mecanismos de ação diferentes, enquanto *P. chlamydosporia* parasita ovos e fêmeas, *D. flagrans* preda os juvenis. Os resultados também sugerem que *P. chlamydosporia* deve ser mais estável que *D. flagrans* dependendo menos das condições ambientais para exercer efetivo controle (Kerry et al. 1982; Stirling, 1991). As condições ideais para cada organismo são variáveis e, desse modo, o uso de mais de um organismo é mais uma garantia para a estabilidade do biocontrole, visto que, quando as condições do ambiente agrícola não são adequadas para um dado organismo podem ser para o outro.

Resultados semelhantes aos obtidos nesses trabalhos foram observados por Muthulakshmi et al. (2012) que relataram a utilização conjunta de *P. chlamydosporia*, *Pseudomonas fluorescens* CHA0 e *Trichoderma viride* Pers com maior redução no número de ovos de *Globodera* spp. em comparação a cada organismo isolado.

TABELA 3 - Número de ovos de *Meloidogyne javanica* g⁻¹ de raiz em função da aplicação de *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e *Duddingtonia flagrans* (Df).

Experimento 1			
Tratamentos	Concentrações de Pc no solo (clamidósporos g ⁻¹)		
Concentrações de Df no solo (clamidósporos g ⁻¹)	0	5.000	10.000
0	450.883,8 Ba	305.378,1 Aba	283.203,5 Aa
5.000	350.869,3 Aa	302.050,6 Aa	287.553,6 Aa
10.000	381.994,8 Ba	236.202,8 Aa	269.206,6 Aa
CV (%)	27,7		
Experimento 2			
0	34.983,2 Ba	32.956,0 Bc	20.845,8 Aa
5.000	30.378,6 Ba	10.433,6 Aa	28.022,7 Aba
10.000	33.429,7 Aa	24.912,1 Ab	24.656,8 Aa
CV (%)	42,2		

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os tratamentos não influenciaram a altura das plantas em ambos os experimentos (Tabela 4). No experimento 1 as plantas ficaram mais altas e com menor massa seca em relação ao experimento 2 com sintomas de estiolamento). O estiolamento observado no experimento 1 pode ser resultado da maior população de nematoides (Peixoto et al., 2011) em comparação com o experimento 2 (Tabelas 2 e 3).

TABELA 4 - Altura das plantas de tomate, inoculadas com nematoide, em função da aplicação de *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e *Duddingtonia flagrans* (Df).

Experimento 1			
Tratamentos	Concentrações de Pc no solo (clamidósporos g ⁻¹)		
Concentrações de Df no solo (clamidósporos g ⁻¹)	0	5.000	10.000
0	80,9 Aa	81,3 Aa	79,1 Aa
5.000	83,7 Aa	82,9 Aa	78,5 Aa
10.000	74,5 Aa	80,4 Aa	74,9 Aa
CV (%)	11,8		
Experimento 2			
0	65,8 Aa	67,3 Aa	68,3 Aa
5.000	67,4 Aa	62,9 Aa	67,0 Aa
10.000	62,5 Aa	68,2 Aa	70,2 Aa
CV (%)	18,7		

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

No experimento 1, a adição de *P. chlamydosporia* promoveu incremento na massa seca das plantas, o que não ocorreu no experimento 2, no qual essa variável não foi afetada (Tabela 5). Esses resultados indicam que a ação de *P. chlamydosporia* na promoção de crescimento do tomateiro deve ser mais importante em condições mais restritivas ao desenvolvimento das plantas, visto que, no experimento 1, o ambiente era menos favorável. Isto está de acordo com os estudos onde a promoção de crescimento dada pela ação de fungos endofíticos ocorreu nos ambientes mais desfavoráveis ao desenvolvimento das plantas (Haselwandter e Read, 1982; Porras-Alfaro et al. 2008; Khidir et al., 2010). Além disso, a população do nematoide foi maior no experimento 1 do que no 2, e o crescimento de *P. chlamydosporia* é mais abundante em raízes infectadas com nematoides, devido, entre outros fatores, à maior liberação de exsudados radiculares, em decorrência da infecção, que atraem esses fungos (De Leij e Kerry, 1991; Bourne et al., 1996).

TABELA 5 - Massa das plantas secas de tomate, inoculadas com nematoide, em função da aplicação de *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e *Duddingtonia flagrans* (Df).

Experimento 1			
Tratamentos		Concentrações de Pc no solo (clamidósporos g ⁻¹)	
Concentrações de Df no solo (clamidósporos g ⁻¹)	0	5.000	10.000
0	3,9 Ba	4,3 Aa	4,5 Aa
5.000	3,8 Aa	4,4 Aa	4,7 Aa
10.000	3,7 Aa	4,6 Aa	4,2 Aa
CV (%)	18,8		
Experimento 2			
0	17,5 Aa	16,1 Aa	17,7 Aa
5.000	18,4 Aa	16,2 Aa	16,7 Aa
10.000	16,8 Aa	16,9 Aa	17,1 Aa
CV (%)	11,0		

