

LUCAS CASTRO ALVES

***Pochonia boninensis* COMO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO DE
PATÓGENOS HABITANTES DO SOLO**

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*.

Orientador: Leandro Grassi de Freitas

Coorientadora: Thalita Suelen Avelar Monteiro

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

A474p
2021
Alves, Lucas Castro, 1994-
Pochonia boninensis como agente de controle biológico de
patógenos habitantes do solo / Lucas Castro Alves. - Viçosa, MG, 2021.
1 dissertação eletrônica (33 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Leandro Grassi de Freitas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Fitopatologia, 2021.

Referências bibliográficas: f.26-33.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.057>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Meloidogyne javanica*. 2. Metabólitos. 3. Pragas agrícolas -
Controle integrado. I. Freitas, Leandro Grassi de, 1963-. II.
Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia.
Mestrado em Fitopatologia. III. Título.

CDD22. ed. 632.6257

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB6/2578

LUCAS CASTRO ALVES

***Pochonia boninensis* COMO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO DE
PATÓGENOS HABITANTES DO SOLO**


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: 18 de novembro de 2021.

Assentimento:



Lucas Castro Alves
Autor



Leandro Grassi de Freitas
Orientador

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Patrícia, pelo amor incondicional, apoio e por ser minha maior inspiração de vida.

À minha companheira Thais, pelo amor, compreensão e por me ajudar em todos os momentos e decisões.

À minha família, pelo apoio e pelo amor incondicional.

Aos meus amigos que me ajudaram a passar por este momento com mais leveza.

Ao professor Leandro Grassi de Freitas, pela amizade, orientação e ensinamentos transmitidos.

À Thalita Monteiro e ao professor Lucas Abreu pela imensurável contribuição ao longo deste trabalho.

Ao Vitor Augusto, pela amizade e por não medir esforços em me ajudar na execução deste trabalho.

Aos membros do laboratório Bionema, pelos conhecimentos compartilhados, amizades e apoio.

Aos membros do UCB, pela contribuição para este trabalho.

A toda minha turma de mestrado, pela amizade e por deixar esta etapa mais divertida.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia UFV pelo conhecimento transmitido.

A todos os servidores públicos que me auxiliaram nas minhas atividades.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais FAPEMIG, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelos recursos e bolsa concedida.

“Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, um menino colocado à frente de fenômenos naturais que impressionam como se de um conto de fadas se tratassem!”

(Marie Curie)

RESUMO

ALVES, Lucas Castro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2021. ***Pochonia boninensis* como agente de controle biológico de patógenos habitantes do solo.** Orientador: Leandro Grassi de Freitas. Coorientadora: Thalita Suelen Avelar Monteiro

Alguns dos principais patógenos que acometem a cultura do tomate são *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Meloidogyne javanica*. O fungo *Pochonia chlamydosporia* já é amplamente utilizado por produtores para combater os nematoides e traz o adicional de disponibilizar nutrientes para as plantas. Em um estudo anterior, o extrato fúngico de um isolado pertencente a espécie *Pochonia boninensis* demonstrou aptidão para o controle de doenças fúngicas de parte aérea no tomateiro. Sendo assim, este trabalho teve como objetivos avaliar se esse isolado de *P. boninensis* promove o crescimento de plantas de tomate e reduz doenças causadas por patógenos habitantes do solo. Os experimentos realizados contra os patógenos *R. solani* e *S. rolfsii* demonstraram que tanto o fungo *P. boninensis* quanto os extratos fúngicos não foram capazes de reduzir a incidência das doenças causada pelos patógenos fúngicos. Em contrapartida, nos experimentos *in vivo* realizados contra o fitonematoide *M. javanica*, o fungo *P. boninensis* reduziu em até 60% a população do nematoide. Além disso, foi observada uma ação direta de colonização de ovos e juvenis de segundo estágio do nematoide pelo fungo em um teste *in vitro*. O fungo promoveu o crescimento das plantas em relação ao tratamento testemunha, aumentando os valores de parâmetros de massa de parte aérea e de raiz, assim como de eficiência no uso da água e eficiência fotossintética. O fungo *P. boninensis* possui a capacidade de solubilizar fósforo, como observado em experimento *in vitro*, devido aos ácidos orgânicos produzidos pelo microrganismo. Apesar de não ter sido eficiente no controle dos fungos fitopatogênicos *R. solani* e *S. rolfsii*, o isolado Pc17 de *P. boninenses* é promissor para se tornar ingrediente ativo de produto comercial, já que demonstrou eficiência no controle de *M. javanica*, capacidade de promoção de crescimento do tomateiro e de solubilização de fósforo, todas características apreciadas em um agente de controle biológico.

Palavras-chave: *Meloidogyne javanica*. Metabolitos secundários. Manejo integrado de doenças.

ABSTRACT

ALVES, Lucas Castro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November 2021. ***Pochonia boninensis* as a biological control agent for soil borne pathogens.** Adviser: Leandro Grassi de Freitas. Co-adviser: Thalita Suelen Avelar Monteiro

Some of the main pathogens that affect tomato crops are *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* and *Meloidogyne javanica*. The use of the biological control strategy has already become a consolidated tool for the management of soil pathogens. The fungus *Pochonia chlamydosporia* is already widely used by growers to combat nematodes and brings the added benefit of providing nutrients for plants. In a previous study, the fungal metabolic extracts of an isolate belonging to the species *Pochonia boninensis* showed aptitude for the control of a fungal disease of leaves of tomato. Therefore, this work aimed to evaluate whether this *P. boninensis* isolate promotes the growth of tomato plants and reduces diseases caused by soil-borne pathogens. The experiments carried out against the pathogens *R. solani* and *S. rolfsii* demonstrated that both the fungus *P. boninensis* and its extracts were not able to reduce the incidence of diseases caused by the fungal pathogens. On the other hand, in *in vivo* experiments carried out against the phytonematode *M. javanica*, the fungus *P. boninensis* reduced up to 60% the nematode population. Furthermore, a direct action of nematode colonization by the fungus was observed in an *in vitro* test. The fungus promoted plant growth in relation to the control treatment, increasing the values of shoot and root mass parameters, as well as water use efficiency and photosynthetic efficiency. The fungus *P. boninensis* has the ability to solubilize phosphorus, as observed in an *in vitro* experiment, due to the organic acids produced by the microorganism. Despite not having been efficient in the control of the phytopathogenic fungi *R. solani* and *S. rolfsii*, the *P. boninensis* isolate Pc17 is promising to become an active ingredient of a commercial product as it has shown efficiency in the control of *M. javanica*, capacity to promote growth of tomato and phosphorus solubilization, all characteristics appreciated in a biological control agent.

Keywords: *Meloidogyne javanica*. Secondary metabolites. Integrated disease management.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	8
MATERIAL E MÉTODOS	10
Preparo dos isolados e extratos fúngicos	11
Ação de <i>Pochonia boninensis</i> sobre <i>Sclerotium rolfsii</i> e <i>Rhizoctonia solani</i> <i>in vitro</i>	11
Ação de <i>Pochonia boninensis</i> sobre <i>Sclerotium rolfsii</i> e <i>Rhizoctonia solani</i> <i>in vivo</i>	12
Ação de <i>Pochonia boninensis</i> sobre <i>Meloidogyne javanica</i> <i>in vitro</i>	12
Ação de <i>Pochonia boninensis</i> sobre <i>Meloidogyne javanica</i> <i>in vivo</i>	14
Promoção de crescimento.....	14
Estatística.....	15
RESULTADOS.....	16
Preparo dos isolados e extratos de metabólitos fúngicos.....	16
Ação de <i>Pochonia boninensis</i> sobre <i>Sclerotium rolfsii</i> e <i>Rhizoctonia solani</i> <i>in vitro</i>	16
Ação de <i>Pochonia boninensis</i> sobre <i>Sclerotium rolfsii</i> e <i>Rhizoctonia solani</i> <i>in vivo</i>	16
Ação de <i>Pochonia boninensis</i> sobre <i>Meloidogyne javanica</i> <i>in vitro</i>	17
Ação de <i>Pochonia boninensis</i> sobre <i>Meloidogyne javanica</i> <i>in vivo</i>	19
Promoção de crescimento.....	21
DISCUSSÃO.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

INTRODUÇÃO

O tomateiro é uma das hortaliças mais cultivadas no mundo e que tem a sua produção limitada ao ataque de patógenos, especialmente, os habitantes do solo.-Fitopatógenos habitantes de solo, na maioria dos casos, são de difícil controle, pois estes possuem interações muito complexas e são alvos de menor assertividade quando se trata da utilização de produtos para manejá-los (Oerke, 2006; Huang *et al.*, 2016). Na maioria dos casos estes patógenos possuem estruturas de resistência que prolongam o tempo em que estes microrganismos permanecem no solo e dificultam seu controle (Raaijmakers *et al.*, 2008). Patógenos habitantes do solo são alguns dos grandes desafios encontrados na agricultura devido à soma destes fatores associada, muitas vezes, a altos danos nas culturas hospedeiras.

