

ROSANGELA DALLEMOLE GIARETTA

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE *Pochonia chlamydosporia* NO CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

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

T

G435i
2008

Giaretta, Rosangela Dallemole, 1973-
Isolamento, identificação e avaliação de
Pochonia chlamydosporia no controle de
Meloidogyne javanica e na promoção de crescimento
de tomateiro / Rosangela Dallemole Giaretta.
– Viçosa, MG, 2008.
xii, 83f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

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

1. *Pochonia chlamydosporia* - Identificação.
2. *Meloidogyne javanica*. 3. Fungos nematófagos -
Controle biológico. 4. Adubação verde. 5. Tomate -
Crescimento. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 632.45

ROSANGELA DALLEMOLE GIARETTA

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE *Pochonia chlamydosporia* NO CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO

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

APROVADA: 18 de fevereiro de 2008.



Prof. Silamar Ferraz
(Co-Orientador)



Prof. Ernani Luiz Agnes
(Co-Orientador)



Prof.^a Maria Catarina M. Kasuya



Pesq. Everaldo Antônio Lopes



Prof. Leandro Grassi de Freitas
(Orientador)

A Deus.

À minha família.

Aos meus amigos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade da realização do curso.

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

Ao meu orientador professor Leandro Grassi de Freitas, pela orientação, pela oportunidade e pelos ensinamentos repassados durante todo o tempo em que trabalhamos juntos, enfim, por toda a amizade e apoio.

Aos professores Silamar Ferraz e Ernani Luiz Agnes, pelas críticas, pela colaboração e pelas sugestões na elaboração deste trabalho.

Ao pesquisador Everaldo A. Lopes e à professora Catarina M. Kasuya, pelas sugestões para a correção deste trabalho.

Agradeço aos professores da UFV que contribuíram para a minha formação profissional e pela amizade.

Agradeço ao pesquisador Luis Vicente Lopez-Llorca, da Universidade de Alicante, Espanha, que gentilmente cedeu os isolados 52, 64, 75 e 123 de *P. chlamydosporia*.

Agradeço em especial aos amigos Wânia, Everaldo e Cristiane, pelos conselhos, pelas conversas e pela amizade.

Aos amigos de laboratório, Paulo Afonso, Guilherme, Marcelo, Cléia, Deisy, Ronaldo, Vanessa, Larissa e Janaína, pela amizade, pela ajuda e pelo agradável convívio.

Aos amigos Vivian, Robson, Antônio, Carla, Aderlan e Cláudia, pelos ótimos momentos em que convivemos em Viçosa.

Aos colegas do Departamento de Fitopatologia, pela amizade e apoio.

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

BIOGRAFIA

Rosangela Dallemole Giaretta, filha de Gabriel Dallemole e Angelina Dallemole, nasceu em Mariópolis, Paraná, em 5 de maio de 1973.

Em 2000, graduou-se em Agronomia pelo Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná - Unidade de Pato Branco, Pato Branco - Paraná.

Em 2003, obteve o título de mestre em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.

Em fevereiro de 2004, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, em nível de Doutorado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
Caracterização morfológica de isolados de <i>Pochonia chlamydosporia</i> obtidos de solos de cultivo de olerícolas	8
RESUMO	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1. Isolamento e identificação de isolados de <i>Pochonia</i>	11
2.2. Caracterização morfológica dos isolados de <i>Pochonia</i>	12
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
Seleção de isolados de <i>Pochonia chlamydosporia</i> para o controle de <i>Meloidogyne javanica</i>	21
RESUMO	21
ABSTRACT.....	22
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1. Produção de clamidósporos de <i>P. chlamydosporia</i>	24

	Página
2.2. Bioensaios em casa de vegetação.....	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
Efeito da concentração de clamidósporos de <i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> no controle de <i>Meloidogyne javanica</i>	37
RESUMO	37
ABSTRACT.....	38
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1. Produção de clamidósporos de <i>P. Chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	40
2.2. Condução do experimento	40
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
Avaliação de plantas de cobertura de solo em associação com <i>Pochonia chlamydosporia</i> para o controle de <i>Meloidogyne javanica</i>	47
RESUMO	47
ABSTRACT.....	48
1. INTRODUÇÃO.....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1. Multiplicação de <i>Meloidogyne javanica</i>	50
2.2. Produção de clamidósporos de <i>P. chlamydosporia</i> Pc-10.....	50
2.3. Montagem dos ensaios	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
<i>Pochonia chlamydosporia</i> como promotor de crescimento de plântulas de tomateiro	65
RESUMO	65
ABSTRACT.....	66
1. INTRODUÇÃO.....	67
2. MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1. Produção de clamidósporos	68
2.2. Ensaios <i>in vitro</i>	68
2.3. Preparo dos segmentos de raízes para microscopia óptica	70
2.4. Preparo dos segmentos de raízes para microscopia de varredura.....	70

	Página
2.5. Ensaio em casa de vegetação	70
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
CONCLUSÕES GERAIS	83

RESUMO

GIARETTA, Rosangela Dallemole, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Isolamento, identificação e avaliação de *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica* e na promoção de crescimento de tomateiro.** Orientador: Leandro Grassi de Freitas. Co-Orientadores: Silamar Ferraz e Ernani Luiz Agnes.

Vinte e nove isolados de *Pochonia chlamydosporia* foram obtidos de solos cultivados com olerícolas e naturalmente infestados com *Meloidogyne* spp. nos municípios de Viçosa (MG), Mariópolis (PR) e Venda Nova do Imigrante (ES). Desses isolados, 65,52 % foram identificados morfológicamente como *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* e 34,48 % como *P. chlamydosporia* var. *catenulata*. Tais isolados, juntamente com mais quatro isolados de *P. chlamydosporia* provenientes da Universidade de Alicante, Espanha, foram avaliados quanto ao potencial de controle de *Meloidogyne javanica*, em casa de vegetação. Dos trinta isolados testados, os isolados Pc-1, Pc-2, Pc-3, Pc-4, Pc-9, Pc-10, Pc-21, Pc-24, Pc-28 e Pc-64 foram os mais eficientes na redução do número de ovos do nematóide por sistema radicular. Na reavaliação destes isolados, os mais eficientes foram o Pc-64, proveniente da Espanha, com redução no número de ovos e de galhas de 72 e 10,4 %, respectivamente, e o isolado Pc-10, de Viçosa, com redução de 60 % quanto ao número de ovos e de 21,3 % quanto ao número de galhas. O isolado Pc-10 foi utilizado para testes posteriores. Quando aplicado ao solo infestado com

ovos de *M. javanica*, sete dias antes do plantio do tomate, esse isolado reduziu o número de ovos por sistema radicular quando comparado ao tratamento testemunha sem o fungo, mas não houve aumento da eficiência com o aumento da dose aplicada (5.000, 10.000, 15.000, 20.000 ou 25.000 clamidósporos/g de solo). A aplicação do fungo não reduziu o número de galhas por sistema radicular. No entanto, a aplicação deste isolado, na dose de 5.000 clamidósporos/g de solo, 15 dias antes do transplante do tomateiro em solo infestado com o nematóide, proporcionou reduções de 50 e 82 % nos números de galhas e ovos, respectivamente. Além disso, o isolado Pc-10 de *P. chlamydosporia* foi aplicado ao solo cultivado com plantas de cobertura de solo de verão ou de inverno para redução da população de *M. javanica*, em casa de vegetação. O cultivo das plantas de cobertura de solo, tanto de verão como de inverno, em associação ou não com *P. chlamydosporia*, promoveu reduções significativas na população de *M. javanica*. No ensaio com as plantas de verão, a aplicação de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* Pc-10 nos solos em pousio (solo nu) ou em cultivo sucessivo com tomateiro, não reduziu o número de galhas ou de ovos quando comparado com suas respectivas testemunhas. No entanto, no ensaio com as plantas de inverno, o antagonista reduziu o número de galhas nesses tratamentos bem como o número de ovos no tratamento pousio solo nu. Os isolados Pc-3, Pc-10 e Pc-19 promoveram o crescimento de plântulas de tomate quando crescidas em substrato de fibra de coco colonizado. A análise em microscópio óptico das raízes de plântulas de tomate crescidas em substrato com *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* Pc-19 permitiu observar que o fungo colonizou a rizosfera das plântulas em apenas 15 dias e produziu uma grande quantidade de clamidósporos. A análise em microscopia de varredura do isolado Pc-10 permitiu constatar que este isolado, além de colonizar o rizoplane das plantas, também penetra nas células epidérmicas da raiz de tomate.

ABSTRACT

GIARETTA, Rosangela Dallemole, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2008. **Isolation, identification and evaluation of *Pochonia chlamydosporia* for controlling *Meloidogyne javanica* and promoting growth in tomato plants.** Adviser: Leandro Grassi de Freitas. Co-Advisers: Silamar Ferraz and Ernani Luiz Agnes.

Twenty-nine isolates of *Pochonia chlamydosporia* were found in *Meloidogyne* infested-soils samples of vegetables crops from Viçosa (MG), Mariópolis (PR) and Venda Nova do Imigrante (ES). Among them, 65.52 % were identified as *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* and 34.48 % as *P. chlamydosporia* var. *catenulata*. The potential of these isolates including four isolates from Alicante – Spain, as biological control agents against *Meloidogyne javanica* on tomato plants was evaluated under greenhouse conditions. The isolates Pc-1, Pc-2, Pc-3, Pc-4, Pc-9, Pc-10, Pc-21, Pc-24, Pc-28 and Pc-64 were the most efficient in reducing the number of eggs of the nematode per root system. These isolates were re-evaluated and the most efficient were the Pc-64, originated from Alicante – Spain, reducing 72.0 % the number of eggs and 10.4 % the number of galls, and the Pc-10, originated from Viçosa – Brazil, reducing 60.0 % the number of eggs and 21.3 % the number of galls. The isolate Pc-10 was then used in the following experiments. When this isolate was added into the *M. javanica* infested-soil 7 days before the transplanting of the tomato seedlings, all chlamydospore rates (5,000, 10,000, 15,000, 20,000 or 25,000 per gram of soil) resulted in reduction of the number of eggs of *M. javanica* (up to 56 %), but no effect on the number the galls was observed. In

the following experiment, the application of 5,000 chlamyospores/g of soil of the antagonist 15 days before the transplanting of tomato reduced in 82 % the number of eggs and in 50 % the number of galls per root system. In another experiment, the isolate Pc-10 of *P. chlamydosporia* was used with summer cover crops, pearl millet (*Pennisetum americanum* (L.) Leek) and suriname grass (*Brachiaria decumbens* Stapf), or winter cover crops, black oat (*Avena strigosa* Schreb) and oil radish (*Raphanus sativus* var. *oliferus* Metzg), for reducing *Meloidogyne javanica* population in the soil was studied under greenhouse conditions. The cover crops treatments, associated or not with *P. chlamydosporia*, reduced the root-knot nematode population. *P. chlamydosporia* Pc-10 alone did not reduce the number of galls or eggs of the nematode in the summer experiment. On the other hand, the fungus alone reduced the number of galls and eggs of *M. javanica* in the winter experiment. The isolates Pc-3, Pc-10 and Pc-19 promoted the growth of tomato seedlings on coconut fiber substrate, *in vitro* conditions. The fungal isolate Pc-19 colonized the rhizosphere of tomato plants and produced a large amount of chlamyospores after 15 days. Scanning microscopy revealed that the isolate Pc-10 colonized the rhizoplane of the tomato plants in this same period and the hyphae penetrated the epidermal cells.

INTRODUÇÃO GERAL

A associação entre o fungo *Pochonia chlamydosporia* Zare & Gams (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard) e nematóides foi primeiramente documentada por Willcox e Tribe (1974), após ter sido isolado de ovos de *Heterodera schachtii* Schmidt. Posteriormente, esse fungo também foi isolado de ovos de *Heterodera avenae* Wollenweber (KERRY, 1975). Mais tarde, esse agente de biocontrole foi considerado o principal responsável pelo declínio da população de *H. avenae* em cultivares suscetíveis de cereais, num sistema de monocultivo (KERRY *et al.*, 1982).

Pochonia chlamydosporia também foi relatado por Morgan-Jones *et al.* (1981) e Godoy *et al.* (1983) como parasita de ovos e fêmeas de *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood, no Alabama, em campos de monocultivo de amendoim, e de várias outras espécies desse gênero de nematóide (FREIRE e BRIDGE, 1985; RIBEIRO e CAMPOS 1993; HIDALGO-DIAZ *et al.*, 2000; SUN *et al.*, 2006).

Como a fase de ovo do gênero *Meloidogyne* sp. Goeldi é o estágio do ciclo de vida mais vulnerável ao ataque de antagonistas, por estarem os ovos geralmente localizados sobre a superfície da raiz, agrupados numa matriz gelatinosa e ficarem expostos ao parasitismo de fungos, um parasita efetivo, como *P. chlamydosporia*, pode se estabelecer nas proximidades das raízes e eliminar muitos ovos produzidos por um único nematóide (STIRLING, 1991).

Morgan-Jones *et al.* (1983) estudaram o modo de ação de *P. chlamydosporia* em ovos de *M. arenaria* e constataram que o fungo é capaz de parasitar os ovos, levando os juvenis à morte. Segundo os autores, o parasitismo ocorre pela desintegração parcial da camada vitelínica, devido à ação de exoenzimas. Após a hifa penetrar o ovo, ocorre a dissolução enzimática das camadas de quitina e de lipídios. Em adição ao efeito direto do parasitismo de *P. chlamydosporia* sobre o desenvolvimento embrionário, existe o efeito enzimático sobre a casca do ovo, aumentando sua permeabilidade e facilitando a passagem de possíveis toxinas produzidas pelo fungo no ambiente, pois os juvenis de primeiro estágio (J₂) não eclodem quando o fungo está presente (STIRLING, 1991).

Nas últimas décadas, esse antagonista tem sido muito estudado como agente de biocontrole do nematóide das galhas *Meloidogyne* spp., e sua efetividade já foi comprovada em vários estudos (DE LEIJ e KERRY, 1991; DE LEIJ *et al.*, 1993, CAMPOS e CAMPOS, 1997; VIAENE e ABAWI, 2000; LOPES *et al.*, 2007), sendo classificado como um dos antagonistas mais promissores no controle biológico desse fitoparasita.

De Leij e Kerry (1991), ao avaliarem três isolados de *P. chlamydosporia* no controle de *M. arenaria*, constataram que um dos isolados promoveu redução de mais de 80% na multiplicação do fitonematóide. D'angieri e Campos (1997) estudaram o efeito de *P. chlamydosporia* sobre *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood e observaram que o fungo foi eficiente em reduzir a população total do nematóide após 6 e 12 meses de aplicação, em plantas de jaborandi. Mukhtar e Pervaz (2003), ao avaliarem o efeito de filtrados da cultura de *P. chlamydosporia* sobre a mortalidade e a eclosão dos J₂ de *M. javanica*, constataram que a mortalidade e a inibição da eclosão dos J₂ foram diretamente proporcionais ao aumento da concentração do filtrado do fungo. Khan *et al.* (2001) obtiveram resultados semelhantes sobre a eclosão dos J₂ de *M. incognita* (Kofoid e White) Chitwood.

No geral, *P. chlamydosporia* causa significativas reduções na multiplicação do nematóide das galhas, mas sua combinação com outros métodos de controle pode potencializar seus efeitos no controle biológico.

Pandey e Sikora (2000) observaram que, ao tratar os ovos de *M. incognita* com extratos de casca de pinheiro, houve aumento no parasitismo

de *P. chlamydosporia*. Metabólitos secundários de compostos orgânicos presentes no solo aumentam a suscetibilidade dos ovos de nematóides ao parasita, por alterar ou degradar a casca, ou ainda distorcer a membrana que protege os ovos, tornando-os mais suscetíveis ao fungo. Mukhtar *et al.* (2002) constataram que a utilização conjunta de *P. chlamydosporia* com extratos de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) foi eficiente na redução do número de galhas e de ovos de *M. javanica*, aumentando significativamente o parasitismo de ovos no solo e nos sistemas radiculares por *P. chlamydosporia*. Também a associação de torta de nim com *P. chlamydosporia* promoveu maior supressão de *M. incognita* em plantas de berinjela, quando comparada com os tratamentos controles, sem o fungo ou apenas com o antagonista (CANNAYANE e RAJENDRAN, 2001). A utilização de *P. chlamydosporia* em associação com plantas más hospedeiras também pode reduzir significativamente a população do nematóide das galhas. Tal fato foi comprovado por Bourne (2001) ao testar diferentes culturas como couve, feijão e repolho num sistema de rotação e aplicação de *P. chlamydosporia*. O autor constatou que houve redução de 99 % no número de nematóides nas raízes com subsequente cultivo de plantas de tomate e 95 % de controle quando se plantou novamente a cultura do tomate.

Além do grande potencial de *P. chlamydosporia* como agente de controle biológico, outra vantagem desse antagonista é sua capacidade de colonizar a rizosfera de várias espécies de plantas, mesmo na ausência de nematóides (BOURNE *et al.*, 1994; BOURNE *et al.*, 1996). Em estudos mais recentes, Lopez-Llorca *et al.* (2002) constataram que *P. chlamydosporia* foi capaz de colonizar o sistema radicular de cevada, desenvolvendo-se no rizoplano com grande crescimento micelial na região das junções celulares, onde a concentração de exsudatos é particularmente alta, proporcionando a formação de muitos clamidósporos, após três semanas de inoculação. Além disso, foi observada a penetração direta do fungo nas células do sistema radicular, ficando restrito às células epidermais e corticais. A partir de tais resultados, pode-se inferir que as raízes, assim como os nematóides que as infectam, são importantes fontes de alimentos para o fungo, garantindo assim sua persistência no solo.

No entanto, há diferenças na competência saprofítica entre diferentes isolados de *P. chlamydosporia* no solo ou na rizosfera das plantas ou mesmo de um único isolado nas diferentes espécies de plantas (BOURNE *et al.*, 1996; MAUHLINE *et al.*, 2004). Dessa forma, a planta hospedeira influencia a eficácia de *P. chlamydosporia* como agente de biocontrole pela habilidade em suportar a colonização do fungo na rizosfera e a suscetibilidade do ataque ao nematóide, afetando a formação das galhas e, conseqüentemente, a multiplicação do fitonematóide (BOURNE *et al.*, 1996).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOURNE, J. M. Making a soil suppressive to root-knot nematodes by applications of *Verticillium chlamydosporium*. Tri-Trophic Interactions in the Rhizosphere. **IOBC/WPRS Bulletin**, v. 24, n. 1, p. 25-30, 2001.

BOURNE, J. M.; KERRY, B. R.; DE LEIJ, F. A. A. M. Methods for the study of *Verticillium chlamydosporium* in the rhizosphere. **Journal of Nematology**, v. 26, n. 4S, p. 587-591, 1994.

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

CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P. Efeito da época e forma de aplicação dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* no controle de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 361-365, 1997.

CANNAYANE, I.; RAJENDRAN, G. Application of biocontrol agents and oil cakes for the management of *Meloidogyne incognita* in brinjal (*Solanum melongena* L.). **Current Nematology**, v. 12, n. 1-2, p. 51-55, 2001.

D'ANGIERI, C. N. F.; CAMPOS, V. P. Controle de *Meloidogyne javanica* em JABORANDI (*Pilocarpus microphyllus*) com *Arthrobotrys conoides*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium*. **Nematologia Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 23-30, 1997.

DE LEIJ, F.A.A.M.; KERRY, B. R. The nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. **Revue de Nématologie**, v. 14, n. 1, p. 157-164, 1991.

DE LEIJ, F.A.A.M.; KERRY, B. R.; DENNEHY, J. A. *Verticillium chlamyosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and micro-plot tests. **Nematologica**, v. 39, p. 115-126, 1993.

FREIRE, F. C. O.; BRIDGE, J. Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamyosporium*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 10, p. 577-596, 1985.

GODOY, G.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; MORGAN-JONES, G. Fungal parasites of *Meloidogyne arenaria* eggs in an Alabama soil. A mycological survey and greenhouse studies. **Nematropica**, v. 13, n. 2, p. 201-213, 1983.

HIDALGO-DÍAZ, L.; BOURNE, J. M.; KERRY, B. R.; RODRÍGUEZ, 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.

KHAN, H.; AHMED, R.; KHAN, S. M. Evaluation of culture filtrates of different fungi on the hatching of *Meloidogyne incognita*. **Pakistan Journal of Phytopathology**, v. 13, n. 1, p. 58-60, 2001. (Abstract).

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

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

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

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

MAUCHLINE, T. H.; KERRY, B. R.; HIRSCH, P. R. The biocontrol fungus *Pochonia chlamyosporia* shows nematode host preference at the infraspecific level. **Mycological Research**, v. 108, n. 2, p. 161-169, 2004.

MORGAN-JONES, G.; GODOY, G.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. *Verticillium chlamyosporium* fungal parasite of *Meloidogyne arenaria* females. **Nematropica**, v. 11, n. 2, p. 115-120, 1981.

MORGAN-JONES, G.; WHITE, J. F.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. Phytonematode pathology: Ultrastructural studies. I. Parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs by *Verticillium chlamyosporium*. **Nematropica**, v. 13, n. 2, p. 245-260, 1983.

MUKHTAR, T.; PERVAZ, I. *In vitro* evaluation of ovicidal and larvicidal effects of culture filtrate of *Verticillium chlamyosporium* against *Meloidogyne javanica*. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 5, n. 4, p. 576-579, 2003. (Abstract).

MUKHTAR, T.; AHMAD, R.; JAVED, N. Control of *Meloidogyne javanica* by two antagonistic plants and a nematophagous fungus and effects of antagonistic plants on the activity of the fungus. Integrated plant disease management **Proceedings of 3rd National Conference of Plant Pathology**, NARC, Islamabad 129-132, 2002. (Abstract).

PANDEY, R.; SIKORA, R. A. Influence of aqueous extracts of organic matter on the sensitivity of *Heterodera schachtii* Schmidt and *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood eggs to *Verticillium chlamyosporium* Goddard infection. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v. 107, n. 5, p. 494-497, 2000. (Abstract).

RIBEIRO, R. C. F.; CAMPOS, V. P. Isolamento, identificação e efeito da temperatura no crescimento *in vitro* de fungos parasitas de ovos de *Meloidogyne* spp. do sul de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 132-139, 1993.

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

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

VIAENE, N. M.; ABAWI, G. S. *Hirsutella rhossiliensis* and *Verticillium chlamyosporium* as biocontrol agents of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on lettuce. **Journal of Nematology**, v. 32, n. 1, p. 85-100, 2000.

WILLCOX, J.; TRIBE, H. T. Fungal parasitism in cysts of *Heterodera*. I Preliminary investigations. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 62, n. 3, p. 585-594, 1974.

Caracterização morfológica de isolados de *Pochonia chlamydosporia* obtidos de solos de cultivo de olerícolas

Resumo: Espécies de *Pochonia* ocorrem naturalmente em solos infestados com o nematóide das galhas e são amplamente distribuídas nas mais diferentes regiões do mundo. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo verificar a diversidade de espécies de *Pochonia* associadas a solos infestados com *Meloidogyne* spp., cultivados com olerícolas. O isolamento foi realizado pela técnica de diluições seriadas e plaqueamento em meio semi-seletivo. Pela caracterização morfológica do total de vinte e nove isolados, todos foram identificados como pertencentes à espécie *Pochonia chlamydosporia*: 65,52 % como *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* e 34,48 % como *P. chlamydosporia* var. *catenulata*. Portanto, a baixa diversidade de espécies de *Pochonia* pode ser reflexo do saprofitismo de *P. chlamydosporia*, pois este fungo também está associado, freqüentemente, à presença de matéria orgânica nos solos.

Palavras-chave: fungos nematófagos, microbiologia do solo, *Meloidogyne*, controle biológico.

Morphological characterization of *Pochonia chlamydosporia* isolates of soils of vegetables crops

Abstract: *Pochonia* species are found naturally in *Meloidogyne* infested soils throughout the world. The present study investigated the diversity of *Pochonia* species found in *Meloidogyne* infested soils in vegetables crops. Based on the morphological studies, the twenty-nine isolates were identified as *P. chlamydosporia*. Among them, 65.52 % were identified as *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* and 34.48 % as *P. chlamydosporia* var. *catenulata*. The small diversity of *Pochonia* species found in vegetables crops soil samples may reflect the saprofitic ability of *P. chlamydosporia*, because this fungus is often related to the presence of organic matter in the soils.

Key-words: nematophagous fungi, soil microbiology, *Meloidogyne*, biological control.

1. INTRODUÇÃO

Meloidogyne spp. Goeldi é um dos gêneros de fitonematóides mais importantes economicamente, por apresentar grande diversidade de hospedeiros e se encontrar amplamente disseminado nas mais variadas regiões do mundo (Taylor & Sasser, 1983; Moura, 1996).