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Utilizando técnicas de microscopia, Lopez-Llorca et al. (2002) observaram que *P. chlamydosporia* coloniza células da epiderme e do córtex radicular de cevada. Esses mesmos autores, observaram ainda, a formação abundante de apressórios e crescimento fúngico no interior da epiderme sem alterações visíveis da célula vegetal, de forma semelhante ao que ocorre com micorrizas e antagonistas endofíticos (Dong e Zhang, 2006). Dallemole-Giaretta (2008) documentou a colonização superficial e endofítica de células de raízes de tomateiro, com formação de pelotons semelhantes aos que ocorrem em associações micorrízicas. Embora estudos com microrganismos endofíticos como *P. chlamydosporia* ainda sejam preliminares e sua ação ainda pouco conhecida, trabalhos tem apontado a importância desses organismos na proteção e promoção de crescimento das plantas. Os mecanismos envolvidos na interação desses organismos com os vegetais superiores ainda não são bem esclarecidos, entretanto, alguns trabalhos tem evidenciado sua importância na aquisição de nutrientes, água e tolerância a estresses pela planta. (Haselwandter e Read, 1982; Jumpponen et al., 1998; Yadav et al., 2010; Porras-Alfaro e Bayman, 2011).

REFERÊNCIAS

- ALVES, F. R.; CAMPOS, V. P. 2003. Efeitos da temperatura sobre a atividade de fungos no controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* raça 3. *Ciência e Agrotecnologia*, 27(1): 91-97.
- BOURNE, J. M.; KERRY, B. R.; DE LEIJ, F. A. A. M. 1996. The importance of the host plant in the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Biocontrol Science and Technology*, 6:539-48.
- COOK, R. J.; BAKER, K. F. 1983. Why biological control ? In: COOK, R. J.; BAKER, K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, 1-29.
- COUTINHO, M. M.; FREITAS, L. G.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; NEVES, W. S.; LOPES, E. A.; FERRAZ, S. 2009. Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pochonia chlamydosporia* e farinha de sementes de mamão. *Nematologia brasileira*, 33(2):169-175.
- DABIRÉ, R. K.; NDIAYE, S.; MOUNPORT, D.; MATEILLE, T. 2007. Relationships between abiotic soil factors and epidemiology of the biocontrol bacterium *Pasteuria penetrans* in a root-knot nematode *Meloidogyne javanica* -infested Weld. *Biological Control*, 40: 22-29.
- DALLA PRIA, M. 1992. Controle biológico de *Meloidogyne incognita*, raça 3, pelos fungos *Verticillium chlamydosporium* e espécies de *Monacrosporium*, isolados ou combinados (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 101 p.
- DALLEMOLE-GIARETTA, R. 2008. Isolamento, identificação e avaliação de *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica* e na promoção de crescimento de tomateiro. (Tese de Doutorado). Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), 83 p.
- DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; FERRAZ, S.; PODESTA, G. S.; AGNES, E. L. 2011. Cover crops and *Pochonia chlamydosporia* for the control of *Meloidogyne javanica*. *Nematology*, 13:919-926.
- 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* Goddard, as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood. *Revue de Nématologie*, 14:157–64.

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

GARDNER, K.; WIEBE, M. G.; GILLESPIE, A. T.; TRINCI, A. P. J. 2000. Production of chlamydospores of the nematode-trapping *Duddingtonia fagrans* in shake ask culture. *Mycological Research*, 104 (2): 205-209.

FREITAS, L.G.; FERRAZ, S.; ALMEIDA, A. M. S. 1999. Controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro pela produção de mudas em substrato infestado com *Paecilomyces lilacinus*. *Nematologia Brasileira*, 23:65-73.

GUO, J-H.; QI, H-Y.; GUO, Y-H.; GE, H-L.; GONG, L-Y.; ZHANG, L-X.; SUN, P-H. 2004. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control*, 29:66–72.

HASELWANDTER, K.; READ, R. J. 1982. The significance of root-fungus association in two *Carex* species of high-alpine plant communities. *Oecologia* 53:352–54

JUMPPONEN, A.; MATTSON, K. G.; TRAPPE, J. M. 1998. Mycorrhizal functioning of *Phialocephala fortinii* with *Pinus contorta* on glacier forefront soil: interactions with soil nitrogen and organic matter. *Mycorrhiza*, 7:261–65.

KHIDIR, H. H.; EUDY, D. M.; PORRAS-ALFARO, A.; HERRERA, J.; NATVIG, D. O.; SINSABAUGH, R. L. 2010. A general suite of fungal endophytes dominate the roots of two dominant grasses in a semiarid grassland. *Journal of Arid Environments*, 74:35–42.

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

LOPES, E. A.; FERRAZ, S.; FERREIRA, P. A.; FREITAS, L. G.; DHINGRA, O. D.; GARDIANO, C. G.; CARVALHO, S. L. 2007. Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira*, 31(2):20-26.

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 colonization of barley rhizosphere by the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium*. *Micron* 33: 61-67.

MACIEL, A. S. 2009. Fungos nematófagos predadores no controle de Ancilostomatídeos de cães (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 110 p.

MOENS, M.; PERRY, R. N.; STARR, J. L. 2009. *Meloidogyne* Species – a Diverse Group of Novel and Important Plant Parasites. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. Root-knot nematodes. CAB International, Wallingford, 1-13.

