

RAUL RODRIGUES COUTINHO

***Pochonia chlamydosporia*: CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM SOJA,
ASSOCIAÇÃO COM CULTURAS DE COBERTURA E INTERAÇÃO COM
BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO E COM O pH DO SOLO**

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
2018

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

T

C871p
2018
Coutinho, Raul Rodrigues, 1987-
Pochonia chlamydosporia : controle de *Meloidogyne javanica* em soja, associação com culturas de cobertura e interação com bactérias fixadoras de nitrogênio e com o pH do solo / Raul Rodrigues Coutinho. – Viçosa, MG, 2018.
viii, 91f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. *Meloidogyne javanica* - Controle. 2. *Pochonia chlamydosporia*. 3. Soja - Doenças e pragas - Controle biológico. 4. Fungos nematófagos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 592.57

RAUL RODRIGUES COUTINHO

***Pochonia chlamydosporia*: CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM SOJA,
ASSOCIAÇÃO COM CULTURAS DE COBERTURA E INTERAÇÃO COM
BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO E COM O pH DO SOLO**

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: 05 de outubro de 2018.



Hélvio Gledson Maciel Ferraz



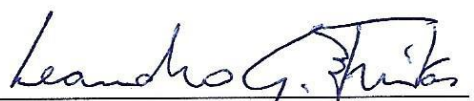
Paulo Afonso Ferreira



Thalita Suelen Avelar Monteiro



Robert Weingart Barreto



Leandro Grassi de Freitas
(Orientador)

Aos meus exemplos de vida, **José Engrácio Moreira e
Maria Auxiliadora Soares Coutinho Moreira,**
Por me ensinar a ser um ser humano melhor
e a nunca desistir dos meus sonhos.

À **Suzane Bhering**, pelo amor, carinho, paciência
e incentivo. Ela...O motivo pelo qual busco cada
conquista.

À minha filha que está por vir, meu motivo
maior para superar os desafios do futuro.

Aos meus irmãos **Bruno e Poliana,**
eternos amigos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua presença viva no meu dia a dia, me ensinando por onde pisar e por sua infinita misericórdia.

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

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

Ao meu orientador professor Leandro Grassi de Freitas, pela orientação, paciência, confiança, dedicação e principalmente pela amizade.

Ao Guilherme Silva de Podestá pela amizade e Coorientação.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos amigos e colegas do BIONEMA Paulo, Huarlen, Cássia, Luciana e Angélica pelo convívio, pela amizade e colaborações.

A Thalita Suelen Avelar Monteiro pela amizade, parceria e atenção em todos momentos que precisei.

Ao Samuel Valadares, por toda ajuda com as análises estatísticas dos dados e, claro, pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia por todas as informações e serviços prestados, em especial o Guilherme e Delfin que sempre se mostraram dispostos para o que precisei nas montagens e condução dos experimentos.

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

Aos meus pais por sempre abrirem mão das coisas por causa dos filhos.

À minha esposa Suzane, pelo carinho, amor, dedicação e paciência, sempre estando ao meu lado em todos os momentos, agora me dando o maior dos presentes, uma filha, a Júlia. Te amo.

Aos meus irmãos Poliana e Bruno por sempre serem motivação para mim, em especial ao Bruno por se mostrar sempre disposto em me auxiliar, principalmente nas correções dos trabalhos.

À família Resgate, pelo apoio, amizade e oração em todas etapas dessa jornada.

A todas as pessoas que de alguma forma me auxiliaram na condução deste trabalho. O meu muito obrigado.

BIOGRAFIA

Raul Rodrigues Coutinho, filho de José Engrácio Moreira e Maria Auxiliadora Soares Coutinho Moreira, nasceu em Viçosa-MG dia 16 de outubro de 1987.

Iniciou sua vida acadêmica na Universidade Federal de Viçosa (UFV) em março de 2007, obtendo o título de Engenheiro Agrônomo em janeiro de 2012.

Em 2014 obteve o título de mestre em fitopatologia pela UFV e em 2014 iniciou o curso de Doutorado em fitopatologia pela mesma instituição, submetendo-se à defesa no dia 05 de outubro de 2018.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	7
INTERAÇÃO <i>Pochonia chlamydosporia</i> , <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E <i>Azospirillum brasilense</i> NO CONTROLE de <i>Meloidogyne javanica</i> E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE SOJA	
CAPÍTULO 2	30
EFEITO DO pH DO SOLO NA ATIVIDADE DE BIOCONTROL <i>Pochonia chlamydosporia</i> E SOBRE SEUS EFEITOS COMO PROMOTOR DE CRESCIMENTO DA SOJA	
CAPÍTULO 3	50
VEICULAÇÃO DE <i>Pochonia chlamydosporia</i> POR SEMENTE OU INCORPORAÇÃO NO SOLO: O EFEITO DE BIOCONTROLE DE <i>Meloidogyne javanica</i> EM SOJA	
CAPÍTULO 4	70
ASSOCIAÇÃO RADICULAR E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE CULTURAS DE COBERTURA POR <i>Pochonia chlamydosporia</i>	
CONCLUSÕES GERAIS	91

RESUMO

COUTINHO, Raul Rodrigues, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2018. ***Pochonia chlamydosporia*: Controle de *Meloidogyne javanica* em soja, associação com culturas de cobertura e interação com bactérias fixadoras de nitrogênio e com o pH do solo.** Orientador: Leandro Grassi de Freitas. Coorientador: Guilherme Silva de Podestá.

A soja é uma das principais culturas do mundo e os pesquisadores têm procurado exaustivamente por novas tecnologias para melhorar o rendimento e a adaptação das plantas para diferentes condições ambientais. Este trabalho avaliou o fungo *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e sua funcionalidade no sistema produtivo da soja. Os primeiros experimentos visaram esclarecer a interação do fungo com duas bactérias diazotróficas (*Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*), em relação ao controle de *Meloidogyne javanica* (Mj) e sua influência na promoção do crescimento da soja. Os testes demonstraram que, a melhor interação observada ocorreu quando o Pc foi associado com *B. japonicum* aumentando a altura das plantas e a matéria seca da parte aérea em comparação com o controle e os demais tratamentos. Em relação ao controle de nematoides, nenhum organismo influenciou na capacidade de Pc em reduzir o número de ovos e galhas de Mj. Outro grupo de experimentos foi desenvolvido para avaliar a influência do pH do solo sobre a ação de Pc contra Mj e sua capacidade de promover o crescimento da soja em dois níveis distintos de pH do solo. O fungo pode reduzir as populações de nematoides para ambos os níveis de pH (4,36 e 7,0). No primeiro ensaio, para tratamentos sem a presença do nematoide, Pc também promoveu aumento da matéria seca da parte aérea. Em resumo, o pH do solo não interferiu na atividade de Pc em controlar Mj e em sua capacidade como promotor de crescimento vegetal. Outro conjunto de experimentos foi realizado para entender como diferentes modos de aplicação de Pc poderiam afetar sua atividade contra nematoides. Conclui-se que, independentemente da forma de aplicação do fungo, seja por tratamento de sementes, aplicação direta ao sulco de plantio ou a combinação dos dois métodos, sua capacidade de controlar Mj em plantas de soja não é afetada. Finalmente, ainda mais importante, novos ensaios foram realizados para analisar a interação entre Pc e cultura de cobertura, como *Pennisetum glaucum* (ADR 300, ADR 500 e ADRG 9050), *Urochloa ruziziensis*, *Crotalaria spectabilis* e *Stylosanthes* sp. Com o objetivo de identificar a posição correta das colônias de Pc no sistema radicular (endofítica ou epifítica), um ensaio *in vitro* foi organizado. Além disso, um experimento em casa de vegetação foi construído para verificar se Pc também poderia atuar como promotor de crescimento de tais culturas de cobertura. O fungo pode colonizar

epifítica e endofiticamente as raízes e promover crescimento de todas as culturas de cobertura analisadas. Este é o primeiro relato da colonização desse fungo nessas espécies de plantas por Pc e a primeira observação do clamidósporos de *P. chlamydosporia* dentro de células de plantas vivas.

ABSTRACT

COUTINHO, Raul Rodrigues, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2018.
***Pochonia chlamydosporia*: Control of *Meloidogyne javanica* in soybean, association with cover crops and interaction with nitrogen fixing bacteria and the soil pH.**
Adviser: Leandro Grassi de Freitas. Co-adviser: Guilherme Silva de Podestá.

Soybean is one of the main crops over the world and researchers have been exhaustively searching for new technologies to improve yield and plants adaptation to different environment conditions. This work evaluated the fungus *Pochonia chlamydosporia* (Pc) and its functionality in the soybean production system. The first experiments aimed to clarify the interaction between the fungus and two diastrophic bacteria (*Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*) in relation to the control of *Meloidogyne javanica* (Mj) and to the soybean growth promotion. The tests demonstrated that the best interaction happened when Pc was associated with *B. japonicum* increasing plant height and shoot dry matter in comparison to the control and the other treatments. In relation to the control of nematodes, no organism influenced the ability of Pc to reduce the number of eggs and galls of Mj. Another group of experiments were set to evaluate the influence of soil pH over Pc action against Mj and its ability to promote soybean growth in two different levels of soil pH. The fungus could reduce nematode populations at both pH levels (4.36 and 7.0). In the first trial, for treatments without the presence of the nematodes, Pc also promoted increases of shoot dry matter. In brief, the soil pH did not interfere in Pc activity to control Mj and its ability as plant growth promoter. Another set of experiments was carried out to understand how different modes of application of Pc could affect its activity against nematodes. It is concluded that, regardless of the form of application of the fungus, whether by seed treatment, direct application to the planting groove or the combination of the two methods, its ability to control Mj in soybean plants is not affected. Finally yet importantly, new trials were performed to analyze the interaction between Pc and cover crops such as *Pennisetum glaucum* (ADR 300, ADR 500 e ADRG 9050), *Urochloa ruziziensis*, *Crotalaria spectabilis* and *Stylosanthes*. With the purpose of identifying the real position of Pc's colonies in the root system (endophytic or epiphytic), one *in vitro* trial was arranged. In addition, a greenhouse experiment was conducted to verify whether Pc could also act as a growth promoter of such cover crops. The fungus could endophytically colonize the roots and promote the growth of all cover crops analyzed. This is the first report of the colonization of these plant species by Pc and the first observation of *P. chlamydosporia*'s chlamydospore inside live plants cells.

Introdução Geral

O Brasil ocupa a segunda colocação na produção e na exportação mundial de soja, perdendo apenas para os Estados Unidos (CONAB, 2018). A cultura foi introduzida no país no estado da Bahia em 1882 e hoje é produzida em mais de dez estados, principalmente no bioma Cerrado, considerado a última fronteira agrícola (Mittermeier et al., 1997; Borlaug, 2002). O Cerrado possui por características solos com pH baixo, sendo necessário realizar calagem para que se tenha uma boa produtividade da soja (Zandona et al., 2015). Além disso, o solo ácido pode interferir na capacidade antagonistas de microrganismos e no desenvolvimento de pragas (Ferraz & Brown, 2016).

A adequação da soja às variações climáticas brasileira deve-se, em grande parte, à fixação biológica de nitrogênio (FBN) por bactérias diazotróficas que fornecem à cultura valores próximos a 300 kg de nitrogênio por hectare (Hungria et al., 2007). O nitrogênio fixado, supre toda demanda exigida pela planta, excluindo a necessidade de adubação mineral, gerando uma economia de bilhões de dólares para a agricultura (Campos, 2014). No entanto, a capacidade da soja em absorver e/ou assimilar os nutrientes pode ser afetada pela presença de fitopatógenos como fungos, bactérias, vírus e nematoides (Sinclair & Hartman, 2008).