Um dos grandes problemas na cultura do tomate é o fungo habitante de solo *Sclerotium rolfsii*. Os escleródios deste fungo possuem coloração amarronzada, persistem no solo por longos períodos de tempo e são resistentes à degradação química e biológica (Elad, Barak e Chet, 1983). Existem duas formas de germinação dos escleródios, a germinação micelial e a germinação eruptiva. Na germinação micelial, a partir do escleródio, crescem pequenas quantidades de micélio de forma não extensiva. Na germinação eruptiva, uma grande massa de micélio cresce a partir do escleródio alcançando maior área e distância (Punja, 1985). É relatado que o fungo *S. rolfsii* consegue causar doença e mais de 600 espécies de plantas (Rivard e Louws, 2010). Em tomateiro, esse fungo pode causar podridão no colo da planta, tombamento de plantas, murcha e em casos mais severos pode matar a planta (Elad *et al.*, 1982).

Outro fungo fitopatogênico habitantes do solo importante para a cultura do tomateiro é *Rhizoctonia solani* (Goudjal *et al.*, 2014). As células do fungo são multinucleadas, sem presença de produção de esporos em condições ambientais e o fungo tem a capacidade de produzir uma estrutura de resistência chamada de escleródio (JR e Whitney, 1970). O escleródio tem resistência à degradação química e biológica do ambiente, fazendo com que sua permanência no solo seja mais longa e viável (Sumner, 1996). *Rhizoctonia solani* pode ocasionar grandes perdas econômicas em plantas de tomateiro, por causar tombamento em plantas jovens e podridão em frutos, ao entrarem em contato com o solo (Strashnov *et al.*, 1985). A doença nos frutos pode ser chamada de mela-de-rizoctonia.

Nematoides também são uma das causas de grandes perdas da cultura do tomate. O gênero *Meloidogyne* é de grande importância econômica para esta cultura devido a sua agressividade e ampla distribuição (Whitehead, 1997). Este gênero engloba espécies endoparasitas sedentárias, que possuem alta capacidade de reprodução em plantas hospedeiras,

principalmente na cultura do tomate. A espécie *Meloidogyne javanica* pode causar alterações graves no sistema radicular e na parte aérea dessa cultura. No sistema radicular, há a presença de sintomas diretos observados por meio das galhas e, na parte aérea, sintomas reflexos como murcha nas horas mais quentes do dia e redução do crescimento e produção de frutos (Rose, Awol e Wim, 2016).

Todas esses patógenos e outros, sejam na cultura do tomate ou em qualquer outra cultura, são favorecidas pelo método de produção agrícola (Culman *et al.*, 2010; Crews, Carton e Olsson, 2018). A monocultura e a má utilização das tecnologias disponíveis levam a uma alta produção de inóculo dos patógenos e interferência na produção. A alternativa para resolver estes problemas é o manejo integrado das doenças, que consiste na utilização de várias práticas para tentar ao máximo, reduzir o impacto que as doenças podem gerar na lavoura (Hodson e Lewis, 2016). Exemplo de práticas consagradas por este manejo integrado é a utilização consciente de moléculas químicas, utilização de controle genético a partir de cultivares resistentes a doenças, utilização de manejo cultural, seja uma rotação de cultura, escape, e uma das práticas que tem constantemente crescido na agricultura, o controle biológico.

Diante desta alternativa, pesquisas envolvendo microrganismos biocontroladores para defender as plantas dos ataques de fitopatógenos em sistemas agrícolas mais sustentáveis são realidade. Existem vários produtos comercializados à base de bactérias, fungos, extratos vegetais, entre outros. Alguns produtos possuem alta eficiência no controle de patógenos e são altamente recomendados em programas de manejo de várias culturas. Estudos indicam que os agentes de controle biológico podem induzir resistência, competir com fitopatógenos e alimentar-se deles. Outra forma de ação pode ser produzindo compostos que afetam de forma negativa o estabelecimento de patógenos no ambiente (Emmert e Handelsman, 1999; Howell, 2003; Ongena e Jacques, 2008). A partir destas descobertas muitos microrganismos utilizados como agentes de controle biológico tiveram seus metabólitos secundários caracterizados para elucidar quais compostos possuíam tais atividades (Dowling e O’Gara, 1994; Reino *et al.*, 2008; X. M. Niu *et al.*, 2010; X. M. Niu, 2017).

Dentre os produtos biológicos utilizados no mundo, alguns são à base do fungo da espécie *Pochonia chlamydosporia*. No Brasil, atualmente, estão registrados quatro produtos utilizando esta espécie. Isolados desta espécie possuem a habilidade nematicida, conseguem estabelecer interação endofítica em plantas, tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas (Bordallo *et al.*, 2002; Lopez-Llorca *et al.*, 2002). Estes fungos nematófagos possuem a capacidade de parasitar os ovos deste grupo de fitopatógenos, relatos demonstram que eles

também podem se alimentar de nematoides juvenis e adultos. Outro ponto relatado é que a interação endofítica entre *P. chlamydosporia* e plantas pode levar à promoção de crescimento por parte das plantas e indução de resistência contra doenças (Hidalgo-Diaz *et al.*, 2000; Siddiqui e Shaukat, 2003; Monfort *et al.*, 2005; Muthulakshmi *et al.*, 2012; Podestá, de *et al.*, 2013; Nasu *et al.*,; 2019 Coutinho *et al.*, 2021)

O gênero *Pochonia* tem passado por constantes reestruturações após vários estudos filogenéticos. Em 2013 uma nova espécie denominada *P. boninensis* foi descrita no Japão (Nonaka *et al.*, 2013), mas a espécie não foi aceita no âmbito científico devido a problemas na publicação (Evans e Kirk, 2017). O isolado Pc-17, pertencente à coleção do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides (Bionema), foi recentemente identificado como *P. boninensis* (Matos, 2020). Poucos estudos foram realizados em relação aos hábitos e capacidade de biocontrole dessa espécie, sendo este o primeiro estudo sobre a interação do fungo *P. boninensis* com nematoides. Sabe-se que *P. boninensis* não produz clamidósporos como os isolados da espécie *P. chlamydosporia* e que seu extrato fúngico de metabólitos secundários conseguiu reduzir a incidência de *Alternaria solani* em plantas de tomateiro quando aplicado via pulverização foliar (Matos, 2020). Sabendo que o extrato fúngico deste isolado teve efeito sobre patógenos fúngicos, também sabendo que o gênero *Pochonia* é conhecido por controlar doenças causadas por nematoides, esse trabalho foi realizado com os objetivos de verificar se isolado Pc-17 de *P. boninensis* possui a capacidade de controlar doenças causadas por patógenos habitantes do solo e de promover o crescimento plantas de tomate.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides (BIONEMA), localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e em casas de vegetação pertencentes ao Departamento de Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa.

Preparo dos isolados e extratos fúngicos

Os isolados de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) e *Pochonia boninensis* (Pc-17) foram obtidos a partir da coleção micológica do Bionema.

O isolado de *Pochonia boninensis* foi repicado para placas de Petri contendo BDA. Após 7 dias de crescimento do fungo, este foi repicado para quatro diferentes substratos, sendo estes a base de arroz, cevada, milho e trigo. Cada substrato foi autoclavado previamente com 30% de

umidade e mantido em câmara de crescimento por 21 dias a 25°C. Após este período, amostras de 10g de cada substrato foram tomadas para verificar o substrato com melhor desempenho de colonização e produção de esporos. O melhor substrato foi o escolhido para seguir com a pesquisa.

O isolado de *Pochonia chlamydosporia* foi repicado para placas de Petri contendo BDA. Após 7 dias de crescimento do fungo, este foi repicado para o substrato escolhido previamente autoclavado com umidade de 30% e mantido em câmara de crescimento por 21 dias a 25°C.