MOOSAVI, M-R.; ZARE, R.; ZAMANIZADEH, H-R.; FATEMY, S. 2010. Pathogenicity of *Pochonia* species on eggs of *Meloidogyne javanica*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 104:125–133.

MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAUJO, J. V. 2003. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 23 (3):93-100.

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

OJEDA-ROBERTOS, N. F.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; AYALA-BURGOS, A. J.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; VALERO-COSS, R. O.; MENDOZA-DE-GIVES, P. 2009. Digestibility of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in ruminants: *in vitro* and *in vivo* studies. *BMC Veterinary Research*, 46 (5):1-7.

PARAUD, C.; LORRAIN, R.; PORS, I.; CHARTIER, C. 2012. Administration of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* to goats: an evaluation of the impact of this fungus on the degradation of faeces and on free-living soil nematodes. *Journal of Helminthology*, 86:95–103.

PEIXOTO, L. A.; BELAN, L. L.; MORAES, W. B.; ALVES, F. R.; FONSECA, S. O.; FONSECA, A. S. 2011. Avaliação do desenvolvimento de genótipos de feijoeiros parasitados por *Meloidogyne incognita*. Nucleus, 8(1): 463-472.

PORRAS-ALFARO, A.; BAYMAN, P. 2011. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. Annual Review Phytopathology, 49:291–315.

PORRAS-ALFARO, A.; HERRERA, J.; ODENBACH, K.; LOWREY, T.; SINSABAUGH, R. L.; NATVIG, D. O. 2008. A novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. Applied and Environmental Microbiology, 74:2805–13.

SEGRS, R.; BUTT, T. M.; KERRY, B. R.; BECKETT, 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: 421–428

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

WALLER, P. J.; LJUNGSTRÖM, B-L.; SCHWAN, O.; MARTIN, L. R.; MORRISON, D. A.; RYDZIK, A. 2006. Biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans*: trials on commercial farms in sweden. Acta Veterinaria Scandinavica. 47: 23-32.

WARD, E.; KERRY, B. R.; MANZANILLA-LO'PEZ, R. H.; MUTUA, G; DEVONSHIRE, J.; KIMENJU, J.; HIRSCH, P. R. 2012. The *Pochonia chlamydosporia* serine protease gene vcp1 is subject to regulation by carbon, nitrogen and pH: implications for nematode biocontrol. PLoS ONE, 7(4): 12p.

YADAV, V.; KUMAR, M.; DEEP, D. K.; KUMAR, H.; SHARMA, R.; TRIPATHI, T.; TUTEJA, N.; SAXENA, A. K.; JOHRI, A. K. 2010. A phosphate transporter from the root endophytic fungus *Piriformospora indica* plays a role in phosphate transport to the host plant. Journal of Biological Chemistry, 285(34):26532–44.

YANG, J-I.; LOFFREDO, A.; BORNEMAN, J.; BECKER, J. O. 2012. Biocontrol efficacy among strains of *Pochonia chlamydosporia* obtained from a root-knot nematode suppressive soil. Journal of Nematology, 44(1):67–71.

CAPÍTULO 3

Aquisição de nutrientes minerais e promoção de crescimento em plantas de tomate induzidas pelos fungos nematófagos *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia flagrans*

Resumo: Fungos nematófagos podem colonizar raízes, de modo semelhante às micorrizas, e promover crescimento vegetal, característica interessante para um agente de biocontrole. Nesse estudo avaliou-se a promoção de crescimento e aquisição de nutrientes minerais no tomateiro em função da aplicação de *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia flagrans*. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e os tratamentos foram compostos por três concentrações de *P. chlamydosporia* (0; 5.000 ou 10.000 clamidósporos g⁻¹ de solo) e quatro concentrações de *D. flagrans* (0; 5.000; 10.000 ou 15.000 clamidósporos g⁻¹ de solo) combinadas em arranjo fatorial completo (3x4), com cinco repetições. Após 60 dias avaliou-se a massa seca das plantas e o conteúdo de N, P, K, Ca, Mg e S. Houve efeito positivo dos dois fungos aplicados sobre a massa seca total do tomateiro e conteúdo de nutrientes minerais nas plantas. A promoção de crescimento vegetal pelos dois fungos estudados, associada à melhoria do estado nutricional das plantas, indica seu bom potencial de uso agrícola, não apenas para o controle de nematoides, mas também por sua ação direta no desenvolvimento do tomateiro e na economia de fertilizantes.

Palavras-chave: *Lycopersicon esculentum*, nutrição mineral, agentes de controle biológico.

Acquisition of mineral nutrients and growth promotion in tomato plants induced by nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Duddingtonia flagrans*

Abstract: Some nematophagous fungi are plant growth promoters and can colonize roots similarly to mycorrhizas. In this study we evaluated the growth promotion and acquisition of mineral nutrients in tomato plants as a function of the soil inoculation with different rates of *Pochonia chlamydosporia* (Pc) and *Duddingtonia flagrans* (Df). The experiment was carried out in a completely randomized design. Treatments were composed of three Pc concentrations (0, 5.000 and 10.000 chlamydospores g⁻¹ soil) and four Df levels (0, 5.000, 10.000 and 15.000 chlamydospores g⁻¹ soil) combined in a complete factorial arrangement (3x4) with five replications. After 60 days, plant dry matter and content of N, P, K, Ca, Mg and S were evaluated. Both fungi increased total dry matter and mineral nutrients content in tomato plants. The plant growth promotion by the two fungi studied, associated with improved nutritional status of the plants, indicates the potential of these organisms for agricultural use not only for the control of nematodes but also by its direct effect in plant growth and for fertilizers economy.