As medidas tradicionalmente utilizadas para o controle desses fitonematóides são a rotação de culturas, o emprego de cultivares resistentes e o controle químico. Entretanto, poucos cultivares resistentes estão disponíveis no mercado, sendo raras as opções de rotação para nematóides polípagos, como *Meloidogyne* spp., e existindo muitas restrições ao uso de nematicidas, que são caros, poluentes e, eventualmente, ineficazes (Nico *et al.*, 2004). Outros métodos de controle, como o controle biológico, têm despertado maior interesse por parte dos pesquisadores, por não causar prejuízos ao homem e ao meio ambiente (De Leij & Kerry, 1991; Dalla Pria & Ferraz, 1996; Campos & Campos, 1997; Freitas *et al.*, 2000; Naves *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2007).

Dentre os vários inimigos naturais de fitonematóides, os fungos nematófagos têm sido os microrganismos mais estudados para o controle desses fitoparasitas (Kerry, 1987). Eles podem ser classificados como endoparasitas, predadores, produtores de metabólitos secundários e parasitas de ovos e fêmeas (Mankau, 1980). O fungo *Pochonia chlamydosporia* Zare & Gams (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard), parasita facultativo de ovos e fêmeas, destaca-se por apresentar grande potencial no controle do nematóide das galhas (De Leij & Kerry, 1991; De Leij *et al.*, 1993; Campos & Campos, 1997; Lopes *et al.*, 2007).

Várias espécies do gênero *Pochonia* são encontradas no solo em várias regiões do mundo, podendo ser isoladas diretamente do solo ou de ovos e cistos de fitonematóides (Gaspard, *et al.*, 1990a; 1990b; Ribeiro & Campos, 1993; Kerry, 1995; Hidalgo-Diaz *et al.*, 2000; Olivares-Bernabeu, 2002; Zare & Gams 2004; Sun *et al.*, 2006).

Em Cuba, Hidalgo-Diaz *et al.* (2000) obtiveram 83 isolados de *Pochonia* de solos naturalmente infestados com *Meloidogyne* spp., identificados morfológicamente como *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, *P. suchlasporia* (Gams & Dackman) Zare &

Gams e *Lecanicillium psalliotae* (Treschow) Zare & Gams. No Brasil, esse gênero foi primeiramente relatado por Batista & Fonseca (1965), após isolar o fungo de amostras de solos de diferentes regiões do Nordeste. Posteriormente, Barza Ramos & Upadhyay (1966) também relataram a presença de *P. chlamydosporia* em solos da mesma região. Mais recentemente, outros autores isolaram *P. chlamydosporia* de ovos de *Meloidogyne* spp. de outras regiões do Brasil (Freire & Bridge, 1985; Ribeiro & Campos, 1993).

Entretanto, há pouca informação sobre a diversidade de espécies de *Pochonia* spp. em solos brasileiros. O presente trabalho teve como objetivo verificar a diversidade de espécies de *Pochonia* associadas aos solos infestados com *Meloidogyne* spp. e cultivados com olerícolas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolamento e identificação de isolados de *Pochonia*

As amostras de solo utilizadas para fazer o isolamento das espécies de *Pochonia* foram coletadas de diferentes áreas infestadas com *Meloidogyne* spp. (Tabela 1), acondicionadas em sacos de plástico, etiquetadas e armazenadas em câmara fria até sua utilização.

Para a obtenção dos isolados de *Pochonia*, amostras de 10 g de solo foram postas, separadamente, em frascos Erlenmeyer de 200 mL de capacidade, contendo 90 mL de água esterilizada, e agitadas por 30 minutos em agitador orbital. Posteriormente, foram feitas diluições em série até 1×10^{-4} , e uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi espalhada em placas de Petri contendo meio semi-seletivo (Gaspard *et al.*, 1990b), com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram armazenadas a 25 °C até o crescimento das colônias fúngicas.

As colônias de cada amostra de solo foram repicadas para placas contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) e incubadas a 25 °C. Após uma semana, as colônias fúngicas foram pré-identificadas, conforme características morfológicas do isolado, como cor da colônia e tipo de conidióforo. Posteriormente, os isolados foram armazenados em sílica-gel (Gonçalves *et al.*, 2007) e mantidos a 8 °C para estudos posteriores.

Tabela 1 – Locais de coletas das amostras de solos para isolamento de espécies de *Pochonia*

Amostra	Origem
1	Viçosa - MG
2	Viçosa - MG
3	Viçosa - MG
4	Viçosa - MG
5	Mariópolis - PR
6	Mariópolis - PR
7	Viçosa - MG
9	Viçosa - MG
10	Viçosa - MG
11	Viçosa - MG
12	Viçosa - MG
13	Mariópolis - PR
14	Viçosa - MG
15	Viçosa - MG
16	Mariópolis - PR
17	Mariópolis - PR
18	Venda Nova do Imigrante - ES
19	Viçosa - MG
20	Mariópolis - PR
21	Viçosa - MG
22	Viçosa - MG
23	Mariópolis - PR
24	Viçosa - MG
26	Viçosa - MG
27	Mariópolis - PR
28	Mariópolis - PR
29	Mariópolis - PR
30	Mariópolis - PR
31	Mariópolis - PR

2.2. Caracterização morfológica dos isolados de *Pochonia*

Os isolados de *Pochonia* foram caracterizados pela medição do crescimento radial e coloração das colônias, presença ou não de clamidósporos e medição de estruturas reprodutivas. Para isto, papéis de filtro, armazenados em sílica-gel contendo as estruturas dos respectivos isolados fúngicos, foram transferidos para placas de Petri, contendo meio de cultura

'Corn Meal Agar' (CMA) e mantidas a 25 °C, no escuro, por 5 dias. Posteriormente, discos de micélio de 5 mm foram retirados das bordas de colônias de *Pochonia*, colocados no centro de placas de Petri contendo meio BDA e armazenadas no escuro a 25 °C, por 10 dias. Avaliaram-se o diâmetro das colônias (com o auxílio de uma régua, em duas medidas diametralmente opostas), sua coloração (na parte superior e no reverso da placa) e a presença externa ou não de clamidósporos. O ensaio constou de três repetições, em delineamento inteiramente casualizado.

Para a medição de estruturas reprodutivas dos isolados de *Pochonia*, utilizou-se a técnica de microcultura. Placas de Petri foram previamente autoclavadas, contendo dois discos de papel de filtro umedecidos em água destilada, sobre os quais foram dispostas varetas de vidro em forma de V como suporte para uma lâmina. Sobre cada lâmina foi colocado um fragmento de meio de cultura CMA de 1 cm², parcialmente colonizado com o respectivo isolado fúngico e, em seguida, coberto com uma lamínula. As placas foram armazenadas em B.O.D. a 25 °C, durante 21 dias, para permitir o crescimento do fungo em direção à lamínula e sua esporulação. Após a verificação do crescimento fúngico sob a superfície das lamínulas, elas foram retiradas e montadas sobre uma lâmina contendo uma gota de lactofenol, para observação em microscópio de luz.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vinte e nove isolados de *Pochonia* foram obtidos dos locais amostrados. Todos os isolados apresentaram produção de clamidósporos externos no micélio, dez dias após o cultivo em câmara de crescimento a 25 °C, no escuro. A coloração no reverso da placa foi branca, creme ou amarela e apresentou crescimento de 3,0 a 4,5 cm, dependendo do isolado (Tabela 2 e Figuras 1A, 1B, 1C e 1D).

Todos os isolados eram pertencentes à espécie *Pochonia chlamydosporia* (Tabelas 2 e 3). A maioria dos isolados (65,52 %) apresentava conídios hialinos subglobosos a ovóides ou elipsóides, medindo 1,0 - 5,0 X 1,0 - 4,0 µm; dictioclamidósporos de 8,0 - 26,0 X 8,0 - 31,0 µm e fiáides com comprimento

Tabela 2 – Crescimento micelial, coloração da colônia e presença ou não de dictioclamidósporos de isolados de *Pochonia*, obtidos de solos cultivados com olerícolas e infestados com *Meloidogyne* spp., crescidos em meio de cultura BDA por 10 dias, a 25 °C, no escuro

Isolado	Diâmetro da colônia (cm)	Coloração da colônia		Formação de Clamidósporos
		Reverso da Placa	Superfície da Placa	
1	4,5	Branca	Branca	Externo
2	4,0	Amarela	Branca	Externo
3	4,0	Branca	Branca	Externo
4	4,0	Creme	Branca	Externo
5	4,0	Creme	Branca	Externo
6	4,0	Creme	Branca	Externo
7	4,0	Creme	Branca	Externo
9	4,0	Amarela	Branca	Externo
10	4,0	Amarela	Branca	Externo
11	4,0	Amarela	Branca	Externo
12	4,0	Creme	Branca	Externo
13	4,5	Amarela	Branca	Externo
14	4,0	Amarela	Branca	Externo
15	4,0	Amarela	Branca	Externo
16	4,0	Branca	Branca	Externo
17	3,0	Creme	Branca	Externo
18	4,5	Amarela	Branca	Externo
19	4,0	Amarela	Branca	Externo
20	4,0	Creme	Branca	Externo
21	4,0	Amarela	Branca	Externo
22	4,0	Amarela	Branca	Externo
23	4,0	Amarela	Branca	Externo
24	4,0	Branca	Branca	Externo
26	3,0	Creme	Branca	Externo
27	3,0	Creme	Branca	Externo
28	3,5	Amarela	Branca	Externo
29	4,0	Amarela	Branca	Externo
30	4,0	Amarela	Branca	Externo
31	4,0	Amarela	Branca	Externo

Fonte: Zare & Gasms (2004).

de 3,0 - 60,0 μm , produzindo agrupamento de conídios em cabeças, identificados como *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Figuras 2A e 2C). Os demais isolados (34,48 %) apresentavam conídios hialinos globosos a subglobosos, medindo 1,0 - 4,0 X 1,0 - 4,0 μm , dictioclamidósporos de 5,0 - 31,0 X 6,0 - 32,0 μm e fiálides com comprimento de 3,0 - 92,0 μm , produzindo

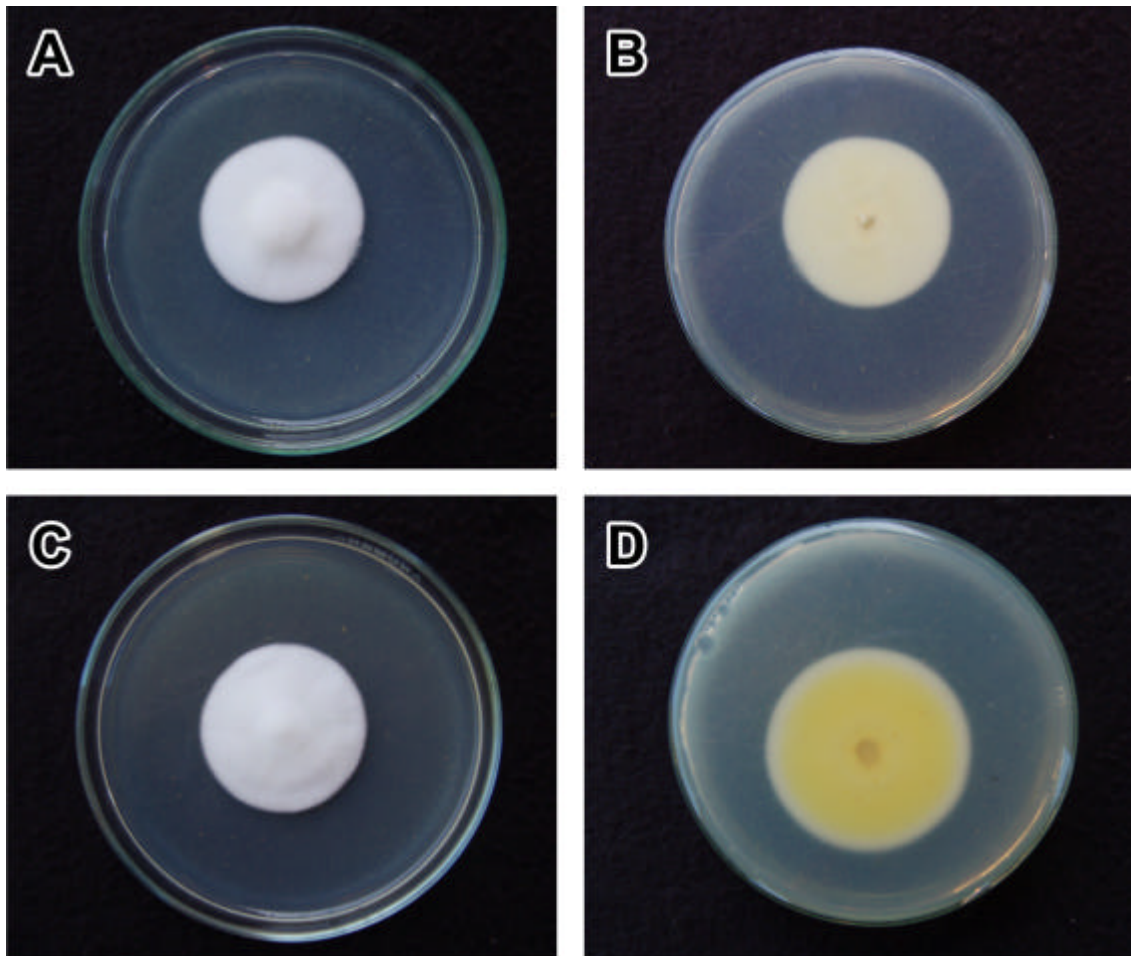


Figura 1 – Culturas puras de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, crescidas por 10 dias em meio de cultura BDA, no escuro, a 25 °C. A – Superfície da placa (Isolado 3); B- Reverso da placa (Isolado 3); C – Superfície da placa (Isolado 13); e D – Reverso da placa (Isolado 13).

conídios em cadeias, identificados como *P. chlamydosporia* var. *catenulata* (Figuras 2B e 2D). Não houve prevalência dessas variedades de *P. chlamydosporia* de acordo com as localidades em que foram coletadas as amostras de solo (Tabelas 1 e 3).

No Brasil, os isolados de ambas as variedades apresentaram dimensão da estrutura de conídios e de clamidósporos (Tabela 3) similar àquelas estruturas descritas por Zare & Gams (2004). Gams (1988) considerou que a distinção entre conídios em cadeias e em cabeças era um valor taxonômico limitado. Como não há nenhuma delimitação distinta entre os isolados, conseqüentemente, as taxa *V. chlamydosporium* e *V. catenulatum* são consideradas variedades de somente uma espécie: *V. chlamydosporium*.

Tabela 3 – Características morfológicas de variedades de *Pochonia chlamydosporia* isoladas de solos cultivados com olerícolas e infestados com *Meloidogyne* spp

Isolados	Fiálides (mm)		Conídios (mm)			Clamidósporos (mm)		Variedades
	Nº	Comprimento	Comprimento	Largura	+ cabeça - cadeia	Comprimento	Largura	
1	1 a 3	6 – 38	1,0 - 2,5	1,0 - 4,0	-	18,0 - 23,0	20,5 - 27,0	<i>catenulata</i>
2	1 a 2	6 – 28	1,0 - 4,0	1,0 - 4,0	+	20,5	23,0	<i>chlamydosporia</i>
3	1 a 3	3 – 28	1,0 - 3,0	1,0 - 2,0	+	11,5-19,0	14,0 - 24,0	<i>chlamydosporia</i>
4	1 a 3	9,5 – 22	2,5 - 4,0	1,0 - 2,0	+	14,0 - 18,0	17,0 - 24,0	<i>chlamydosporia</i>
5	1 a 2	9,5 – 28	2,0 - 2,5	1,0 - 2,5	-	19,0 - 28,0	23,0 - 32,0	<i>catenulata</i>
6	1 a 3	9,5 - 20,5	2,5 - 2,5	2,5 - 2,5	-	5,0 - 19,0	6,0 - 20,5	<i>catenulata</i>
7	1 a 2	3 – 16	2,0 - 4,0	1,0 - 2,0	+	17,0 - 19,0	15,0 - 24,0	<i>chlamydosporia</i>
9	1 a 3	5 – 28	2,0 - 4,0	1,0 - 2,0	+	17,0 - 20,5	19,0 - 26,0	<i>chlamydosporia</i>
10	1 a 3	6 – 22	1,0 - 4,0	1,0 - 2,0	+	17,0 - 22,0	23,0 - 31,0	<i>chlamydosporia</i>
11	1 a 4	5 – 22	1,0 - 3,0	1,0 - 3,0	+	18,0 - 2,40	17,0 - 29,0	<i>chlamydosporia</i>
12	1 a 2	9,5 – 25	1,0 - 4,0	1,0 - 4,0	-	18,0 - 24,0	22,0 - 27,0	<i>catenulata</i>
13	1 a 4	6 – 32	1,0 - 5,0	1,0 - 2,5	+	-	-	<i>chlamydosporia</i>
14	1 a 2	6 – 38	2,0 - 3,0	1,0 - 4,0	-	18,0 - 20,5	19,0 - 27,0	<i>catenulata</i>
15	1 a 3	3 – 28	1,0 - 4,0	1,0 - 2,5	+	14,0 - 26,0	15,0 - 28,0	<i>chlamydosporia</i>
16	1 a 3	9,5 – 32	2,0 - 2,5	2,0 - 3,0	-	19,0 - 31,0	24,0 - 28,0	<i>catenulata</i>
17	1 a 4	6 – 54	2,5 - 5,0	1,0 - 4,0	+	-	-	<i>chlamydosporia</i>
18	1 a 2	5 – 32	1,0 - 4,0	1,0 - 4,0	-	18,0 - 24,0	19,0 - 27,0	<i>catenulata</i>
19	1 a 4	3 – 38	1,0 - 4,5	1,0 - 2,0	+	18,0 - 23,0	19,0 - 28,0	<i>chlamydosporia</i>
20	1 a 3	6 – 92	2,0 - 4,0	2,0 - 4,0	-	18,0 - 28,0	23,0 - 29,0	<i>catenulata</i>
21	1 a 3	3 – 28	1,0 - 5,0	1,0 - 2,5	+	11,5 - 20,5	14,0 - 26,0	<i>chlamydosporia</i>
22	1 a 3	6 – 25	2,0 - 4,0	1,0 - 2,5	+	17,0 - 260	18,0 - 31,0	<i>chlamydosporia</i>
23	1 a 3	6 – 25	1,0 - 4,5	1,0 - 2,0	+	10,0 - 22,0	11,5 - 29,0	<i>chlamydosporia</i>
24	1 a 2	5 – 28	1,0 - 3,0	1,0 - 2,5	-	10,0 - 23,0	11,5 - 24,0	<i>catenulata</i>
26	1 a 3	6 – 60	1,0 - 4,0	1,0 - 4,0	+	8,0 - 22,0	8,0 - 26,0	<i>chlamydosporia</i>
27	1 a 4	3 – 47	2,0 - 4,0	2,0 - 4,0	-	-	-	<i>catenulata</i>
28	1	6 – 54	2,0 - 4,5	1,0 - 4,0	+	9,0 - 23,0	8,0 - 28,0	<i>chlamydosporia</i>
29	1 a 4	6 – 35	1,0 - 4,5	1,0 - 2,5	+	14,0 - 24,0	14,0 - 31,0	<i>chlamydosporia</i>
30	1 a 3	5 – 38	1,0 - 4,5	1,0 - 2,5	+	14,0 - 21,0	19,0 - 27,0	<i>chlamydosporia</i>
31	1 a 2	5 – 32	2,0 - 5,0	1,0 - 2,5	+	-	-	<i>chlamydosporia</i>

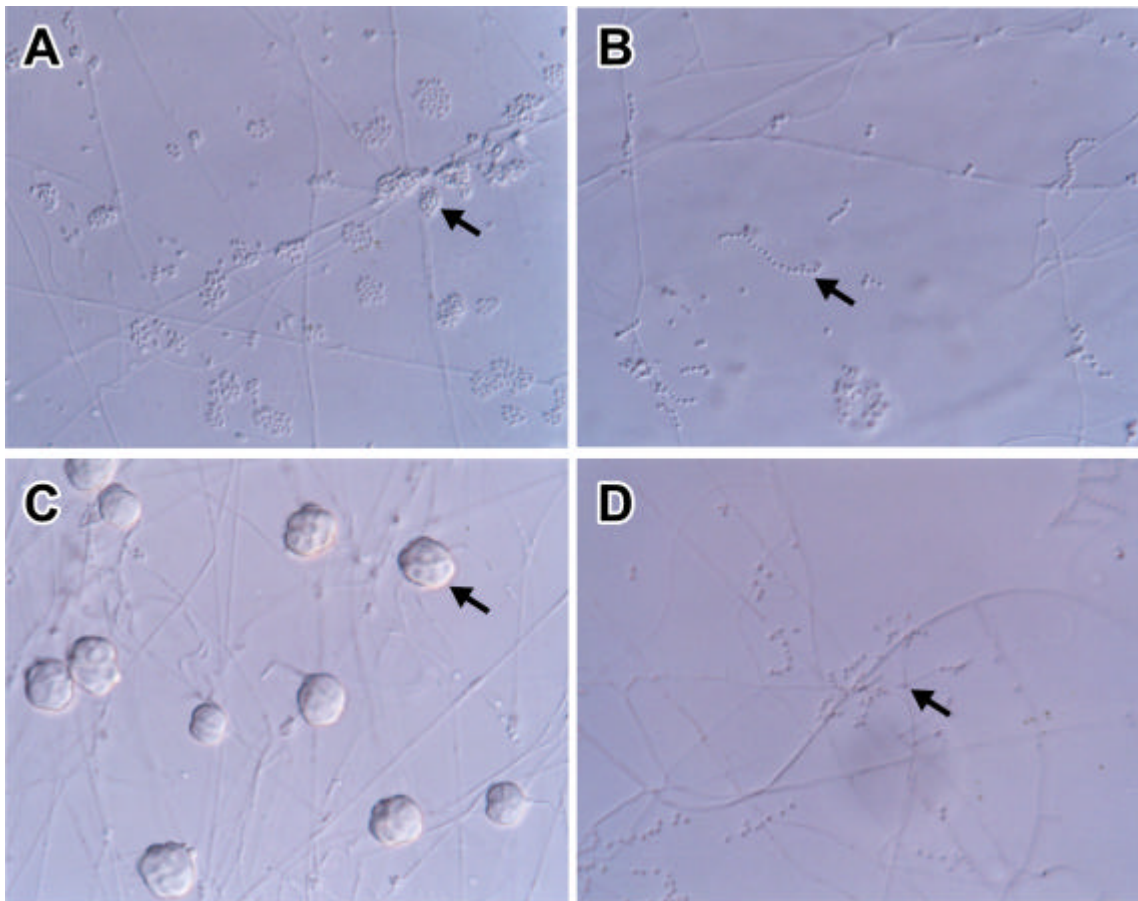


Figura 2 – Fotomicrografias ópticas de *Pochonia chlamydosporia*. A – Conídios agrupados em cabeças (Isolado 9); B – Conídios agrupados em cadeias (Isolado 24); C – Dictioclamidósporos (Isolado 7); e D – Fiálide (Isolado 16).

Zare & Gams (2004), ao introduzirem o nome genérico *Pochonia*, reconhecem a similaridade entre as duas variedades de *P. chlamydosporia*, var. *chlamydosporia* e var. *catenulata*. Segundo esses autores, os conídios de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* são geralmente mais globosos para subglobosos, enquanto os de *P. chlamydosporia* da var. *chlamydosporia* são mais elipsoidais.

Uma possível explicação para a baixa diversidade de espécies de *Pochonia* isoladas nos locais amostrados poderia ser reflexo de alguma especificidade quanto ao gênero *Meloidogyne*, amplamente distribuído em solos agricultáveis. Entretanto, *P. chlamydosporia* é também relatada como parasita de ovos ou de cistos de outros gêneros de fitonematóides, como *Heterodera schachtii* Schmidt, *Heterodera avenae*, Wollenweber, *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens, *Rotylenchulus reniformis* Linford &

Oliveira, *Nacobbus aberrans* Thorne & Allen, bem como de ovos de caramujo e larvas de besouro (Willcox & Tribe, 1974; Kerry, 1975; Crump & Irving, 1992; Zare & Gams 2004; Wang, et al., 2005; Pérez-Rodríguez, 2007; Zare & Gams, 2007).

Portanto, a baixa diversidade de espécies de *Pochonia* possivelmente seja reflexo do saprofitismo de *P. chlamydosporia*, visto que esta espécie também está associada, freqüentemente, à presença de matéria orgânica nos solos (Batista & Fonseca, 1965; Zare & Gams, 2004) e não é tão dependente do nematóide para o seu desenvolvimento (Gams,1988).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARZA RAMOS, T.M. & H.P. UPADHYAY. 1966. Fungos dos solos do Nordeste do Brasil. 4. Atas do Instituto de Micologia, Recife, 3: 328-335.