O substrato colonizado por *Pochonia boninensis* foi adicionado em Erlenmeyer de 250mL junto a 50 mL de etanol (99,5%) e colocado sob agitação por 1 hora, a 150 rpm a 25 °C. Após o período de agitação, o material foi filtrado e o sobrenadante coletado. O substrato colonizado foi submetido novamente a agitação com adição de 50 mL do extrator por 1 hora e, após este processo, o sobrenadante foi coletado mais uma vez.

Em seguida, todos os materiais foram centrifugados para eliminação de resíduos do substrato e biomassa do fungo (3000 rpm/5 minutos) e o sobrenadante foi preservado. O etanol das amostras foi eliminado por rotovaporização (45 - 50 °C) e os metabólitos congelados e secos por liofilização. Para realização dos experimentos, os extratos de metabólitos obtidos do fungo *Pochonia boninensis* foram diluídos em água deionizada autoclavada para a concentração 10000 ppm.

Ação de *Pochonia boninensis* sobre *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani* *in vitro*

Para determinar a capacidade de antibiose do extrato do fungo *P. boninensis* contra os patógenos *S. rolfsii* e *R. solani*, um experimento *in vitro* foi realizado. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Em placas de Petri vertida com meio de cultura BDA, cinco poços equidistantes utilizando canudos de 5mm autoclavados foram feitos. Em cada placa foi colocado apenas um extrato de metabólitos secundários das concentrações testadas de 0, 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 e 10000 ppm. Em seguida, ao centro da placa, foi adicionado *R. solani* ou *S. rolfsii*. Diariamente o crescimento do fungo foi mensurado e caso houvesse halo de inibição, o halo também seria mensurado.

Ação de *Pochonia boninensis* sobre *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani* *in vivo*

A patogenicidade dos isolados de *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani*, foi testada em plantas de tomateiro. Os isolados de fitopatógenos foram crescidos em arroz, previamente

autoclavado com 30% de umidade, durante um período de 7 dias. Em câmara de incubação a 25°C, copos plásticos de 50 mL foram preenchidos com solo previamente esterilizado. O teste contou com os tratamentos: *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e grão não-colonizado (testemunha). Um grão de arroz de cada tratamento foi adicionado aos copos plásticos contendo o solo esterilizado. Depois de 7 dias, três sementes de tomate da cultivar Santa Clara foram semeadas nos recipientes. Os tratamentos foram avaliados em relação a germinação das sementes e tombamento de plântulas.

Em câmara de incubação a 25°C, um experimento em delineamento inteiramente casualizado foi realizado para determinar a atividade *in vivo* dos extratos dos metabólitos secundários do fungo *P. boninensis* contra os fitopatógenos. Copos plásticos de 50mL foram preenchidos com solo previamente esterilizado. Um grão de arroz colonizado por *Sclerotium rolfsii* ou *Rhizoctonia solani*, foi posicionado no centro de cada copo plástico a um centímetro de profundidade e os substratos dos copos foram irrigados diariamente, durante 7 dias. Após esse período, três sementes de tomate cultivar Santa Clara, foram semeadas de maneira equidistante nos copos plásticos contendo solo. Juntamente com a semeadura, foi realizada aplicação de 10 mL do extrato fúngico de *P. boninensis* próximo às sementes, já no tratamento controle foram aplicados 10mL de água autoclavada. A avaliação foi realizada com base na germinação de sementes e tombamento de plântulas.

Ação de *Pochonia boninensis* sobre *Meloidogyne javanica* *in vitro*

Para a realização dos testes, foi utilizado inóculo de *Meloidogyne javanica* multiplicado em plantas de tomateiro cultivadas em casa de vegetação. Para a extração dos ovos, as raízes de plantas contendo galhas foram selecionadas. As raízes foram fragmentadas em pequenos pedaços e colocadas no liquidificador previamente desinfestado com hipoclorito a 2%. Foi adicionado uma solução de cloro ativo a 0,5% até imergir as raízes completamente (Hussey, 1973; Boneti, 1981). As raízes foram processadas no liquidificador durante 15 segundos. Após o processamento, a solução foi separada por peneiras de 200 e 500 mesh. Os ovos que ficaram retidos na peneira de 500 mesh foram recuperados com água corrente em um frasco estéril. Utilizando a metodologia de funil de Baermann, a partir de ovos de *M. javanica*, juvenis em estágio J2, foram obtidos para os estudos com nematoides.

Para testar o efeito direto do extrato de metabólitos secundários do isolado Pc-17 contra os juvenis de *M. javanica*. Cerca de 40 juvenis (J2) foram colocados em microtubos tipo Eppendorf contendo 2mL de solução do extrato de metabólitos secundários a 10000 ppm e

como controle os nematoides foram colocados em água estéril. Os nematoides ficaram na solução durante 24, 48 e 72 horas. Após cada período, o número de nematoides mortos foi registrado. Cada tratamento contou com oito repetições em delineamento inteiramente casualizado.

Para testar o efeito direto do extrato de metabólitos secundários do isolado Pc-17 sobre a eclosão dos ovos de juvenis de *M. javanica*, cerca de 200 ovos foram colocados em microtubos tipo Eppendorf contendo 2mL de solução do extrato de metabólitos secundários a 10000 ppm e como controle os ovos foram colocados em água estéril. Os ovos ficaram na solução durante 24, 48 e 72 horas. Após cada período, o número de ovos eclodidos foi avaliado. Cada tratamento contou com 8 repetições em delineamento inteiramente casualizado.

Um experimento de microcosmos foi realizado para identificar a melhor concentração de esporos do fungo *Pochonia boninensis* que ocasione maior mortalidade de nematoides *in vitro*. O experimento seguiu o delineamento inteiramente casualizado com sete repetições. Copos descartáveis de 80 mL foram preenchidos com solo esterilizado. Foram colocados 1000 ovos de *Meloidogyne javanica* em cada copo contendo o solo. O ensaio contou com os seguintes tratamentos: 5000, 10000, 15000 e 20000 esporos de *Pochonia boninensis* por grama de solo, controle negativo com água autoclavada e o controle positivo com 5000 clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) por grama de solo. O experimento foi avaliado após 10 dias da montagem por meio da mortalidade dos nematoides utilizando a metodologia de Funil de Baermann.

A capacidade do fungo *Pochonia boninensis* colonizar ovos e juvenis de nematoides foi testada em experimento *in vitro*. Tanto os ovos quanto os juvenis de *M. javanica* foram desinfestados superficialmente com lavagens sucessivas de soluções preparadas com água deionizada autoclavada e antibióticos. Solução 1: Nistatina 100.000 UI, Penicilina 0.02% e Cloranfenicol 0.12%. Solução 2: Cloramina T (4%). Solução 3 e 4: Cloranfenicol 300ppm e Ampicilina 200ppm. Após finalizar as lavagens com soluções contendo os antibióticos, os ovos e juvenis foram lavados três vezes em água destilada esterilizada. Cada uma das lavagens durou 15 minutos. Em placas de Petri, o meio-de-cultura ágar 2% foi vertido com a adição de estreptomicina. O isolado Pc-17 foi repicado ao centro da placa e incubado por 4 dias a 25°C. Após este período cerca de 200 ovos e 30 juvenis foram posicionados na periferia da placa. Como controle negativo foi utilizada água deionizada autoclavada e o controle positivo foi composto por apenas ovos ou juvenis do nematoide na ausência do fungo. As distribuições das

placas seguiram o delineamento inteiramente casualizado. As avaliações foram realizadas diariamente ao longo de 15 dias.

Ação de *Pochonia boninensis* sobre *Meloidogyne javanica* in vivo

Em duas épocas diferentes, a capacidade do isolado Pc-17 de controlar *Meloidogyne javanica* in planta foi testada em casa de vegetação. O primeiro experimento foi montado em setembro de 2020 e o segundo experimento foi montado em janeiro de 2021. No total o experimento contava com oito tratamentos, sendo estes: o tratamento testemunha contendo água deionizada, 5000 esporos de Pc-17 por grama de solo, 10000 esporos de Pc-17 por grama de solo, 15000 esporos de Pc-17 por grama de solo, 20000 esporos de Pc-17 por grama de solo, 20 mL de extrato de metabólitos secundários de Pc-17, 5000 clamidósporos de Pc-10 por grama de solo e 20 mL de extrato de Pc-10. Vasos de 2 L foram preenchidos com solo previamente esterilizado. No dia do transplântio das mudas de tomate, as plantas foram tratadas conforme cada tratamento e o solo foi infestado com 2000 ovos de *Meloidogyne javanica*. Após 45 dias do transplântio das mudas, foram avaliadas as seguintes variáveis: altura, massa fresca, massa seca, quantidade de galhas e número de ovos de nematoide por planta. O delineamento adotado foi o de blocos casualizados com oito repetições.