Keywords: *Lycopersicon esculentum*, mineral nutrition, biological control agents.

1. INTRODUÇÃO

Nematoides afetam diretamente o rendimento das culturas por meio da alteração morfológica e funcional do sistema radicular, que resulta da invasão dos tecidos da raiz e de sua alimentação (Kerry, 2000). Numerosos fungos têm sido testados com eficiência no controle desses patógenos. Alguns desses antagonistas possuem a capacidade de colonizar as raízes, o que os tornam mais eficientes, em função dos nematoides geralmente estarem restritos à rizosfera.

Muitos fungos nematófagos são parasitas facultativos, podem crescer saprofiticamente no solo e, na presença de hospedeiros, mudar da fase saprofítica para a parasitária (Lopez-Llorca et al, 2006), como ocorre com *Pochonia chlamydosporia* Zare e Gams, fungo parasita de ovos e fêmeas muito eficiente no controle de nematoides do gênero *Meloidogyne* spp. Goeldi. Esse antagonista coloniza raízes, de modo semelhante às micorrizas e vem sendo relatado como promotor de crescimento vegetal (Hidalgo-Diaz et al., 2000; Monfort et al., 2005; Dallemole-Giaretta, 2008), característica interessante para um agente de biocontrole (Reimann et al., 2008). Alguns fungos predadores formadores de armadilhas também têm sido relatados colonizando raízes de cevada e tomate, a exemplo dos fungos *Arthrobotrys dactyloides* Drechsler e *Arthrobotrys oligospora* Fresenius (Persson e Jansson, 1999; Bordallo et al., 2002). Entre os fungos predadores, *Duddingtonia flagrans* Cooke, habitante do solo, tem sido estudado para o controle de helmintos de importância veterinária (Maciel, et al. 2010; Araújo, et al. 2012; Braga, et al. 2013). Embora seja um dos agentes de biocontrole mais eficientes contra parasitas de animais, pouco se sabe sobre sua ação contra fitonematoides, bem como seu relacionamento com as plantas.

Os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal por fungos nematófagos ainda são pouco conhecidos. Acredita-se que esses organismos possam atuar, entre outras formas, na mineralização da matéria orgânica do solo e, de modo semelhante às micorrizas, no aumento da superfície de aquisição de água e nutrientes (Falih e Wainwright, 1996; Oliveira et al., 2003; Badr et al., 2006). Assim, além de sua ação biocontroladora, o fungo deve agir diretamente no crescimento da planta, contrabalanceando o dano causado pelo patógeno. Contudo, dado o complexo relacionamento entre plantas e microrganismos no ambiente, a ação desses organismos

deve resultar em efeitos variáveis dependendo do próprio antagonista, da cultura, do ambiente e do manejo de cada agroecossistema.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de *D. flagrans* e *P. chlamydosporia* no crescimento e na nutrição do tomateiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos fungos e produção do inóculo fúngico

O isolado do fungo *P. chlamydosporia* (Pc-10), utilizado nos ensaios, pertence à micoteca do Laboratório de Controle de Fitonematoides da Universidade Federal de Viçosa e o isolado do fungo *D. flagrans* (AC001) à coleção do Laboratório de Parasitologia, do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

O inóculo de *D. flagrans* (Df) foi produzido em milho triturado (canjiquinha), conforme descrito por Dalla Pria (1992) e o de *P. chlamydosporia* (Pc) foi produzido em arroz beneficiado conforme descrito por Freitas *et al.* (1999). Os cereais (300 gramas) foram depositados em sacos plásticos com filtro biológico, para permitir a troca gasosa, junto com 80 mL de água e, posteriormente, os sacos foram autoclavados por 20 minutos a 120 °C. Cada saco, após atingir a temperatura ambiente, recebeu seis discos de micélio de 9 mm de diâmetro da cultura fúngica, previamente crescida em placa de Petri com meio de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA). Em seguida, os sacos plásticos permaneceram no escuro, a 25 °C para produção de clamidósporos: 15 dias para *D. flagrans* e 21 dias para *P. chlamydosporia*.

2.2. Ensaio experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em casa de vegetação. Cada unidade experimental consistiu de uma planta cultivada em vaso

de plástico contendo 2 L de substrato, composto pela mistura de terriço e areia, na proporção 1:1, (v:v) e previamente tratado com brometo de metila. Os tratamentos foram compostos por três concentrações de *P. chlamydosporia* (0; 5.000 ou 10.000 clamidósporos g⁻¹ de solo) e quatro concentrações de *D. flagrans* (0; 5.000; 10.000 ou 15.000 clamidósporos g⁻¹ de solo) combinadas em arranjo fatorial completo 3x4, com cinco repetições.