BATISTA A.C. & O.M. FONSECA. 1965. *Pochonia humicola* n. gen. e n. sp., uma curiosa entidade fúngica dos solos do Nordeste do Brasil. Instituto de micologia, Recife, 462: 1-11.

CAMPOS, H.D & V.P. CAMPOS. 1997. Efeito da época e forma de aplicação dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* no controle de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, 22 (3): 361-365.

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

DALLA PRIA, M. & S. FERRAZ. 1996. Controle biológico de *Meloidogyne incognita*, raça 3, por seis espécies de *Monacrosporium*, isoladas ou combinadas com *Verticillium chlamydosporium*. Fitopatologia Brasileira, 21 (1): 30-34.

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

DE LEIJ, F.A.A.M., B.R. KERRY & J.A. DENNEHY. 1993. *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and micro-plot tests. Nematologica, 39: 115-126.

FREIRE, F.C.O. & J. BRIDGE. 1985. Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. *Fitopatologia Brasileira*, 10: 577-596.

FREITAS, L.G.; W.S. NEVES; D.N. CARMO & G.S. SILVA. 2000. First case of induction of soil suppressiveness to root-knot nematode by *Pasteuria penetrans* in large areas in the field in Brazil. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Uberlândia. Resumos, p. 129.

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

GASPARD, J.T.; B.A. JAFFEE & H. FERRIS. 1990a. *Meloidogyne incognita* survival in soil infested with *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. *Journal of Nematology*, 22 (2): 176-181.

GASPARD, J.T.; B.A. JAFFEE & H. FERRIS. 1990b. Association of *Verticillium chlamydosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with root-knot nematode infested soil. *Journal of Nematology*, 22 (2): 207-213.

GONÇALVES R.C.; A.C. ALFENAS & R.G. MAFIA. 2007. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C. & R.G. MAFIA. (eds.). Métodos em fitopatologia, Viçosa. p. 91-102.

HIGALGO-DIAZ, L.; J.M. BOURNE; B.R. KERRY & M.G. RODRÍGUEZ. 2000. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. *International Journal of Pest Management*, 46 (4): 277-284.

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

KERRY, B.R. 1995. Ecological considerations for the use of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium*, to control plant parasitic nematodes. *Canadian Journal of Botany*, 73 (Supplement 1): S65-70.

KERRY, B.R. 1987. Biological control. In: BROWN, R.H.; B.R. KERRY (eds.) Principles and practice of nematode control in crops, London: Academic Press. p. 233-263.

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

MANKAU, R. 1980. Biological control of nematode pests by natural enemies. *Annual Review of Phytopathology*, 18: 415-440.

- MOURA, R.M. 1996. Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. Revisão Anual de Patologia de Plantas, 4: 209-244.
- NAVES, R.L.; V.P. CAMPOS & R.M. SOUZA. 2002. Antagonismo de bactérias endofíticas à formação de galhas e à reprodução de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. Nematologia Brasileira, 26 (1): 13-19.
- NICO, A.I. R.M. JIMÉNEZ-DÍAZ & P. CASTILLO. 2004. Control of root-knot nematodes by composted agro-industrial wastes in potting mixtures. Crop Protection, 23: 581-587.
- OLIVARES-BERNABEU, C.M. & L.V. LOPEZ-LLORCA. 2002. Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. Revista Iberoamericana de Micología, 19: 104-110.
- PÉREZ-RODRÍGUEZ, I.; A. DOROTEO-MENDONZA; F. FRANCO-NAVARO; V. SANTIAGO-SANTIAGO & A. MONTERO-PINEDA. 2007. Isolates of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* from Mexico as potential biological control agents of *Nacobbus aberrans*. Nematropica, 37 (1): 127-134.
- RIBEIRO, R.C.F. & V.P. CAMPOS. 1993. Isolamento, identificação e efeito da temperatura no crescimento "in vitro" de fungos parasitas de ovos de *Meloidogyne* spp. do sul de Minas Gerais. Nematologia Brasileira, 17 (2): 132-139. 1993.
- SUN, M.H.; L.GAO; Y.X. SHI; B.J. LI & X.Z. LIU. 2006. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. Journal of Invertebrate Pathology, 93:22-28.
- TAYLOR, A.L. & J.N. SASSER. 1983. Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz. (Especies de *Meloidogyne*). Artes gráficas de la Universidad del Estado del Carolina del Norte. Raleigh, Carolina del Norte, 111 p.
- WANG K.; R.D. RIGGS & D. CRIPPEN. 2005. Isolation, selection, and efficacy of *Pochonia chlamydosporia* for control of *Rotylenchulus reniformis* on cotton. Phytopathology, 95(8): 890-893.
- WILLCOX, J. & H.T. TRIBE. 1974. Fungal parasitism in cysts of *Heterodera*. I Preliminary investigations. Transactions of the British Mycological Society, 62 (3): 585-594.
- ZARE, R. & W. GAMS. 2004. A monograph of *Verticillium* section Prostrata. Rostaniha (Botanical Journal of Iran), Supplement, 3, 188 p.
- ZARE, R. & W. GAMS. 2007. *Pochonia globispora* sp. nov. Nova Hedwigia, 84 (3-4): 421-428.

Seleção de isolados de *Pochonia chlamydosporia* para o controle de *Meloidogyne javanica*

Resumo: O potencial de trinta isolados de *Pochonia chlamydosporia* como agentes de controle biológico de *Meloidogyne javanica* foi avaliado em condições de casa de vegetação. Cinco mil clamidósporos foram incorporados por grama de solo e, logo a seguir, transplantou-se uma plântula de tomate por vaso de 300 mL de capacidade. Após uma semana, cada planta foi inoculada com 1.000 ovos de *M. javanica*. Os isolados 1, 2, 3, 4, 9, 10, 21, 24, 28 e 64 foram os mais eficientes na redução do número de ovos do nematóide. Esses isolados foram avaliados novamente, e o solo de cada vaso foi inicialmente infestado com os clamidósporos e 3.000 ovos de *M. javanica*, e, após uma semana, transplantou-se uma muda de tomateiro. Neste experimento, os isolados mais eficientes foram o 64, proveniente de Alicante – Espanha, reduzindo o número de ovos e de galhas em 72,0 e 10,4 %, respectivamente, e o isolado 10, proveniente de Viçosa, com redução de 60,0 % quanto ao número ovos e de 21,3 % quanto ao número de galhas. Conclui-se que, em solos brasileiros, podem ser encontrados isolados de *P. chlamydosporia* com potencial para o controle de *M. javanica*.

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

Selection of *Pochonia chlamydosporia* isolates for the control of *Meloidogyne javanica*

Abstract: The potential of thirty *Pochonia chlamydosporia* isolates as biological control agents of *Meloidogyne javanica* on tomato plants was evaluated under greenhouse conditions. Five thousand chlamydospores were incorporated per gram of soil and one tomato seedling was transplanted in each 300 mL pot. One week later, each plant was inoculated with 1,000 eggs of *M. javanica*. The isolates 1, 2, 3, 4, 9, 10, 21, 24, 28 and 64 were the most efficient in reducing the number of eggs of the nematode. These isolates were re-evaluated, however, the soil was initially infested with chlamydospores and with 3,000 eggs of *M. javanica*, and one tomato seedling was transplanted in each pot one week later. In this experiment, the most efficient isolates were the 64, originated from Alicante – Spain, reducing 72.0 % the number of eggs and 10.4 % the number of galls, and the isolate 10, originated from Viçosa – Brazil, reducing 60.0 % the number of eggs and 21.3 % the number of galls.

Key-words: nematophagous fungi, root-knot nematodes, biological control.

1. INTRODUÇÃO

A associação do agente de controle biológico *Pochonia chlamydosporia* Zare & Gams (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard) com nematóides foi primeiramente relatada por Willcox & Tribe (1974). Após esse fungo ter sido isolado de ovos de *Heterodera schachtii* Schmidt. Posteriormente, Kerry (1975) também relatou ter isolado este fungo de ovos de *Heterodera avenae* Wollenweber. Esse parasita facultativo de ovos de nematóides foi considerado o principal responsável pelo declínio da população de *H. avenae* em cultivares suscetíveis de cereais, num sistema de monocultivo (Kerry *et al.*, 1982).

Pochonia chlamydosporia também foi relatado como parasita de ovos e fêmeas de *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chiwood, em campos de amendoim no Alabama (Godoy *et al.*, 1983) e de várias outras espécies desse gênero (Freire & Bridge, 1985; Riberiro e Campos, 1993; Hidalgo-Diaz 2000; Sun *et al.*, 2006). Nas últimas décadas, esse antagonista tem sido amplamente estudado para o controle do nematóide de cisto (Crump & Irving, 1992, Sosnowska & Sikora 2001) e do nematóide de galhas (De Leij & Kerry, 1991; Campos & Campos, 1997; Lopes *et al.*, 2007).

Diferentes espécies de *Meloidogyne* Goeldi podem ser igualmente suscetíveis a um isolado específico do fungo, mas este pode infectar poucos ovos de *Globodera* Skarbilovich ou *Heterodera* spp. Schmidt. No geral, *P. chlamydosporia* infecta mais ovos imaturos do que os que contenham juvenis de segundo estágio (J₂). Muitos ovos escapam da infecção em temperaturas próximas de 30 °C, pois os J₂ eclodem antes que as massas de ovos sejam totalmente colonizadas pelo fungo. Então, é necessário selecionar um determinado isolado fúngico para um nematóide específico e para as condições em que se queira aplicar o agente de biocontrole (Kerry & Bourne, 2002).

O processo de seleção geralmente é iniciado com um rápido teste *in vitro* com um grande número de isolados. No entanto, os resultados obtidos na seleção *in vitro* nem sempre coincidem com os resultados obtidos *in vivo* (Hidalgo-Diaz *et al.*, 2000; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2007). A seleção *in vivo*, embora seja mais trabalhosa e demande mais espaço e tempo, apresenta resultados mais confiáveis na seleção de um agente de controle biológico para posteriores estudos em condições de campo.

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi selecionar, em casa de vegetação, um isolado de *P. chlamydosporia* com maior potencial para o biocontrole de *M. javanica*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de *P. chlamydosporia* utilizados nos ensaios foram obtidos de solos cultivados com olerícolas naturalmente infestadas com *Meloidogyne* spp., nos municípios de Viçosa (MG), Mariópolis (PR) e Venda Nova do Imigrante (ES).

Foram utilizados os isolados 1, 5, 6, 12, 14, 16, 18, 20 e 24, de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* e os isolados 2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 19, 21, 22, 23, 26, 28 e 29 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, além do isolado 8 e quatro isolados obtidos de Alicante- Espanha.

2.1. Produção de clamidósporos de *P. chlamydosporia*

Em frascos Erlenmeyeres com capacidade de 250 mL, colocaram-se 80 g da mistura areia e milho triturado (canjiquinha) 1:1 (p:p) e 60 mL de água destilada. O substrato foi autoclavado e, em cada frasco, foram colocados três discos de micélio (7 mm de diâmetro) de cada um dos isolados de *P. chlamydosporia*, previamente cultivados no meio 'Corn Meal Agar' (CMA), com idade de uma semana. Os frascos foram armazenados em câmara de crescimento a 26 °C, no escuro, por 21 dias. Transcorrido esse período, os clamidósporos foram extraídos por meio de uma lavagem manual do substrato colonizado, num balde com água de torneira. A suspensão fúngica foi filtrada em camada dupla de gaze, e o número de clamidósporos foi quantificado com o auxílio de uma câmara de Newbauer e um microscópio óptico.

2.2. Bioensaios em casa de vegetação

Para a pré-seleção dos isolados de *P. chlamydosporia*, foram montados dois ensaios em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições por tratamento. No primeiro ensaio, foram

avaliados quinze isolados de *P. chlamydosporia* (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15 e 16). No segundo, avaliaram-se mais quinze isolados (18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 13, 26, 28, 52, 64, 75 e 123). O tratamento testemunha, em ambos os ensaios, constou de uma mistura do solo sem a adição de antagonistas.

Em ambos os ensaios, uma mistura de solo e areia 1:1 (v:v), previamente tratada com brometo de metila, foi posta em sacos plásticos de 5 L de capacidade e umedecida com a suspensão fúngica, previamente calibrada para resultar na aplicação de 5.000 clamidósporos/g de solo. Posteriormente, essa mistura foi acondicionada em copos plásticos de 300 mL, e uma plântula de toma cultivar Santa Clara, com aproximadamente 10 cm de altura, foi transplantada por copo. Após uma semana, 1.000 ovos de *M. javanica*, extraídos conforme o método descrito por Hussey & Barker e modificado por Boneti & Ferraz (1981), foram aplicados por planta.

Um terceiro ensaio foi conduzido para reavaliar os isolados pré-selecionados (1, 2, 3, 4, 9, 10, 21, 24, 28 e 64) e montado conforme os ensaios anteriores, porém, neste ensaio foram utilizados vasos contendo 500 gramas de mistura de solo e areia. Logo após a adição dos clamidósporos ao solo, ele foi infestado com 3.000 ovos de *M. javanica* por vaso. O solo permaneceu úmido com 60 % da capacidade de campo por uma semana e, após este período, foi transplantada uma plântula de tomate com aproximadamente 10 cm de altura em cada vaso.

Os ensaios 1 e 2 foram conduzidos por 45 dias, com temperaturas da máxima média de 35,2 °C e mínima média de 20,9 °C. O terceiro ensaio foi conduzido por 60 dias, e as temperaturas média máxima e mínima foram de 33,4 e 14,7 °C, respectivamente, quando então as plantas dos ensaios foram retiradas e o peso de raiz fresca e os números de galhas e de ovos por sistema radicular foram determinados.

Amostras compostas de solo de cada parcela experimental foram coletadas logo após a incorporação dos clamidósporos ao solo e ao final dos ensaios para determinação da população do fungo. A determinação da população foi feita conforme técnica descrita por Kerry (1991) e o plaqueamento em meio semi-seletivo conforme Gaspard *et al.* (1990), com três repetições por tratamento.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelos testes Scott-Knott ou Duncan, a 5% de probabilidade. Os dados do segundo ensaio quanto ao número de galhas e ovos foram submetidos à análise estatística descritiva por não seguir a distribuição normal.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 15 isolados de *P. chlamydosporia* estudados no primeiro bioensaio, somente os isolados 6, 8, 14 e 15 não diferiram da testemunha quanto à redução do número de galhas (Tabela 1). No segundo ensaio, os isolados que resultaram nas menores médias do número de galhas foram os números 18, 19, 21, 22, 23, 24 e 28 (Tabela 2).

Quanto à redução do número de ovos, no ensaio 1, somente os isolados 7, 8 e 12 (Tabela 1) não diferiram significativamente em relação à testemunha. Neste ensaio, os melhores isolados foram o 1, 2, 3, 4, 9 e 10, com reduções médias do número de ovos de 39 a 67,3 %, quando comparadas ao controle. No ensaio 2, os isolados que reduziram as médias dos números de ovos em mais de 50 % em relação à testemunha, foram o 21, 24, 28 e 64 (Tabela 2) e, por isso, foram selecionados para ser reavaliados num terceiro ensaio.

Todos os isolados reavaliados não diferiram estatisticamente da testemunha quanto ao número de galhas (Figura 1). No entanto, em relação ao número de ovos, novamente todos os isolados promoveram diminuição significativa da multiplicação de *M. javanica* (Figura 2). Os isolados 2, 3, 10 e 64 foram os mais eficientes com reduções de 54 a 72 %. O isolado 10 apresentou redução de 60% no número de ovos e a maior redução do número de galhas, da ordem de 21,3 % (Figuras 1 e 2).

A diferença entre isolados de *P. chlamydosporia* no controle de fitonematóides em casa de vegetação, também foi observada por vários autores (De Leij e Kerry, 1991; Wang *et al.*, 2005; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2007).

De Leij & Kerry (1991), ao avaliar três isolados de *P. chlamydosporia*, verificaram que somente um isolado foi eficaz em reduzir em aproximadamente 80 % o número total de ovos e de juvenis de *M. arenaria*, quando comparado

Tabela 1 – Efeito de 15 isolados de *Pochonia chlamydosporia* sobre o número de galhas e de ovos em raízes de tomateiros, aos 45 dias após a inoculação com 1.000 ovos de *Meloidogyne javanica*

Isolado	Nº de galhas	Nº de ovos
1	328 b	114.814 c
2	407 b	143.053 c
3	361 b	142.255 c
4	372 b	150.099 c
5	354 b	263.359 b
6	430 a	241.130 b
7	387 b	350.636 a
8	483 a	321.055 a
9	347 b	170412 c
10	376 b	214.190 c
11	399 b	250.627 b
12	393 b	352.999 a
14	443 a	238.028 b
15	437 a	243.862 b
16	371 b	288.624 b
Testemunha (sem fungo)	499 a	351.167 a

Médias obtidas de oito repetições. Médias dentro da coluna seguidas pela mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste Scott-Knot ($P < 0,05$). Médias originais são apresentadas na tabela.

Tabela 2 – Efeito de 15 isolados de *Pochonia chlamydosporia* sobre o número de galhas e de ovos em raízes de tomateiros, aos 45 dias após a inoculação com 1.000 ovos de *Meloidogyne javanica*

Isolado	Nº de galhas	Nº de ovos
18	512 (± 51)*	433.229 \pm (90.188)
19	507 (± 26)	371.605 (± 48.307)
20	538 (± 45)	467.977 (± 87.099)
21	440 (± 60)	157.255 (± 30.367)
22	442 (± 64)	329.604 (± 46.566)
23	486 (± 45)	372.770 (± 85.172)
24	454 (± 78)	201.185 (± 24.300)
13	589 (± 42)	442.696 (± 65.022)
26	546 (± 77)	579.658 (± 89.967)
28	511 (± 47)	270.810 (± 55.497)
29	519 (± 160)	409.740 (± 147.770)
52	618 (± 64)	666.187 (± 81.225)
64	616 (± 40)	248.380 (± 38.427)
75	564 (± 71)	587.467 (± 106.040)
123	613 (± 46)	641.512 (± 57.361)
Testemunha (sem fungo)	587 (± 149)	634.869 (± 190.691)

Médias obtidas de oito repetições.* \pm IC =Intervalo de confiança.

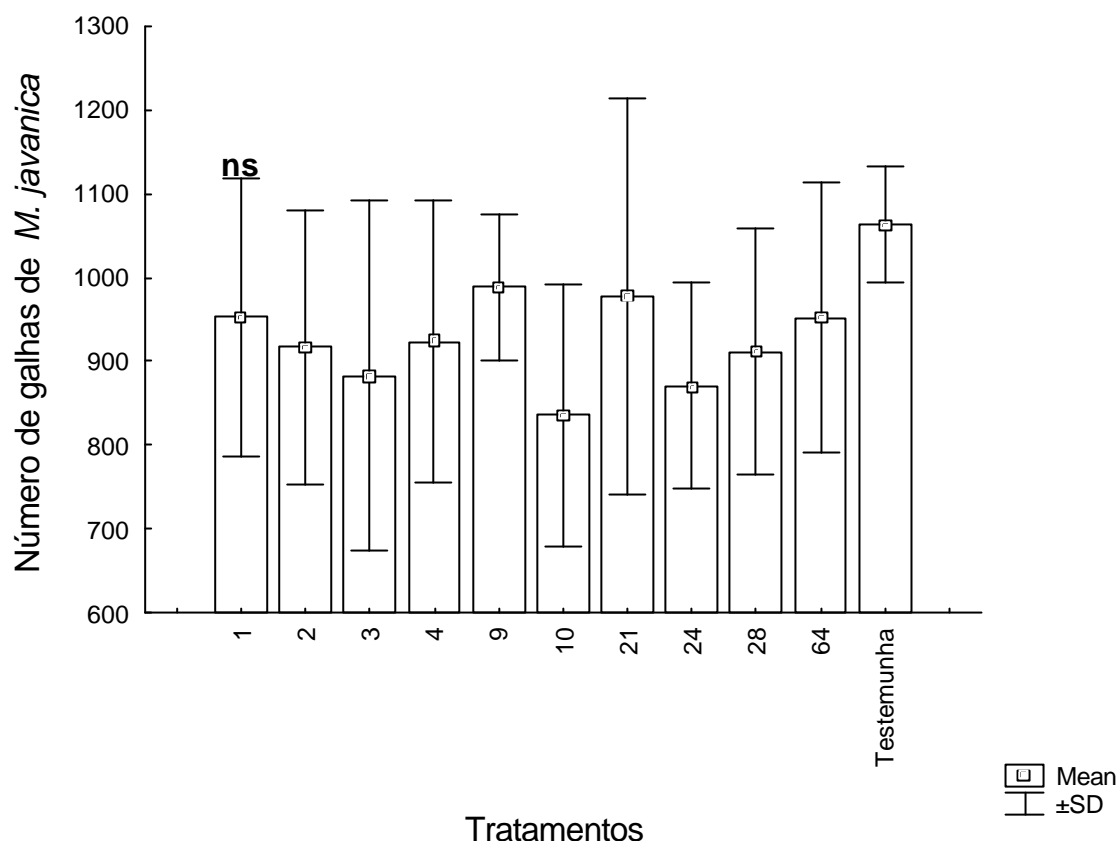


Figura 1 – Número de galhas em raízes de tomateiro, 60 dias após o transplântio das mudas em solo infestado com diferentes isolados de *P. chlamydosporia* e 3.000 ovos de *M. javanica*. Médias de oito repetições. ^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. As barras representam o desvio-padrão da média.

com a testemunha. Hidalgo-Diaz *et al.* (2000), ao selecionar 24 isolados de *P. chlamydosporia* obtidos de solos cubanos, observaram que todos os isolados foram efetivos em colonizar ovos de *M. incognita*. Contudo, a maior porcentagem de ovos colonizados entre os isolados testados foi observada em *P. chlamydosporia* var. *catenulata* e não em *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, como no presente trabalho, quanto à redução do número de ovos.

Estes resultados indicam que a seleção é essencial para reduzir o número de isolados e assim viabilizar a montagem de testes no campo, para confirmar a efetividade dos isolados em condições reais de cultivo.

Apesar de os isolados reavaliados no ensaio 3 confirmarem a eficiência no controle de *M. javanica*, pôde-se observar que os resultados obtidos, quanto

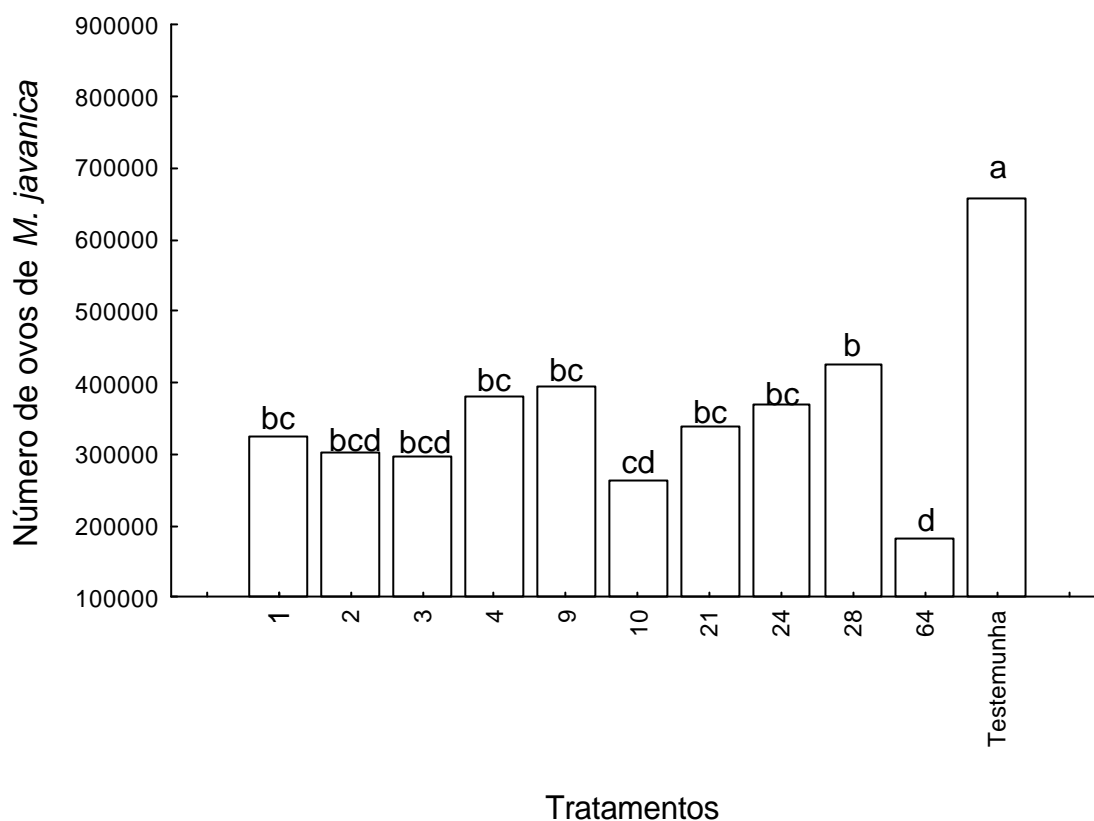


Figura 2 – Número de ovos em raízes de tomateiro, 60 dias após o transplântio das mudas em solo infestado com diferentes isolados de *P. chlamydosporia* e 3.000 ovos de *M. javanica*. Médias de oito repetições e seguidas pela mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste Duncan, a 5 % de probabilidade.

ao número de galhas e ovos, não foram os mesmos dos ensaios anteriores (Tabelas 1 e 2 e Figuras 1 e 2).