Promoção de crescimento

Um experimento *in vitro* foi realizado para testar a capacidade do fungo *P. boninensis* em solubilizar fósforo. Foi preparado um meio de cultura contendo os ingredientes: glicose (10g/L), NH₄Cl (5g/L), NaCl (1g/L), (MgSO₄)7H₂O (1g/L), Ca₃(PO₄)₂ (170mg/L) e ágar (20g/L). O meio foi vertido em placas de Petri após ser autoclavado e discos de BDA colonizados por *P. boninensis* foram posicionados no centro das placas. O controle foi feito com discos de BDA não-colonizados. O intuito foi observar a presença de halo, que indica que o fungo solubiliza o P presente no meio. O tamanho da colônia (Co) e o tamanho do halo (Ha) foram observados e mensurados. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado.

Foi realizado um experimento para avaliar a capacidade do fungo *Pochonia boninensis* e de seu extrato de metabólitos em promoverem crescimento de plantas de tomateiro em janeiro de 2020. Foram utilizados sete tratamentos, sendo estes: o tratamento testemunha contendo água deionizada, 5000 esporos de Pc-17 por grama de solo, 10000 esporos de Pc-17 por grama de solo, 15000 esporos de Pc-17 por grama de solo, 20000 esporos de Pc-17 por grama de solo, 20mL de extrato de metabólitos secundários de Pc-17 e 5000 clamidósporos de Pc-10 por grama de solo. Vasos de 3 litros foram preenchidos com solo previamente esterilizado. No dia do

transplântio das mudas de tomate, as plantas receberam os respectivos tratamentos. O experimento foi avaliado 45 dias após o transplântio das mudas. Foram avaliados os parâmetros: altura das plantas, massa fresca e massa seca de parte aérea e raiz, número de folhas, número de nós. Utilizando a técnica de impressão de epiderme, amostras de folha foram retiradas de todos os tratamentos para realizar a contagem dos estômatos e comparação entre os tratamentos. Utilizando o equipamento IRGA foi estimado valores para análise fotossintética em plantas, variações nas concentrações de CO₂ e de vapor de água foram calculadas para mensurar o carbono presente no mesófilo foliar (C_i), a taxa de fotossíntese líquida (A), a condutância estomática (g_s) e a transpiração (E). Com estes valores foi possível estimar a eficiência na carboxilação pela Rubisco (A/C_i), eficiência no uso instantâneo de água (A/E) e eficiência no processo fotossintético (A/g_s). A enzima Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO), responsável pela fixação do CO₂ em plantas, tem sua atividade carboxilase afetada em condições de estresse (GALMÉS et al., 2013). O delineamento adotado foi o de blocos casualizados com oito repetições.

Estatística

O teste de Shapiro-wilk e o teste de Bartlett foram aplicados para avaliar a normalidade dos resíduos e a homogeneidade da variância, respectivamente. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Preparo dos isolados e extratos de metabólitos fúngicos

O substrato que obteve maior produção de esporos por *P. boninensis* foi a cevada. Este substrato foi escolhido como padrão para dar seguimento aos estudos (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação de esporulação de Pc-17 em 10 gramas de diferentes substratos.

Tratamento	Conídios totais
Cevada	5,38E+07 a
Arroz	3,05E+07 b
Milho	2,35E+07 c
Trigo	1,16E+07 d
CV	0,54

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste Duncan, a 5% de probabilidade.

Ação de *Pochonia boninensis* sobre *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani* in vitro

Para a utilização dos fitopatógenos fúngicos, foi observado que um grão de arroz colonizado pelo período de 7 dias, tanto pelo fungo *Sclerotium rolfsii* quanto para o fungo *Rhizoctonia solani* foi o suficiente para causar doença em plantas de tomate.

O extrato do fungo *Pochonia boninensis*, no experimento *in vitro* dos poços em BDA, não inibiram o desenvolvimento dos fitopatógenos *S. rolfsii* e *R. solani* em nenhuma das concentrações testadas (Dados não mostrados).

Ação de *Pochonia boninensis* sobre *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani* in vivo

Em relação ao experimento *in vivo*, tanto o extrato metabólico do fungo Pc17, quanto os esporos do fungo em diferentes concentrações não reduziram a incidência das doenças causadas pelos patógenos *S. rolfsii* e *R. solani* (Tabela 2).

Tabela 2. Incidência de *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani* sobre plantas de tomate.

Tratamento	<i>Sclerotium rolfsii</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
Testemunha	83,4% a	95,9% a
Extrato Pc17	91,7% a	100,0% a
Pc17-5000 esporos por grama de solo	87,5% a	100,0% a
Pc17-10000 esporos por grama de solo	87,5% a	91,7% a
Pc17-15000 esporos por grama de solo	83,4% a	100,0% a
Pc17-20000 esporos por grama de solo	79,2% a	95,9% a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste Duncan, a 5% de probabilidade.

Ação de *Pochonia boninensis* sobre *Meloidogyne javanica* in vitro

O teste para avaliar a ação do extrato 10000 ppm contra o *M. javanica* *in vitro* foi realizado utilizando-se os extratos obtidos a partir da colonização de *P. boninensis* cultivado em cevada. O extrato não teve efeito sobre a mortalidade e mobilidade de juvenis em nenhum dos tempos testados (Tabela 3).

Tabela 3. Mortalidade de *Meloidogyne javanica* na presença de extrato fúngico de Pc-17.

Tratamento	24 horas	48 horas	72 horas
Testemunha	5,93% a	5,65% a	6,41% a
Extrato-10000ppm	5,49% a	5,70% a	6,90% a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste Duncan, a 5% de probabilidade.

Utilizando o extrato na mesma concentração de 10000 ppm, não foi observada redução da eclosão dos ovos tratados com o extrato fúngico em comparação com o controle nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Tabela 4. Eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* na presença de extrato de metabólitos fúngicos de Pc-17

Tratamento	24 horas	48 horas	72 horas
Testemunha	36,87 a	49,87 a	61,62 a
Extrato-10000ppm	31,87 a	48,12 a	58,72 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste Duncan, a 5% de probabilidade.

Em relação ao experimento com microcosmos, houve diferença estatística entre os tratamentos. Com exceção do tratamento que continha a concentração de 10000 esporos de *P. boninensis* por grama de solo, todos os outros diferiram estatisticamente do tratamento testemunha em relação à eclosão de ovos (Tabela 5).

Tabela 5. Número de J2 de *M. javanica* recuperados de solo após 7 dias de incubação a 25°C.

Tratamento	Juvenis
Pc10-5000 clamidósporos por grama de solo	225 a
Pc17-5000 esporos por grama de solo	280 ab
Pc17-10000 esporos por grama de solo	332 bc
Pc17-15000 esporos por grama de solo	274 ab
Pc17-20000 esporos por grama de solo	278 ab
Testemunha	365 c
CV	16,90%

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste Duncan, a 5% de probabilidade.

Em relação ao teste de parasitismo, o fungo *P. boninensis* apresentou *in vitro* a capacidade de colonizar tanto ovos, quanto juvenis de segundo estágio de *M. javanica*. A partir do décimo dia, os nematoides nas placas em que o fungo estava presente, começaram a apresentar sinais de imobilização e colonização fúngica. No décimo quarto dia, foram visualizados micélios e conídios de *P. boninensis* sobre a cutícula dos nematoides e morte (Figura 1). No tratamento controle, na ausência do fungo, os nematoides permaneceram com alta mobilidade.