Nematoides fitoparasitas constituem um dos principais problemas limitando a produção da soja, principalmente as espécies do gênero *Meloidogyne*, particularmente, *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*. Somada às essas espécies, *Heterodera glycines*, *Rotylenchulus reniformis*, *Pratylenchus brachyurus* e mais recentemente, *Aphelenchoides besseyi* e *Scutellonema brachyurus*, podem contribuir expressivamente para o declínio da cultura nos campos de produção (Dias, et al., 2010; Favoreto et al., 2015; Santos, 2015).

A forma mais eficiente de combater nematoides em uma área é adotando um

conjunto de métodos na forma de manejo integrado. Existem medidas que foram preconizadas durante décadas e que persistem até hoje, como o uso de plantas antagonistas (Ferraz & Brown, 2016). O uso de microrganismos antagonistas também tem ganhado espaço no manejo de fitonematoides. O uso combinado de plantas má ou não hospedeiras e microrganismos antagonistas aos nematoides pode ser uma ferramenta de manejo de nematoides poderosa, principalmente se apresentar efeito aditivo ou sinérgico.

Várias são as espécies de plantas já estudadas para fins de controle de nematoides (Costa et al., 2014; Gardiano et al., 2014; Moreira & Ferreira, 2015) e dentre os microrganismos antagonista as bactérias e os fungos são os mais estudados e apresentam o maior potencial (Stirling, 1991; Chen & Dickson, 2004).

Pochonia chlamydosporia (Pc) é um fungo nematófago da família Clavicipitaceae (ordem Hypocreales) que possui capacidade de parasitar ovos e fêmeas de nematoides, bem como de sobreviver no solo em condições desfavoráveis e na ausência de nematoides, devido sua habilidade em produzir estruturas de resistência, denominadas clamidósporos, e assim se alimentar saprofiticamente de restos culturais presentes no ambiente (Stirling, 1991; Zare et al., 2001). Além do mais, Pc é capaz de colonizar epifítica e endofiticamente raízes de diversas espécies de mono e dicotiledôneas, promovendo uma associação simbiótica com essas plantas (Bordallo et al., 2002). Vários são os trabalhos demonstrando a associação benéfica de Pc com plantas cultivadas (Macia-Vicente et al., 2009; Dallemole-Giaretta et al., 2015; Larriba, et al., 2015).

Desde o desenvolvimento de produtos à base de Pc, esse fungo vem sendo aplicado em áreas de cultivo de soja, visando o manejo de nematoides (Hidalgo-Díaz et al., 2017). Nessa cultura, a capacidade endofítica de Pc e sua ação sobre o desenvolvimento do vegetal foi bem documentada (Monteiro, 2017; Nasu, 2018), porém a sua interação com outros organismos benéficos para a cultura (como bactérias fixadoras

de nitrogênio), com o pH do solo e com as culturas utilizadas como cobertura antes do plantio da soja, ainda carecem de pesquisas.

Este trabalho teve como objetivos:

- Avaliar, por teste *in vitro*, a compatibilidade das bactérias diazotróficas *B. japonicum* e *A. brasilense* e o fungo *P. chlamydosporia* e também a interação desses organismos no controle de *M. javanica* e na promoção de crescimento de plantas de soja.
- Avaliar o efeito pH do solo na capacidade do fungo *P. chlamydosporia* em controlar *M. javanica* em plantas de soja, bem como sobre sua capacidade de promover o crescimento das plantas.
- Avaliar a eficiência da forma de aplicação de *P. chlamydosporia* em controlar *M. javanica* e promover crescimento de plantas de soja.
- Avaliar se o isolado Pc-10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* é capaz de colonizar raízes de *Pennisetum glaucum* (milheto das variedades ADR 300, ADR 500 e ADRG 9050), *Urochloa ruziziensis*, *Crotalaria spectabilis* e *Stylosanthes* sp., se estabelecer ao longo do perfil do solo e promover crescimento vegetativo dessas plantas de cobertura.

REFERÊNCIAS

- Bettiol, W. (2014). Control Biológico de Enfermedades en Brasil: Del Laboratorio al Control Masivo en el Campo, 30-32.
- Bordallo, J. J., Lopez-Llorca, L. V., Jansson, H. B., Salinas, J., Persmark, L., & Asensio, L. (2002). Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. *New Phytologist*, *154*, 491-499.
- Borlaug, N. E. (2002). Feeding a World of 10 Billion People: The Miracle Ahead. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, *38*, 221-228.
- CONAB. (2018). A produtividade da soja: análise e perspectivas, 1–35. Retrieved from https://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_08_02_14_27_28_10_c ompendio_de_estudos_conab__a_produtividade_da_soja_-_analise_e_perspectivas_-_volume_10_2018.pdf
- Costa-Neto, P. R., & Rossi, L. F. S. (2000). Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, *23*(4), 531–537.
- Costa, M. J. N., Pasqualli, R. M., & Prevedello, R. (2014). Efeito do teor de matéria orgânica do solo, cultura de cobertura e sistema de plantio no controle de *Pratylenchus brachyurus* em soja. *Summa Phytopathologica*, *40*(10), 63–70.
- Chen, S., & Dickson, D. W. (2004). Biological control of nematodes by fungal antagonists. In Chen, Z., Chen, S., Dickson, D. W. (Eds). *Nematology - Advances and perspectives*, v.2: Nematodes Management and utilization. Tsinghua: University Press; CABI Publishing, 979-1039.
- Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L. G. de., Lopes, E. A., Silva, M. D. C. S. da, Kasuya, M. C. M., & Ferraz, S. (2015). *Pochonia chlamydosporia* promotes the growth of tomato and lettuce plants. *Acta Scientiarum Agronomy*, *37*(4), 417.
- Dias, W. P., Garcia, A., Silva, J. F. V., & Cameiro, G. E. D. S. (2010). Nematóides em soja: identificação e controle. *Embrapa Soja. Circular 76*, 1–8.
- Fageria, N. K., & Stone, L. F. (1999). Manejo da acidez de solos de Cerrado e de várzea

do Brasil, 42.

- Favoreto, L., Meyer, M. C., Kleper, D., Campos, L. J. M., & Paiva, E. V. (2015). Ocorrência de *Aphelenchoides* sp. em plantas de soja com sintomas de Soja Louca II. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 32., Londrina. Nematologia: problemas emergentes e perspectivas: *anais*. Londrina: Sociedade Brasileira de Nematologia, 82-83.
- Ferraz, L. C. C. B., & Brown, D. J. F. (2016). *Nematologias de plantas: fundamentos e importância*, 251p.
- Freitas, M. C. M. (2011). A cultura da soja no Brasil: O crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. *Enciclopédia Biosfera*, 7, 1-12.
- Gardiano, C. G., Krzyzanowski, A. A., & Saab, O. J. G. A. (2014). Eficiência de espécies de adubos verdes sobre a população do nematoide reniforme. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(2), 719-726.
- Hungria, M., Campo, R. J., & Mendes, I. C. (2007). A importância do processo de fixação biológica de nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina, Embrapa Soja, 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).
- Larriba, E., Jaime, M. D. L. A., NiSPow, C., Martín-Nieto, J., & Lopez-Llorca, L. V. (2015). Endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* reveals plant growth promotion and a general defense and stress transcriptomic response. *Journal of Plant Research*, 128(4), 665-678.
- Marcía-Vicente, J. G., Rosso, L. C., Ciancio, A., Janson, H. B., & Lopez-Llorca, L. V. (2009) Colonisation of roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*: effects on plant growth and disease. *Annals of Applied Biology*, 155, 391-401.
- Mittermeier, R. A., Goettsch Mittermeier, C., & Robles Gil, P. (1997). *Megadiversidad : los países biológicamente más ricos del mundo*. Cemex.

- Moreira, F. J. C., & Ferreira, A. C. S. (2015). Controle alternativo de nematoide das galhas (*Meloidogyne enterolobii*) com cravo de defunto (*Tagetes patula* L.), Incorporado ao solo. *Holos*, 1, 99-110.
- Sinclair, J. B., & Hartman, G. L. (2008). Soybean diseases. In: HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. (Eds.) Compendium of soybean diseases. 4 ed., Minnesota: APS, 3-4.
- Sinclair, J. B., & Shurtleff, M. C. (1975). Compendium of soybean diseases. St.. Paul: *American Phytopatology Society*, 69p.
- Stirling, G. R. (1991). Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects. Wallingford: *CAB International*, 282p.
- Zare, R., Gams, W., & Evans, H. C. (2001). A revision of *Verticillium* section Prostrata . V. The genus *Pochonia*, with notes on Rotiferophthora). *Nova Hedwigia*, 73, 51-86.

CAPÍTULO 1

INTERAÇÃO *Pochonia chlamydosporia*, *Bradyrhizobium japonicum* E *Azospirillum brasilense* NO CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE SOJA

RESUMO

O uso de bactérias diazotróficas desempenha um papel fundamental no cultivo da soja. Reduz significativamente o consumo de fertilizantes químicos e, além disso, ajuda a maximizar o nível de produção. No entanto, os nematoides são patógenos que afetam negativamente várias culturas em todo o mundo. Considerando isso, o controle biológico tem aparecido frequentemente como uma boa opção para minimizar tais problemas. *Pochonia chlamydosporia* (Pc) tem sido utilizada para essa finalidade em campo de soja e níveis expressivos de controle de fitonematoides tem sido relatados na última década. Além disso, também pode atuar como promotor de crescimento de plantas. O objetivo deste trabalho, foi avaliar a interação entre duas bactérias diazotróficas (*Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*) e Pc em relação ao controle de *Meloidogyne javanica* (Mj) e sua influência na promoção do crescimento da soja. Diferentes testes foram realizados para verificar a compatibilidade entre as estirpes bacterianas e Pc. Além disso, experimentos em casa de vegetação foram conduzidos para avaliar a interação entre esses microrganismos na atividade de Pc para controlar Mj e promover crescimento das plantas. Nenhum nível de incompatibilidade foi detectado pela análise de confronto direto, antibiose por difusão em dupla camada e compostos voláteis. Nenhum tratamento aumentou significativamente a altura das plantas, a massa da parte aérea seca e a massa da raiz seca em experimentos *in vivo* com nematoides. Em relação ao experimento sem a presença de nematoides, o tratamento com Pc co-inoculado com *B. japonicum* aumentou significativamente a altura das plantas (42%) e a massa da parte aérea seca (12%). Todos os tratamentos reduziram o número de ovos de nematoides por grama de raiz. No entanto, o melhor nível de controle de nematoides foi encontrado em tratamentos com 2 ou 3 combinações de microrganismos e no tratamento com apenas Pc. Para o número de galhas por grama de raiz, apenas os tratamentos que utilizaram *B. japonicum* e *A. brasilense* como única fonte de inóculo, não apresentaram nível de controle para este parâmetro. Assim, conclui-se que a co-inoculação de Pc e *B. japonicum* favorece o desenvolvimento da soja e que *B. japonicum* e *A. brasilense* não interferem na capacidade de Pc controlar Mj.