A correção de solo foi realizada de modo a elevar a saturação por bases a 70%. As plantas foram adubadas de acordo com a disponibilidade de nutrientes no solo, estimada por meio da análise de solo (Tabela 1), e com a necessidade da cultura.

O cultivo foi realizado por 60 dias e ao fim desse período, foi avaliada a massa das plantas secas.

TABELA 1 – Análise química e física do solo.

pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	(t)	(T)	V	m	MO	P-rem
H ₂ O	mg/dm ³		cmlo _c /dm ³				cmlo _c /dm ³			%.....		dag/kg	mg/L
5,34	118,4	180	1,33	0,18	0,00	4,7	1,97	1,97	6,67	29,5	0,0	1,32	23,3
Classe Textural - Franco-Argilo-Arenosa													

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

2.3. Avaliação do estado nutricional das plantas

Amostras da parte aérea e do sistema radicular das plantas foram enviadas ao Laboratório de Análise de Tecido Vegetal da UFV e analisadas quanto aos teores de macronutrientes.

Para determinação dos teores de fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S) as amostras de folhas foram submetidas à digestão nitroperclórica (Johnson e Ulrich, 1959). O teor de P foi determinado pelo método de redução do fosfomolibdato pela vitamina C, modificado por Braga e Defelipo (1974); o K por fotometria de chama; Ca e Mg por espectrofotometria de absorção atômica (AOAC, 1975); S por turbidimetria do sulfato (Jackson, 1959) e o N, após a digestão sulfúrica do material vegetal (Jackson, 1958), de acordo com o método descrito por Bremner (1965).

2.4. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância, a 5% de probabilidade. Os efeitos dos fatores quantitativos foram desdobrados por meio de regressão e dos qualitativos pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito positivo dos dois fungos aplicados sobre a massa seca total do tomateiro (Figuras 1 e 2), mas não da interação entre eles. Como nesse experimento nematoides não foram inoculados, esse resultado indica que a ação desses dois organismos não está restrita ao controle de nematoides, como muitas vezes relatado na literatura. Isso é, o maior crescimento das plantas na presença do fungo não deve ser atribuído somente à redução da população do patógeno, mas também ao efeito direto do fungo na promoção de crescimento da planta.

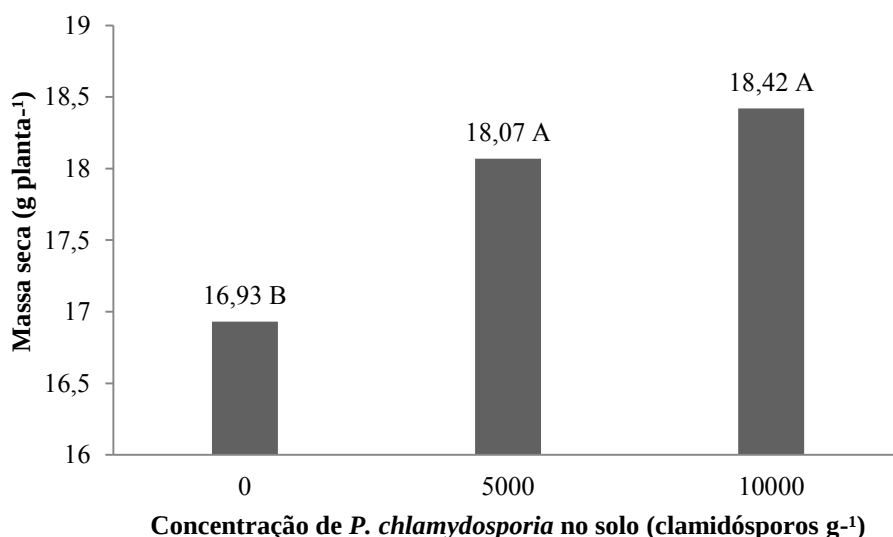


FIGURA 1 – Massa seca do tomateiro em função da aplicação de diferentes concentrações de *Pochonia chlamydosporia*. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