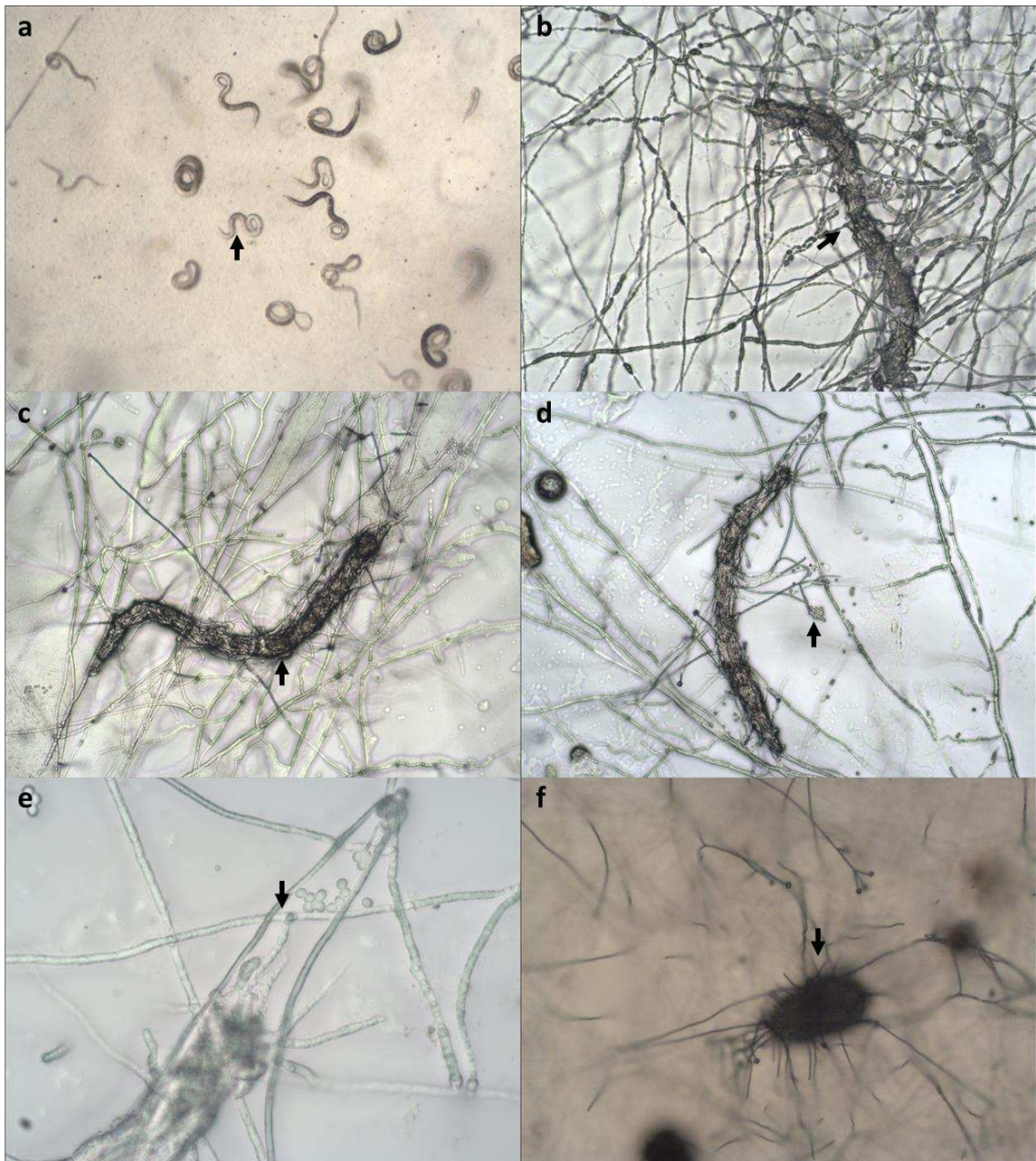


Figura 1: Parasitismo de juvenis e ovos de *Meloidogyne javanica* por *Pochonia boninensis* em placa de Petri contendo ágar-ágar após 14 dias de incubação a 25°C. Nematóide do tratamento testemunha (a); nematóide colonizado pelo Pc-17 (b; c); conidióforo e conídios a partir do corpo do nematóide (d; e); ovo de nematóide colonizado (f). Seta indica em: a nematóide saudável; em b e c nematóide colonizado; em d e e conidióforo + conídios; em f, o ovo colonizado.

Ação de Pochonia boninensis sobre Meloidogyne javanica in vivo

Dois experimentos foram realizados em casa de vegetação para testar a capacidade do isolado de *P. boninensis* no controle de nematoides (Tabela 6 e Tabela 7). No primeiro experimento, apenas quando *P. boninensis* foi aplicado na dose de 10000 esporos por grama de

solo, houve diferença estatística no número de galhas em relação ao controle. Em relação ao número de ovos, todas as doses de *P. boninensis* reduziram essa variável, chegando a 60% de redução.

Tabela 6. Número de ovos e galhas de *Meloidogyne javanica* por sistema radicular de tomateiro, 1º experimento.

Tratamento	Ovos	Galhas
Pc10-5000 clamidósporos por grama de solo	166583 cd	210 bc
Pc17-5000 esporos por grama de solo	128416 bc	224 bc
Pc17-10000 esporos por grama de solo	88833 ab	181 ab
Pc17-15000 esporos por grama de solo	135333 bc	270 bc
Pc17-20000 esporos por grama de solo	142833 bc	228 bc
Extrato Pc10	156000 bcd	237 bc
Extrato Pc17	153416 bcd	232 bc
Testemunha	223583 d	290 c
CV	26%	14%

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste Duncan, a 5% de probabilidade.

Já no segundo experimento, além da dose de 10000 esporos de *P. boninensis*, a dose de 5000 e os tratamentos com *P. chlamydosporia* e extrato de *P. boninensis* reduziram significativamente o número de ovos por planta em relação à testemunha chegando a uma redução de 31% (Tabela 7). Em relação ao número de galhas, todos os tratamentos diferiram estatisticamente do tratamento testemunha e os tratamentos que proporcionaram maiores reduções foram com *P. chlamydosporia* e com *P. boninensis* nas doses de 5000 e 10000 de esporos por grama de solo, respectivamente.

Tabela 7. Número de ovos e galhas de *Meloidogyne javanica* por sistema radicular de tomateiro, 2º experimento.

Tratamento	Ovos	Galhas
Pc10 - 5000 clamidósporos por grama de solo	223333 a	352 ab
Pc17 - 5000 esporos por grama de solo	241000 a	372 ab
Pc17 - 10000 esporos por grama de solo	232000 a	326 a
Pc17 - 15000 esporos por grama de solo	342666 c	418 bc
Pc17 - 20000 esporos por grama de solo	276333 bc	408 bc
Extrato de Pc10	284333 bc	416 bc
Extrato de Pc17	262333 ab	456 c
Testemunha	324333 bc	599 d
CV	16%	20%

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste Duncan, a 5% de probabilidade.

Tabela 8. Efeito de doses de Pc-17 de *Pochonia boninensis* sobre reprodução de *Meloidogyne javanica* e sintomas em raízes de tomateiro.

Tratamento	Ovos	Galhas
Pc17 - 0 esporo por grama de solo	324333	599
Pc17 - 5000 esporos por grama de solo	241000	372
Pc17 - 10000 esporos por grama de solo	232000	326
Pc17 - 15000 esporos por grama de solo	342666	418
Pc17 - 20000 esporos por grama de solo	276333	408
Efeito da dose de Pc17	$Y=349011-49,01x+0,005957x^2$ $r^2=46,79$ p Valor = 0,000	$Y=558,4-0,06887x+0,000006x^2$ $r^2=58,19$ p Valor = 0,007
CV	17.36%	24.48%

Promoção de crescimento vegetal

O efeito de promoção de crescimento do fungo *P. boninensis* sobre as plantas de tomate pôde ser observado. Em relação aos parâmetros massa de raiz fresca, massa de parte aérea fresca e diâmetro da base do caule, nos tratamentos com aplicação de *P. boninensis* as doses de 5000, 10000 e 15000 esporos por grama de solo diferiram estatisticamente do tratamento testemunha. Em relação ao número de estômatos na face abaxial da folha, utilizando-se a média da área de 1mm, apenas quando *P. boninensis* foi aplicado nas doses de 5000 e 10000 esporos por grama de solo houve diferença em relação ao tratamento testemunha (Tabela 9). Para os parâmetros altura de plantas, número de nós e número de folhas expandidas, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 9. Desenvolvimento vegetal e número de estômatos/mm² de tomateiros tratados com esporos e metabólitos de *Pochonia boninensis*.

Tratamento	MRF (g)	MPAF (g)	DC (cm)	NE
------------	---------	----------	---------	----

Pc17 - 5000 esporos por grama de solo	10,53 ab	28,61 bc	5,88 ab	70,25 ab
Pc17 - 10000 esporos por grama de solo	10,42 ab	28,90 ab	5,90 ab	72,75 a
Pc17 - 15000 esporos por grama de solo	10,85 ab	28,90 ab	6,10 ab	63,62 bc
Pc17 - 20000 esporos por grama de solo	10,01 bc	27,38 bcd	5,57 bc	60,37 c
Extrato Pc17	9,31 bc	25,73 cd	5,75 ab	59,75 c
Testemunha	8,41 c	24,71 d	5,23 c	62,75 c
CV	9%	7%	5%	8%

MRF = massa de raízes frescas, MPAF = massa de parte aérea fresca, DC = diâmetro do caule e NE = número de estômatos. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste Duncan, a 5% de probabilidade.