Palavras-chave: co-inoculação, controle biológico, nematoide de galhas

CHAPTER 1

INTERACTION *Pochonia chlamydosporia*, *Bradyrhizobium japonicum* E *Azospirillum brasilense* IN THE CONTROL OF *Meloidogyne javanica* AND IN THE PROMOTION OF GROWTH OF SOYBEAN PLANTS

ABSTRACT

The use of diazotrophic bacteria plays a key role in the cultivation of soybean. It significantly reduces the consumption of chemical fertilizers and, in addition, helps to maximize the level of production. However, nematodes are pathogens which negatively affect several crops worldwide. Considering this, biological control has often appeared as a good option to minimize such problems. *Pochonia chlamydosporia* (Pc) has been used for this purpose in soybean fields and expressive levels of control of phytoparasite nematodes have been reported in the last decade. Moreover, it can also acts as a plant growth promoter. The objective of this paper was evaluate the interaction between two diazotrophic bacteria (*Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*) and Pc in relation to control of *Meloidogyne javanica* (Mj) and their influence about soybean growth promotion. Different tests were performed to check the compatibility between bacterial strains and Pc. In addition, greenhouse experiments were conducted to evaluate the effect of the interaction between these microorganisms on the Pc effectiveness to control Mj and to promote plant growth. No level of incompatibility was detected by analysis of direct confrontation, double layer diffusion antibiosis or volatile compounds. No treatment significantly increased plant height, dry shoot mass and dry root mass in *in vivo* experiments with nematodes. In relation to the experiment without the presence of nematode, treatment with Pc co-inoculated with *B. japonicum* significantly increased plant height (42%) and shoot dry mass (12%). All treatments reduced the number of nematode eggs per gram of root. However, the best level of nematode control was found in treatments with 2 or 3 combinations of microorganisms and in the treatment with only Pc. For the number of galls per gram of root, only the treatments which used *B. japonicum* and *A. brasilense* as sole source of inoculum did not present reduction of this parameter. Thus, it is concluded that the co-inoculation of Pc and *B. japonicum* favors the development of soybean and that *B. japonicum* and *A. brasilense* do not interfere in the capacity of Pc to control Mj.

Key-words: co-inoculation, biological control, root-knot nematodes

1. Introdução

A soja é uma das plantas cultivadas com maior capacidade de extração de nitrogênio do ambiente, sendo necessários cerca de 240 kg desse nutriente para suprir uma produção de 3000 kg de grãos por hectare (Hungria et al., 2001). Sabe-se que a presença de fitopatógenos, a exemplo dos nematoides, interferem no processo de absorção de água e nutrientes por essas plantas, reduzindo a produtividade ou aumentando o custo de controle desses organismos (Ferraz & Brown, 2016).

Bactérias fixadoras de nitrogênio têm sido uma das principais opções para suprir a grande demanda de nitrogênio na cultura da soja, pois são capazes de fornecer valores próximos a 300 kg de nitrogênio por hectare, proporcionando uma economia anual de cerca de 3 bilhões de dólares para a agricultura brasileira (Campos, 2014). Além disso, esse grupo de bactérias, principalmente bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, já foram reportados diminuindo a reprodução de várias espécies de nematoides, tais como, *Heterodera glycines* (Barker, 1972), *Meloidogyne incognita* (Oyekanmi et al., 2007) e *Meloidogyne javanica* (Tabatabaei & Saeedizadeh, 2017).

Outro grupo de bactérias capaz de prover benefícios às plantas, são as bactérias do gênero *Azospirillum*, caracterizadas como promotoras de crescimento, principalmente de espécies não leguminosas, devido sua habilidade em fixar nitrogênio atmosférico e produzir um complexo de fitormônios que estimula o crescimento radicular aumentando a capacidade da planta em absorver água e nutrientes (Dobereiner, 1987; Cassán et al., 2008). Ressalta-se que em gramíneas essas bactérias se estabelecem endofiticamente e que sua relação com plantas leguminosas é apenas associativa (Hungria, 2011).

Além da melhoria no desenvolvimento vegetal, estirpes de *Azospirillum*, já foram relatadas agindo sobre fitopatógenos, como fungos (Tortora et al., 2011; López-Reyes et al., 2017), bactérias (Yasuda et al., 2009), vírus (Lima et al., 2017) e nematoides (Siddiqui & Mahmood, 2001), seja essa ação diretamente sobre esses organismos ou indiretamente,

favorecendo a morfofisiologia da planta, deixando-as mais tolerante ao ataque de patógenos.

Pochonia chlamydosporia (Pc) também é um organismo capaz de promover o crescimento vegetativo de plantas (Maciá-Vicente et al., 2009; Dallemole-Giaretta et al., 2015; Larriba et al., 2015). A natureza do estímulo ao crescimento vegetal promovido por Pc ainda está sendo esclarecida mas, sabe-se que Pc tem a capacidade de colonizar epifítica e endofiticamente suas raízes proporcionando à planta um aumento na aquisição de nutrientes (Monteiro et al., 2018). Este é também muito conhecido como fungo nematófago bastante eficaz em reduzir populações de fitonematoides em culturas de importância econômica como o algodoeiro (Wang et al., 2005), a soja (Nunes et al., 2010) e o tomateiro (Luambano et al., 2015).

Considerando que *Bradyrhizobium* spp., *Azospirillum* spp. e Pc tem comprovada capacidade de promover o crescimento de plantas e reduzir populações de nematoides fitoparasitas, o objetivo desse trabalho foi avaliar *in vitro* a compatibilidade das estirpes bacteriana e o isolado Pc-10 de Pc, bem como a interação desses organismos na promoção de crescimento de plantas de soja e no controle de *M. javanica*.

2. Material e Métodos

2.1 Preparação do inóculo de *Meloidogyne javanica*

O inóculo de *M. javanica* (Mj) foi obtido a partir de raízes de soja mantidas em casa de vegetação e os ovo foram extraídos seguindo a técnica de extração de Hussey & Barker (1973) modificado por Boneti & Ferraz (1981).

2.2 Preparação do inóculo de *Pochonia chlamydosporia*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*

O inóculo fúngico de *P. chlamydosporia* (Pc) (isolado Pc-10) consistiu do produto comercial Rizotec[®] que continha cerca de $5,02 \times 10^7$ clamidósporos por grama de produto. Os inóculos bacterianos consistiram dos produtos Masterfix L[®] (composto das estirpes bacterianas SEMIA 5019 e SEMIA 5079 de *B. japonicum*) com concentração bacteriana de 5×10^7 UFC (unidades formadoras de colônia) por mililitros de produto e Masterfix L. Gramíneas[®] (composto das estirpes bacterianas Abv5 e Abv6 de *A. brasilense*) com uma concentração de 2×10^8 UFC/mL.

2.3 Testes de compatibilidade entre *Pochonia chlamydosporia*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*

2.3.1 Compatibilidade por confrontação direta

A metodologia para este teste foi baseada nos estudos de Bell et al., (1982), com adaptações. Inicialmente os organismos foram pipetados das embalagens comerciais e isolados em meio de cultura. *Pochonia chlamydosporia* e *B. japonicum* foram cultivados em meio BDA (Batata-Dextrose-Agar) e *A. brasilense* foi cultivado em meio semi-seletivo, cuja a composição para um litro de meio é: 0,5g de fosfato monoácido de

potássio (K_2HPO_4); 0,2g de sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$); 0,1g de cloreto de sódio (NaCl); 0,5g de extrato de levedura; 2,3 mL de solução de ferro EDTA; 5,0g de ácido málico; 4,8g de hidróxido de potássio (KOH); 15 mL de solução vermelho congo; 15g de ágar e 1L de água deionizada.

Dois discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram obtidos da margem de colônias de Pc formadas em BDA e colocados em placas de Petri a 2 cm do bordo de placas contendo BDA, um em cada bordo da placa. Com auxílio de uma alça de repicagem, foi feito uma risca de uma suspensão de cada estirpe bacteriana no centro de cada placa e transversal em relação aos pontos de depósito de Pc. As placas foram vedadas e mantidas a uma temperatura de 28°C e as medições da área das colônias de Pc foram feitas 5, 10, e 15 dias após a montagem do ensaio. Para a testemunha do ensaio, foram utilizadas placas em que o risco havia sido feito apenas com água esterilizada. Para o cálculo da área da colônia fúngica foi utilizado a fórmula da área da circunferência ($A=\pi R^2$, onde: A = área da colônia e R = raio da colônia, o qual foi calculado pela média dos valores dos diâmetros na vertical e na horizontal da colônia).

Foi conduzido um experimento para cada combinação fungo-bactéria. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento e as médias comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade. Os experimentos foram replicados.

2.3.2 Teste de antibiose por difusão em dupla camada

Para os teste de antibiose por difusão em dupla camada, utilizou-se a metodologia descrita por Martins-Corder & Melo (1998). O teste foi realizado, tanto para verificar se Pc produz algum composto com efeito inibidor para bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense*, quanto para verificar se as bactérias produzem algum composto nocivo ao fungo. As placas foram armazenadas em câmara de incubação a 28°C e diariamente

durante 15 dias foi feita a averiguação da formação do halo de inibição. O experimento foi replicados.

2.3.3 Compostos voláteis

Este teste foi realizado para verificar se as estirpes bactérias de *B. japonicum* e *A. brasilense* produzem algum composto volátil capaz de inibir o crescimento de Pc. Para esse teste, foi utilizado a metodologia descrita por Bharat et al., (1980), com adaptações. Para tanto, placas de Petri de 9 cm de diâmetro foram posicionadas uma sobre a outra. Na placa inferior, foram espalhados 200 µL das estirpes bacterianas a serem testadas e no centro da placa superior foi colocado um disco de micélio de Pc de 0,9 cm de diâmetro. As placas foram vedadas lateralmente com filme de PVC e mantidas no escuro em câmara de incubação a uma temperatura de 28°C.

Aos 5, 10 e 15 dias após a montagem do ensaio, foi medido o diâmetro das colônias e calculado a área das colônias fúngicas e comparadas com a testemunha (fungo em ambas as placas). O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento e as médias comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade. O experimento foi replicado.

2.4 Interação entre *Pochonia chlamydosporia*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* no controle de *Meloidogyne javanica* e na promoção de crescimento de plantas de soja

Vasos de 2 L de capacidade foram preenchidos com uma mistura de solo de barranco e areia na proporção de 1:1 (v:v) previamente desinfestado com BASAMID® (Ingrediente ativo: Dazomete, um precursor de isotiocianato). Cada vaso recebeu uma semente de soja cultivar M9350 tratada com Pc, *B. japonicum* e *A. brasilense*, isolados ou com todas possíveis combinações entre os organismos e uma suspensão de 3000 ovos de *M. javanica*. Os vasos que receberam sementes não tratadas compuseram a testemunha. Para cada tratamento, 50 sementes de soja foram tratadas com 20 µL de cada produto bacteriano e 0,1g do Rizotec® isoladamente ou em mistura, dependendo do tratamento. Das 50 sementes tratada, cinco compuseram cada tratamento, ou seja, uma semente por vaso formando cinco repetições por tratamento. Para todos os tratamentos foram adicionados 1 mL de uma solução de sacarose a 0,5% a fim de providenciar a adesão dos produtos às sementes.

Foram realizados dois experimentos, um na presença de *M. javanica* e o outro sem o nematoide. Ambos experimentos foram mantidos em casa de vegetação por 60 dias. No experimento em que o nematoide estava presente, foram avaliadas as variáveis nematológicas (número de galhas e ovos por grama de raiz), bem como as variáveis vegetativas da planta (altura, massa da parte aérea seca e massa da raiz seca). Para obtenção da massa da parte aérea seca e da raiz seca, as plantas permaneceram em estufas a 60 °C por 15 dias. No experimento envolvendo plantas sem o nematoide foram avaliadas apenas as variáveis vegetativas das plantas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

2.5 Ensaio em solo em microcosmo

Um ensaio em condições de microcosmo foi montado com intuito de verificar se a bactéria *A. brasilense* é capaz de agir diretamente sobre o nematoide *M. javanica*. Para isso, recipientes de polipropileno de 100 mL de capacidade foram preenchidos 50g de uma mistura esterilizada de solo e areia na proporção 1:1 (v:v) e infestados com 1400 ovos de *M. javanica* e, em seguida, cinco concentrações do produto Masterfix L. Gramíneas[®]. Foi realizada a contagem de células viáveis de cada concentração da bactéria por meio da contagem das unidades formadoras de colônia em meio de cultura semi-seletivo para *A. brasilense*.