O isolado 10 foi o mais eficiente em reduzir a multiplicação de *M. javanica* no ensaio 3, mas no ensaio 1 ele reduziu o número de ovos em apenas 39 %. Provavelmente, essa variação entre os resultados tenha ocorrido porque, no teste de reavaliação, o fungo permaneceu no solo por uma semana em contato com os ovos de *M. javanica* antes de serem transplantadas as mudas de tomate. Além disso, este ensaio foi conduzido no inverno com temperatura média do ar de 24 °C. Já os ensaios 1 e 2 foram montados no verão com temperatura média do ar de 28 °C, e os ovos do nematóide foram colocados após uma semana do transplântio do tomateiro no substrato infestado com os respectivos antagonistas.

Embora os resultados obtidos por Campos & Campos (1996; 1997) sejam contraditórios, estes autores também constataram que a época de aplicação de *P. chlamydosporia* foi um fator importante na eficácia desse antagonista no controle de *M. incognita* raça 2 e *Meloidogyne exigua* Goeldi. Além disso, em temperaturas próximas a 30 °C, muitos ovos do nematóide escapam da infecção, pois os J₂ eclodem antes que as massas de ovos ou os ovos no solo sejam colonizados pelo antagonista (Kerry & Bourne, 2002).

Possivelmente, o isolado 10 se estabeleça melhor em períodos mais frios do ano e dependa mais da presença do nematóide para sua nutrição e estabelecimento na rizosfera das plantas, já que este isolado foi obtido de solo rizosférico de plantas de alface altamente infestadas pelo nematóide das galhas. Conclui-se que o isolado 10 tem potencial para ser utilizado como agente de controle biológico de *M. javanica* no campo, pois nos ensaios utilizou-se como planta-teste o tomateiro 'Santa Clara', altamente suscetível a esse nematóide e, mesmo assim, esse isolado conseguiu promover reduções expressivas de 60 % quanto ao número de ovos de *M. javanica*.

O fungo *P. chlamydosporia* é mais efetivo em plantas menos suscetíveis ao nematóide das galhas, pois as galhas formadas são pequenas e as massas de ovos são externas e acessíveis ao fungo (Bourne et al., 1996). Plantas que formam galhas grandes apresentam mais fêmeas em seu interior depositando os ovos dentro do tecido radicular da planta, ficando estes ovos protegidos do antagonista (De Leij et al., 1992; Viaene & Abawi, 2000).

A seleção do isolado 10 para testes posteriores também se deu devido à promoção do desenvolvimento do sistema radicular do tomateiro em 28 %, quando comparado com os sistemas radiculares das plantas do tratamento testemunha sem fungo e nematóide (Figura 3). Além disso, as raízes dos tomateiros, mesmo com 21,3 % menos galhas do que a testemunha com nematóides, apresentaram maior peso de raiz fresca (Figura 1). Diferentes isolados de *P. chlamydosporia* também promoveram o crescimento do sistema radicular de plantas de tomate (Hidalgo-Díaz et al., 2000) e de plântulas de tomate e de trigo (Monfort et al., 2005; Dallemole-Giaretta et al., 2006).

A utilização de microrganismos na agricultura que promovam crescimento das plantas e, ao mesmo tempo, controlem patógenos, reduz o uso de insumos químicos e traz benefícios de ordem econômica e ecológica.

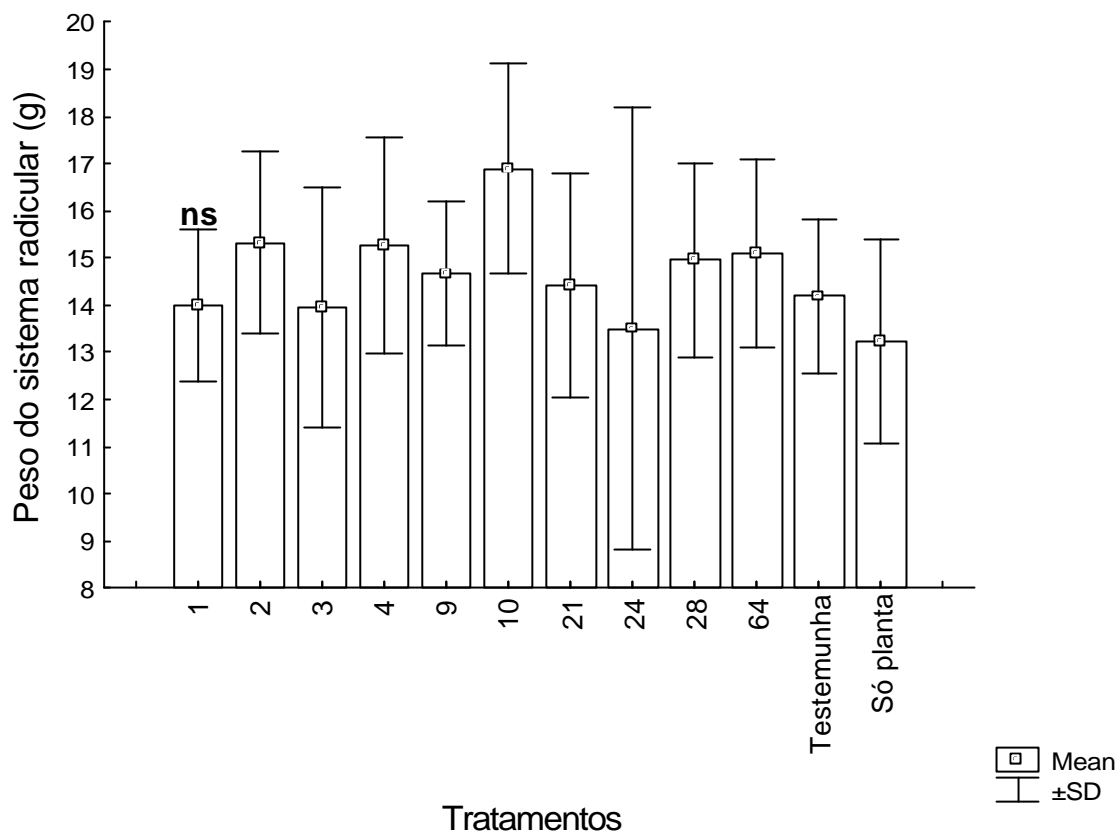


Figura 3 – Peso do sistema radicular de tomateiros, proveniente de solo infestado com diferentes isolados de *P. chlamydosporia* e inoculadas e (ou) *M. javanica*. Médias de oito repetições. ^{ns} Não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade. As barras representam o desvio padrão da média.

Porém, o desempenho de determinado agente de biocontrole deve ser confirmado em diferentes condições, principalmente no campo.

A baixa eficácia da maioria dos isolados de *P. chlamydosporia* testados pode estar relacionada com a baixa produção de enzimas extracelulares antes da infecção, como quitinases e proteases, envolvidas na degradação das camadas externas de ovos do nematóide (Segers et al. 1996; Tikhonov et al. 2002). A produção dessas enzimas possivelmente é diferente entre os isolados testados, apesar de todos terem sido obtidos de solos infestados com o nematóide das galhas. Olivares-Bernabeu & Lopez-Llorca (2002) constataram que isolados de *P. chlamydosporia* obtidos de solos de diferentes regiões da Espanha apresentaram alta atividade proteolítica. No entanto, para a atividade quitinolítica, houve variação entre isolados, principalmente no 3^o e 5^o dias da avaliação, incluindo que um isolado nem sequer produziu quitinase.

Outros fatores podem afetar o desempenho de isolados de *P. chlamydosporia*. De Leij et al. (1993) constataram que *P. chlamydosporia* se estabeleceu mais eficientemente no solo e no rizoplane de plantas cultivadas em solo orgânico com textura arenosa do que em solo de textura arenosa. Como o substrato utilizado para a montagem dos ensaios foi uma mistura de solo e areia 1:1 (v:v) sem adição de esterco, provavelmente esse substrato não continha nutrientes suficientes para permitir o estabelecimento de alguns isolados que se mostraram menos efetivos no controle de *M. javanica*. Possivelmente, tais isolados dependam da matéria orgânica do solo, além dos exsudatos radiculares das plantas de tomate para proliferar, visto que a maioria dos isolados estudados foi obtida de solos cultivados com olerícolas, ricos em matéria orgânica.

Conseqüentemente, a quantidade de inóculo deve ser maior em solos que não apresentem condições satisfatórias para a germinação dos clamidósporos dos isolados menos efetivos, para assegurar a colonização no rizoplane das raízes das plantas e o controle dos fitonematóides (De Leij et al., 1993). Todos os isolados de *P. chlamydosporia* avaliados se estabeleceram no solo e sobreviveram durante todo o período dos ensaios, exceto o isolado 123 (Tabela 3). Este isolado, talvez por não estar ativo desde sua aplicação no solo, não tenha reduzido o número de galhas e de ovos em relação à testemunha (Tabelas 2 e 3). Embora não seja possível determinar em meios semi-seletivos se as unidades formadoras de colônias são provenientes de hifas, conídios ou clamidósporos (Bourne & Kerry, 2000), bem como não podem ser medida da atividade ou da exata densidade da população do fungo no solo (Kerry et al., 1993), é prova que os isolados sobreviveram e proliferaram no solo ou na rizosfera das plantas.

Portanto, conclui-se que, em solos brasileiros, podem ser encontrados isolados de *P. chlamydosporia* com potencial de controle de *M. javanica*, pois neste trabalho foram selecionados dois isolados de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* e sete isolados de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, destacando-se o isolado 10, com redução de pelo menos 60 % no número de ovos.

Tabela 3 – População de diferentes isolados de *Pochonia chlamydosporia*, logo após a infestação do solo com 5.000 clamidósporos/g de solo ou 45 ou 60 dias após o transplântio das mudas de tomate, com a presença de *Meloidogyne javanica*, em três experimentos. Médias de três repetições

Isolados	Log UFC/g solo	
	Ensaio 2	
	Montagem do Experimento	Após 45 dias
1	3,97	5,02
2	4,20	5,24
3	3,30	5,33
4	3,60	5,31
5	3,52	5,02
6	3,52	5,27
7	3,52	5,07
8	3,42	4,86
9	2,82	4,97
10	3,52	5,13
11	4,00	4,92
12	3,12	5,14
14	3,52	4,68
15	3,60	5,41
16	3,12	4,83
Testemunha	0	0
Isolados	Ensaio 2	Após 45 dias
18	3,12	4,56
19	3,30	4,49
20	3,72	5,20
21	3,12	5,43
22	3,60	4,63
23	3,12	5,19
24	3,52	5,18
13	5,08	4,88
26	4,17	5,60
28	4,58	5,29
29	4,31	4,74
52	3,60	4,59
64	4,69	5,42
75	4,50	5,35
123	0	0
Testemunha	0	2,82
isolados	Ensaio 3	Após 60 dias
1	4,17	5,38
2	4,56	4,97
3	3,60	4,88
4	4,08	5,05
9	4,30	4,62
10	3,90	4,89
21	4,51	4,72
24	4,05	4,88
28	4,44	4,96
64	4,33	4,84
Testemunha	0	0

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONETI, J.I.S. & S FERRAZ. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, 6 (Suplemento): 553. Resumo.

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

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

CAMPOS, H.D & V.P. CAMPOS. 1996. Efeito do tipo de matéria orgânica e da época e forma de aplicação dos fungos *Arthrobotrys musiformis*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamyosporium* no controle de *Meloidogyne incognita* raça 2 no feijoeiro. Summa Phytopathologica, 22 (2): 168-171.

CAMPOS, H.D & V.P. CAMPOS. 1997. Efeito da época e forma de aplicação dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamyosporium* no controle de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, 22 (3): 361-365.

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

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; R.J.F. ZOOCA; L.G. FREITAS; W.S. NEVES; S. FERRAZ & C.F.S. FABRY. 2006. *Pochonia chlamyosporia* como promotor de crescimento de plântulas de tomateiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, XXXIX, Salvador. Resumos, p. 191.

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

DE LEIJ, F.A.A.M., B.R. KERRY & J.A. DENNEHY. 1993. *Verticillium chlamyosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and micro-plot tests. Nematologica, 39: 115-126.

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

FREIRE, F.C.O. & J. BRIDGE. 1985. Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. Fitopatologia Brasileira, 10: 577-596.

GASPARD, J.T.; B.A. JAFFEE & H. FERRIS. Association of *Verticillium chlamydosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with root-knot nematode infested soil. Journal of Nematology, 22 (2): 207-213. 1990.

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

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

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

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

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

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

KERRY, B.R.; I.A. KIRKWOOD; F.A.A.M. DE LEIJ; J. BARBA; M.B. LEIJDENS & P.C. BROOKES. 1993. Growth and survival of *Verticillium chlamydosporium* Goddard, a parasite of nematodes, in soil. Biocontrol Science and Technology, 3: 355-365.

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

MONFORT, E.; L.V. LOPEZ-LLORCA; H.B. JANSSON; J. SALINAS; J. O. PARK & K. SIVASITHAMPARAM. 2005. Colonization of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on

Gaeumannomyces graminis var. *tritici* and development of root-rot. Soil Biology & Biochemistry, 1-17.

OLIVARES-BERNABEU, C.M. & L.V. LOPEZ-LLORCA. 2002. Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. Revista Iberoamericana de Micología, 19: 104-110.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, I.; A. DOROTEO-MENDONZA; F. FRANCO-NAVARO; V. SANTIAGO-SANTIAGO & A. MONTERO-PINEDA. 2007. Isolates of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* from Mexico as potential biological control agents of *Nacobbus aberrans*. Nematropica, 37 (1): 127-134.

RIBEIRO, R.C.F. & V.P. CAMPOS. 1993. Isolamento, identificação e efeito da temperatura no crescimento "in vitro" de fungos parasitas de ovos de *Meloidogyne* spp. do sul de Minas Gerais. Nematologia Brasileira, 17 (2): 132-139. 1993.

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

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

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

TIKHONOV, V.E.; L.V. LOPEZ-LLORCA; J. SALINAS & H.B. JANSSON. 2002. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. Fungal Genetics and Biology, 35: 67-78.

VIAENE, N.M. & G.S. ABAWI, 2000. *Hirsutella rhossiliensis* and *Verticillium chlamydosporium* as biocontrol agents of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on lettuce. Journal of Nematology, 32 (1): 85-100.

WANG K.; R.D. RIGGS & D. CRIPPEN. 2005. Isolation, selection, and efficacy of *Pochonia chlamydosporia* for control of *Rotylenchulus reniformis* on cotton. Phytopathology, 95 (8): 890-893.

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

Efeito da concentração de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* para o controle de *Meloidogyne javanica*

Resumo: Avaliou-se, em dois experimentos de casa de vegetação, a eficiência de *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica*. No primeiro experimento, o solo de cada vaso foi infestado com 3.000 ovos de *M. javanica* e com clamidósporos do fungo nas proporções de 5.000, 10.000, 15.000, 20.000 ou 25.000/g de solo, e, após 7 dias, uma muda de tomate foi transplantada para cada vaso. No segundo experimento, foram adicionados 4.000 ovos do nematóide e 5.000 clamidósporos por grama de solo, tendo sido as mudas transplantadas somente após 15 dias. No primeiro experimento, o número de ovos de *M. javanica* foi reduzido de 34 a 60 %, independentemente da quantidade de clamidósporos aplicada, mas não se observou redução no número de galhas. No segundo experimento, a aplicação do antagonista ao solo reduziu em 82 % o número de ovos e em 50 % o número de galhas por sistema radicular. Desta forma, conclui-se que o fungo deve ser colocado em contato com o nematóide no solo por um período maior, antes do plantio da cultura, para que haja redução da densidade de inóculo do patógeno e do número de galhas já no primeiro ciclo do nematóide.

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

Effect of different rates of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* chlamydospores on *Meloidogyne javanica* control

Abstract: The efficiency of *P. chlamydosporia* on the control of *M. javanica* was evaluated in two greenhouse experiments. In the first experiment, the soil of each pot was infested with 3,000 eggs of *M. javanica* and chlamydospores of the fungus at the rates of 5,000; 10,000; 15,000; 20,000 or 25,000/g of soil. Seven days later, one tomato seedling was transplanted in each pot. In the second experiment, 4,000 eggs of the nematode and 5,000 chlamydospores/g of soil were added into the soil, but the tomato seedlings were transplanted only after 15 days. In the first experiment, all chlamydospore rates reduced the number of eggs of *M. javanica* (up to 56 %), but no effect on the number the galls was observed. In the second experiment, the application of the antagonist reduced in 82 % the number of eggs and in 50 % the number of galls per root system. Therefore, the fungus should be placed in contact with the nematode eggs into the soil for a longer period before the transplanting of the crop in order to reduce the pathogen inoculum density and to promote reduction in the number of galls right in the first cycle of the nematode.

Key-words: nematophagous fungi, root-knot nematode, chlamydospores, biological control.

1. INTRODUÇÃO

Pochonia chlamydosporia Zare & Gams (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard) é um fungo parasita facultativo de ovos de *Meloidogyne* spp. Goeldi (De Leij & Kerry, 1991; De Leij et al., 1993), e sua efetividade no controle do nematóide das galhas *Meloidogyne* spp. Goeldi já foi comprovada em vários estudos (Viaene & Abawi, 2000; Bourne, 2001; Khan et al., 2005). Este antagonista reduz a população do nematóide pela colonização das massas de ovos expostas na superfície do sistema radicular das plantas e morte do embrião ou juvenil de segundo estágio (Morgan-Jones, 1983; Bourne et al., 1996; Kerry & Bourne, 2002; Mukhtar & Pervaz, 2003).

Pochonia chlamydosporia apresenta a vantagem de produzir clamidósporos, estruturas de resistência e sobrevivência, preferencialmente utilizados como inóculo, podendo ser adicionados ao solo em suspensão aquosa sem fonte adicional de nutrientes (Kerry & Bourne, 2002). No solo, os clamidósporos germinam, e o micélio formado prolifera, coloniza o sistema radicular e parasita as massas de ovos formadas na superfície das galhas (Bourne et al., 1996).

A colonização radicular por *P. chlamydosporia* depende da quantidade de inóculo do antagonista no solo, da presença ou ausência do nematóide nas raízes e da quantidade de estímulos liberados pelas raízes das plantas para o crescimento do fungo (De Leij & Kerry, 1991; De Leij et al., 1992a; Bourne & Kerry, 2000). *Pochonia chlamydosporia* também é capaz de utilizar a matéria orgânica do solo como fonte de nutrientes, preda ovos não associados às raízes ou em restos culturais, sugerindo que esse antagonista possa viver no solo na ausência de plantas (Stirling, 1991; Bourne & Kerry, 2000; Viaene & Abawi, 2000; Mauchline et al., 2002).

Considerando que os ovos dos fitonematóides são importantes fontes nutricionais para o fungo (Stirling, 1991), pode-se potencializar o controle do nematóide das galhas pela aplicação de *P. chlamydosporia* ao solo alguns dias antes do plantio da cultura principal, visando a aumentar o parasitismo de ovos dos nematóides e, assim, reduzir o inóculo inicial do fitopatógeno.

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar diferentes concentrações de clamidósporos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*

isolado Pc-10 e a aplicação do fungo no solo aos sete ou quinze dias antes da instalação da cultura para o controle de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Produção de clamidósporos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*

O isolado Pc-10 do antagonista utilizado nos ensaios pertence à coleção de fungos nematófagos do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematóides da UFV e foi obtido de solo infestado com *Meloidogyne* spp., no município de Viçosa - MG.

Para a obtenção dos clamidósporos, o fungo foi repicado para placas de Petri contendo meio 'Corn Meal Agar' (CMA) e cultivado por 15 dias em câmara de crescimento, no escuro, a 26 °C. Posteriormente, três discos de meio de 7 mm de diâmetro, contendo micélio, foram transferidos para um frasco tipo Erlenmeyer, com capacidade de 250 mL, contendo 80 g de substrato previamente autoclavado, composto de milho triturado (canjiquinha) + areia 1:1 (p:p) e 60 mL de água destilada. Os frascos foram armazenados por 21 dias em câmara de crescimento, no escuro, a 26 °C. Após esse período, o substrato de cada frasco foi transferido para um balde, e, após a adição de água de torneira, foi feita uma agitação manual da mistura e uma filtragem através de uma camada dupla de gaze. A concentração de clamidósporos na suspensão foi quantificada com o auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico.

2.2. Condução do experimento

O primeiro experimento foi conduzido durante o período de 10/11/06 a 02/01/07, com temperatura média na casa de vegetação de 28,8 °C, sendo a média das máximas de 36 °C e a média das mínimas de 21,6 °C. Vasos de 500 mL de capacidade foram enchidos com a mistura solo e areia, na proporção 1:1 (v:v), previamente tratada com brometo de metila. O solo de cada vaso foi posto em um saco de plástico de 5 L de capacidade com os clamidósporos do fungo (5.000, 10.000, 15.000, 20.000 ou 25.000

clamidósporos/g de solo), homogeneizado por agitação manual e colocado novamente no vaso. A seguir, o solo foi infestado com 3.000 ovos de *M. javanica* por vaso, adicionando-se o inóculo em quatro buracos eqüidistantes 5 cm na parte central do vaso. O solo foi mantido úmido em 60 % da capacidade de campo por uma semana, quando uma muda de tomateiro cultivar Santa Clara foi transplantada para cada vaso.

O segundo experimento foi conduzido durante o período de 13/05 a 28/07/07, com média de temperatura na casa de vegetação de 22,1 °C, sendo a média das máximas de 30,6 °C e a média das mínimas de 13,6 °C. Os procedimentos metodológicos foram semelhantes àqueles do experimento anterior, tendo o solo de cada vaso sido infestado com 5.000 clamidósporos/g de solo e 4.000 ovos de *M. javanica*. O transplântio das mudas de tomate ocorreu após 15 dias. Como controle, em ambos os experimentos, foi utilizada uma mistura de solo e areia infestada com o nematóide, sem a adição do fungo. O delineamento dos experimentos foi o inteiramente casualizado, com oito repetições por tratamento. No final de cada experimento, foram avaliados a altura, o peso da parte aérea e das raízes frescas e os números de galhas e de ovos por sistema radicular.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observado aumento na altura e no peso das plantas de tomate nos dois experimentos, quando comparado com as testemunhas com nematóides.

O isolado Pc-10 de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* reduziu a multiplicação de *M. javanica* em raízes de tomateiro em todas as concentrações de clamidósporos aplicadas ao solo (Tabela 1). No primeiro experimento, no qual o fungo e os ovos foram introduzidos no solo sete dias antes do transplântio das mudas, a redução do número de ovos foi de 34 a 60 %, variando independentemente do aumento da concentração, não se observando, porém, redução no número de galhas (Tabela 1).

No segundo experimento, no qual o fungo e os ovos permaneceram no solo por 15 dias antes do transplante do tomateiro, a quantidade de 5.000 clamidósporos/g de solo (a menor concentração de inóculo inicial do primeiro experimento) proporcionou reduções de 82 % no número de ovos por sistema

Tabela 1 – Número médio de galhas e ovos de *Meloidogyne javanica* em raízes de tomateiros após aplicação no solo de diferentes quantidades de clamidósporos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, isolado Pc-10 e ovos do nematóide, sete dias (ensaio 1) ou 15 dias (ensaio 2) antes do plantio das mudas de tomate, em casa de vegetação

Quantidade de clamidósporos/g de solo	Nº de galhas	Nº de ovos
Experimento 1		
Adição do fungo e do nematóide sete dias antes do plantio		
0 (Testemunha)	1.444 ns	313.329
5.000	1.337	159.700*
10.000	1.505	138.667*
15.000	1.297	191.562*
20.000	1.603	125.187*
25.000	1.415	207.808*
Experimento 2		
Adição do fungo e do nematóide quinze dias antes do plantio		
0 (Testemunha)	611	177.618 ^a
5.000	276 ⁺	31.488 ⁺

* Médias que diferem do controle pelo de Dunnett, a 5 % de probabilidade. ^{ns} Não significativo pelo teste F, a 5 % de probabilidade. ^a Valores transformados para \sqrt{x} . ⁺ Significativo pelo teste F, a 5 % de probabilidade. Médias de oito repetições.

radicular e de 55 % no número de galhas, em comparação com o tratamento testemunha ($P < 0,05$) (Tabela 1).