Em relação aos dados de massa de material vegetal seco, pode-se observar que *Pochonia boninensis* aplicado nas doses de 5000, 10000 e 15000 esporos por grama de solo diferiram estatisticamente do tratamento testemunha, tanto em relação à massa de raiz, quanto à massa de parte aérea e massa total da planta secas. O tratamento com extrato de *Pochonia boninensis* a 10000 ppm diferiu estatisticamente do tratamento testemunha apenas no parâmetro de massa de parte aérea (Tabela 10).

Tabela 10. Desenvolvimento vegetal de tomateiros tratados com *Pochonia boninensis*.

Tratamento	MRS (g)	MPAS (g)	MPS (g)
Pc17 - 5000 esporos por grama de solo	1,39 a	4,99 a	6,38 a
Pc17 - 10000 esporos por grama de solo	1,31 a	4,87 a	6,18 a
Pc17 - 15000 esporos por grama de solo	1,45 a	5,09 a	6,55 a
Pc17 - 20000 esporos por grama de solo	1,01 b	4,24 bc	5,25 b
Extrato Pc17	0,75 c	4,36 b	5,12 b
Testemunha	0,84 bc	3,92 c	4,77 b
CV	27%	10%	13%

MRS = massa de raízes secas, MPAS = massa de parte aérea seca e MPS = massa de planta seca. Médias Seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste Duncan, a 5% de probabilidade.

A taxa de transpiração (E) nos tratamentos com *P. boninensis* nas doses 5000 e 10000 esporos por grama de solo foram estatisticamente menores em relação a testemunha (Tabela 11).

Tabela 11. Alterações fisiológicas de tomateiros tratados com esporos e metabólitos de *Pochonia boninensis*.

Tratamento	Ci	E	gs	A
Pc17 - 5000 esporos por grama de solo	306,33 ab	1,92 a	0,111 a	9,16 a
Pc17 - 10000 esporos por grama de solo	296,94 a	1,97 a	0,103 a	8,98 a
Pc17 - 15000 esporos por grama de solo	301,89 ab	2,47 ab	0,129 a	10,17 a
Pc17 - 20000 esporos por grama de solo	304,67 ab	2,24 ab	0,117 a	9,00 a
Extrato Pc17	329,94 b	2,34 ab	0,142 a	8,96 a
Testemunha	322,89 ab	2,56 b	0,134 a	8,77 a
CV	4%	12%	12%	5%

Taxa de carbono no mesófilo foliar (Ci), fotossíntese líquida (A), condutância estomática (gs) e transpiração (E) de tomateiro tratados com esporos e metabólitos de *Pochonia boninensis*. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste Duncan, a 5% de probabilidade.

Em relação ao parâmetro de eficiência no uso instantâneo de água (A/E), apenas os tratamentos com *P. boninensis* nas doses de 5000, 10000 e 15000 esporos por grama de solo obtiveram taxas maiores e diferiram estatisticamente do tratamento controle (Tabela 12). Em relação à eficiência do processo fotossintético (A/gs), foi possível observar que *P. boninensis* nas doses de 5000 e 10000 esporos por grama de solo foram superiores aos outros tratamentos, sendo que estes dois já citados também diferiram estatisticamente em relação ao tratamento controle (Tabela 12).

Tabela 12. Efeito de *Pochonia boninensis* sobre parâmetros fisiológicos do tomateiro.

Tratamento	A/Ci	A/E	A/gs
Pc17 - 5000 esporos por grama de solo	0,0302 a	4,84 a	83,75 ab
Pc17 - 10000 esporos por grama de solo	0,0306 a	4,63 ab	87,28 ab
Pc17 - 15000 esporos por grama de solo	0,0339 a	4,12 b	79,67 bc
Pc17 - 20000 esporos por grama de solo	0,0294 a	4,02 bc	80,93 bc
Extrato Pc17	0,0275 a	3,90 c	65,74 c
Testemunha	0,0274 a	3,43 c	67,43 c
CV	8%	12%	11%

Eficiência da rubisco (A/Ci), eficiência no uso da água (A/E) e eficiência fotossintética (A/gs) de tomateiros tratados com esporos e metabólitos de *Pochonia boninensis*. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste Duncan, a 5% de probabilidade.

O fungo *P. boninensis* foi capaz de formar halo de solubilização de fósforo como observado na Figura 2. As médias dos diâmetros das colônias formadas nos tempos 24, 48 e 72 foram respectivamente 0,68, 0,92 e 1,46 cm. As médias dos diâmetros dos halos formados nos tempos 24, 48 e 72 horas foram respectivamente 1,54, 2,40 e 3,42 cm.

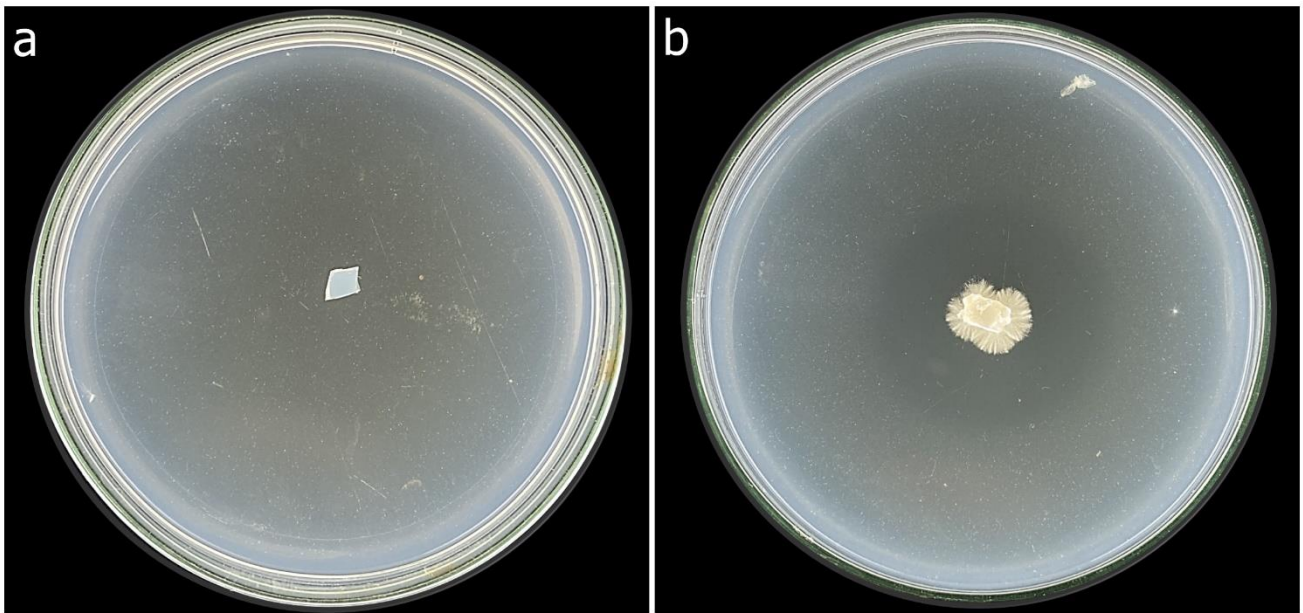


Figura 2: Solubilização de fosfato por *Pochonia boninensis* Pc-17 em meio de cultura. Testemunha (a) e *Pochonia boninensis* Pc-17 (b).

DISCUSSÃO

O fungo *P. boninensis* se revelou um eficiente agente de controle biológico do nematoide de galhas, *M. javanica*. A sua produção massal foi favorecida pelo uso da cevada em relação aos outros grãos utilizados como substrato, possivelmente porque este grão tem um alto teor de proteína, atendendo melhor às condições nutricionais requeridas.

Apesar do isolado Pc-17 de *P. boninensis* (o mesmo utilizado nesse trabalho) possuir a capacidade de reduzir a germinação dos esporos e a severidade da doença causada por *Alternaria grandis* (Matos, 2020), observamos aqui que nem o isolado, nem o seu extrato fúngico, tiveram efeitos sobre os patógenos fúngicos *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani*. Uma hipótese para o extrato fúngico não reduzir a incidência das doenças testadas neste trabalho foi o fato de estarmos trabalhando com patógenos habitantes do solo. O extrato fúngico, estando ser exposto à microbiota do solo, pode ter sido degradado e perdido seu efeito. Outra hipótese é que os patógenos utilizados neste trabalho são pertencentes ao filo Basidiomycota e o fungo *A. grandis*, utilizado no trabalho anterior, é pertencente ao filo Ascomycota. Dessa forma, mesmo sendo filos próximos, as fisiologias dos patógenos são muito divergentes. Isto pode ser um dos motivos da divergência dos resultados.