Cada tratamento foi composto por cinco repetições. Após 15 dias incubados a 28°C, o solo foi recolhido e os nematoides foram extraídos pela técnica de funil de Baermann (Baermann, 1917) 48 horas após a montagem. Feita a extração, os juvenis de segundo estágio (J2) foram quantificados em microscópio de luz com auxílio de uma câmara de Peter.

3. Resultados

3.1 Testes de compatibilidade

3.1.1 Compatibilidade por confrontação direta

No teste de compatibilidade por confrontação direta, em nenhuma das épocas avaliadas as estirpe de *B japonicum* e de *A. brasilense* inibiram o crescimento de Pc, pois não se observou redução da área das colônias de Pc quando na presença das estipes bacterianas (Tabela 1). Além disso, após 15 dias, o micélio fúngico invadiu a área de crescimento das bactérias (Figura 1). No entanto, os tratamentos em que foram confrontados *B. japonicum* e Pc, ao final dos ensaios houve um crescimento mais atenuado da colônia fúngica ao entrar em contato com a bactéria (Figura 1A e 1B).

Tabela 1. Compatibilidade por confrontação direta entre as bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* e o fungo *Pochonia chlamydosporia*.

Área da colônia de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (cm ²)						
Avaliação	Pc	Pc + Bj 19	Pc	Pc + Bj 79	Pc	Pc + Ab
5 dias	0,613	0,812*	0,613	0,950*	0,253	0,336 ^{NS}
10 dias	4,539	4,467 ^{NS}	4,539	5,318 ^{NS}	2,453	2,433 ^{NS}
15 dias	9,357	9,625 ^{NS}	9,357	9,532 ^{NS}	5,108	6,044 ^{NS}

NS = Não significativo; * = Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. Pc = *Pochonia chlamydosporia*; Bj19 = SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium japonicum*; Bj79 = SEMIA 5079 de *Bradyrhizobium japonicum*; Ab = *Azospirillum brasilense*.

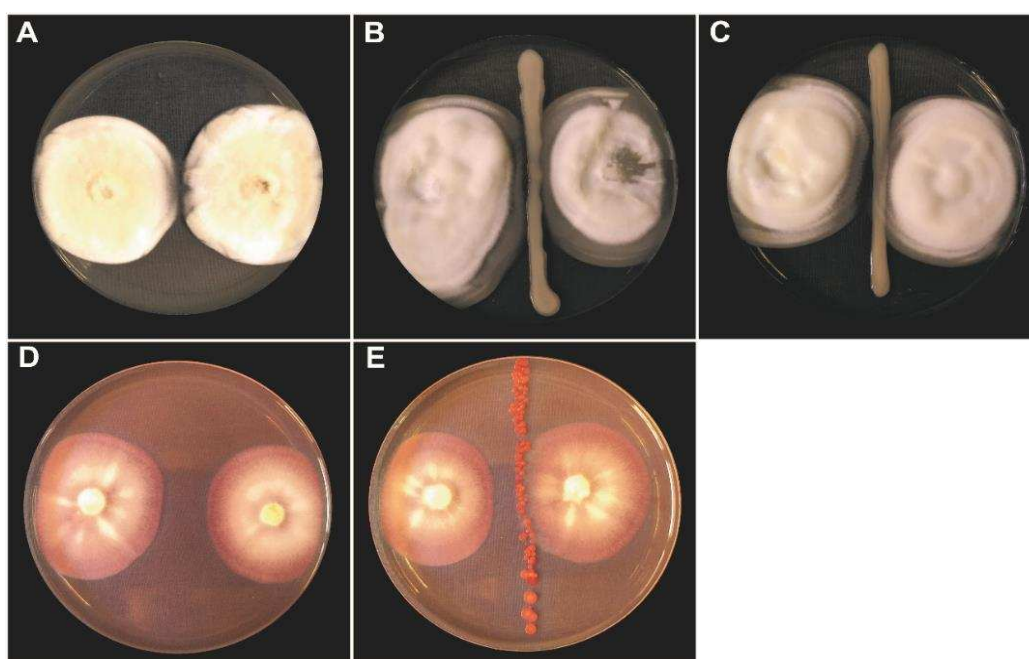


Figura 1. Compatibilidade por confrontação direta 15 dias após montagem do ensaio. A = testemunha contendo somente isolado Pc-10 em meio BDA; B = Pc-10 x SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium japonicum* em meio BDA; C = Pc-10 x SEMIA 5079 de *Bradyrhizobium japonicum* em BDA; D = Testemunha contendo Pc-10 em meio semi-seletivo para *Azospirillum brasilense*; E = Pc-10 x *Azospirillum brasilense* em meio semi-seletivo para *Azospirillum brasilense*.

3.1.2 Antibiose por difusão em dupla camada

No teste de antibiose não houve formação de nenhum halo de inibição em nenhum dos tratamentos (Figura 2).

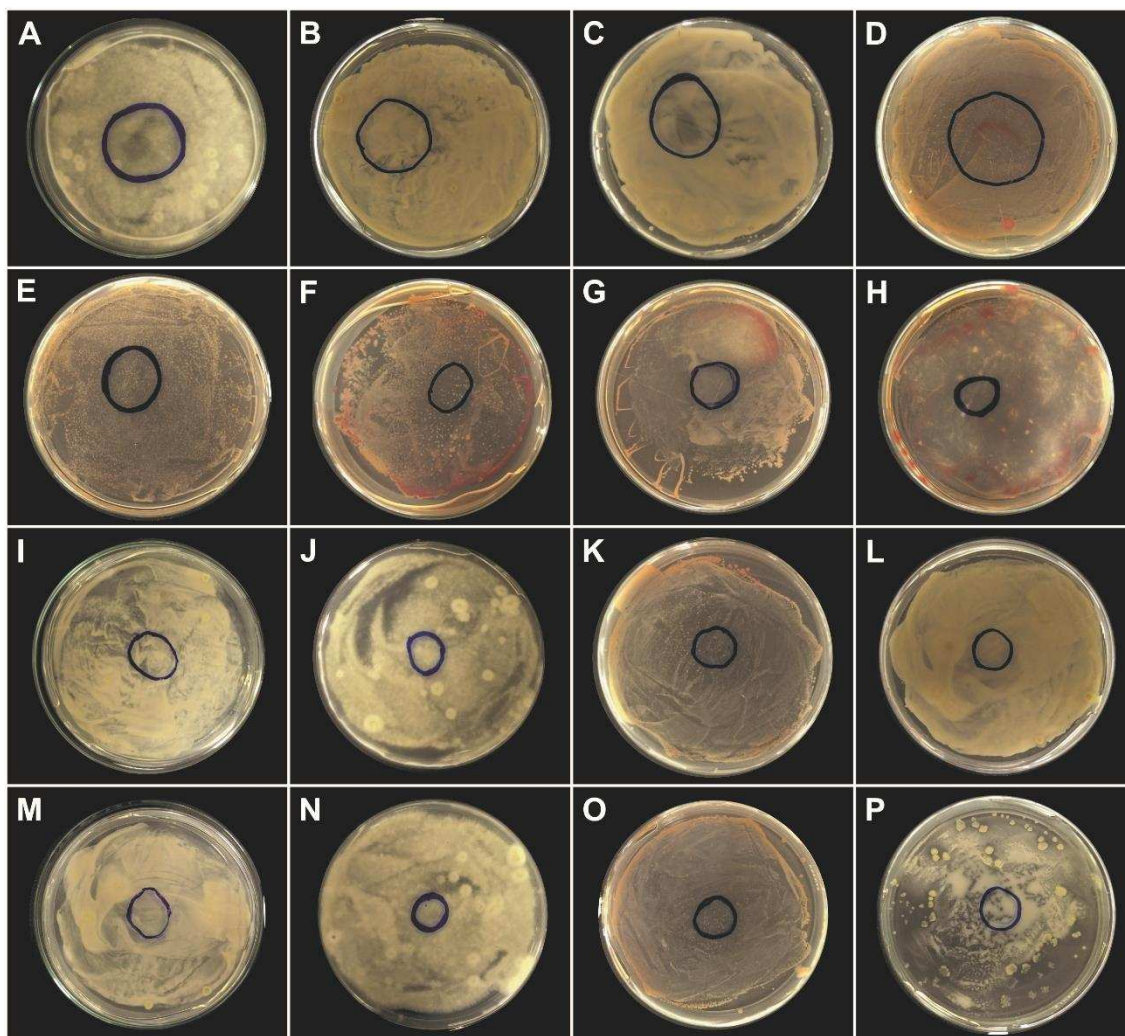


Figura 2. Teste de antibiose por difusão em dupla camada após 15 dias do contato do agente com os antibióticos. A- Testemunha Pc-10 x Pc-10; B-D antibiose de Pc-10 sobre Bj19, Bj79 e Ab, respectivamente. E- Testemunha Ab x Ab; F-H antibiose de Ab sobre Bj19, Bj79 e Pc-10, respectivamente. I- Testemunha Bj19 x Bj19; J-L antibiose de Bj19 sobre Pc-10, Ab e Bj79, respectivamente; M- Testemunha Bj79 x Bj79; N-P antibiose de Bj79 sobre Pc-10, Ab e Bj19, respectivamente. Pc-10 = Isolado de *Pochonia chlamydosporia*; Ab = *Azospirillum brasilense*; Bj19 e Bj79 = SEMIA 5019 e SEMIA 5079 de *Bradyrhizobium japonicum*.

3.1.3 Compatibilidade por produção de compostos voláteis

No teste de produção de compostos voláteis em nenhum momento da avaliação houve redução do diâmetro das colônias fúngica dos tratamentos comparados ao tratamento testemunha, ou seja, não houve produção de compostos antifúngicos pelas bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense* (Tabela 2 e Figura 3).

Tabela 2. Compatibilidade por produção de compostos voláteis pelas bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* contra o fungo *Pochonia chlamydosporia*.

Área da colônia de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (cm ²)			
Avaliação	Pc-10 x Pc-10 (Controle)	Bj x Pc-10	Ab x Pc-10
5 dias	1,99	2,08 ^{ns}	2,22 ^{ns}
10 dias	6,22	6,27 ^{ns}	8,63 ^{ns}
15 dias	12,15	11,1 ^{ns}	13,17 ^{ns}

ns= Não significativo; * = Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. Pc-10 = *Pochonia chlamydosporia* (isolado Pc-10); Bj = *Bradyrhizobium japonicum*; Ab = *Azospirillum brasilense*

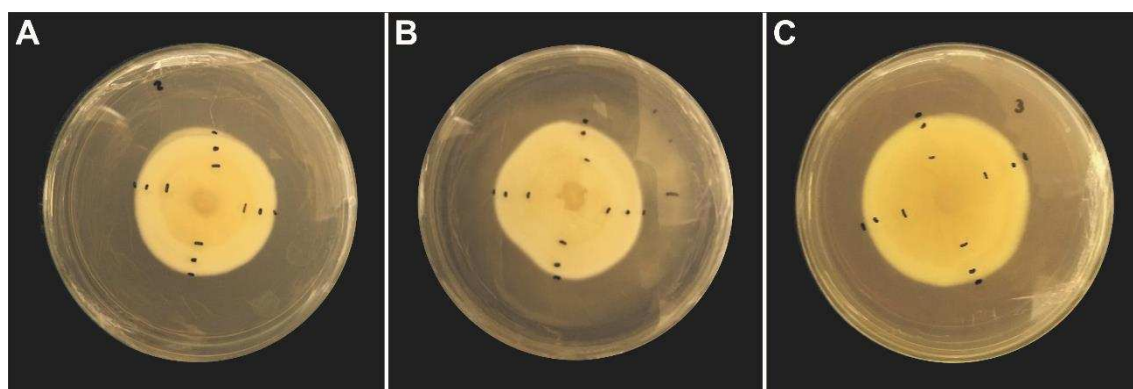


Figura 3. Visão do reverso de colônias de *Pochonia chlamydosporia* em placas justapostas sobre placas contendo: A = Placa inferior contendo *Pochonia chlamydosporia*; B = Placa inferior contendo *Bradyrhizobium japonicum*; C = Placa inferior contendo *Azospirillum brasilense*.