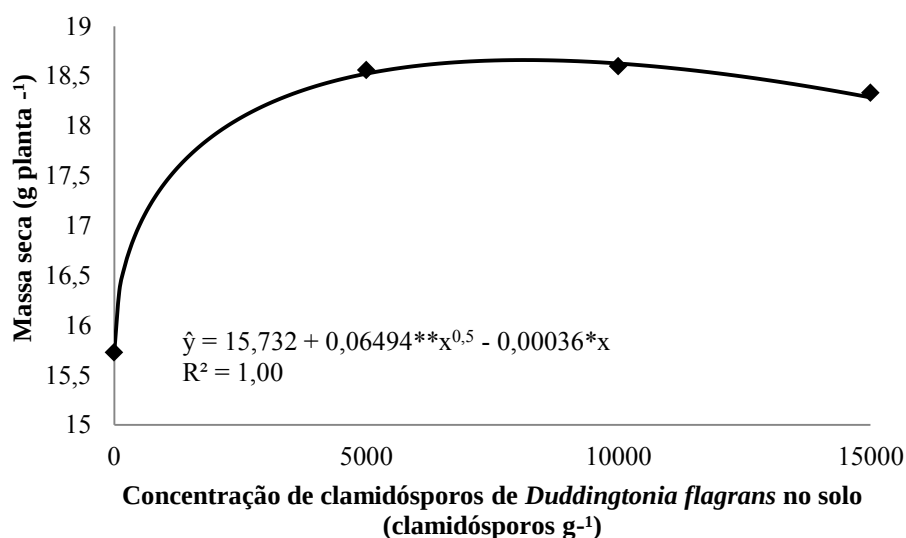


FIGURA 2 – Massa do tomateiro seco em função da aplicação de *Duddingtonia flagrans*. **significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. *significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Embora a promoção de crescimento por *P. chlamydosporia* já seja conhecida (Hidalgo-Diaz et al., 2000; Monfort et al., 2005; Dallemole-Giaretta, 2008), não havia registros na literatura desse tipo de ação para *D. flagrans*. Alguns mecanismos têm sido apontados para explicar a promoção de crescimento por microrganismos, como, por exemplo: aumento da superfície de aquisição de água e nutrientes, mineralização de matéria orgânica e produção de reguladores de crescimento vegetal (Falih e Wainwright, 1996; Oliveira et al., 2003; Badr et al., 2006).

Monfort et al. (2005) ao estudarem resistência induzida de plantas de trigo observaram, além de promoção de crescimento, redução da atividade de peroxidase e sugeriram que a ação de *P. chlamydosporia* deve estar associada à alteração dos reguladores de crescimento vegetal. Esses autores atribuíram a redução da atividade de peroxidase ao maior vigor das plantas inoculadas com esse fungo.

Neste estudo, a adição dos dois fungos aumentou o conteúdo de nutrientes minerais nas plantas e, de modo semelhante ao que ocorreu para a variável massa seca total, não houve efeito da interação entre os dois antagonistas. Isso explica, pelo menos em parte, o maior desenvolvimento das plantas crescidas em solo inoculado com esses fungos. A aplicação ao solo de 5.000 clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* aumentou o conteúdo de N (14,3%), P (24,5%) e K (13,3%) (Tabela 2) enquanto que a mesma dose de

D. flagrans aumentou os teores de P (30,1%), K (22,8%), Ca (19,0%) e Mg (16,8%) (Figura 3).

O aumento no conteúdo de alguns nutrientes, notadamente de P e K, foi superior ao incremento de matéria seca, indicando que os fungos aumentaram o teor desses elementos nos tecidos das plantas, ou seja, que as plantas estavam mais bem nutridas. Dessa maneira, o efeito nutricional da adição desses organismos deve ter influenciado o crescimento do tomateiro.

O fungo *P. chlamydosporia* coloniza as células do córtex das raízes do tomateiro (Lopez-Llorca et al., 2002; Dallemole-Giaretta, 2008) e, dessa maneira, suas hifas podem atuar no aumento da superfície de aquisição de água e nutrientes, de modo semelhante aos fungos micorrízicos, o que deve ter favorecido a absorção desses elementos pelas plantas. Alguns fungos predadores formadores de armadilhas também podem colonizar raízes de tomateiros (Persson e Jansson, 1999; Bordallo et al., 2002), o que pode ter ocorrido com *D. flagrans*, mas essa colonização deve ser investigada.

TABELA 2 – Conteúdo de macronutrientes no tomateiro (mg planta⁻¹) aos 60 dias de idade em função da aplicação de *Pochonia chlamydosporia*.

Concentração de clamidósporos de <i>P. chlamydosporia</i> g ⁻¹ de solo	N	P	K	Ca	Mg	S
0	492,8 B	94,0 B	652,9 B	428,4 A	91,0 A	217,7 AB
5.000	563,4 A	117,0 A	739,4 A	466,0 A	95,4 A	246,3 A
10.000	540,1 AB	105,4 B	711,7A	432,7 A	91,2 A	211,0 B

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

O efeito mais pronunciado sobre a aquisição de P pode estar relacionado à menor mobilidade desse nutriente no solo, pois esse elemento é transportado predominantemente, na maioria dos solos, por difusão (Novais e Smith, 1999). Assim, com o aumento da superfície de aquisição, dado pela adição do fungo, sua absorção é mais favorecida (Novais e Smith, 1999). Há ainda o relato da presença de transportadores de P de alta afinidade em hifas de fungos endofíticos, que favorecem a aquisição desse nutriente (Yadav et al., 2010), notadamente em solos com baixa capacidade de suprimento de P.

Outro processo que pode estar envolvido na maior disponibilização de nutrientes para o tomateiro é a mineralização da matéria orgânica. Uma vez que esses fungos são saprófitas facultativos (Kerry, 2000; Siddiqui et al., 2009; Anan'ko e Teplyakova, 2011; Sagüés et al., 2011), sua ação na degradação de compostos orgânicos pode aumentar a solubilização de formas indisponíveis dos nutrientes contidos nessa fração do solo.

Fungos micorrízicos arbusculares possuem ação biofertilizadora, biocontroladora e biorremediadora, no entanto, por serem simbiotróficos obrigatórios, o seu cultivo *in vitro* ainda representa um obstáculo não superado (Siqueira et al., 2002). Isso não acontece com *P. chlamydosporia* e *D. flagrans* uma vez que são facilmente produzidos em condições laboratoriais, além da vantagem de ser mais rústico, por produzir clamidósporos, sendo mais interessante que as micorrizas.