Apesar do extrato fúngico não ter causado morte dos nematoides nem ter diminuído a taxa de eclosão dos ovos, nada impede que eles tenham alguma função no modo de ação do fungo sobre os nematoides, uma vez que é comum entre os fungos antagonistas de nematoides a liberação de compostos que podem atrair ou repelir estes patógenos (Ji Field, 1977; Jansson, 1982; Schouten, 2016), além de poderem possuir elicitores responsáveis por indução de resistência (Santos *et al.*, 2017; Suarez-Fernandez *et al.*, 2021). Estudos futuros precisam ser realizados para confirmar se os metabólitos secundários da espécie *P. boninensis* apresentam algum destes efeitos. Em relação ao efeito dos extratos de metabólitos fúngicos produzidos, muitos estudos indicam que a própria fisiologia de agentes de controle biológico pode se alterar ao entrar em contato com o patógeno, e isto pode explicar o motivo da utilização do fungo *in natura* pode causar essa diminuição de população, enquanto que o extrato de metabolitos fúngicos obtidos a partir de uma cultura pura, não obteve resultado (Bogner *et al.*, 2017).

Mesmo observando que o extrato de metabólitos fúngicos do Pc-17 não teve efeito direto sobre a eclosão ou mortalidade dos juvenis de *M. javanica*, a partir dos resultados obtidos com o microcosmo, foi possível observar que o estabelecimento do fungo no solo interferiu negativamente sobre a população de *Meloidogyne javanica*. Um diferencial deste fungo sobre *Pochonia chlamydosporia* é que além de parasitar ovos (Braga *et al.*, 2008; Dallemole-Giaretta *et al.*, 2014; Monteiro *et al.*, 2017) ele também parasita juvenis. Foi possível observar que os juvenis parasitados não estavam em posição de morte típica da espécie, e além disso era possível encontrar nematoides presos entre os micélios do isolado. Assim, podemos chegar à conclusão de que uma das maneiras que o *P. boninensis* age, pode ser através de ação direta sobre os ovos e juvenis.

Quando *P. boninensis* foi aplicado em concentrações mais elevadas, foi menos eficiente no controle de *M. javanica* em tomateiro. Isto pode ser explicado devido ao efeito de auto inibição que fungos apresentam quando estão no ambiente em altas concentrações (Filip e Roth, 1976; Sajili *et al.*, 2013). Dessa forma, é muito importante estudar qual a melhor dose em que cada microrganismo tem seu melhor desempenho. As melhores doses de aplicação do fungo *P. boninensis* são: 5000 e 10000 esporos por grama de solo para o controle dos nematoides.

Assim como *P. chlamydosporia*, *P. boninensis* também é capaz de solubilizar fósforo e promover o crescimento de plantas de tomate. Este efeito pode ser responsável pelo aumento nos parâmetros que caracterizam a promoção de crescimento vegetal. Uma planta com maior disponibilidade de fósforo consegue realizar com mais eficiência os processos metabólicos (Gouveia *et al.*, 2019).

Pochonia chlamydosporia, por meio de alterações fisiológicas, consegue aprimorar o desenvolvimento de tomate (Escudero e Lopez-Llorca, 2012), no presente estudo através de parâmetros de promoção, pode-se observar que *P. boninensis* também possui o mesmo efeito. Apesar de *P. boninensis* ter aumentado a densidade de estômatos na parte abaxial da folha, o fungo reduziu a taxa de transpiração das plantas. Este efeito, pode ter ocorrido devido a um melhor funcionamento, redução do estresse e melhor aproveitamento da água, quando comparado com o tratamento em que o fungo estava ausente (Larriba *et al.*, 2015). Como consequência disto, a planta inoculada com *P. boninensis* teve uma maior eficiência no uso instantâneo da água. Todas essas alterações, podem ser consequências da produção de compostos benéficos e fito-hormônios produzidos pelo fungo ou até consequência da interação fungo-planta. No gênero *Pochonia* já foram descritos compostos químicos, hormônios e alterações fisiológicas benéficas causadas pela interação com plantas (Maciá-Vicente *et al.*, 2009; Gouveia *et al.*, 2019; Coutinho *et al.*, 2021). Estas alterações tiveram como consequência uma maior promoção de crescimento das plantas tratadas com o fungo, levando a uma maior produção de massa fresca e seca total das plantas, maior diâmetro de caule entre outros parâmetros. Em estudos futuros, parâmetros de produtividade e qualidade dos frutos devem ser mensurados para um maior entendimento desta interação.

Apesar de não ter sido eficiente no controle dos fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, o isolado Pc17 de *P. boninenses* é promissor para se tornar componente ativo de produto comercial, já que demonstrou eficiência no controle de *M. javanica*, capacidade de promoção de crescimento do tomateiro e de solubilização de fósforo, sendo estas, características apreciadas em um produto à base de agentes de controle biológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOGNER, C. W.; KAMDEM, R. S. T.; SICHTERMANN, G.; MATTHÄUS, C.; HÖLSCHER, D.; POPP, J.; PROKSCH, P.; GRUNDLER, F. M. W.; SCHOUTEN, A. Bioactive secondary metabolites with multiple activities from a fungal endophyte. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 175-188, 2017.
- BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, n. 3, 1981.
- BORDALLO, J. J.; LOPEZ-LLORCA, L. V.; JANSSON, H. B.; SALINAS, J.; PERSMARK,

L.; ASENSIO, L. Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. **New Phytologist**, v. 154, n. 2, p. 491-499, 2002.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. M.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R.; TAVELA, A. O. In vitro evaluation of the action of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Fasciola hepatica* eggs. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 1559-1564, 2008.

COUTINHO, R. R.; PACHECO, P. V. M.; MONTEIRO, T. S. A.; BALBINO, H. M.; MOREIRA, B. C.; FREITAS, L. G. Root colonization and growth promotion of cover crops by *Pochonia chlamydosporia*. **Rhizosphere**, v. 20, p. 100432, 2021.

CREWS, T. E.; CARTON, W.; OLSSON, L. Is the future of agriculture perennial? Imperatives and opportunities to reinvent agriculture by shifting from annual monocultures to perennial polycultures. **Global Sustainability**, v. 1, 2018.

CULMAN, S. W.; DUPONT S.T; GLOVER J. D.; BUCLEY D. H.; FICK G. W.; FERRIS H.; CREWS T. E. Long-term impacts of high-input annual cropping and unfertilized perennial grass production on soil properties and belowground food webs in Kansas, USA. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 137, n. 1-2, p. 13-24, 2010.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; DA SILVA, M. de C. S.; KASUYA, M. C. M.; FERRAZ, S. Incorporação ao solo de substrato contendo micélio e conídios de *Pochonia chlamydosporia* para o manejo de *Meloidogyne javanica*. **Ciência Rural**, v. 44, p. 629-633, 2014.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; DA SILVA, M. de C. S.; KASUYA, M. C. M.; FERRAZ, S. *Pochonia chlamydosporia* promove crescimento de tomateiro e alface. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 37, n. 4, p. 417-423, 2015.

DOWLING, D. N.; O'GARA, F. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. **Trends in Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 133-141, 1994.

ELAD, Y.; BARAK, R.; CHET, I. Prevention, with *Trichoderma harzianum* Rifai aggr., of reinfestation by *Sclerotium rolfsii* Sacc. and *Rhizoctonia solani* Kühn of soil fumigated with methyl bromide, and improvement of disease control in tomatoes and peanuts. **Crop protection**, v. 1, n. 2, p. 199-211, 1982.

ELAD, Y.; HADAR, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 16, n. 4, p. 381-386, 1984.

EMMERT, E. A.; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. **FEMS Microbiology letters**, v. 171, n. 1, p. 1-9, 1999.

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

EVANS, H. C.; KIRK, P. M. Systematics of *Pochonia*. **Perspectives in sustainable nematode management through *Pochonia chlamydosporia* applications for root and rhizosphere health**, p. 21-43, 2017.

FIELD, J. I.; WEBSTER, J. Traps of predacious fungi attract nematodes. **Transactions of the British mycological Society**, v. 68, n. 3, p. 467-469, 1977.