3.2 Interação entre *Pochonia chlamydosporia*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* na promoção de crescimento de plantas de soja e no controle de *Meloidogyne javanica*

Na presença do nematoide de galhas *M. javanica*, nenhum tratamento diferiu da testemunha em relação à altura de parte aérea (APA), massa da parte aérea seca (MPAS) e massa da raiz seca (MRS) de plantas de soja (Tabela 3). Porém, na ausência do nematoide, quando Pc e *B. japonicum* foram co-inoculados, houve aumento na altura de plantas e na massa da parte aérea seca em 42% e 12%, respectivamente (Tabela 3). A aplicação dos três organismos não proveu nenhum incremento das variáveis analisadas, tanto na presença como na ausência do nematoide (Tabelas 3).

Tabela 3. Desenvolvimento vegetativo de plantas de soja 60 dias após a aplicação de *Pochonia chlamydosporia*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* combinados ou aplicados isoladamente.

Tratamentos	APA (cm)		MPAS (g)		MRS (g)	
	C/N	S/N	C/N	S/N	C/N	S/N
Soja	83,4 a	92,8 a	16,41 a	17,17 b	1,78 a	7,69 a
Soja+Ab	88,0 a	102,8 a	16,39 a	16,79 b	1,37 a	7,65 a
Soja+Bj	97,8 a	103,6 a	18,29 a	18,91 a	1,63 a	7,56 a
Soja+Ab+Bj	85,4 a	87,8 a	17,22 a	15,98 b	1,77 a	7,23 a
Soja+Pc-10	97,6 a	112,4 a	16,95 a	16,60 b	1,65 a	7,52 a
Soja+Pc-10+Ab	83,6 a	108,8 a	16,30 a	15,82 b	1,63 a	7,58 a
Soja+Pc-10+Bj	85,4 a	131,4 a	16,82 a	19,20 a	1,72 a	7,43 a
Soja+Pc-10+Ab+Bj	104,6 a	118,8 a	15,76 a	18,70 a	1,64 a	7,77 a
MÉDIA	90,73	107,30	16,77	17,40	1,65	7,56
CV (%)	17,46	19,81	9,95	10,05	18,05	5,02

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

APA = Altura da Parte Aérea; MPAS = Massa da Parte Aérea Seca; MRS = Massa da Raiz Seca.

Ab = *Azospirillum brasilense*; Bj = *Bradyrhizobium japonicum*; Pc-10 = *Pochonia chlamydosporia*

C/N = Com Nematoides; S/N = Sem Nematoides.

Todos os tratamentos foram eficientes em reduzir o número de ovos por grama de raiz, no entanto, os tratamentos compostos por mais de um organismo foram mais eficazes que os tratamentos em que os organismos foram aplicados isoladamente, exceto o tratamento composto apenas por Pc que teve o mesmo efeito que os tratamentos com mais de um organismo (Tabela 4). *Bradyrhizobium japonicum* e *A. brasilense* foram menos eficientes em reduzir o número de ovos por grama de raiz quando aplicados isoladamente, mas ao serem co-inoculados mostraram a mesma resposta no controle que os tratamentos que possuíam o fungo Pc.

Já para o número de galhas por grama de raiz, apenas os tratamentos compostos unicamente por *B. japonicum* ou por *A. brasilense*, não foram capazes de reduzir essa variável (Tabela 4).

Tabela 4. Interação de *Pochonia chlamydosporia*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* e efeito na produção de galhas e ovos de *Meloidogyne javanica* após 60 dias.

Tratamentos	Número de ovos.g ⁻¹ raiz	Número de galhas.g ⁻¹ raiz
Soja+Mj	30344,0 a	385,3 a
Soja+Mj+Ab	15881,1 b	258,5 a
Soja+Mj+Bj	16987,9 b	326,0 a
Soja+Mj+Ab+Bj	6727,8 c	178,4 b
Soja+Mj+Pc-10	7034,0 c	149,5 b
Soja+Mj+Pc-10+Ab	8096,3 c	187,9 b
Soja+Mj+Pc-10+Bj	6838,8 c	180,7 b
Soja+Mj+Pc-10+Ab+Bj	4433,4 c	127,1 b
MÉDIA	12042,94	224,19
CV (%)	40,79	29,88

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

APA = Altura da Parte Aérea; MPAS = Massa da Parte Aérea Seca; MRS = Massa da Raiz Seca.

Ab = *Azospirillum brasilense*; Bj = *Bradyrhizobium japonicum*; Pc-10 = *Pochonia chlamydosporia*

3.3 Ensaio em solo em Microcosmo

Não houve redução da taxa de eclosão de *M. javanica* em testes realizados *in vitro* somente com a presença da bactéria *A. brasilense* (Figura 4).

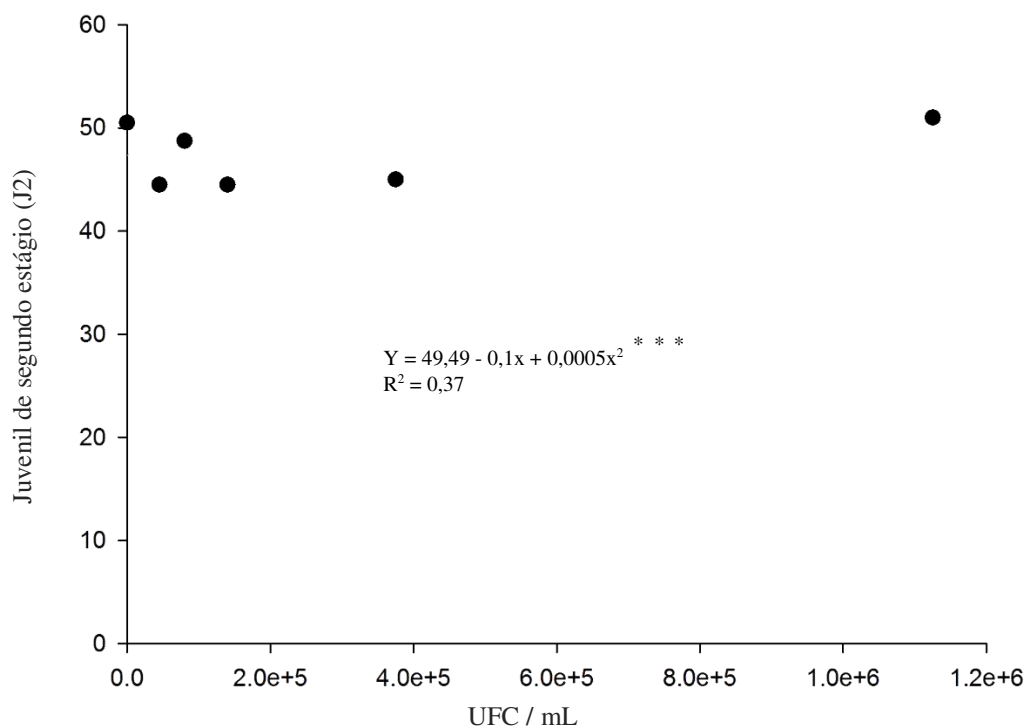


Figura 4. Análise de regressão da Taxa de mortalidade de *Meloidogyne javanica* e diferentes concentrações da bactéria *Azospirillum brasilense* 15 dias após contato do nematoide com a bactéria em ambiente de solo em microcosmo.***Não significativo a 5% de probabilidade.

4. Discussão

Pochonia chlamydosporia não teve interação negativa com as bactérias diazotróficas estudadas. Foi eficiente em promover o crescimento de plantas e em controlar o nematoide *M. javanica*, mostrando que a associação do fungo à outros organismos é uma alternativa para os fins de promoção de crescimento de plantas e controle de nematoides fitoparasitas. Vários trabalhos mostram o benefício dessa associação (Macia-Vicente et al., 2009; Dallemole-Giaretta et al., 2015; Larriba et al., 2015; Monteiro et al., 2018).

Neste trabalho, o tratamento em que Pc foi co-inoculado com *B. japonicum* foi o que promoveu maior crescimento de soja, corroborando com os resultados encontrados por Monteiro (2017) que demonstrou que a co-inoculação desses dois organismos em soja aumenta a aquisição de Fe pelas plantas e promove incremento na massa seca total da soja quando o ambiente se encontra isento de nematoides. *Bradyrhizobium japonicum* age fixando nitrogênio atmosférico (N₂) e disponibilizando para a planta na forma de amônia (NH₃) que ajuda na produção de novas células e tecidos, síntese proteica e por fim crescimento vegetativo (Pereira et al., 1981).

Os resultados obtidos para os tratamentos em que *A. brasilense* foi aplicado sozinho ou em combinação com outro organismo, indicam que essa bactéria não contribui para a promoção do crescimento de soja ou até tem tendência de reduzir o estímulo dela por Pc. Zuffo (2016) obteve resultados semelhantes para as cultivares de soja Anta 82 RR[®], BRS Favorita RR[®], BRSMG 780RR[®] e BRSMG 820RR[®]. Em contrapartida, Bulegon et al., (2015) estudando o desenvolvimento das cultivares de soja BMX turbo e Coodetec 250 inoculadas de *A. brasilense* e *B. japonicum* isoladamente ou em combinação, constataram que a presença de *A. brasilense* pode promover o desenvolvimento vegetativo da soja. Sabe-se ainda que a co-inoculação de *A. brasilense* e bactérias noduladoras pode aumentar a produtividade de soja quando comparada à

inoculação de rizobactérias inoculadas isoladamente (Hungria et al., 2013; Galindo et al., 2018).

Os trabalhos supracitados, bem como os resultados encontrados neste trabalho, sugerem que ação de *A. brasilense* em promover crescimento de plantas de soja pode estar relacionado ao genótipo da cultura, visto que para algumas cultivares houve desenvolvimento vegetativo superior para plantas inoculadas com *A. brasilense* enquanto que para outras cultivares não. A relação bactéria-planta depende tanto do genótipo da planta quanto da estirpe bacteriana (Moreira & Siqueira, 2006).

Vale ressaltar que a bactéria *A. brasilense* não reduziu o crescimento normal das plantas. Chibeba et al., (2015) conclui a partir de seus estudos que a aplicação em conjunto de *A. brasilense* com *B. japonicum*, pois pode aumentar a tolerância das plantas à estresses ambientais nos primeiros dias após a emergência das plântulas de soja, ao promover aumento da biomassa das plantas e maior capacidade de fixar nitrogênio atmosférico.

A combinação de *B. japonicum* e de *A. brasilense* com Pc não interferiu na capacidade do último de atuar como nematófago reduzindo o número de ovos e galhas de *M. javanica* em soja. Os tratamentos combinados tiveram os mesmo resultados que o tratamento onde Pc foi aplicado isoladamente. Puertas et al., (2006), também constataram que a associação de *Rhizobium* sp. com Pc teve efeito semelhante de redução da população de *M. incognita* que o obtido para a aplicação de Pc isoladamente. Sobretudo, vale a pena ressaltar que os três organismos aqui estudados se foram compatíveis em crescer um em um mesmo ambiente mediante teste *in vitro* de antibiose, confronto direto e compostos voláteis.