A promoção de crescimento pelos dois fungos estudados, associada à melhoria do estado nutricional das plantas, indica seu bom potencial de uso agrícola, não apenas para o controle de nematoides, conforme apresentado nos capítulos anteriores, mas também por sua ação direta no desenvolvimento do tomateiro e, possivelmente, na economia de fertilizantes.

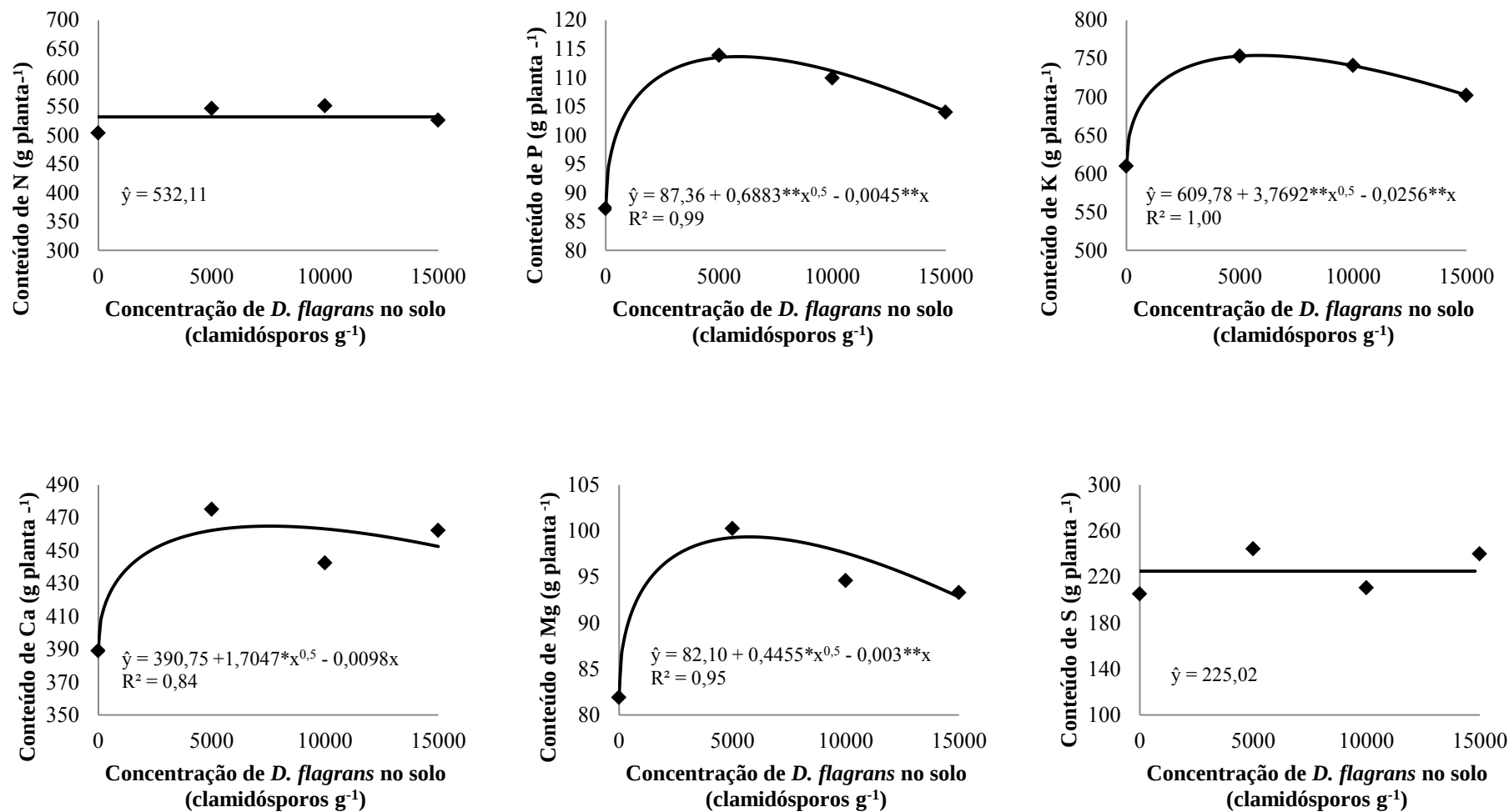


FIGURA 3 – Conteúdo de nutrientes em plantas de tomate (mg planta⁻¹) em função da aplicação de *Duddingtonia flagrans*. **significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. * significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