O maior período de contato entre o fungo e os ovos do nematóide no solo aumentou a atuação de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* na redução da infecção inicial de *M. javanica*. Somente sete dias de contato do antagonista com os ovos do nematóide, antes do plantio do tomate, não permitiram que *P. chlamydosporia* reduzisse significativamente o número de galhas. Tal fato também foi constatado por Lopes et al. (2007), após manter os ovos de *M. javanica* em contato com *P. chlamydosporia* por sete dias antes do plantio da mesma cultura. Os ovos dos nematóides são constituídos de proteínas e lipídios, utilizados pelo fungo como fonte de energia (Stirling, 1991). Quanto maior o tempo de contato do fungo com os ovos, mais eficiente é o parasitismo dos ovos, podendo impedir a formação e a eclosão dos juvenis de segundo estágio (J_2), reduzindo assim a infecção das raízes e, por consequência, o número de galhas e de ovos produzidos.

A temperatura ambiente afeta diretamente o crescimento do fungo e do nematóide. A temperatura ótima para *P. chlamydosporia* é de 25 °C (Zare & Gams, 2004) e para *M. javanica* é de 29 °C (Taylor & Sasser, 1983). Como o primeiro experimento foi montado em uma época do ano mais quente do que a do segundo experimento, com temperatura média próxima a 29 °C, ótima para o nematóide, mas muito quente para o fungo, os J₂ se formaram mais rapidamente, eclodiram e penetraram nas raízes antes de o fungo ter tido a chance de colonizar e parasitar os ovos do nematóide (De Leij et al., 1992b; De Leij et al., 1993; Kerry & Bourne, 2002). Por outro lado, durante o segundo experimento, a temperatura média foi de 22,1 °C, o que prolongou muito mais o ciclo de vida do nematóide do que do fungo, retardando a eclosão e favorecendo a atividade parasítica de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*.

Quanto ao efeito das diferentes quantidades de clamidósporos testadas para o controle de *M. javanica* no primeiro experimento, não se observou maior redução do número de ovos por sistema radicular à medida que se aumentou a quantidade de clamidósporos. No entanto, todas as quantidades de clamidósporos diminuíram a multiplicação do nematóide, quando comparadas com o tratamento testemunha (Tabela 1). De Leij et al. (1992a, 1993) também estudaram o efeito de diferentes quantidades de clamidósporos de *P. chlamydosporia* no controle de *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood. Contudo, nesses estudos, os autores aplicaram o antagonista no solo e, em seguida, transplantaram ou semearam o tomate e somente quinze ou trinta dias após, inocularam juvenis do nematóide. Os autores observaram que *P. chlamydosporia* não preveniu a penetração dos J₂ nas raízes das plantas. No entanto, observaram reduções na população de *M. incognita*, principalmente quando foram inoculadas as quantidades de 5.000 a 50.000 clamidósporos/g de solo.

Portanto, como *P. chlamydosporia* é parasita facultativo de ovos e fêmeas de nematóide, o tipo de inóculo do nematóide utilizado para a montagem dos testes e a época em que o fungo for aplicado ao solo poderão afetar os resultados obtidos quanto à efetividade do antagonista. Esse fato é sugerido porque em outro estudo com esse mesmo isolado, Pc-10 de *P. chlamydosporia* (dados não publicados), também foram aplicados ao solo 5.000 clamidósporos/g de solo, no momento do transplante do tomate. A

inoculação dos ovos do nematóide foi feita somente sete dias após o plantio. Com este procedimento, constatou-se uma baixa redução tanto do número de galhas como de ovos de *M. javanica*, quando comparado com a testemunha.

De Leij et al. (1993) também testaram as quantidades de 500, 1.000, 5.000 ou 10.000 clamidósporos de *P. chlamydosporia*/g de solo no controle de *M. incognita* em tomateiros. Estas plantas cresceram em solo orgânico com textura arenosa, areia-franca ou solo de textura arenosa. Os autores constataram que a maior quantidade de clamidósporos resultou em menor população final de *M. incognita*, quando comparada com as outras quantidades de inóculo fúngico, mas somente quando as plantas foram cultivadas em solo orgânico.

Portanto, a pouca diferença na redução do número de ovos de *M. javanica*, observada no primeiro experimento, entre as quantidades de 5.000 a 25.000 clamidósporos/g de solo de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, provavelmente, ocorreu porque o substrato utilizado para a montagem do ensaio foi apenas uma mistura de solo e areia 1:1 (v:v), sem adição de matéria orgânica. Nesse tipo de substrato, possivelmente, as quantidades mais altas de inóculo de *P. chlamydosporia* competiram por nutrientes para germinar e se estabelecer no solo.

Embora a presença de matéria orgânica no solo possa favorecer a germinação dos clamidósporos e o estabelecimento do fungo no solo (Stirling, 1991), a utilização de quantidades muito altas de inóculo de *P. chlamydosporia* pode ser inviável, considerando a aplicação do antagonista em escala comercial (Kerry, 2001).

Como foi observado, em ambos os experimentos, *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* reduziu efetivamente o número de ovos de *M. javanica* quando aplicado na quantidade de 5.000 clamidósporos/g de solo, principalmente quando o fungo permaneceu maior tempo em contato com os ovos do nematóide no solo. Dessa forma, conclui-se que o aumento do período de exposição dos ovos do nematóide ao fungo poderá ser mais efetivo no controle desse fitoparasita do que o aumento da quantidade de clamidósporos aplicada ao solo.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BOURNE, J.M. 2001. Making a soil suppressive to root-knot nematodes by applications of *Verticillium chlamyosporium*. *IOBC/WPRS Bulletin*, 24 (1): 25-30.

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

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

DE LEIJ, F.A.A.M.; B.R. KERRY & J.A. DENNEHY. 1993. *Verticillium chlamyosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and micro-plot tests. *Nematologica*, 39: 115-126.

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

DE LEIJ, F.A.A.M.; J.A. DENNEHY & B.R. KERRY. 1992b. The effect of temperature and nematode species on interactions between the nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium* and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Nematologica*, 38: 65-79.

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

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

KHAN, M.R.; S.M. KHAN & F. MOHIDE. 2005. Root-knot nematode problem of some winter ornamental plants and its biomanagement. *Journal of Nematology*, 37 (2): 198-206.

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

MAUCHLINE, T.H.; B. R. KERRY & P.R. HIRSCH. 2002. Quantification in soil and the rhizosphere of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* by competitive PCR and comparison with selective plating. *Applied Environmental Microbiology*, 68 (4): 1846-1852.

MORGAN-JONES, G.; J.F. WHITE & R. RODRÍGUEZ-KÁBANA. 1983. Phytonematode pathology: Ultrastructural studies. I. Parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs by *Verticillium chlamydosporium*. *Nematropica*, 13 (2): 245-260.

MUKHTAR, T. & I. PERVAZ. 2003. In vitro evaluation of ovicidal and larvicidal effects of culture filtrate of *Verticillium chlamydosporium* against *Meloidogyne javanica*. *International Journal of Agriculture and Biology* 5 (4): 576-579. (Abstract).

STIRLING, G.R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes. CAB. International, Wallingford, 282 p.

TAYLOR, A.L. & J.N. SASSER. 1983. Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz. (Especies de *Meloidogyne*). Artes gráficas de la Universidad del Estado del Carolina del Norte. Raleigh, Carolina del Norte, 111 p.

VIAENE, N.M. & G.S. ABAWI, 2000. *Hirsutella rhossiliensis* and *Verticillium chlamydosporium* as biocontrol agents of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on lettuce. *Journal of Nematology*, 32 (1): 85-100.

ZARE, R. & W. GAMS. 2004. A monograph of *Verticillium* section Prostrata. *Rostaniha (Botanical Journal of Iran)*, Supplement, 3, 188 p.

Avaliação de plantas de cobertura do solo em associação com *Pochonia chlamydosporia* para o controle de *Meloidogyne javanica*

Resumo: A utilização de *P. chlamydosporia* em conjunto com as plantas de cobertura do solo de verão, milheto (*Pennisetum americanum* (L.) Leek) e capim-braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf), ou de inverno, aveia-preta (*Avena strigosa* Schreb) e nabo-forrageiro (*Raphanus sativus* var. *oliferus* Metzg) foi estudada para a redução da população de *Meloidogyne javanica* no solo, em condições de casa de vegetação. Solo previamente infestado ou não com 200 ou 165 J₂ de *M. javanica* por 100 cm³ recebeu 5.000 clamidósporos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* por grama de solo no momento do plantio de milheto, capim-braquiária, aveia-preta, nabo-forrageiro ou tomate. Além disso, em ambos os ensaios, foram adicionados os tratamentos pousio solo nu somente em substrato infestado. Sessenta dias após o plantio, a parte aérea das plantas de tomate foi descartada e a das plantas de cobertura do solo foi cortada em fragmentos de ± 2 cm, seca e colocada sobre os respectivos vasos. Em seguida, uma plântula de tomate foi transplantada para cada vaso, em sistema de simulação de plantio direto na palhada. As plantas de cobertura do solo, em associação ou não com *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, reduziram significativamente a população do nematóide das galhas. A aplicação de *P. chlamydosporia* Pc-10 nos tratamentos pousio solo nu ou tomate, no ensaio com as plantas de cobertura do solo de verão, não reduziu o número de galhas ou de ovos quando se comparou com suas respectivas testemunhas. No entanto, no ensaio com as plantas de cobertura de solo de inverno, o antagonista reduziu o número de galhas nesses tratamentos bem como o número de ovos no tratamento pousio solo nu. A espécie *Pochonia chlamydosporia* se estabeleceu mais efetivamente no solo nos tratamentos com a presença do nematóide e, principalmente, na cultura do tomate, 74 dias após o plantio. A associação desse agente de biocontrole no campo com plantas de cobertura é uma alternativa viável de manejo integrado do nematóide das galhas.

Palavras-chave: fungo nematófago, nematóide das galhas, controle biológico, sucessão de culturas.

Evaluation of cover crops and *Pochonia chlamydosporia* for the control of *Meloidogyne javanica*

Abstract: The use of *Pochonia chlamydosporia* associated with summer cover crops, pearl millet (*Pennisetum americanum* (L.) Leek) and suriname grass (*Brachiaria decumbens* Stapf), or winter cover crops, black oat (*Avena strigosa* Schreb) and oil radish (*Raphanus sativus* var. *oliferus* Metzg), for reducing *Meloidogyne javanica* population in the soil was studied under greenhouse conditions. Five thousands chlamydospores of *Pochonia chlamydosporia* were applied per gram of nematode-infested soil (200 or 165 *M. javanica* J₂ per 100 cm³) and non-infested soil at the moment of the planting of pearl millet, brachiaria grass, black oat, oil radish or tomato. Sixty days after the planting, tomato plants were eliminated and aboveground of the cover crops was cut, dried, and placed on the pots. One tomato seedling was transplanted in each pot, in direct planting system. The cover crops treatments, associated or not with *P. chlamydosporia*, reduced the root-knot nematode population. *P. chlamydosporia* Pc-10 alone did not reduce the number of galls or eggs of the nematode in the summer experiment. On the other hand, the fungus alone reduced the number of galls and eggs of *M. javanica* in the winter experiment. After 74 days, the fungus established better in the nematode-infested soil and cultivated with tomato, mainly. The use of *P. chlamydosporia* and cover crops under field conditions is a viable alternative for the integrated management of the root-knot nematode.

Key-words: nematophagous fungi, root-knot nematode, control biological.

1. INTRODUÇÃO

O nematóide das galhas, gênero *Meloidogyne* Goeldi, é considerado um fitoparasita muito destrutivo, pois causa severos danos ao sistema radicular, tornando-o pouco eficiente na absorção de água e nutrientes e, assim, reduzindo a produtividade e o valor comercial de órgãos subterrâneos, deformando-os (Moura, 1996).

Uma das medidas tradicionalmente utilizadas no manejo do nematóide das galhas é o controle químico, mas com a retirada de muitos nematicidas do mercado, por serem altamente tóxicos e causarem sérios riscos à saúde humana e ao meio ambiente, táticas alternativas de manejo vêm sendo estudadas intensivamente nas últimas décadas, a exemplo do controle biológico (De Leij & Kerry, 1991; Stirling, 1991; Dickson *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1996;).

Dentre os agentes de biocontrole de nematóides, o fungo *Pochonia chlamydosporia* Zare & Gams (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard) se destaca por ser um antagonista parasita de ovos e fêmeas do nematóide das galhas e apresentar grande potencial no controle deste fitonematóide (De Leij & Kerry, 1991; De Leij *et al.*, 1993; Viaene & Abawi, 2000, Lopes *et al.*, 2007). Além disso, este fungo é facilmente cultivado *in vitro*, (Bourne *et al.*, 1999), estabelecendo-se no sistema radicular de muitas plantas (Bourne *et al.*, 1996), que é onde se localizam os ovos do nematóide, e produzindo clamidósporos, que são as estruturas de resistência que prolongam sua sobrevivência no campo em situações de estresse e durante o armazenamento.

Outra alternativa de manejo do nematóide das galhas é a combinação do fungo nematófago com outros métodos de controle, como plantas antagonistas ou adubos verdes (Carneiro *et al.*, 1998; Ferraz & Freitas, 2004; Inomoto *et al.*, 2006) em sistema de rotação de cultura, sendo um método eficiente, barato e sustentável para controlar o nematóide das galhas. O fungo *P. chlamydosporia* tem a vantagem de colonizar raízes de gramíneas e de outras plantas de cobertura (Bourne *et al.*, 1994; Bourne *et al.*, 1996), aumentando assim sua densidade no solo para atuar mais eficientemente sobre os nematóides que parasitarão a cultura principal.

A multiplicação do fungo nas raízes de plantas de cobertura e na matéria orgânica incorporada se insere perfeitamente no conceito de agricultura sustentável, pois substitui os defensivos químicos tóxicos ao homem, protege o solo contra erosão, recompõe sua fertilidade, estimula sua biodiversidade e reduz os gastos da agricultura familiar com insumos externos. Uma vez introduzido na propriedade, o fungo *P. chlamydosporia* pode se estabelecer indefinidamente, pois seus clamidósporos resistem às entressafras e seus micélios se desenvolvem saprofiticamente em solos organicamente manejados.

Este trabalho visa a verificar o estabelecimento de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* Pc-10 no solo manejado com plantas de cobertura de solo de inverno e de verão e o efeito antagônico dessa combinação sobre o nematóide das galhas *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Multiplicação de *Meloidogyne javanica*

Para ambos os experimentos, mudas de tomate cultivar Santa Clara foram transplantadas para vasos de plástico de 2 L de capacidade, contendo uma mistura solo e areia 1:1 (v:v), tratada com brometo de metila. Após dois dias do transplante, foram abertos orifícios no solo ao redor de cada planta e inoculados 5.000 ovos de *M. javanica*. Também foram cultivados tomateiros sem inocular o nematóide das galhas para a obtenção de substrato sem nematóides.

Decorridos três meses da inoculação, as plantas foram descartadas e o substrato com o nematóide foi homogeneizado em betoneira por 10 minutos e recolocado em vasos de 2 L de capacidade. Amostra de solo foi coletada e o número de J_2 por 100 cm³ de solo foi determinado segundo Jenkins (1964), antes da montagem de cada experimento.

2.2. Produção de clamidósporos de *P. chlamydosporia* Pc-10

Clamidósporos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* Pc-10 foram produzidos em substrato composto por milho triturado (canjiquinha),

previamente umedecido e esterilizado dentro de sacos de polipropileno autoclaváveis. Cada saco recebeu três discos de micélio (7 mm) do meio 'Corn Meal Agar' (CMA) colonizados pelo fungo por 15 dias, no escuro, a 25 °C. O substrato foi armazenado por 21 dias em câmara de crescimento, no escuro, a 25 °C.

Após esse período, os clamidósporos foram extraídos pela agitação manual do substrato colonizado num balde com água de torneira. A suspensão contendo os clamidósporos foi filtrada em camada dupla de gaze e o número de clamidósporos foi estimado com o auxílio de câmara de Newbauer.

2.3. Montagem dos ensaios

Para avaliar a eficiência de plantas de cobertura em associação com *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no controle de *M. javanica*, foram montados dois ensaios. O primeiro ensaio foi montado com as plantas de cobertura de solo de verão (milheto e capim-braquiária) e foi conduzido durante o período de 09/02/07 a 28/06/07, com temperatura máxima média do ar de 26,5 °C e a mínima média de 14,9 °C, com os seguintes tratamentos: 1) Tomate; 2) Milheto; 3) Capim-braquiária; 4) Tomate+Pc; 5) Milheto+Pc; e 6) Capim-braquiária+Pc. O segundo ensaio foi montado com as plantas de cobertura de solo de inverno (aveia-preta e nabo-forrageiro) e foi conduzido durante o período de 10/04/07 a 26/08/07, com temperatura máxima média do ar de 26,1 °C e a mínima média de 12,7 °C, com os tratamentos: 1) Tomate; 2) Aveia-preta; 3) Nabo-forrageiro; 4) Tomate+Pc; 5) Aveia-preta+Pc; e 6) Nabo-forrageiro+Pc. Todos os tratamentos dos ensaios foram montados tanto em substrato infestado com *M. javanica* como em substrato não infestado. O tratamento Pousio solo nu de ambos os ensaios foi montado somente em solo infestado. Os ensaios foram montados em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado, com nove repetições por tratamento.

Para a aplicação de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* Pc-10, os solos dos tratamentos 4, 5 e 6 foram colocados separadamente em sacos plásticos de 5 L de capacidade juntamente com a suspensão aquosa de clamidósporos do antagonista, previamente calibrada de forma a resultar em 5.0000 clamidósporos/g de solo. Posteriormente, essa mistura foi

homogeneizada manualmente por aproximadamente três minutos e retornada novamente aos vasos. Uma amostra composta de 100 g de solo de cada tratamento foi coletada para avaliação da população do antagonista no solo por meio da análise das unidades formadoras do antagonista (UFC). Em seguida, para cada vaso foi transplantada uma muda de tomate cultivar Santa Clara ou semeada uma das plantas de cobertura, com desbaste feito após sete dias para a condução de doze plantas/vaso.

Após 60 dias de condução dos experimentos, a parte aérea das plantas de tomate foi retirada e descartada e a das plantas de cobertura foi cortada em fragmentos de ± 2 cm e seca por 72 h a 70 °C, para determinação do peso de matéria seca de cada espécie. Permitiu-se que as plantas rebrotassem por doze dias e, após, foi pulverizado sobre a rebrota das gramíneas o dessecante glifosate na dose de 4L/ha, e a palhada do milho, capim-braquiária, aveia-preta ou nabo-forageiro foi colocada sobre a superfície dos respectivos vasos. Somente após quatro dias da aplicação do herbicida, efetuou-se o arranquio do sistema radicular das plantas de tomate remanescentes, coletando-se uma amostra composta de solo de todos os tratamentos. Em seguida, foi feito o plantio de uma muda de tomate em cada um dos vasos de todos os tratamentos, tendo sido as plantas conduzidas por 60 dias na casa de vegetação.

No momento da coleta dos ensaios, amostras de solo dos respectivos tratamentos foram coletadas novamente para determinação da população do fungo no solo. As UFCs foram determinadas conforme o método descrito por Kerry (1991), em meio semi-seletivo (Gaspard *et al.*, 1990). Foram avaliados a altura, o peso de matéria fresca da parte aérea das plantas, o peso de matéria fresca das raízes e o número de galha e de ovos por sistema radicular.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelos testes Duncan ou Scott-Knott, a 5 % de probabilidade, após a transformação ou não dos dados para $\sqrt{x+1}$ ou \sqrt{x} . Os dados do ensaio das plantas de cobertura do solo de verão, quanto ao número de galhas e ovos, foram submetidos à análise estatística descritiva por não seguir a distribuição normal.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio 1, o plantio das gramíneas forrageiras de verão, milho e capim-braquiária, independentemente da adição de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, promoveu reduções significativas no número de galhas e ovos de *M. javanica* (Figuras 1 e 2), quando comparado aos demais tratamentos. A aplicação de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, Pc-10, nos tratamentos pousio ou tomate não reduziu o número de galhas ou de ovos quando comparados com suas respectivas testemunhas (Figuras 1 e 2).

Pochonia chlamydosporia se estabeleceu no solo em todo o período em que foi conduzido o experimento. Aos 74 dias, comprovou-se que os valores de unidades formadoras de colônias entre os tratamentos variaram de $2,0 \times 10^4$ a $1,3 \times 10^5$ por grama de solo. Os menores valores foram observados nos tratamentos com as plantas de cobertura de solo, principalmente no solo sem nematóide e com capim-braquiária. O tomate foi a cultura que proporcionou o melhor estabelecimento do antagonista no solo, independentemente da presença do nematóide.

A alta efetividade no controle de *M. javanica* observada nos tratamentos com as gramíneas de verão, sem aplicação de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* Pc-10, ocorreu porque essas gramíneas apresentam efeito antagônico a esse nematóide (Santo & Ruano, 1987; Carneiro *et al.*, 1998; Dias-Arieira *et al.*, 2002; Dias-Arieira *et al.*, 2003; Carneiro *et al.*, 2007). O milho é uma planta praticamente imune ao ataque de *M. javanica*. (Carneiro *et al.*, 1998; Carneiro *et al.*, 2007). Para o capim-braquiária, Dias-Arieira *et al.* (2002) sugeriram ação nematicida ou nematostática de alguns compostos químicos presentes nas raízes da planta, após constatar baixa penetração e inibição do desenvolvimento de *M. javanica* nas raízes dessa cultura.

Embora essas plantas possam ser utilizadas em sistema de rotação ou sucessão de culturas para reduzir o inóculo inicial do nematóide, a integração de compostos orgânicos e agentes de controle biológico apresenta resultados mais promissores no controle desses fitopatógenos (Ehteshamul-Haque *et al.*, 1996; Al-Rehiyani *et al.*, 1999; Cannayane & Rajendran, 2001). Esta associação pode favorecer o estabelecimento e a proliferação do antagonista

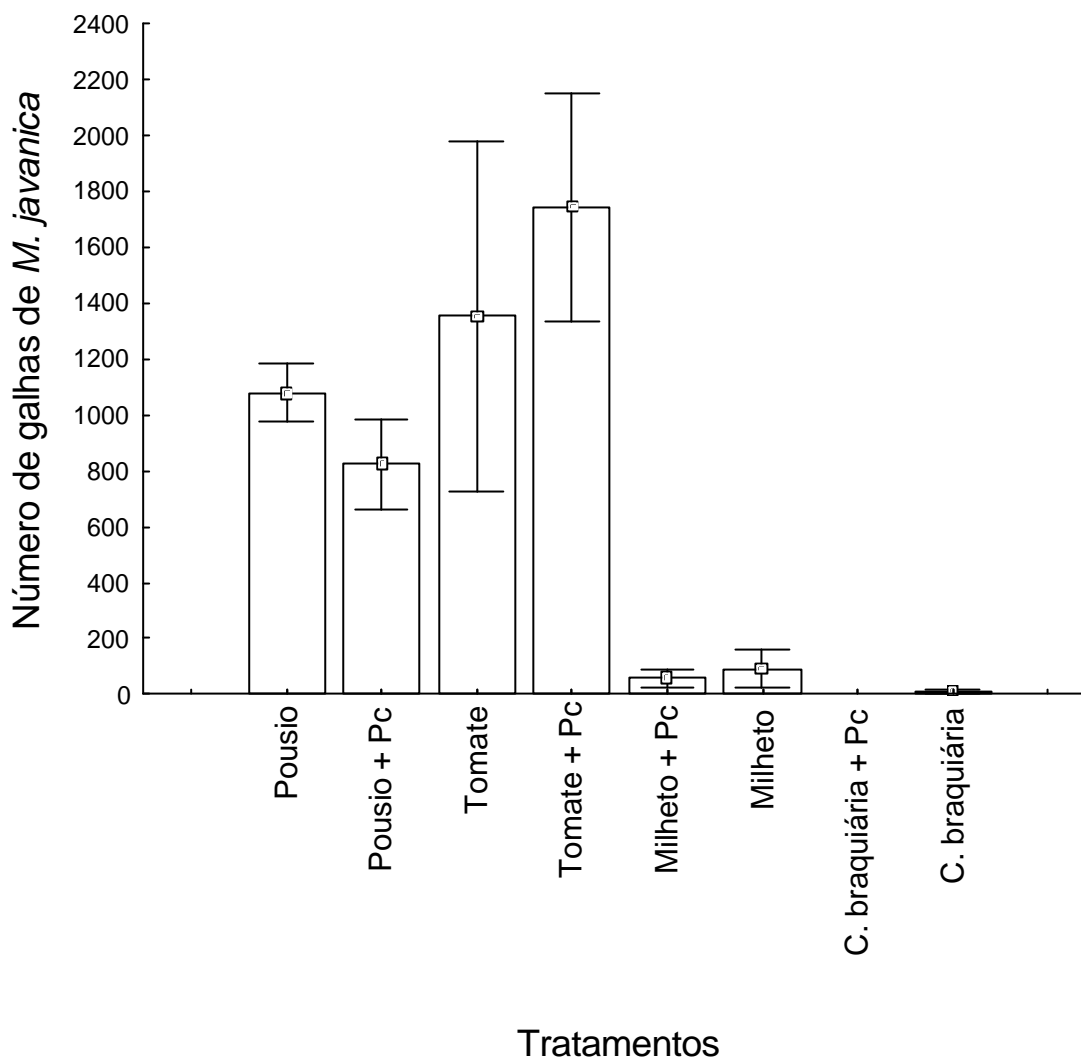


Figura 1 – Número de galhas obtidas por sistema radicular de tomateiro, após a aplicação de 5.000 clamidósporos/g de solo de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* isolado Pc-10 e cultivo de tomate, milho, capim-braquiária ou pousio solo no seguido de tomate, em solo infestado com *M. javanica*. As barras representam o intervalo de confiança associado ao teste T a 5 % de probabilidade. Médias de nove repetições.

no solo, podendo assim o fungo atuar sobre o nematóide das galhas por um período mais prolongado.