Quando *B. japonicum* ou *A. brasilense* foram inoculados isoladamente, foi observada redução significativa do número de ovos de *M. javanica*. Porém, quando aplicados juntos, houve aumento nessa redução, indicando efeito aditivo quando co-

inoculados. É possível que a presença de *A. brasilense* tenha estimulado a atividade de nodulação por *B. japonicum*, pois já foi constatado que *A. brasilense* aumenta a concentração de leg-hemoglobina e conseqüentemente a atividade da nitrogenase e, como resultado, desencadeia aumento na taxa de fixação do nitrogênio (Groppa et al., 1999). A fixação biológica de N atmosférico, leva ao aumento da produção de lecitinas, pois o nitrogênio é um dos componentes estruturais da molécula de lecitina, as quais, além de serem uma das responsáveis pelo o estabelecimento dos nódulos, principalmente na fixação e na formação inicial deles, também estão envolvidas nos mecanismos de defesa das plantas contra parasitas, podendo essa ser uma das formas pela qual ocorreu o controle (Halverson & Stacey, 1986; Sharon & Lis, 1990; Chrispeels & Raikhel, 1991; Limpens & Bisseling, 2003).

A ausência do efeito direto de *A. brasilense* sobre *M. javanica* no ensaio em solo microcosmo no presente trabalho, indica que as reduções do número de galhas e ovos de *M. javanica* nos tratamentos compostos por *A. brasilense* isolado ou em combinação com outros organismos, não foram devidas a uma ação direta da bactéria sobre o nematoide. Isso sugere que *A. brasilense* atue favorecendo ou desencadeando as respostas de defesa da planta e não diretamente sobre *M. javanica*.

5. Conclusões

Não houve incompatibilidade entre as estirpes bacterianas e Pc.

A aplicação conjunta de Pc e *B. japonicum* é uma forma de favorecer o desenvolvimento vegetativo de plantas de soja.

Nenhum organismo interferiu na capacidade de Pc em controlar *M. javanica* em plantas de soja.

6. Referências

- Baermann, G. (1917). Eine einfache methode zur auffindung von *Ancylostomum* (Nematoden) larven in erdproben, *Gennesk. Tijds. Ned. Ind.* 57, 131-137.
- Barker, K. R., Huisingh, D., Johnston, & S. A. (1972). Antagonistic interaction between *Heterodera glycines* and *Rhizobium japonicum* on soybean. *Phytopathology* 62,1201-1205.
- Bharat, R., Singh, V. N., & Singh, D. B. (1980). *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. *Plant Soil* 57,131-5.
- Bell, D. K., Wells, H. D., Markhabell, D. K., & Wells, C. R. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72, 379-382.
- Boneti, J. I. S., & Ferraz, S. (1981). Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6(3), 533.
- Campos, L. J. M. (2014). Co-inoculação de soja. *Fronteira Agrícola: Informativo Técnico*, (4), 1-2.
- Cassán, F., Sgroy, V., Perrig, D., Masciarelli, O., & Luna, V. (2008). Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp.. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: *Asociación Argentina de Microbiología*, 61-86.
- Chibeba, A. M., Guimarães, M. de F., Brito, O. R., Nogueira, M. A., Araujo, R. S., & Hungria, M. (2015). Co-Inoculation of Soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* Promotes Early Nodulation Amaral. *American Journal of Plant Sciences*, 06(10), 1641-1649.
- Chrispeels, M. J., & Raikhel, N. V. (1991). Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *The Plant Cell*, 3(1), 1-9.
- Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L. G. de., Lopes, E. A., Silva, M. D. C. S. da., Kasuya,

- M. C. M., & Ferraz, S. (2015). *Pochonia chlamydosporia* promotes the growth of tomato and lettuce plants. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 37(4), 417.
- Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L. G. de., Zooca, R. J. F., Caixeta, L. B. (2010). Controle de *Meloidogyne javanica* por Meio da Aplicação de Palha de Café Colonizada por *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. *Nematologia Brasileira*, 34, 137-140.
- Döbereiner J., & Pedrosa F. O. (1987) Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. Science Tech, Springer Verlag, Madison, 1-155.
- Ferraz, L. C. C. B., & Brown, D. J. F. (2016). *Nematologias de plantas: fundamentos e importância*.
- Galindo, F. S., Filho, M. C. M. T., Buzetti, M. G. Z. L., Rosa, P. A. L., & Tritapepe, C. A. (2018). Technical and economic viability of co-inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean cultivars in the Cerrado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 22(1), 51-56.
- Groppa, D., & Tomaro, L. (1998). with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* on soybean plants. *Europe Journal Soil Biology*, 34(2), 75–80.
- Halverson, L. J., & Stacey, G. (1986). Effect of lectin on nodulation by wild-type *Bradyrhizobium japonicum* and a nodulation-defective mutant. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(4), 753-760.
- Hungria, M. (2011). Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. *Documentos 325-Embrapa Soja*, 1-36.
- Hungria, M., José, R., Iêda, C., & Mendes, C. (2001). Fixação Biológica Do Nitrogênio Na Cultura Da Soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 31(2), 143-154.
- Hungria, M., Nogueira, M. A., & Araújo, R. S. (2013). Co-inoculation of soybeans and common bean with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Biology Fertil Soils*, 49, 791-801.
- Hussey, R. S., & Barker, K. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57,1025-1028.

- Larriba, E., Jaime, M. D. L. A., NiSPow, C., Martín-Nieto, J., & Lopez-Llorca, L. V. (2015). Endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* reveals plant growth promotion and a general defense and stress transcriptomic response. *Journal of Plant Research*, 128(4), 665-678.
- Lima, A. A. de., Venturoso, R., Antonio, B., Silva, A., & Gomes, A. F. (2017). Eficiência da inoculação de *Azospirillum brasilense* associado com enraizador no crescimento e na produção de alface. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 12(2), 233-240.
- Limpens, E., & Bisseling, T. (2003). Signaling in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(4), 343-350.
- López-Reyes, L., Carcaño-Montiel, M. G., Lilia, T., Rosa, G. M., & Armando, T. R. (2017). Antifungal and growth-promoting activity of *Azospirillum brasilense* in *Zea mays* L. ssp. mexicana. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 50, 727-743.
- Luambano, N. D., Narla, R. D., Wanjohi, W. J., Kimenju, J. W., & Kerry, B. R. (2015). Integrated management of root-knot nematodes in a tomato-maize crop system using the biocontrol fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Crop Protection*, 71, 45-50.
- Maciá-Vicente, J. G., Rosso, L. C., Ciancio, A., Jansson, H. B., & Lopez-Llorca, L. V. (2009). Colonisation of barley roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia* : Effects on plant growth and disease. *Annals of Applied Biology*, 155(3), 391-401.
- Martins-Corder M. P., & Melo, I. S de. (1998). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* KLEB. *Scientia Agricola* 55, 1-7.
- Monteiro, T. S. A. (2017). Ação combinada de *Pochonia chlamydosporia* e outros microrganismos no controle do nematoide de galhas e no desenvolvimento vegetal. Universidade Federal de Viçosa.
- Moreira, F. M. S., & Siqueira, J. O. (2006). Microbiologia e bioquímica do solo. 2.ed. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 729p.
- Monteiro, T. S. A., Valadares, S. V., De Mello, I. N. K., Moreira, B. C., Kasuya, M. C.

- M., Araújo, J. V., & Freitas, L. G. de. (2018). Nematophagus fungi increasing phosphorus uptake and promoting plant growth. *Biological control*, 123,71-75
- Nunes, H. T., Monteiro, A. C., & Pomela, A. W. V. (2010). Uso de agentes microbianos e químico para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja. *Acta Scientiarum - Agronomy*, 32(3), 403-409.
- Oyekanmi, E. O., Coyne, D. L., Fagade, O. E., & Osonubi, O. (2007). Improving root-knot nematode management on two soybean genotypes through the application of *Bradyrhizobium japonicum*, *Trichoderma pseudokoningii* and *Glomus mosseae* in full factorial combinations. *Crop Protection*, 26(7), 1006-1012.
- Pereira, P. A. A., Baldani, J. I., Blana, R. A. G., & Neyra, C. A. (1981). Associação e tranlocação de nitrogênio em relação a produção de grãos e proteínas em milho (*Zea mays*). *Revista Brasileira de Ciência do solo*, 5, 28-31.
- Puertas, A., de la Noval, M. B., Martínez, B., Miranda, I., Fernández, F., & Hidalgo-Díaz, L., (2006). Interacción de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* con *Rhizobium* sp., *Trichoderma harzianum* y *Glomus clarum* en el control de *Meloidogyne incognita*. *Rev. Protección Veg.* 21, 80-89.
- Sharon, N., & Lis, H. (1990). Legume lectins - A large family of homologous proteins. *FASEB, J.* 14(4), 3198-3208.
- Siddiqui, Z. A., & Mahmood, I. (2001). Effects of rhizobacteria and root symbionts on the reproduction of *Meloidogyne javanica* and growth of chickpea. *Bioresource Technology*, 79(1), 41-45.
- Tabatabaei, F. S., & Saeezadeh, A. (2017). Rhizobacteria cooperative effect against *Meloidogyne javanica* in rhizosphere of legume seedlings. *Hellenic Plant Protection Journal*, 10(1), 25-34.
- Tortora, M. L., Díaz-Ricci, J. C., & Pedraza, R. O. (2011). *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives of Microbiology*, 193(4), 275-286.
- Wang, K., Riggs, R. D., & Crippen, D. (2005). Isolation, Selection, and Efficacy of *Pochonia chlamydosporia* for Control of *Rotylenchulus reniformis* on Cotton. *Phytopathology*, 95(8), 890-893.

- Yasuda, M., Isawa, T., Shinozaki, S., Minamisawa, K., & Nakashita, H. (2009). Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on disease resistance in rice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(12), 1657-1662.
- Zuffo, A. M. (2016). Aplicações de *Azospirillum brasilense* na cultura da soja. Universidade Federal de Lavras.

CAPÍTULO 2

EFEITO DO pH DO SOLO NA ATIVIDADE DE BIOCONTROL *Pochonia chlamydosporia* E SOBRE SEUS EFEITOS COMO PROMOTOR DE CRESCIMENTO DA SOJA

RESUMO

Setenta por cento da produção de soja no Brasil ocorrem no bioma Cerrado, que é caracterizado por ter solos arenosos e ácidos. Os nematoides tornaram-se uma enorme desvantagem nos campos de soja, especialmente neste tipo de condições de solo. *Pochonia chlamydosporia* (Pc) é um agente de controle biológico e promotor de crescimento vegetal bastante diferenciado, no entanto, ainda é desconhecida a influência do pH do solo sobre sua capacidade de controlar nematoides. Considerando isso, é importante conhecer a interação entre Pc, soja e nematoides em tais condições de solo. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vivo* a influência do pH do solo sobre a ação de Pc contra *Meloidogyne javanica* (Mj) e sua capacidade de promover o crescimento da soja. O experimento foi instalado em solo natural do Cerrado (pH 4,36) e metade do volume total do solo foi corrigido para pH 7,0 usando calcário dolomítico. Cinco tratamentos foram testados em ambos os níveis de pH do solo: i) Soja; ii) Soja + Pc-10; iii) Soja + Pc-10 + Mj; iv) Soja + Mj. O ensaio foi realizado duas vezes em diferentes épocas do ano. O número de galhas e ovos por grama de raiz, massa da parte aérea seca e massa da raiz seca foram avaliados 60 dias depois. O fungo reduziu significativamente o número de galhas em 75% e 76%, no primeiro e segundo ensaios, respectivamente. *P. chlamydosporia* reduziu a reprodução do nematoide para ambas as condições de pH do solo (pH 4,36, ensaio 1: 58% e ensaio 2: 63%; pH 7,0, ensaio 1: 31% e ensaio 2: 37%). No primeiro ensaio, independente da presença de organismos, maiores volumes de massa da parte aérea seca foram observados em solo ácido. Entretanto, o tratamento com Pc e sem Mj promoveu acúmulo de massa da parte aérea seca no primeiro ensaio. Na presença de Mj, Pc não recuperou os danos causados pelo nematoide nas duas condições de pH. Em relação à massa da raiz seca, nos dois ensaios, não houve diferença em termos de desenvolvimento radicular. Além disso, Pc não promoveu crescimento radicular quando o nematoide não estava presente. Portanto, concluiu-se que o pH do solo não afetou a capacidade de Pc em reduzir a reprodução de Mj e que no solo o ácido, Pc, pode reduzir a infecção das plantas pelos nematoides. *P. chlamydosporia* também promoveu o desenvolvimento de plantas.