FILIP, G. M. **Chemical applications for control of Armillaria root rot of ponderosa pine**. 1976.

GALMÉS, J.; ARANJUELO I.; MEDRANO H.; FLEXAS J. Variation in Rubisco content and activity under variable climatic factors. **Photosynthesis research**, v. 117, n. 1, p. 73-90, 2013.

GOUDJAL, Y.; TOUMATIA, O.; YEKKOUR, A.; SABAOU, N.; MATHIEU, F.; ZITOUNI, A. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 59-65, 2014.

GOUVEIA, A. S.; MONTEIRO, T. S. A.; VALADARES, S. V.; SUFIATE, B. L.; FREITAS, L. G.; RAMOS, H. J. de O.; DE QUEIROZ, J. H. Understanding how *Pochonia chlamydosporia* increases phosphorus availability. **Geomicrobiology Journal**, v. 36, n. 8, p. 747-751, 2019.

HAILMI, M. S.; KADIR J.; NG S. C.; RAHIM A. A. Effect of inoculum form of *Exserohilum longirostratum* on disease development. **Journal Of Agrobiotechnology**, v. 4, p. 43-56, 2013.

HIDALGO-DIAZ, L.; BOURNE, J. M.; KERRY, B. R.; RODRIGUEZ, M. G. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. **International Journal of Pest Management**, v. 46, n. 4, p. 277-284, 2000.

HODSON, A.; LEWIS E. Managing for soil health can suppress pests. **California Agriculture**, v. 70, n. 3, p. 137-141, 2016.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant disease**, v. 87, n. 1, p. 4-10, 2003.

HUANG, W.; CUI J.; LIU S.; KONG L.; WU Q.; PENG H.; HE W.; SUN J.; PENG D. Testing various biocontrol agents against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in cucumber plants identifies a combination of *Syncephalastrum racemosum* and *Paecilomyces lilacinus* as being most effective. **Biological control**, v. 92, p. 31-37, 2016.

HUSSEY, R. S. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Dis. Rep.**, v. 57, p. 1025-1028, 1973.

JANSSON, H. B. Predacity by nematophagous fungi and its relation to the attraction of nematodes. **Microbial Ecology**, v. 8, n. 3, p. 233-240, 1982.

LARRIBA, E.; JAIME M. D. L. A.; NISLOW C.; NIETO J. M.; LOPEZ-LLORCA L. V. Endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* reveals plant growth promotion and a general defense and stress transcriptomic response. **Journal of Plant Research**, v. 128, n. 4, p. 665-678, 2015.

LOPEZ-LLORCA, L. V.; BORDALLO, J. J.; SALINAS, J.; MONFORT, E.; LÓPEZ-SERNA, M. L. Use of light and scanning electron microscopy to examine colonisation of barley rhizosphere by the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium*. **Micron**, v. 33, n. 1, p. 61-67, 2002.

MACIÁ-VICENTE, J. G.; JANSSON, H. B.; TALBOT, N. J.; LOPEZ-LLORCA, L. V.. Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. **New phytologist**, v. 182, n. 1, p. 213-228, 2009.

MATOS, V. **Phylogenetic relations and antagonist actions of *Pochonia* spp.** Universidade Federal de Viçosa, 2020.

MONFORT, E.; LOPEZ-LLORCA, L. V.; JANSSON, H. B.; SALINAS, J.; PARK, J. O.; SIVASITHAMPARAM, K. 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**, v. 37, n. 7, p. 1229-1235, 2005.

MONTEIRO T. S. A.; LOPES, E. A.; EVANS, H. C.; FREITAS, L. G. Interactions between *Pochonia chlamydosporia* and nematodes. In: **Perspectives in Sustainable Nematode Management Through *Pochonia chlamydosporia* Applications for Root and Rhizosphere Health**. Springer, Cham, 2017. p. 77-96.

MUTHULAKSHMI, M.; KUMAR, S.; SUBRAMANIAN, S.; ANITA, B. Compatibility of *Pochonia chlamydosporia* with other biocontrol agents and carbofuran. **Journal of Biopesticides**, v. 5, p. 243, 2012.

NASU, E. G. C.; MONTEIRO, T. S. A.; AMORA, D. X.; ALVES, P. S.; PODESTÁ, G. S.; FERREIRA, F. C.; FREITAS, L. G. Pesticides on the viability of *Pochonia chlamydosporia* for controlling *Meloidogyne incognita*. **Australasian Plant Pathology**, v. 48, n. 4, p. 331-338, 2019.

NIU, X. M. Secondary metabolites from *Pochonia chlamydosporia* and other species of *Pochonia*. In: **Perspectives in Sustainable Nematode Management Through *Pochonia chlamydosporia* Applications for Root and Rhizosphere Health**. Springer, Cham, 2017. p. 131-168.

NIU, X. M.; WANG, Y. L.; CHU, Y. S.; XUE, H. X.; LI, N.; WEI, L. X.; MO, M. H.; ZHANG, K. Q. Nematodetoxic aurovertin-type metabolites from a root-knot nematode parasitic fungus *Pochonia chlamydosporia*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 2, p. 828-834, 2010.

NONAKA, K.; OMURA, S.; MASUMA, R.; KAIFUCHI, S.; MASUMA, R. Three new *Pochonia* taxa (Clavicipitaceae) from soils in Japan. **Mycologia**, v. 105, n. 5, p. 1202-1218, 2013.

OERKE, E. C. Crop losses to pests. **The Journal of Agricultural Science**, v. 144, n. 1, p. 31-43, 2006.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008.

PARMETER, J. R.; WHITNEY, H. S. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state-*Rhizoctonia solani*. In: **Biology and Pathology**. University of California Press Berkeley, USA, 1970. p. 7-19.

PODESTÁ, G. S.; FREITAS L. G.; DALLEMOLE-GIARETTA R.; ZOOCA R. J. F; CAIXETA L. B; FERRAZ S. *Pochonia chlamydosporia*, *Gracilibacillus dipsosauri* e condicionador de solo para o controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 39, p. 122-125, 2013.

PUNJA, Z. K. The biology, ecology, and control of *Sclerotium rolfsii*. **Annual review of Phytopathology**, v. 23, n. 1, p. 97-127, 1985.

RAAIJMAKERS, J. M.; PAULITZ T. C.; STEIMBERG C.; ALABOUVETTE C.; MOENNE-LOCCOZ Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. **Plant and soil**, v. 321, n. 1, p. 341-361, 2009.

REINO, J. L.; GUERRERO, R. F.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R.; COLLADO, I. G. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 89-123, 2008.

RIVARD, C. L.; LOUWS, F. J. Grafting tomato with interspecific rootstock to manage diseases caused by *Sclerotium rolfsii* and southern root-knot nematode. **Plant disease**, v. 94, n. 8, p. 1015-1021, 2010.

ROSE, M.; AWOL, S.; WIM, W. Root-knot nematodes on tomatoes in Kyenjojo and Masaka districts in Uganda. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 38, p. 3598-3606, 2016.

SANTOS, M. C. V.; ABRANTES, I.; CURTIS, R. H. C. Priming plant defence responses can enhance the biological control of *Pochonia chlamydosporia* against root-knot nematodes. In: **Perspectives in Sustainable Nematode Management Through *Pochonia chlamydosporia* Applications for Root and Rhizosphere Health**. Springer, Cham, 2017. p. 295-309.

SCHOUTEN, A. Mechanisms involved in nematode control by endophytic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 54, p. 121-142, 2016.

SIDDIQUI, I. A.; SHAUKAT, S. S. Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamydosporia* for Control of Root-Infecting Fungi in Tomato. **Journal of Phytopathology**, v. 151, n. 4, p. 215-222, 2003.

STRASHNOV, Y.; ELAD, Y.; SIVAN, A.; RUDICH, Y.; CHET, I. Control of *Rhizoctonia solani* fruit rot of tomatoes by *Trichoderma harzianum* Rifai. **Crop Protection**, v. 4, n. 3, p. 359-364, 1985.

SUAREZ-FERNANDEZ, M.; SAMBLES, C.; LOPEZ-MOYA, F.; NUEDA, M. J.; STUDHOLME, D. J.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Chitosan modulates *Pochonia chlamydosporia* gene expression during nematode egg parasitism. **Environmental microbiology**, 2021.

SUMNER, D. R. Sclerotia formation by *Rhizoctonia* species and their survival. In: ***Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. Springer, Dordrecht, 1996. p. 207-215.

WHITEHEAD, A. G. **Plant nematode control**. CAB international, 1997.