O fato de utilizar plantas de cobertura do solo em associação com *P. chlamydosporia* é vantajoso, uma vez que algumas gramíneas são más hospedeiras de certas espécies de nematóides, resultando assim em galhas menores e com massas de ovos mais expostas ao ataque do fungo (Bourne *et al.*, 1996; Kerry & Bourne, 1996). Outro fator positivo dessa integração é a decomposição da matéria orgânica vegetal liberando metabólitos secundários

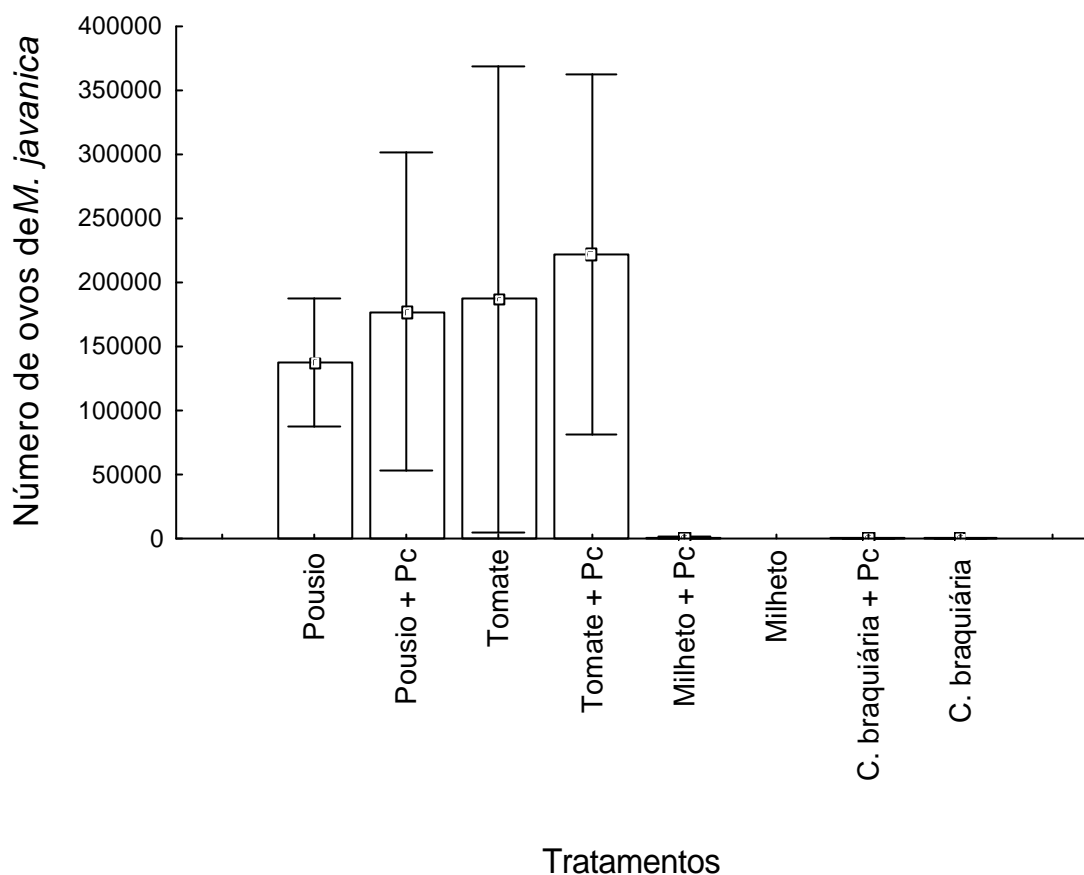


Figura 2 – Número de ovos obtidos por sistema radicular de tomateiro, após a aplicação de 5.000 clamidósporos/g de solo de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* isolado Pc-10 e cultivo de tomate, milho, capim-braquiária ou pousio solo no seguido de tomate, em solo infestado com *M. javanica*. As barras representam o intervalo de confiança associado ao teste T a 5% de probabilidade. Médias de nove repetições.

com efeito nematicida. Pandey & Sikora (2000), quando trataram os ovos de *H. schachtii* Schmidt com extratos de esterco de aves e de nim ou de *M. incognita* com o extrato de composto de casca de pinheiro, antes de esses serem expostos ao fungo *P. chlamydosporia*, observaram que tais extratos alteraram e degradaram a membrana protetora dos ovos, tornando-os mais suscetíveis ao parasitismo do fungo. Considerando que *P. chlamydosporia* compete por muitos nutrientes disponíveis no solo e prolifera bem em solos orgânicos, espera-se que esse antagonista se estabeleça e aumente sua biomassa mais efetivamente em áreas manejadas com gramíneas, uma vez que produzem grande quantidade de massa verde (Stirling, 1991; De Leij *et al.*, 1993; Bourne *et al.*, 1999; Viaene & Abawi, 2000).

No ensaio com plantas de cobertura de solo de inverno, novamente pôde-se observar que não houve diferença na redução do número de ovos de *M. javanica* com ou sem a presença do antagonista (Figura 4). No entanto, nos tratamentos Tomate+Pc e Pousio solo nu+Pc, constatou-se diminuição do número de galhas de *M. javanica*, quando comparados com suas respectivas testemunhas, e do número de ovos para o tratamento Pousio solo nu+Pc, quando comparado com o controle (Figuras 3 e 4).

Novamente, neste ensaio, comprovou-se aos 74 dias que houve maior estabelecimento do fungo no solo, nos tratamentos com nematóides. Os valores observados de unidades formadoras de colônias foram de $2,0 \times 10^4$ a $3,5 \times 10^5$ por grama de solo. A maior proliferação do antagonista no solo foi observada nas plantas de tomate, e a aveia-preta sem o nematóide apresentou o menor estabelecimento do antagonista no solo.

Pochonia chlamydosporia pode ser utilizada mais apropriadamente com adubos verdes de inverno, como utilizados neste segundo ensaio, pois a época do ano em que são cultivados apresenta temperaturas mais propícias para o desenvolvimento desse fungo. Além disso, esses adubos verdes são muito utilizados na agricultura e recomendados para o controle do nematóide das galhas (Santos & Ruano, 1987; Carneiro *et al.*, 1998).

A menor efetividade de *P. chlamydosporia* sobre *M. javanica*, nos tratamentos sem as plantas de cobertura de solo, em ambos os ensaios, provavelmente ocorreu devido à alta população inicial do nematóide, com médias de 200 e de 165 nematóides por cm^3 de solo no momento da aplicação do antagonista, nos experimentos de verão e de inverno, respectivamente, associado principalmente à suscetibilidade das plantas de tomate, que formam galhas grandes, com massas de ovos internas que ficam protegidas da ação do fungo (De Leij & Kerry, 1991; Bourne & Kerry, 1999; Viaene & Abawi, 2000).

Além disso, a diferença de eficiência de *P. chlamydosporia* no controle de *M. javanica* observada nos tratamentos sem as plantas de cobertura de solo de verão e de inverno está associada principalmente ao período em que foram montados os ensaios. O primeiro ensaio foi montado em um período mais quente do ano do que o segundo, portanto, os J₂ eclodiram e penetraram no sistema radicular das plantas de tomate antes de os ovos terem sido colonizados pelo fungo (De Leij *et al.*, 1992; De Leij *et al.*, 1993; Kerry &

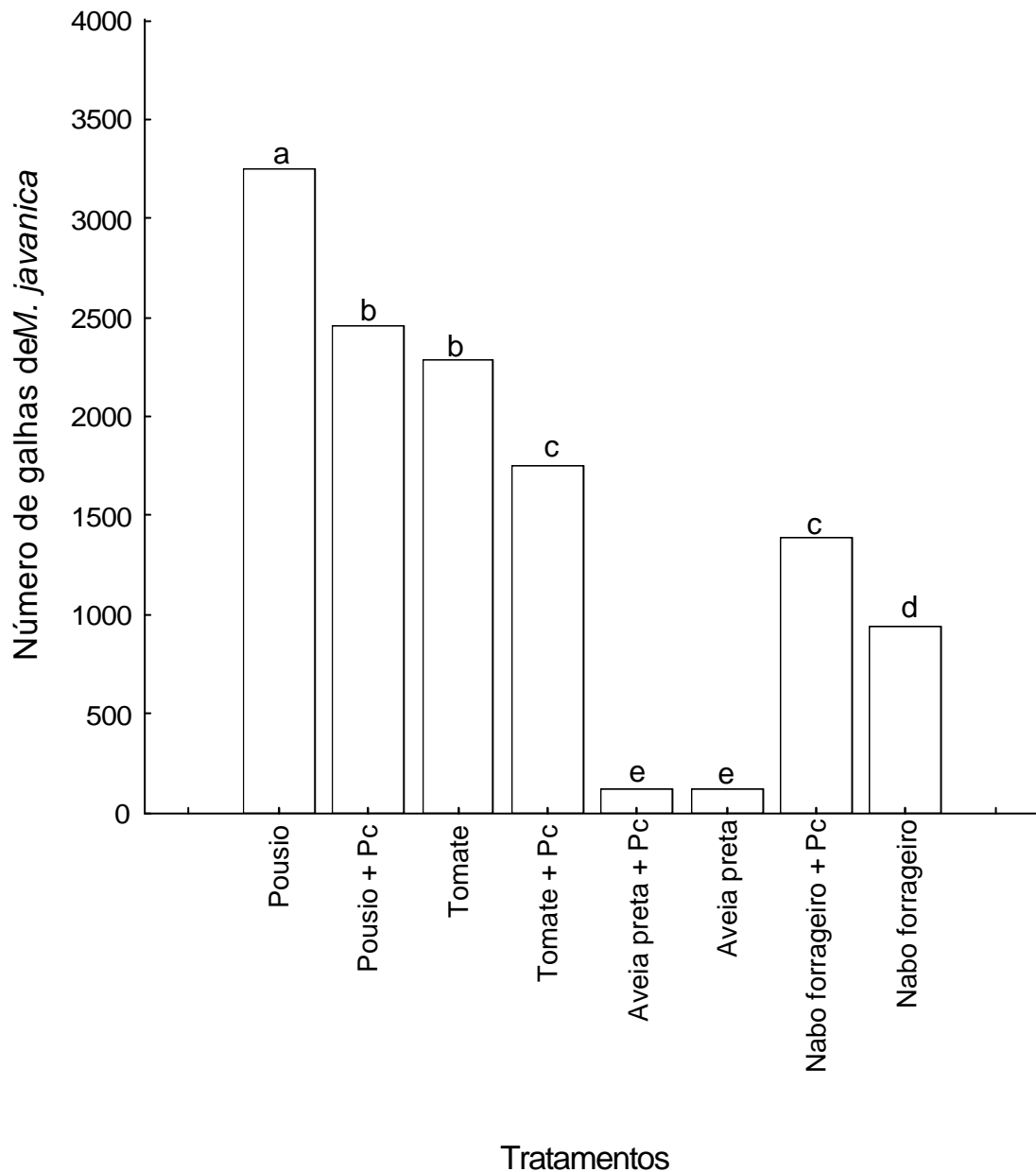


Figura 3 - Número de galhas obtidas por sistema radicular de tomateiro, após a aplicação de 5.000 clamidósporos/g de solo de *P. chlamydosporia* isolado Pc-10 e cultivo de tomate, aveia-preta, nabo-forrageiro ou pousio solo no seguido de tomate em solo infestado com *M. javanica*. Para análise estatística, os dados foram transformados para \sqrt{x} . Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste Duncan a 5% de probabilidade. Médias originais são apresentadas no gráfico.

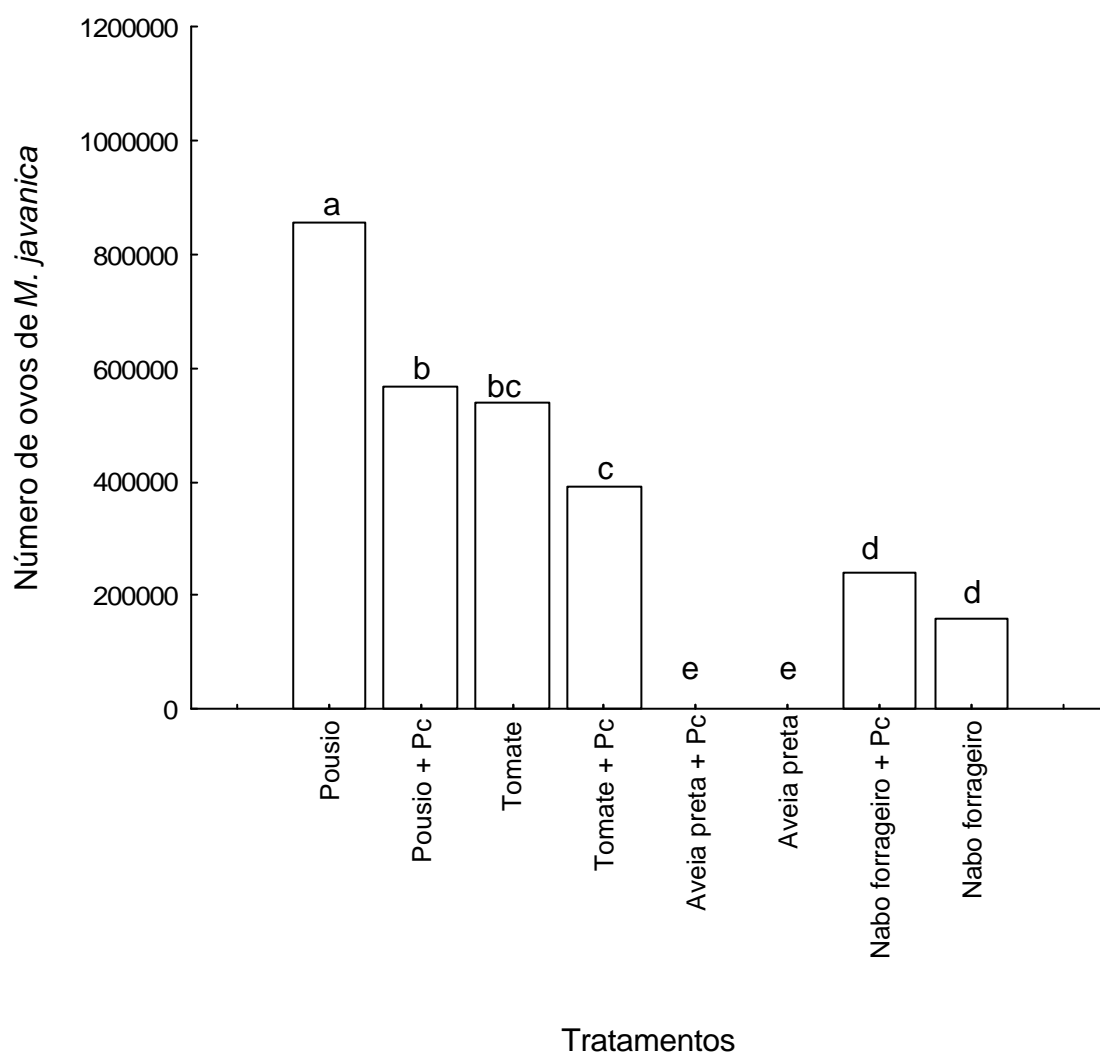


Figura 4 – Número de ovos obtidos por sistema radicular de tomateiro, após a aplicação de 5.000 clamidósporos/g de solo de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* isolado Pc-10 e cultivo de tomate, aveia-preta, nabo-forrageiro ou pousio solo no seguido de tomate, em solo infestado com *M. javanica*. Para análise estatística, os dados foram transformados para $\sqrt{x}+1$. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste Duncan a 5 % de probabilidade. Médias originais são apresentadas no gráfico.

Bourne, 2002). Também no ensaio com as plantas de cobertura de solo de verão, no tratamento pousio solo nu, provavelmente, o fungo não conseguiu se estabelecer e parasitar os ovos pela ausência de matéria orgânica no solo e de raízes para colonizar. Nesse caso, os ovos ficaram dormentes e, quando o tomateiro foi transplantado, os J₂ eclodiram e penetraram nas raízes, antes de o fungo proliferar no solo e colonizar as raízes e os ovos.

No entanto, pode-se observar no ensaio com plantas de cobertura de solo de inverno que esse agente de biocontrole apresenta potencial na redução de *M. javanica*, pois a introdução de *P. chlamydosporia* aos 74 dias antes do último cultivo de tomate foi suficiente para reduzir o número de galhas (Figura 3), fato que se espera ocorrer após várias gerações do nematóide das galhas em solos tratados com o antagonista. Mas, para potencializar o controle do nematóide das galhas em solo altamente infestado, inicialmente *P. chlamydosporia* deve ser utilizada associada a outros métodos de controle, como a utilização de plantas pobres hospedeiras de nematóides, em sistema de rotação de culturas, antes da implantação de culturas suscetíveis (Bourne & Kerry, 1999; Kerry & Bourne, 2002), como verificado no presente trabalho.

A determinação da população do fungo no solo por meio do número de UFC de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* por grama de solo é um indicativo do estabelecimento do fungo no solo, resultante não só de seu desenvolvimento sobre a matéria orgânica e colonização dos ovos do nematóide, mas também de sua proliferação nas rizosferas das diferentes espécies vegetais. Não apenas o fungo coloniza melhor raízes infectadas pelo nematóide do que raízes saudáveis (De Leij et al., 1991; Bourne et al., 1996), como também existe diferença de hospedabilidade do fungo por diferentes espécies vegetais (Bourne et al., 1994; Kerry & Bourne, 1996; Bourne et al., 1996). Das espécies de plantas testadas, o milho é uma planta que permite um moderado desenvolvimento rizosférico de *P. chlamydosporia* (Bourne et al., 1994). Provavelmente, como o capim-braquiária ou a aveia-preta sem nematóide foram os tratamentos que apresentaram os valores mais baixos de UFCs, essas plantas permitiram pouco desenvolvimento rizosférico do fungo. Dessa forma, necessita-se de mais estudos para verificar se realmente essas plantas de cobertura suportam bom desenvolvimento rizosférico do fungo e produção de clamidósporos em suas raízes.

No entanto, nestes tratamentos e nos outros em que foi aplicado o antagonista, pode-se reisolar o fungo do solo ao final do experimento. Os valores observados variaram de $6,6 \times 10^3$ a $7,9 \times 10^4$ para o ensaio com as plantas de cobertura de solo de verão e, de $4,6 \times 10^4$ a $2,7 \times 10^5$ para o ensaio dos adubos verdes de inverno. Além disso, o antagonista também foi constatado no solo de alguns tratamentos sem fungo, em ambos os ensaios. Tais resultados sugerem que *P. chlamydosporia* se tenha multiplicado nos resíduos das plantas de cobertura do solo e se disseminado para os tratamentos sem o antagonista, pois este agente de controle biológico também utiliza matéria orgânica como fonte de nutrientes (Stirling, 1991).

Quanto ao desenvolvimento do tomateiro em sucessão com as plantas de cobertura, constatou-se que tanto o milho como o capim-braquiária afetaram seu desenvolvimento (Tabela 1). Tal fato ocorreu porque essas plantas apresentaram raízes volumosas, fasciculadas, que tomaram o vaso e dificultaram o desenvolvimento radicular das plantas de tomate (Tabela 1). Além disso, a decomposição da palhada, com alta relação C/N, promoveu a indisponibilização do nitrogênio e também afetou drasticamente o desenvolvimento inicial das plantas, deixando-as com folhas amarelas e reduzindo o peso da parte aérea, apesar de haver pouca diferença das médias entre a altura das plantas. Já as plantas de cobertura de inverno não afetaram o desenvolvimento do tomateiro por ter menor sistema radicular e baixa relação C/N (Tabela 2).

Portanto, essa estratégia de controle do nematóide das galhas precisa ser testada no campo para determinar se realmente a seqüência das plantas a serem utilizadas no sistema de sucessão de culturas irá se adaptar ao clima da região e controlar esse fitoparasita. Também é necessário determinar quando e como o antagonista poderá ser aplicado para avaliar a eficácia do agente de controle biológico juntamente com as plantas antagonistas.

Tabela 1 – Valores médios da altura, peso da parte aérea e do sistema radicular de tomateiros cultivados em solo infestado ou não com *M. javanica* e, ou, *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, após pousio solo nu ou cultivo com tomate, milho ou capim-braquiária

Tratamentos	Altura (cm)	Peso da parte aérea (g)	Peso de raiz (g)
Pousio (Testemunha)	86 a*	106 a	28 b
Pousio+Pc	93 a	107 a	26 b
Tomate (Testemunha)	83 a	116 a	25 b
Tomate+Pc	76 b	109 a	27 b
Tomate+Pc (sem <i>M.j.</i>)	81 a	88 b	28 b
Tomate (sem <i>M.j.</i>)	82 a	89 b	34 a
Milho+Pc	75 b	75 c	9 c
Milho	78 b	84 b	12 c
Milho+Pc (sem <i>M.j.</i>)	80 a	77 c	11 c
Milho (sem <i>M.j.</i>)	72 b	72 c	11 c
C. braquiária+Pc	85 a	76 c	8 c
C. braquiária	78 b	91 b	11 c
C. braquiária+Pc (sem <i>M.j.</i>)	75 b	82 b	11 c
C. braquiária (sem <i>M.j.</i>)	65 b	71 c	10 c

* Médias dentro da coluna seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, a 5 % de probabilidade. Médias de nove repetições.