Palavras-chave: controle biológico, *Meloidogyne javanica*, promoção de crescimento

CHAPTER 2

EFFECT OF SOIL pH IN THE BIOCONTROL ACTIVITY BY *Pochonia chlamydosporia* AND ON ITS EFFECTS AS A PROMOTER OF SOYBEAN GROWTH

ABSTRACT

Seventy percent of the soybean production in Brazil occur in the Cerrado bioma, which is characterized for having sandy and acid soils. Nematodes have become an enormous drawback in soybean fields, specially in this kind of soil conditions. *Pochonia chlamydosporia* (Pc) is a very distinguished biological control agent and plant growth promoter, however, it is still unknown the influence of soil pH over its capacity to control nematodes. Considering that, it is important to know the interaction between Pc, soybean and nematodes in such soil conditions. Thus, the objective of this paper was to evaluate *in vivo* the influence of soil pH over Pc action against *Meloidogyne javanica* (Mj) and its ability to promote soybean growth. The experiment was set using natural soil from Cerrado (pH 4.36) and half part of the soil total volume were corrected to pH 7.0 by using dolomitic limestone. Five treatments were tested in both soil pH levels: i) Soybean; ii) Soybean + Pc-10; iii) Soybean + Pc-10 + Mj; iv) Soybean + Mj. The assay was conducted twice at different times of the year. The number of galls and eggs per root grass, dry shoot mass and dry root mass were evaluated 60 days later. The fungus significantly reduced number of galls in 75% and 76%, in the first and second trials, respectively. *P. chlamydosporia* reduced nematode reproduction in both soil pH (pH 4.36, Trial 1: 58% Trial 2: 63%, and pH 7.0, Trial 1: 31% Trial 2: 37%). In the first experiment, regardless the presence of organisms, bigger volumes of shoot dry mass were noticed in acid soil. However, treatment with Pc and without Mj promoted increase of shoot dry mass in the first trial. In the presence of Mj, Pc did not recover the damage caused by the nematode in both pH conditions. In relation to root dry mass, for both experiments, no difference was noticed in terms of root development. In addition to that, Pc did not promote any root growth when the nematode was not present. Therefore, it was concluded that the pH of the soil did not affect the capacity of Pc to reduce the reproduction of Mj and that in the soil the acid, Pc can reduce the infection of the plants by the nematodes. *P. chlamydosporia* also promoted shoot plant development.

Key-words: biological control, *Meloidogyne javanica*, growth promotion

1. Introdução

A soja (*Glycine max*) é uma das principais culturas agrícolas no mundo, abrangendo uma área de produção em torno de 121 milhões de hectares (CONAB, 2018). Somente no Brasil nos últimos dez anos a área plantada cresceu aproximadamente 62% e no ano de 2018 atingiu mais de 36 milhões de hectares plantados. No bioma Cerrado concentra-se mais de 70% de toda área nacional cultivada (CONAB, 2018).

O Cerrado, em sua maior extensão, possui um solo com uma elevada acidez, deficiência nutricional e baixa atividade microbiana. A necessidade de realizar calagem antes do início do plantio da soja para obtenção de uma boa produtividade é um requerente generalizado nas áreas do Cerrado (Fageria, 2001; Caires et al., 2003). No entanto, o tempo elevado para que o calcário tenha capacidade de reagir e proporcionar a correção esperada pode ser um entrave, pois se o pH do solo ainda não tiver atingido a correção esperada, isso pode influenciar na produção final (Alleoni et al., 2005). Além disso, o pH do solo é um fator importante no desenvolvimento e ação de organismos antagonistas e simbiotes, que cuja a presença no campo é importante para o desenvolvimento da soja (Benítez et al., 2004; Rodrigues et al., 2006)

Além da correção de acidez do solo, para uma boa condução da soja no campo, é necessário manejo de pragas e doenças. Dentre as mais agressivas à cultura, estão as doenças causadas por nematoides. As espécies que causam prejuízos mais significantes para esta cultura são *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Heterodera glycines*, *Rotylenchulus reniformes* e *Pratylenchus brachyurus* (Dias et al., 2010). A principal forma de controle desses organismos é a exclusão, pois desde que eles tenham se estabelecido no local de plantio é praticamente impossível erradicá-los. Sendo assim, é imprescindível o uso de material propagativo sadio, bem como quando possível, o controle de qualidade da água de irrigação (Monteiro, 2017). Uma vez que populações de nematoides fitoparasitas se estabelecem na área, o produtor tem que conviver com estas,

adotando medidas de controle para evitar que os mesmos causem danos econômicos à cultura. Dentre as formas de manejo, o controle biológico tem ganhado espaço nas pesquisas, sendo os fungos e as bactérias os mais estudados (Stirling, 1991). São exemplos: *Trichoderma* spp. (Kath et al., 2017), *Bacillus* spp. (Xiang et al., 2017) e *Pseudomonas* spp. (Nam et al., 2018).

Dentre os fungos empregados no biocontrole de nematoides, *Pochonia chlamydosporia* (Pc) tem sido amplamente estudado e utilizado e tem-se mostrado altamente eficiente no controle de nematoides em várias culturas como berinjela (Abhishek & Mahalik, 2018), cenoura (Bontempon et al., 2014), tomate (Podestá et al., 2013), banana (Silva et al., 2017) e pepino (Viggiano et al., 2014). Além de controlar diversas espécies de nematoides, esse fungo possui habilidade de colonizar as raízes e promover crescimento de plantas por aumentar sua capacidade de aquisição de nutrientes (Monteiro et al., 2018).

Após ser aplicado no solo, Pc sofre a influência de fatores bióticos e abióticos que podem favorecer ou comprometer sua eficiência no controle de nematoides, tais como, temperatura, tipo de solo, metabólitos tóxicos produzidos por outros organismos e o pH do solo (Monteiro et al., 2017). A atividade nematicida de Pc já foi avaliada em ambientes com diferentes faixas de pH, alcançando do ácido ao alcalino, no entanto, os trabalhos realizados até o momento, foram conduzidos apenas *in vitro* (Olivares & Lopez-Llorca, 2002; Karakas et al., 2012; Ward et al., 2012; Luambano et al., 2015).

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito pH do solo na capacidade do fungo *P. chlamydosporia* em controlar *M. javanica* (Mj) *in vivo* em plantas de soja, bem como sobre sua capacidade de promover o crescimento das plantas.

2. Material e Métodos

2.1 Preparação do inóculo de *Meloidogyne javanica*

O inóculo de *M. javanica* (Mj) foi obtido a partir de raízes de soja mantidas em casa de vegetação e os ovos foram extraídos seguindo a técnica de extração de Hussey & Barker (1973) modificado por Boneti & Ferraz (1981).

2.2 Preparo do inóculo de *Pochonia chlamydosporia*

O inóculo de *P. chlamydosporia* (Pc) consistiu do produto comercial Rizotec[®], à base de clamidósporos do isolado Pc-10 do fungo.

2.3 Atividade de biocontrole de *Meloidogyne javanica* e promoção de crescimento de plantas de soja em solos ácido e neutro por *Pochonia chlamydosporia*

Para elaboração do experimento *in vivo*, foi utilizado um solo obtido da área de Cerrado (município Três Marias-MG), de pH 4,36 e textura classificada como franco-arenosa (Tabela 1). Parte do solo dos experimentos teve seu pH corrigido para 7,00 com calcário de PRNT de 97% e esperado um período de 2 meses para reação do calcário. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com um arranjo fatorial de 4x2, cujo os tratamentos foram: i) soja; ii) soja + Pc; iii) soja + Mj; iv) soja + Pc + Mj tanto em solo ácido como em solo corrigido com sete repetições por tratamento.

Tabela 1. Análise química e granulométrica do solo utilizado nos experimentos.

P	K	S	B	Cu	Mn	Fe	Zn	V
-----mg/dm ³ -----								%
1,0	15	12,7	0,10	0,52	3,7	121,2	0,84	12,3
Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	t	T	MO	m
-----cmol/dm ³ -----							dag/kg	%
0,42	0,03	0,50	3,5	0,49	0,99	3,99	1,01	50,5
pH	P-rem	Areia Grossa	Areia Fina	Silte	Argila	Classe Textural		
H ₂ O	mg/L	-----dag/kg-----				Franco-Arenosa		
4.36	32,4	22	57	2	19			

*Análise feita pelo laboratório de análise química do solo, tecido vegetal e Fertilizante da Universidade Federal de Viçosa.

**Solo procedente do município de Três Marias – MG.

Vasos de 2 litros de capacidade foram preenchidos com o solo (pH corrigido ou não) e cada vaso recebeu uma semente de soja cultivar M9350 e os tratamentos compostos pelo nematoide e/ou pelo fungo. O inóculo do nematoide constituiu de uma suspensão de 3000 ovos de Mj previamente calibrada com auxílio de uma câmara de *Peters*, enquanto que o inóculo fúngico foi composto por uma suspensão de Pc calibrada com auxílio de uma câmara de Neubauer para conter 5000 clamidósporos do fungo por grama de solo. Ambos os organismos foram aplicados em cavidades feitas próximas à semente.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação. Após 60 dias foram avaliadas as variáveis nematológicas, número de galhas e ovos por grama de raiz e as variáveis vegetativas da cultura, como massa da parte aérea seca e massa da raiz seca, as quais foram obtidas após secagem do material em estufa a 60 °C por 15 dias. Para a quantificação dos ovos, os mesmos foram extraídos seguindo a metodologia descrita por Hussey & Barker (1973) e posteriormente quantificados com auxílio de uma câmara de *Peters* em microscópio de luz.

Ao final de cada ensaio, o solo contido no vaso foi despejado em uma bandeja plástica e em seguida misturado, promovendo sua homogeneização. Do preparo homogeneizado foi coletado uma amostra de solo e dessa, 1 grama foi utilizado para

avaliar a população do fungo no solo pela contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC). Para tanto, foi feito diluições até 10^{-2} . Desta suspensão, foi retirada uma alíquota de 200 μ l e em seguida espalhada em meio semi-seletivo (Gaspard, 1999) com auxílio de uma alça de Drigalsk.

2.4 Análise Estatística

O ensaio foi repetido e os resultados são apresentados separadamente abaixo. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste F e pelo teste Duncan a 5% de probabilidade. Para avaliação das premissas da análise de variância foram aplicados os testes de Shapiro-Wilks e Bartlett.

3. Resultados

Em ambos os ensaios, houve interação estatística entre os tipos de solos usados e os tratamentos com relação ao número de galhas por grama de raiz (Tabela 3). Assim, Mj induziu a formação de maior número de galhas por grama de raiz quando as plantas se encontravam em solo ácido e na ausência do fungo. Para tratamentos com a presença do fungo, não houve diferença estatística no número de galhas por grama de raiz para solo com pH ácido ou neutro. *Pochonia chlamydosporia* foi eficiente em reduzir o número de galhas por grama de raiz apenas em solo ácido, com reduções de 75% e 76% no primeiro e no segundo ensaio, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Número de Galhas de *Meloidogyne javanica* por grama de raiz de soja submetida ao cultivo em solo ácido e solo corrigido.