REFERÊNCIAS

- ANAN'KO, G. G.; TEPLYAKOVA, T. V. 2011. Factors Responsible for Transition of the *Duddingtonia flagrans* Carnivorous Fungus from the Saprotrophic to the Zootrophic Nutrition Type. Microbiology, 80(2): 188–193.
- ARAUJO, J. M. ; ARAÚJO, J. V. ; BRAGA, F. R. ; SOARES, F. E. F. ; FERREIRA, S. R. ; TAVELA, A.O. ; FRASSY, L. N. ; ALVES, C. D. F. ; CARVALHO, G. R. 2012. Control of *Strongyloides westeri* by Nematophagous fungi after passage through the gastrointestinal tract of donkeys. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 21:157-160.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. 1975. Official methods of analysis. 12.ed. Washington, 1094p.
- BADR, M. A.; SHAFEI, A. M.; SHARAF EL-DEEN, S. H. 2006. The dissolution of K and P-bearing minerals by silicate dissolving bacteria and their effect on sorghum growth. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2(1): 5-11.
- BORDALLO, 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.
- BRAGA, F. R. ; ARAUJO, J. M.; ARAÚJO, J. V. ; SOARES, F. E. F. ; TAVELA, A. O. ; FRASSY, L. N. ; LIMA, W. S. ; MOZER, L. R. . 2013 *In vitro* predatory activity of conidia of fungal isolates of the *Duddingtonia flagrans* on *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 46:108-110.
- BRAGA, J.M.; DEFELIPO, B.V. 1974. Determinação espectrofotométrica de P em extratos de solo e material vegetal. Revista Ceres, 21:73-85.
- BREMNER, J.M. Total nitrogen. 1965 In: BLACK, C.A. (ed). Methods of soil analysis. Madison, American Society of Agronomy, p.1149-1178.
- DALLA PRIA, M. 1992. Controle biológico de *Meloidogyne incognita*, raça 3, pelos fungos *Verticillium chlamydosporium* e espécies de *Monacrosporium*, isolados ou combinados (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 101 p.

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

FALIH, A. M. K.; WAINWRIGHT, M. 1996. Microbial and enzyme activity in soils amended with a natural source of easily available carbon. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, 21:177-183.

FREITAS, L. G.; FERRAZ, S.; ALMEIDA, A. M. S.. 1999. Controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro pela produção de mudas em substrato infestado com *Paecilomyces lilacinus*. *Nematologia Brasileira*, 23: 65-73.

HIDALGO-DIAZ, L.; BOURNE, J. M.; KERRY, B. R.; RODRIÁGUEZ, 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.

JACKSON, M.L. Soil chemical analysis. 1958. New Jersey, Prentice Hall, 498p.

JOHNSON, C.M.; ULRICH, A. 1959. Analytical methods for use in plants analyses. Los Angeles, University of California, 766:32-33.

KERRY, B.R. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 38:423-441.

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 colonization of barley rhizosphere by the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium*. *Micron* 33: 61-67.

LOPEZ-LLORCA, L. V.; JANSSEN, H-B.; VICENTE, J. G. M.; SALINAS, J. 2006. Nematophagous fungi as root endophytes. In: Schulz, B. J. E.; Boyle, C. J. C.; Sieber, T. N. (eds.). *Microbial Root Endophytes*. Berlin: Springer-Verlag, 191-206.

MACIEL, A. S.; FREITAS, L. G.; CAMPOS, A. K.; LOPES, E. A.; ARAUJO, J. V. 2010. The biological control of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by *Duddingtonia flagrans* in a soil microcosm. *Veterinary Parasitology*, 173:262-270.

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

NOVAIS, R. F.; SMITH, T. J. 1999. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Viçosa: Editora da UFV, 399p.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. 2003. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 22p. (Documentos 161).

PERSSON, C.; JANSSON, H-B. 1999. Rhizosphere colonization and control of *Meloidogyne* spp. by nematode-trapping fungi. *Journal of Nematology*, 31(2):164–171.

REIMANN, S.; HAUSCHILD, R.; HILDEBRANDT, U.; SIKORA, R. A. 2008. Interrelationships between *Rhizobium etli* G12 and *Glomus intraradices* and multitrophic effects in the biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incongnita* on tomato. *Journal of Plant Diseases and Protection* 115:108–113.

SAGÜÉS, M. F.; PURSLOW, P.; FERNÁNDEZ, S.; FUSÉ, L.; IGLESIAS, L.; SAUMELL, C. 2011. Hongos nematófagos utilizados para el control biológico de nematodos gastrointestinales en el ganado y sus formas de administración. *Revista Iberoamericana de Micología*, 1-5.

SIDDIQUI, I.A.; ATKINS, S.D.; KERRY, B.R. 2009. Relationship between saprotrophic growth in soil of different biotypes of *Pochonia chlamydosporia* and the infection of nematode eggs. *Annals of Applied Biology*, 155:131–141.

SIQUEIRA, J. O.; LAMBAIS, M. R.; STURMER, S. L. 2002. Fungos micorrízicos arbusculares. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 25:12-21.

YADAV, V.; KUMAR, M.; DEEP, D. K.; KUMAR, H.; SHARMA, R.; TRIPATHI, T.; TUTEJA, N.; SAXENA, A. K.; JOHRI, A. K. 2010. A phosphate transporter from the root endophytic fungus *Piriformospora indica* plays a role in phosphate transport to the host plant. *The Journal of Biological Chemistry*, 285 (34): 26532–26544.

CONCLUSÕES GERAIS

Os fungos *Duddingtonia flagrans* e *Pochonia chlamydosporia* controlam o nematoide das galhas *Meloidogyne javanica*.

Os fungos *P. chlamydosporia* e *D. flagrans* podem ser usados conjuntamente para o controle de *M. javanica*.

Os fungos *P. chlamydosporia* e *D. flagrans* promovem o crescimento e aumentam a aquisição de nutrientes em plantas de tomate.