Tabela 2 – Valores médios da altura, peso da parte aérea e do sistema radicular de tomateiros cultivados em solo infestado ou não com *M. javanica* e, ou, *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, após pousio solo nu ou cultivo com tomate, aveia-preta ou nabo-forageiro

Tratamentos	Altura (cm)	Peso da parte aérea (g)	Peso de raiz (g)
Pousio (Testemunha)	58 b*	73 a	23 a
Pousio+Pc	57 b	76 a	21 a
Tomate (Testemunha)	56 b	76 a	25 a
Tomate+Pc	53 b	73 a	24 a
Tomate+Pc (sem <i>M.j.</i>)	54 b	59 b	18 b
Tomate (sem <i>M.j.</i>)	51 b	62 b	20 b
Aveia-preta+Pc	51 b	66 b	14 b
Aveia-preta	53 b	64 b	16 b
Aveia-preta+Pc (sem <i>M.j.</i>)	69 a	79 a	19 b
Aveia-preta (sem <i>M.j.</i>)	53 b	71 a	17 b
Nabo-forageiro+Pc	54 b	68 b	26 a
Nabo-forageiro	59 b	71 a	27 a
Nabo-forageiro+Pc (sem <i>M.j.</i>)	55 b	82 a	21 a
Nabo-forageiro (sem <i>M.j.</i>)	62 a	80 a	24 a

* Médias dentro da coluna seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, a 5 % de probabilidade. Médias de nove repetições.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-REHIAYANI, S.; S.L. HAFEZ; M. THORNTON & P. SUNDARARAJ. 1999. Effects of *Pratylenchus neglectus*, *Bacillus megaterium*, and oil radish or rapeseed green manure on reproductive potential of *Meloidogyne chitwoodi* on potato. *Nematropica*, 29 (1): 37-49.
- BOURNE, J.M. & KERRY, B.R. 1999. Effect of the plant on the efficacy of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent of root-knot nematodes at different nematode densities and fungal applications rates. *Soil Biology Biochemistry*, 31: 75-84.
- BOURNE, J.M.; B.R. KERRY & F.A.A.M. DE LEIJ. 1994. Methods for the study of *Verticillium chlamydosporium* in the rhizosphere. *Journal of Nematology*, 26 (4S): 587-591.
- BOURNE, J.M.; B.R. KERRY & F.A.A.M. DE LEIJ. 1996. The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 539-548.
- BOURNE, J.M.; B.R. KERRY; J. GALLOWAY; C. SMITH & G. MARCHESE. 1999. Evaluation of application techniques and materials for the production of *Verticillium chlamydosporium* in experiments to control root-knot nematodes in glasshouse and field trials. *International Journal of Nematology*, 9 (2): 153-162.
- CANNAYANE, I. & G. RAJENDRAN. 2001. Application of biocontrol agents and oil cakes for the management of *Meloidogyne incognita* in brinjal (*Solanum melongena* L.). *Current Nematology*, 12 (1, 2): 51-55.
- CARNEIRO, R.G.; M.P. MORITZ; A.P.A. MÔNACO; K.C. N. AKAMURA & A. SCHERER. 2007. Reação de milho, sorgo e milheto a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. paranaensis*. *Nematologia Brasileira*, 31 (2): 67-71.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; F.L.C. CARVALHO & S.M. KULCZYNSKI. 1998. Seleção de plantas para o controle de *Mesocriconema xenoplax* e *Meloidogyne* spp. através de rotação de culturas. *Nematologia Brasileira*, 22 (2): 41-48.
- CHEN, Z.X.; D.W. DICKSON; R. McSORLEY; D.J. MITCHELL & T.E. HEWLETT. 1996. Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by soil application of endospores of *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology*, 28 (2): 159-168.
- DE LEIJ, F.A.A.M. & B.R. KERRY. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. *Revue de Nématologie*, 14 (1): 157-164.

DE LEIJ, F.A.A.M., B.R. KERRY & J.A. DENNEHY. 1993. *Verticillium chlamyosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and micro-plot tests. *Nematologica*, 39: 115-126.

DE LEIJ, F.A.A.M.; J.A. DENNEHY & B.R. KERRY. 1992. The effect of temperature and nematode species on interactions between the nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium* and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Nematologica*, 38: 65-79.

DIAS-ARIEIRA, C.R.; S. FERRAZ; E.H. MISOBUTSI & L.G. FREITAS. 2003. Eficiência de gramíneas forrageiras no controle de *Heterodera glycines* e de populações compostas por *H. glycines-Meloidogyne* spp. *Summa Phytopathologica*, 29 (1): 7-11.

DIAS-ARIEIRA, C.R.; S. FERRAZ; L.G. FREITAS & E.H. MISOBUTSI. 2002. Penetração e desenvolvimento de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Heterodera glycines* em quatro gramíneas forrageiras. *Nematologia Brasileira*, 26 (1): 35-41.

DICKSON, D.W.; M. OOSTENDORP; R.M. GIBLIN-DAVIS & D.J. MITCHELL. 1994. Control of plant-parasitic nematodes by biological antagonists. In: ROSEN, D., BENNETT, F.D., CAPINERA, J.L. (eds.) *Pest management in the subtropics. Biological control - A Florida perspective*. London: Intercept, p. 575-601.

EHTESHAMUL-HAQUE, S.; M.ABID; V. SULTANA; J. ARA & A. GHAFAR. 1996. Use of organic amendments on the efficacy of biocontrol agents in the control of root rot and root knot disease complex of okra. *Nematologia Mediterranea*, 24: 13-16.

FERRAZ, S. & L.G. FREITAS. 2004. Use of antagonistic plants and natural products. In: CHEN, Z.X.; S.Y. CHEN & D.W. DICKSON (eds.) *Nematology advances and perspectives-Nematode management and utilization vol 2*, p. 931-960.

GASPARD, J.T.; B.A. JAFFEE & H. FERRIS. 1990. Association of *Verticillium chlamyosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with root-knot nematode infested soil. *Journal of Nematology*, 22 (2): 207-213.

INOMOTO, M.M.; L.C.C. MOTA; D.B. BELUTI & A.C.Z. MACHADO. 2006. Reação de seis adubos verdes a *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus*. *Nematologia Brasileira*, 30 (1): 39-44.

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

KERRY, B.R. & J.M. BOURNE. 1996. The importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant parasitic nematodes - a case study using *Verticillium chlamyosporium*. Pesticide Science, 47: 69-75.

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

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

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

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

PANDEY, R. & R.A. SIKORA. 2000. Influence of aqueous extracts of organic matter on the sensitivity of *Heterodera schachtii* Schmidt and *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood eggs to *Verticillium chlamyosporium* Goddard infection. Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 107 (5): 494-497. (Abstract).

SANTOS, M.A. & O. RUANO. 1987. Reação de plantas usadas como adubos verdes a *Meloidogyne incognita* raça 3 e *M. javanica*. Nematologia Brasileira, XI: 184-197.

STIRLING, G.R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes. CAB. International, Wallingford, 282 p.

VIAENE, N.M. & G.S. ABAWI. 2000. *Hirsutella rhossiliensis* and *Verticillium chlamyosporium* as biocontrol agents of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on lettuce. Journal of Nematology, 32 (1): 85-100.

***Pochonia chlamydosporia* como promotor de crescimento de plântulas de tomateiro**

Resumo: O fungo *Pochonia chlamydosporia* é um agente de biocontrole de fitonematóides que coloniza a rizosfera de várias espécies de plantas. Neste trabalho, avaliaram-se a colonização rizosférica e o potencial de promoção de crescimento de plântulas de tomate por isolados de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. Os três isolados testados, Pc-3, Pc-10 e Pc-19, promoveram o crescimento das plântulas em substrato de fibra de coco, em tubos de cultura, em câmara de crescimento. O isolado Pc-19 foi testado em casa de vegetação, em bandejas de produção de mudas, contendo esse mesmo substrato e em diferentes concentrações de clamidósporos, entretanto, não se observou promoção de crescimento dos tomateiros. A análise do sistema radicular das plântulas de tomate desenvolvidas em câmara de crescimento e inoculadas com *P. chlamydosporia* Pc-19 permitiu constatar que o fungo colonizou a rizosfera das plântulas em apenas 15 dias e produziu uma grande quantidade de clamidósporos. Além disso, hifas de *P. chlamydosporia*, isolado Pc-10, penetraram nas células epidérmicas das raízes de tomate. *Pochonia chlamydosporia* apresenta potencial como promotor de crescimento de plantas e esse mecanismo deve ser mais bem investigado para seu completo entendimento.

Palavras-chave: fungo nematófago, clamidósporos, colonização rizosférica.

***Pochonia chlamydosporia* as a growth promoter of tomato plants**

Abstract: The fungus *Pochonia chlamydosporia* is a biological control agent of plant-parasitic nematodes and has the ability to colonize the rhizosphere of plants from several species. The objective of this work was study the rhizosphere colonization and the potential of *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* isolates promoting growth of tomato plants. All three isolates studied improved the growth of tomato seedlings cultivated *in vitro* on coconut fiber substrate, but did not improve the growth of tomato plants produced on coconut fibers substrate in the greenhouse, at different chlamydospore concentrations. The fungal isolate Pc-19 colonized the rhizosphere of tomato plants and produced a large amount of chlamydospores after 15 days. Scanning microscopy revealed that the isolate Pc-10 colonized the rhizoplane of the plants in this same period and hyphae of the fungus penetrated the root epidermic cells. *Pochonia chlamydosporia* has the potential of promoting plant-growth, but further studies are required to understand this mechanism.

Key-words: nematophagous fungi, chlamydospore, rhizosphere colonization.

1. INTRODUÇÃO

Pochonia chlamydosporia Zare & Gams (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard) é um dos agentes de controle biológico de nematóides mais estudados, devido a seu grande potencial de controle de nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp. Goeldi) e cistos (*Heterodera* spp. Schmidt e *Globodera* spp. Skarbilovich) e também por produzir clamidósporos, estruturas de resistência que favorecem o estabelecimento e a sobrevivência do fungo no solo (De Leij & Kerry, 1991; Crump & Irving, 1992; Bourne & Kerry, 1999; Verdejo-Lucas *et al.*, 2003). Embora muitos isolados de *P. chlamydosporia* proliferem e sobrevivam no solo, somente aqueles capazes de colonizar a rizosfera conseguem parasitar os ovos de nematóides a ponto de limitar sua reprodução (De Leij & Kerry, 1991). A colonização rizosférica varia em função do isolado fúngico e da espécie da planta hospedeira (Bourne *et al.*, 1994; Bourne *et al.*, 1996).

A proliferação de *P. chlamydosporia* é maior em raízes infectadas por nematóides do que em raízes sadias, devido à maior liberação de exsudatos radiculares promovida pela infecção do nematóide (De Leij, *et al.*, 1992; Bourne *et al.*, 1996). Esse antagonista também coloniza externamente o rizoplane das plantas hospedeiras e endofiticamente as células epidérmicas e corticais de raízes de algumas plantas, como cevada e tomateiro (Bordallo *et al.*, 2002; Lopez-Llorca *et al.*, 2002). Essas estruturas são semelhantes às observadas em plantas em associação com micorrízica arbuscular, que auxilia na absorção de água e nutrientes e, por explorar maior volume de substrato, promovem o crescimento das plantas, além de aumentar a tolerância a estresses abióticos, aumentando a resistência a doenças (Azcón-Aguilar & Barea, 1996; Chu, 1999; Al-Karaki, 2006; Stancato & Silveira, 2006; Schreiner, 2007). Provavelmente, essa colonização interna nas raízes das plantas por *P. chlamydosporia* também deve beneficiar as plantas, pois alguns isolados de *P. chlamydosporia* já foram relatados como promotores de crescimento de raízes de tomate e de trigo (Hidago-Diaz *et al.*, 2000; Monfort *et al.*, 2005). Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de promoção de crescimento de plântulas de

tomate e a colonização rizosférica por três isolados *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* utilizados nos ensaios pertencem à coleção de fungos nematófagos do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematóides da UFV e foram obtidos de solos naturalmente infestados com *Meloidogyne* spp., cultivados com olerícolas, no município de Viçosa, MG.

2.1. Produção de clamidósporos

O isolado de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* Pc-19 cresceu em placas de Petri contendo meio 'Corn Meal Agar' (CMA) e cultivado por 15 dias em câmara de crescimento, no escuro, a 26 °C. Posteriormente, três discos de meio de 7 mm de diâmetro, colonizados pelo antagonista, foram postos em frascos tipo erlenmeyers de 250 mL de capacidade contendo como substrato, previamente autoclavado, milho triturado (canjiquinha) + areia 1:1 (p:p) e 60 mL de água destilada. Em seguida, os frascos foram transferidos para a câmara de crescimento, no escuro, a 26 °C.

Transcorridos 21 dias, os clamidósporos foram extraídos por lavagem manual do substrato colonizado pelo antagonista, num balde contendo água de torneira. Posteriormente, a suspensão aquosa foi filtrada em camada dupla de gaze, e o número de clamidósporos foi quantificado com o auxílio de câmara de Newbauer, sob microscópio óptico.

2.2. Ensaio *in vitro*

Em tubos de cultura de 2,3 cm de diâmetro e 15 cm de comprimento, foram colocados 1,5 g de fibra de coco (Tabela 1) e 7,5 mL de água destilada. Após um período para absorção de água pelo substrato, os tubos foram tampados e autoclavados a 120 °C durante 30 minutos, por duas vezes, num

Tabela 1 – Teores de nutrientes em fibra de coco

N	P	K	Ca	Mg	S	Na	C.O.	C/N	Zn	Fe	Mn	Cu	B	pH
----- % -----									----- ppm -----					
0,73	0,33	1,17	1,16	0,48	0,51	0,04	19,34	26,49	502	3.668	250	228	126	5,01

Teores totais, determinados no extrato ácido (ácido nítrico com ácido perclórico); N = método do Kjeldahl; CO = método Walkley-Black. Análise realizada no Laboratório de Análise de Solos Viçosa Ltda.

intervalo de 24 horas. Quatro discos de 5 mm de diâmetro, retirados das bordas das colônias do isolado Pc-19 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, foram colocados a 2 cm de profundidade em cada tubo contendo o substrato e, em seguida, adicionou-se uma semente de tomateiro pré-germinada a 0,5 cm de profundidade. As sementes de tomateiro foram previamente desinfetadas com álcool 70 % (v:v) por 1 minuto, imersas por 10 minutos em hipoclorito de sódio, a 1 % de cloro ativo (v:v), enxaguadas com água esterilizada e pré-germinadas por dois dias em meio de cultura descrito por Bordallo et al. (2002). No tratamento testemunha não foram adicionados nos tubos discos de micélio. Após a montagem do ensaio, os tubos foram transferidos para câmara de crescimento a 25 °C, com fotoperíodo 16 h. O ensaio constou de 14 repetições em delineamento inteiramente casualizado.

Decorridos 15 dias, a altura e o peso da parte aérea das plântulas foram avaliados. Dez segmentos de sistema radicular de \pm 0,5 cm de comprimento de cada plântula foram postos sobre meio semi-seletivo (Gaspard et al., 1990) em placas de Petri, contando-se o número de segmentos colonizados após três dias. Os demais segmentos radiculares obtidos foram armazenados em solução de formaldeído, ácido láctico e álcool (FAA) 50 % (5:5:90, v:v:v) para o estudo da colonização rizosférica.

Um novo ensaio foi conduzido incluindo, além do isolado Pc-19, os isolados Pc-3 e Pc-10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, que também apresentaram potencial de controle de *M. javanica* em testes anteriores. O ensaio constou de dez repetições por tratamento em delineamento inteiramente casualizado. As avaliações foram feitas após 15 dias, porém, neste ensaio, avaliaram-se somente a altura e o peso da parte aérea das plantas. A colonização rizosférica das raízes de plântulas de tomate inoculadas com o isolado Pc-10 foi analisada em microscopia de varredura.

2.3. Preparo dos segmentos de raízes para microscopia óptica

Segmentos de 1 a 2 cm de comprimento das raízes de plântulas de tomate, armazenados em FAA, foram postos em solução de KOH 10 % e aquecidos por 15 minutos para clareamento. Posteriormente, as raízes foram enxaguadas com água para remoção dessa solução e postas em solução acidificante de HCl a 1 %, por 5 minutos. Em seguida, o ácido foi drenado e adicionado azul de tripano em lactoglicerol a 0,05 %. As raízes foram aquecidas até a coloração do fungo e colocadas entre lâmina e lamínula em solução de glicerina 50 %.

2.4. Preparo dos segmentos de raízes para microscopia de varredura

Segmentos de raízes frescas foram cortados e postos imediatamente em frascos contendo solução tampão fosfato a 0,05 M (pH 7,1) com 2,5 % de glutaraldeído. A seguir, os frascos foram tampados e mantidos em temperatura ambiente por uma hora. Decorrido esse período, cada amostra fixada foi lavada em solução tampão fosfato a 0,05 M (pH 7,1) por seis vezes, durante 10 minutos cada, desidratada em série alcoólica etanol de 30 e 50 % por 10 minutos cada e armazenada em etanol 70% em geladeira, até o dia seguinte. Após esse período, continuou-se a desidratação em série alcoólica etanol de 80 e 95 % por 10 minutos cada e em etanol a 100 % por três vezes, porém, por 15 minutos cada. Em seguida, fez-se a secagem das amostras em ponto crítico no aparelho - Bal-Tec, modelo CPD 030. Posteriormente, as amostras foram fixadas em suportes de alumínio e revestidas com ouro, para posterior observação em microscópio eletrônico de varredura.

2.5. Ensaio em casa de vegetação

O substrato fibra de coco, previamente autoclavado, foi posto em sacos plásticos de 5 L de capacidade e regado com suspensões fúngicas, com concentrações ajustadas para resultar em 1.000, 5.000, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000 ou 30.000 clamidósporos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* Pc-19 por grama de substrato. Após a agitação para a

homogeneização do inóculo substrato + clamidósporos, ele foi posto em bandejas de isopor de 128 furos. A cada célula foi adicionada uma semente de tomate cultivar Santa Clara. Após trinta dias foram avaliados a altura e o peso da parte aérea, a colonização rizosférica e o número de unidades formadoras de colônias por grama de substrato.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira avaliação do ensaio *in vitro*, o isolado Pc-19 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* promoveu ($P < 0,05$) aumento da altura e peso das plântulas de tomate (Tabela 2, Figura 3A). A colonização das raízes por esse isolado foi constatada em 100 % dos segmentos dos sistemas radiculares das plântulas de tomate pelo plaqueamento em meio semi-seletivo e observada em microscópio óptico (Figura 3B e 3C).

Tabela 2 – Altura e peso da parte aérea fresca de plântulas de tomate crescidas em substrato de fibra de coco a 25 °C, com fotoperíodo 16 h, por 15 dias, após a infestação ou não com *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Pc-19)

Tratamentos	Altura da planta (cm)	Incremento (%)	Peso da parte aérea fresca (g)	Incremento (%)
Testemunha	3,48 (\pm 3,74) b	-	0,023 (\pm 0,030) b	-
Isolado Pc-19	8,22 (\pm 4,08) a	136	0,118 (\pm 0,118) a	413

Médias de 14 repetições. \pm IC = intervalo de confiança. Médias dentro da coluna seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste F, a 5 % de probabilidade.

Na repetição desse ensaio, em que foram incluídos os isolados Pc-19, Pc-3 e Pc-10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, todos os isolados promoveram crescimento das plântulas de tomate (Figuras 1, 2 e 4).

A análise em microscópio de varredura das raízes de plântulas de tomate mostrou que, em apenas 15 dias, o isolado Pc-10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* colonizou as raízes das plântulas de tomate, formando um manto de hifas, bem como produzindo conídios em algumas partes do rizoplano (Figura 5A). Além disso, foi evidenciada a penetração de hifas do fungo nas células epidérmicas das raízes de tomate (Figura 5B).

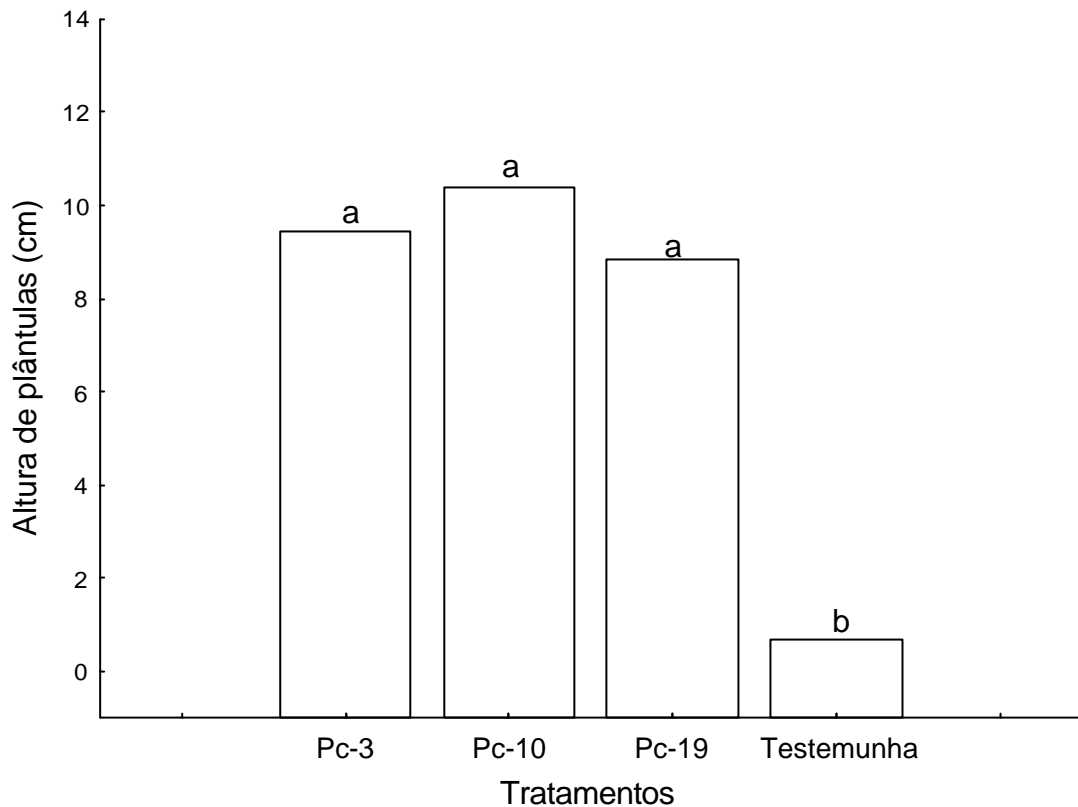


Figura 1 – Altura de plântulas de tomates crescidas em substrato de fibra de coco a 25 °C, com fotoperíodo 16 h, por 15 dias, após a infestação ou não com os isolados Pc-3, Pc-10 e Pc-19 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. Médias obtidas de dez repetições seguidas pela mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste Tukey a 5 % de probabilidade.

A capacidade de os microrganismos estimularem o crescimento vegetal tem sido atribuída a mecanismos diretos, tais como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fósforo, aceleração dos processos de mineralização, síntese de sideróforos e produção de fito-hormônios e mecanismos indiretos, como indução de resistência sistêmica nos vegetais, produção de antibióticos e antagonismo em relação a patógenos, entre outros fatores (Oliveira *et al.*, 2003).

Tal qual no presente trabalho, a promoção de crescimento de tomateiros promovida por *P. chlamydosporia* foi relatada por Hidalgo-Diaz *et al.* (2000), quando foram avaliados diferentes isolados obtidos de solos cubanos. Monfort *et al.* (2005) relataram fenômeno semelhante em plântulas de trigo e sugeriram que os mecanismos envolvidos seja a produção de reguladores de crescimento associada à redução da atividade de peroxidase.

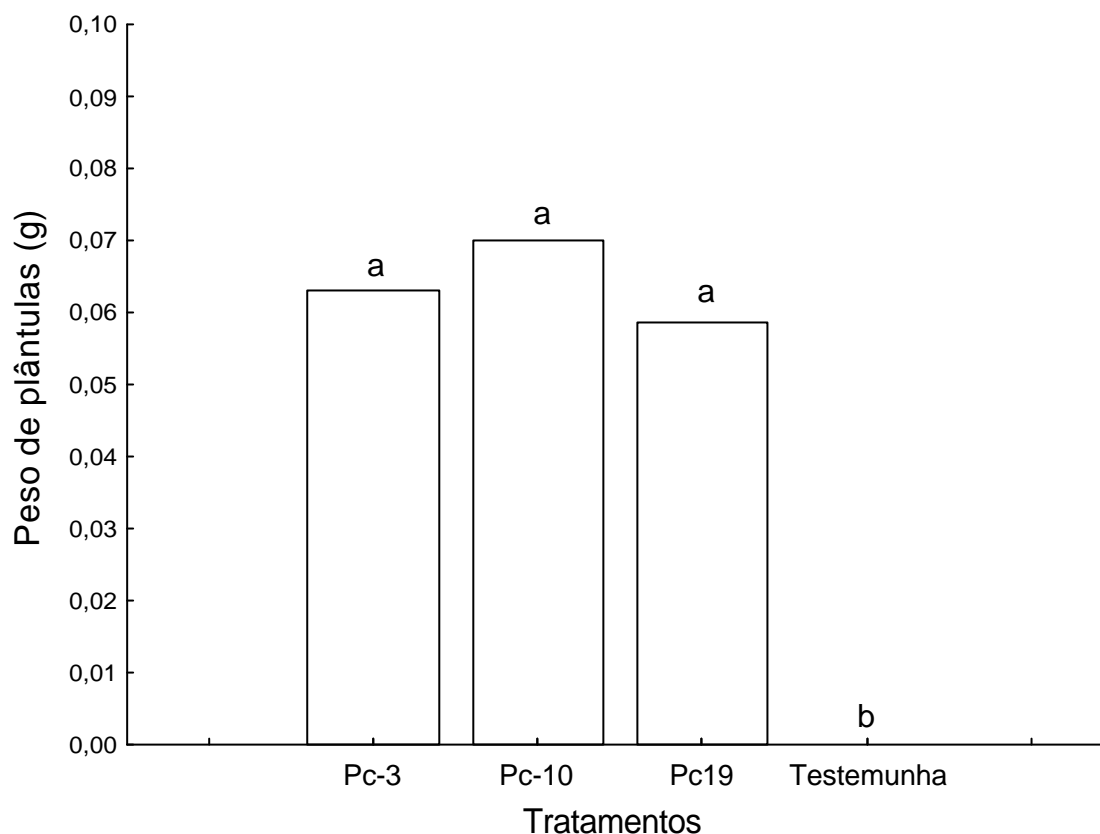


Figura 2 – Peso de plântulas de tomates crescidas em substrato de fibra de coco, a 25 °C, com fotoperíodo 16 h, por 15 dias, após a infestação ou não com os isolados Pc-3, Pc-10 e Pc-19 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. Médias de oito repetições seguidas pela mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Nesse trabalho foi possível observar que o aumento do crescimento das plantas está relacionado ao aumento da área de absorção das raízes, superando possíveis estresses hídricos *in vitro* em tubos de cultura, já que, em casa de vegetação e com irrigação abundante, não houve diferença de crescimento entre plantas inoculadas e não-inoculadas com o fungo (Tabela 3).

O aumento do desenvolvimento das plantas também pode estar associado à degradação química da celulose, pectina e lignina da fibra de coco por enzimas produzidas pelo fungo e posterior translocação dos carboidratos para as raízes do tomateiro, assim como de nutrientes como nitrogênio e fósforo, a exemplo do que ocorre com fungos micorrízicos arbusculares (Chu, 1999; Schreiner, 2007).

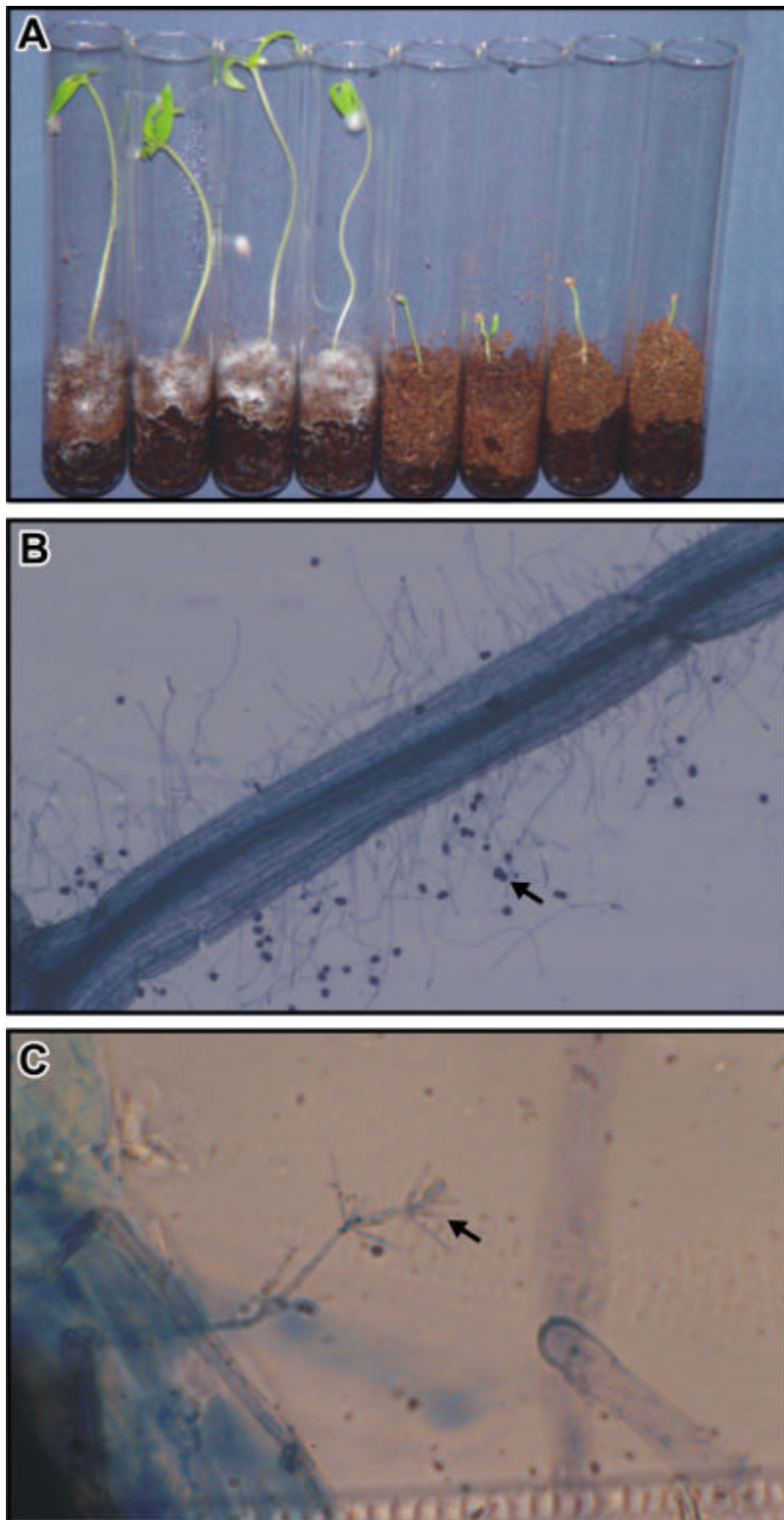


Figura 3 – A = plântulas de tomate crescidas em substrato de fibra de coco, 15 dias após a infestação com *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* Pc-19 e mantidas em câmara de crescimento, a 25 °C, com fotoperíodo 16 h. Os quatro tubos da esquerda com presença dos isolados fúngicos e os quatro tubos da direita sem os antagonistas. B = colonização no rizoplano com formação de clamidósporos. C: Fiálides na superfície da raiz de tomate.

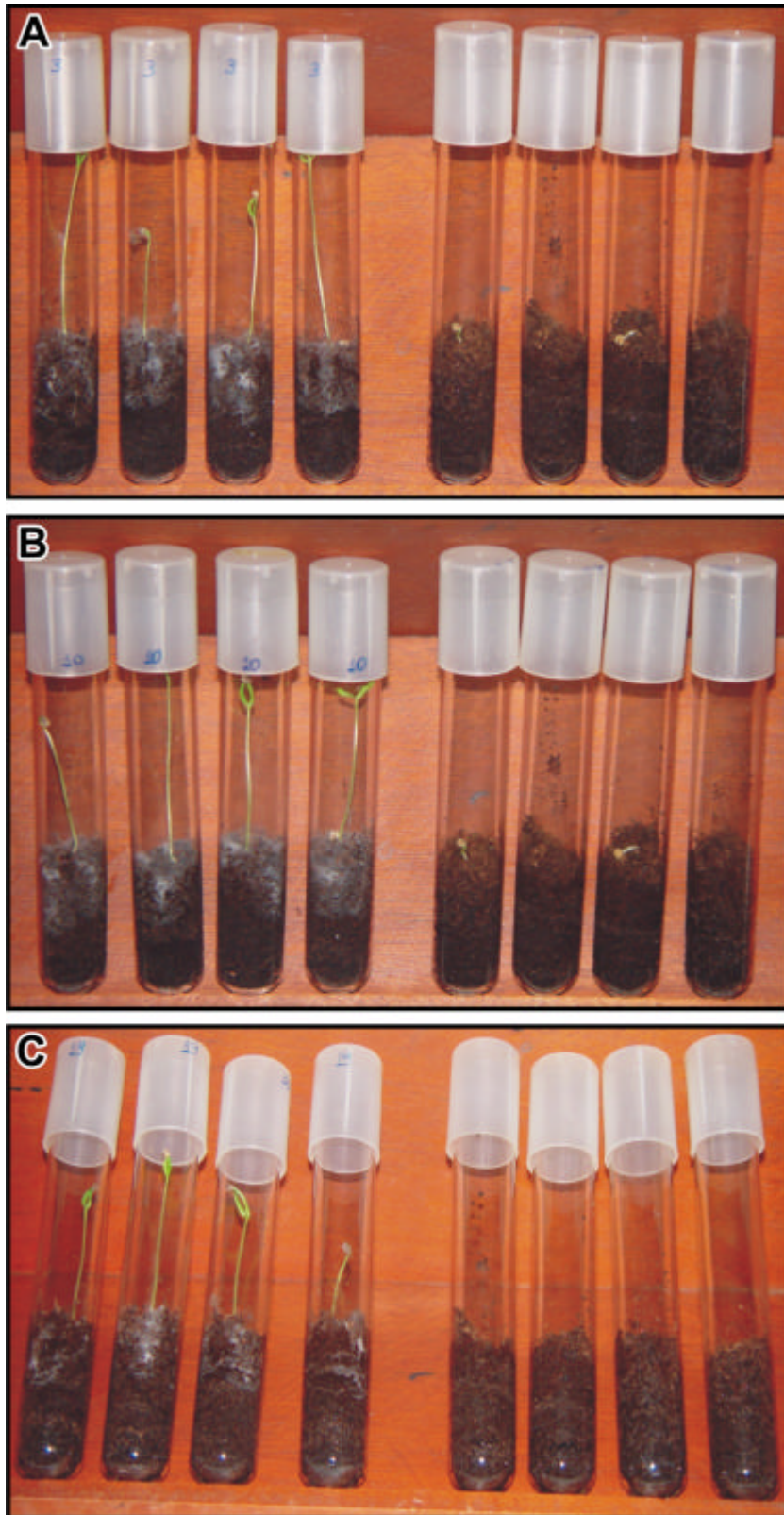


Figura 4 – Plântulas de tomate crescidas em substrato de fibra de coco, sete dias após a infestação com *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* isolados Pc-3 (A), Pc-10 (B) e Pc-19 (C) e mantidas em câmara de crescimento a 25 °C, com fotoperíodo 16 h. Os quatro tubos da esquerda com presença dos isolados fúngicos e os quatro tubos da direita sem os antagonistas.

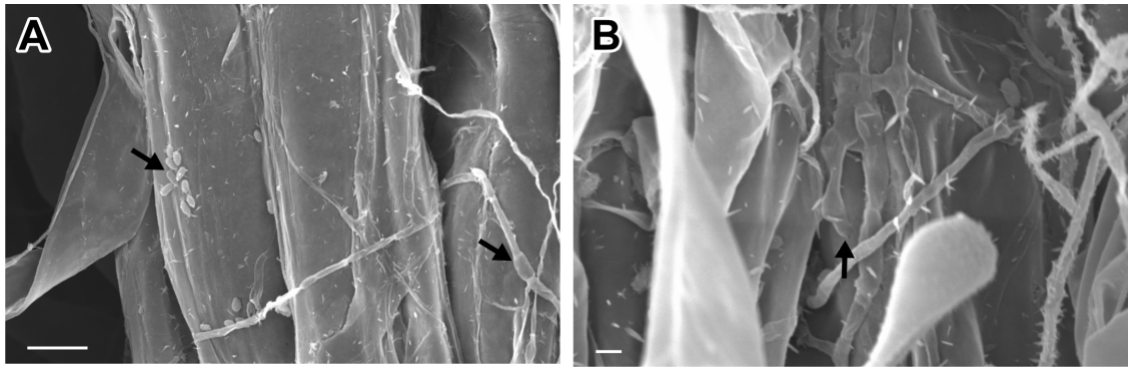


Figura 5 – Fotomicrografias de varredura de raízes de tomate colonizadas com *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* Pc-10. A = Hifas e conídios de *P. chlamydosporia* no rizoplano das raízes. B = Hifa penetrando nas células do córtex da raiz de tomate.

A produção de enzimas extracelulares por *P. chlamydosporia* foi relatada por Olivares-Bernabeu & Lopes-Llorca (2002). Eles constataram que isolados de *P. chlamydosporia* apresentaram atividade proteolítica e lipolítica, principalmente, e alguns isolados apresentaram discreta atividade amilolítica e pectinolítica. A capacidade de produzir diferentes enzimas extracelulares, incluindo quitinases e celulosas (Domsch *et al.*, 1980), permite que *P. chlamydosporia* seja capaz de competir por muitos substratos disponíveis no solo (Stirling, 1991). Além disso, *P. chlamydosporia* coloniza endofiticamente células da epiderme e do córtex do sistema radicular de plantas de cevada e de tomate, formando um emaranhado de hifas semelhantes àsquelas formadas por micorrizas arbusculares (Lopez-Llorca *et al.*, 2002). Os fungos endofíticos e as micorrizas arbusculares formam associações mutualistas com plantas hospedeiras, aumentando suas habilidades competitivas, por aumentar sua capacidade de germinação, absorção de água e nutrientes, resistência à seca, ao estresse hídrico e salino, em troca de proteção ao dessecação, nutrientes e fotossintetizados (Arechavaleta *et al.*, 1992; Bacon, 1993; Faeth & Fagan, 2002; Moreira & Siqueira, 2002; Yano-Melo *et al.*, 2003; Al-Karaki, 2006).

Sugere-se que este antagonista possa ser considerado um endofítico e deve ter ajudado a diminuir os efeitos deletérios de possíveis sais presentes no substrato da fibra de coco, como o cloreto de potássio e de sódio (Carrijo *et al.*, 2002), quando as plântulas foram cultivadas nesse substrato (Figuras 3 e 4). A pré-inoculação de plântulas de tomate com *Glomus mosseae* e,

posteriormente, cultivadas em casa de vegetação e irrigadas com água salina aumentou a resistência das plantas ao estresse salino (Al-Karaki, 2006). Além disso, esse fungo também deve ter fornecido nutrientes necessários para o desenvolvimento da planta.

No ensaio em casa de vegetação, o isolado Pc-19 foi introduzido na forma de clamidósporos, na ordem de 1.000 a 30.000/g de substrato e, mesmo assim, nenhuma quantidade de clamidósporos testada promoveu crescimento das plantas, quando comparado com o tratamento testemunha, sem a presença do fungo (Tabela 3). Embora os clamidósporos sejam preferencialmente utilizados como inóculo de *P. chlamydosporia* para aplicação no solo, por ser estruturas de resistência e favorecer seu maior estabelecimento e sobrevivência no solo (De Leij & Kerry, 1991; Kerry & Bourne, 2002; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2007), De Leij *et al.* (1992) relataram que os clamidósporos, além de utilizar as reservas nutricionais para a germinação, crescimento e proliferação, também dependem de alguns nutrientes disponíveis externamente para se estabelecer no solo. Portanto, é possível que *P. chlamydosporia* tenha competido com a planta por nutrientes para, primeiramente, se estabelecer no substrato.

Tabela 3 – Efeito de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Pc-19) sobre altura e peso da parte aérea fresca de plântulas de tomates cultivadas em fibra de coco e mantidas em casa de vegetação por 30 dias

Número de clamidósporos/g de substrato	Altura da planta (cm)	Peso da parte aérea fresca (g)
0	5,73 (± 0,524) ab	0,102 (± 0,027) ab
1.000	6,50 (± 0,938) a	0,121 (± 0,038) a
5.000	5,13 (± 0,447) b	0,075 (± 0,012) b
10.000	5,88 (± 0,639) ab	0,093 (± 0,007) ab
15.000	5,55 (± 0,118) ab	0,094 (± 0,010) ab
20.000	5,17 (± 0,421) b	0,073 (± 0,013) b
25.000	5,28 (± 0,818) b	0,087 (± 0,025) ab
30.000	5,73 (± 0,657) ab	0,096 (± 0,021) ab

Médias de seis repetições. ± IC = intervalo de confiança. Médias dentro da coluna seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade.

Considerando o número de unidades formadoras de colônias no substrato, avaliado ao final do experimento (dado não apresentado), foi constatada a presença do fungo no substrato em todos os tratamentos em que foram aplicados os clamidósporos. Entretanto, nos segmentos dos sistemas

radiculares das plântulas de tomate, coletados após 30 dias, foi observada maior ocorrência de *Trichoderma* sp. e *Fusarium* sp., possivelmente veiculados via semente. Esses fungos apresentam crescimento mais rápido do que *P. chlamydosporia* e, provavelmente, eles tenham colonizado primeiramente a rizosfera das plântulas de tomate.

Apesar de as espécies de plantas diferirem na habilidade de permitir o crescimento do fungo na rizosfera (Bourne *et al.*, 1996), o tomateiro se mostrou um bom hospedeiro do isolado Pc-19 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, pois em apenas 15 dias o fungo produziu grande quantidade de clamidósporos (Figura 3B). Esses dados corroboram os estudos de Bourne *et al.* (1994; 1996) e Kerry (2001), que mostraram que tomateiro, repolho, crotalária, feijão, milho, couve, batata e guandu são plantas que favorecem o bom desenvolvimento do fungo, enquanto soja, trigo, sorgo, berinjela e quiabo são plantas que não permitem um desenvolvimento rizosférico satisfatório. Essa diferença entre as espécies de plantas também está relacionada com a presença ou ausência do nematóide e com a suscetibilidade da planta hospedeira. Bordallo *et al.* (2002), ao avaliarem a colonização de *P. chlamydosporia* em raízes de tomate e cevada, constataram que a colonização foi mais restrita em tomate do que em cevada, devido às diferenças estruturais do sistema radicular entre monocotiledôneas e dicotiledôneas.

Portanto, o conhecimento da interação entre diferentes espécies de plantas e o fungo pode orientar a escolha de culturas para o sistema de rotação que suportem bom desenvolvimento rizosférico, associado à utilização de um isolado que colonize eficientemente o sistema radicular das plantas, como observado com os isolados Pc-10 (Figura 5A e 5B) e Pc-19 (Figura 3B e 3C), de forma a proporcionar maior desenvolvimento e reprodução do fungo, acarretando maior nível de controle do nematóide.

Embora não tenha sido avaliada a colonização rizosférica do isolado Pc-3, é possível que tal isolado colonize eficientemente a rizosfera de tomateiros, pois além de ele ter promovido o crescimento das plântulas, como o observado com os isolados Pc-10 e Pc-19, bons colonizadores da rizosfera, esse isolado controlou efetivamente a reprodução de *M. javanica* em casa de vegetação, em estudos anteriores.

A capacidade de isolados de *P. chlamydosporia* em colonizar raízes de tomate pode proteger a planta contra outros patógenos do solo (Monfort *et al.*, 2005). Estes autores observaram que o isolado de *P. chlamydosporia* 4624, em teste *in vitro*, reduziu a colonização e a necrose de raízes de cevada causadas por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. A proteção do sistema radicular contra fungos patogênicos provavelmente ocorre assim como o observado com os fungos micorrízicos arbusculares (Azcón-Aguilar & Barea, 1996; Borges *et al.*, 2007), por meio da suplementação de nutrientes e por competição por sítios de infecção, visto que os isolados Pc-10 e Pc-19 colonizaram efetivamente o rizoplane das plântulas de tomate. Além disso, *P. chlamydosporia* ao colonizar a raiz das plantas, induz uma reação de defesa da planta com a formação de papilas na parede celular do sistema radicular (Bordallo *et al.*, 2002), que funcionam como barreiras contra a penetração e a troca de metabólitos entre o hospedeiro e o patógeno (Pascholati & Leite, 1995).

O mecanismo de promoção de crescimento vegetal por *P. chlamydosporia* deve ser mais bem investigado para seu completo entendimento, devendo-se ainda otimizar a proteção contra fitonematóides e outros patógenos do solo.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-KARAKI, G.N. 2006. Nursery inoculation of tomato with arbuscular mycorrhizal fungi and subsequent performance under irrigation with saline water. *Scientia Horticulturae*, 109: 1-7.

ARECHAVALETA, M., C.W. BACON, R.D. PLATTNER, C.S. HOVELAND & D.E. RADCLIFFE. 1992. Accumulation of ergopeptide alkaloids in symbiotic tall fescue grown under deficits of soil water and nitrogen fertilizer. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (3): 857-861.

AZCÓN-AGUILAR, C. & J.M. BAREA. 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*, 6: 457-464.

BACON, C.W. 1993. Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte-infected tall fescue. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 44 (1-4): 123-141.

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

- BORGES, A.J.S.; A.V. TRINDADE; A.P. MATOS & M.F.S. PEIXOTO. 2007. Redução do mal-do-panamá em bananeira-maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42 (1): 35-41.
- BOURNE, J.M. & B.R. KERRY. 1999. Effect of the plant on the efficacy of *Verticillium chlamyosporium* as a biological control agent of root-knot nematodes at different nematode densities and fungal application rates. *Soil Biology Biochemistry*, 31: 75-84.
- BOURNE, J.M.; B.R. KERRY & F.A.A.M. DE LEIJ. 1996. The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus, *Verticillium chlamyosporium* Goddard. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 539-548.
- BOURNE, J.M.; B.R. KERRY & F.A.A.M. DE LEIJ. 1994. Methods for the study of *Verticillium chlamyosporium* in the rhizosphere. *Journal of Nematology*, 26 (4S): 587-591.
- CARRIJO, O.A.; R.S. LIZ & N. MAKISHIMA. 2002. Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. *Horticultura Brasileira*, 20 (4): 533-535.
- CRUMP D.H. & F. IRVING. 1992. Selection of isolates and methods of culturing *Verticillium chlamyosporium* and its efficacy as a biological control agent of beet and potato cyst nematodes. *Nematologica*, 38: 367-374.
- CHU, E.Y. 1999. The effects of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on *Euterpe oleracea* mart. (açai) seedlings. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34 (6): 1019-1024.
- DE LEIJ, F.A.A.M. & B.R. KERRY. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. *Revue de Nématologie* 14 (1): 157-164.
- DE LEIJ, F.A.A.M.; B.R. KERRY & J.A. DENNEHY. 1992. The effect of fungal application rate and nematode density on the effectiveness of *Verticillium chlamyosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita*. *Nematologica*, 38: 112-122.
- DOMSCH, K.H. GAMS, W. & T.H. ANDERSON. Compendium of soil fungi. Vol I Academic Press, London, 1980.
- FAETH, S.H. & W.F. FAGAN. 2002. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integrative and Comparative Biology*, 42 (2):360-368.
- GASPARD, J.T.; B.A. JAFFEE & H. FERRIS. 1990. Association of *Verticillium chlamyosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with root-knot nematode infested soil. *Journal of Nematology*, 22 (2): 207-213.

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

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

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

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

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

MOREIRA, F.M.S. & J.O. SIQUEIRA. 2002. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: Editora UFLA, 625 p.

OLIVARES-BERNABEU, C.M. & L.V. LOPEZ-LLORCA. 2002. Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. Revista Iberoamericana de Micología, 19: 104-110.

OLIVEIRA, A.L.M.; S. URTIAGA & J.I. BALDANI. 2003. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos no crescimento vegetal. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 40 p. (Documentos, 161).

PASCHOLATI, S.F. & B. LEITE. 1995. Hospedeiro: Mecanismos de resistência. In: BERGAMIN, A.F.; H. KIMATI & L. AMORIM (eds.) Manual de Fitopatologia. Vol. 1. Princípios e Conceitos. 3ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 417-453.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, I.; A. DOROTEO-MENDONZA; F. FRANCO-NAVARRO; V. SANTIAGO-SANTIAGO & A. MONTERO-PINEDA. 2007. Isolates of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* from Mexico as potential biological control agents of *Nacobbus aberrans*. Nematopica, 37 (1): 127-134.

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

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

STIRLING, G.R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes. CAB. International, Wallingford, 282 p.

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

YANO-MELO, A.M.; O.J. SAGGIN JUNIOR; L.C. MAIA. 2003. Tolerance of mycorrhized banana (*Musa* sp. cv. Pacovan) plantlets to saline stress. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 95: 343-348.

CONCLUSÕES GERAIS

- A baixa diversidade de espécies de *Pochonia* pode ser reflexo do saprofitismo de *P. chlamydosporia*, pois este fungo também está associado, freqüentemente, à presença de matéria orgânica nos solos e não é tão dependente do nematóide para o seu desenvolvimento.

- Em solos brasileiros também podem ser encontrados isolados de *P. chlamydosporia* com potencial de controle do nematóide das galhas.

- O estudo de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* Pc-10 com diferentes quantidades de clamidósporos por grama de solo não permitiu observar relação de dose-efeito no controle de *M. javanica*.

- Maior efetividade de *P. chlamydosporia* no controle do nematóide das galhas pode ser obtida quando se permite maior período de contato do antagonista com os ovos do nematóide no solo, associado a temperaturas mais baixas.

- A associação de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* Pc-10 com plantas de cobertura de verão ou de inverno pode ser uma alternativa eficaz no controle do nematóide das galhas.

- Os isolados Pc-3, Pc-10 e Pc-19 de *P. chlamydosporia*, além de promoverem efetivamente o controle de *M. javanica*, promoveram crescimento de plântulas de tomate em testes *in vitro*, utilizando fibra de coco como substrato.