Nº Galhas.g ⁻¹ raiz				
Tratamentos	Ensaio I		Ensaio II	
	Solo ácido	Solo corrigido	Solo ácido	Solo corrigido
Soja + Mj	1457,2 Aa	889,1 Ab	1485,3 Aa	921,9 Ab
Soja + Mj + Pc-10	358,2 Ba	530,7 Aa	351,9 Ba	611,9 Aa
Média	907,7	709,9	918,7	766,9
CV (%)	49,68		42,70	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade. Pc-10 = Isolado de *Pochonia chlamydosporia*; Mj = *Meloidogyne javanica*

Não houve interação estatística entre os tipos de solo e os tratamentos em ambos os ensaios quando se avaliou o número de ovos por grama de raiz (Tabela 3), mostrando assim que Pc é capaz de reduzir a reprodução do nematoides independente das condições de pH do solo testadas (Figura 1A e 2A). Em solo sem correção, as reduções foram de 58% no primeiro ensaio (Figura 1B) e 63% no segundo ensaio (Figura 2B). Já em solo corrigido as reduções foram de 31% no primeiro ensaio (Figura 1C) e 37% no segundo ensaio (Figura 2C).

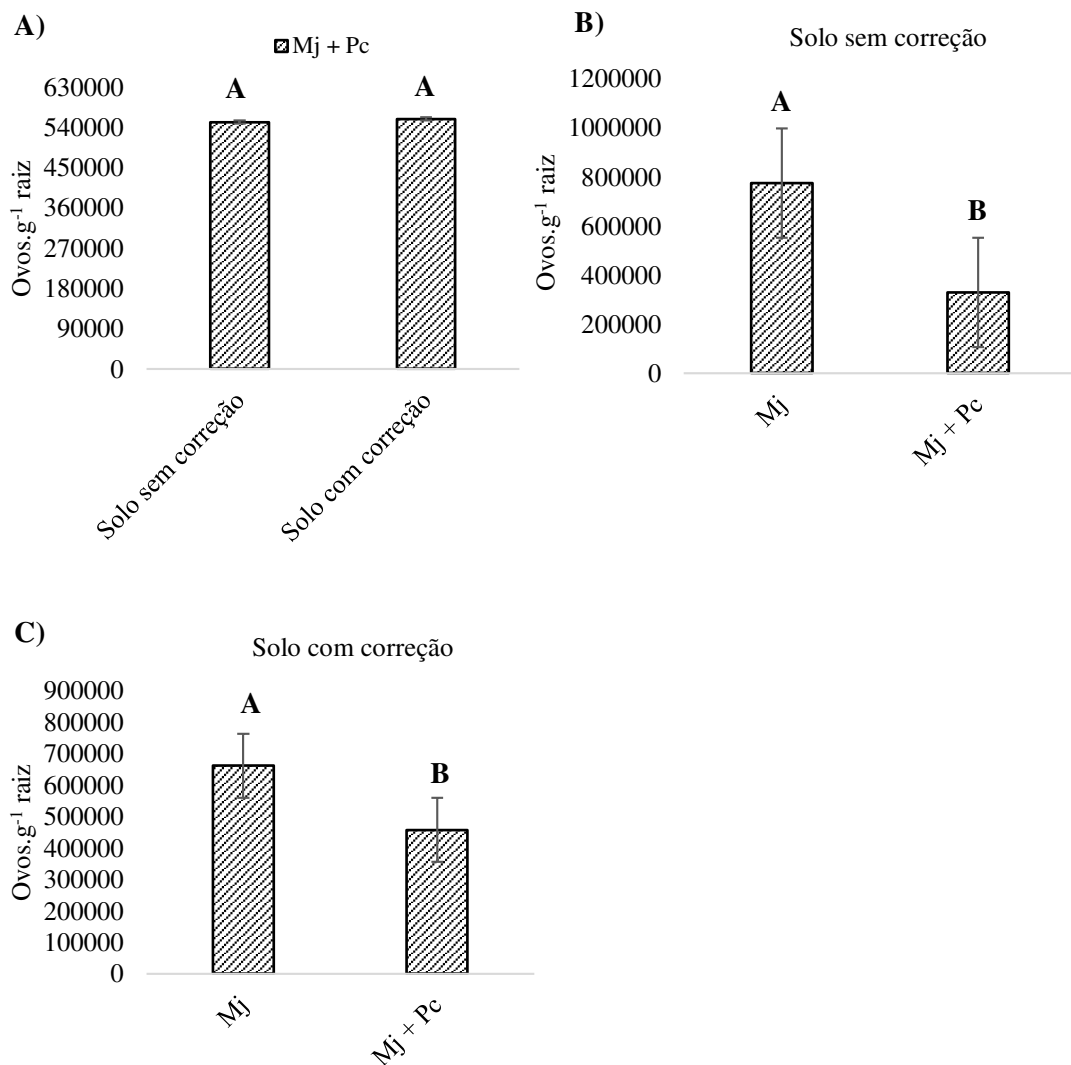


Figura 1. Número de ovos de *Meloidogyne javanica* por grama de raiz de soja submetida ao cultivo em solo ácido e solo corrigido. Médias seguidas pela mesma letra entre barras não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade. Resultados referentes ao ensaio I. Barras com erro padrão.

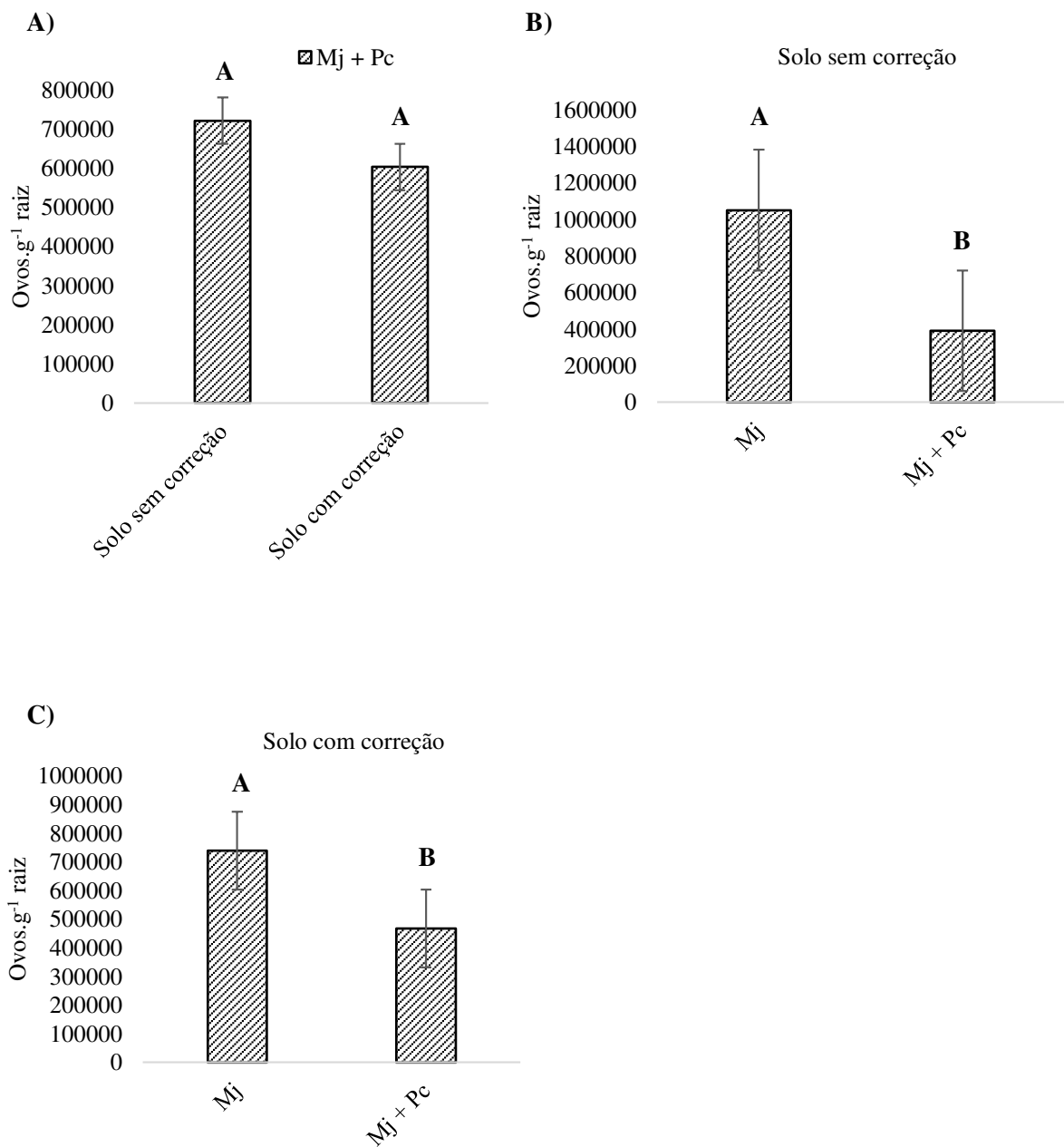


Figura 2. Número de ovos de *Meloidogyne javanica* por grama de raiz de soja submetida ao cultivo em solo ácido e solo corrigido. Médias seguidas pela mesma letra entre barras não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade. Resultados referentes ao ensaio II. Barras com erro padrão.

Com relação à promoção de crescimento, não houve interação estatística entre os tipos de solo e os tratamentos em ambos os ensaios (Tabela 3). No primeiro ensaio, independentemente da presença de Pc ou Mj, a planta produziu mais massa da parte aérea seca em solo ácido (Figura 3A). A presença de Pc estimulou a produção de massa da parte aérea seca sem a presença do nematoide e quando o patógeno se encontrava no solo, o fungo não conseguiu recuperar os danos que ele causou nas plantas, isso indiferentemente do pH do solo em que as plantas se encontravam (Figura 3B). No segundo ensaio a planta produziu a mesma quantidade de massa da parte aérea seca, tanto em solo ácido como em solo corrigido (Figura 4A) e o fungo não estimulou o desenvolvimento da parte aérea das plantas e nem reduziu os danos causados pelos nematoides (Figura 4B).

Com relação à massa da raiz seca, no primeiro ensaio, a planta produziu a mesma quantidade de massa da raiz seca em ambos valores de pH do solo (Figura 3C) e Pc não estimulou o desenvolvimento da raiz sem a presença do nematoide e nem mesmo reduziu os danos causados por ele, também indiferentemente do pH do solo (Figura 3D). Resultados equivalentes foram obtidos no segundo ensaio (Figura 4C e 4D).

Tabela 3. Análise de variância do número de ovos de *Meloidogyne javanica* por grama de raiz de soja, massa da parte aérea seca e massa da raiz seca de soja em função do pH do solo e da presença de *Pochonia chlamydosporia*.

Ensaio I									
		Ovos.g ⁻¹		Galhas.g ⁻¹		MPAS		MRS	
pH*Trat	QM	P	QM	P*	QM	P	QM	P	
		3,5x10 ⁸	0,29957	959802	0,022536	0,1499	0,42999	0,06402	0,08152
Ensaio II									
		Ovos.g ⁻¹		Galhas.g ⁻¹		MPAS		MRS	
pH*Trat	QM	P	QM	P*	QM	P	QM	P	
		2,6x10 ¹¹	0,09806	1186243	0,005824	0,1170	0,2810	0,04234	0,23821

pH*Trat = Interação entre os níveis de pH e os tratamentos; *Interação significativa.

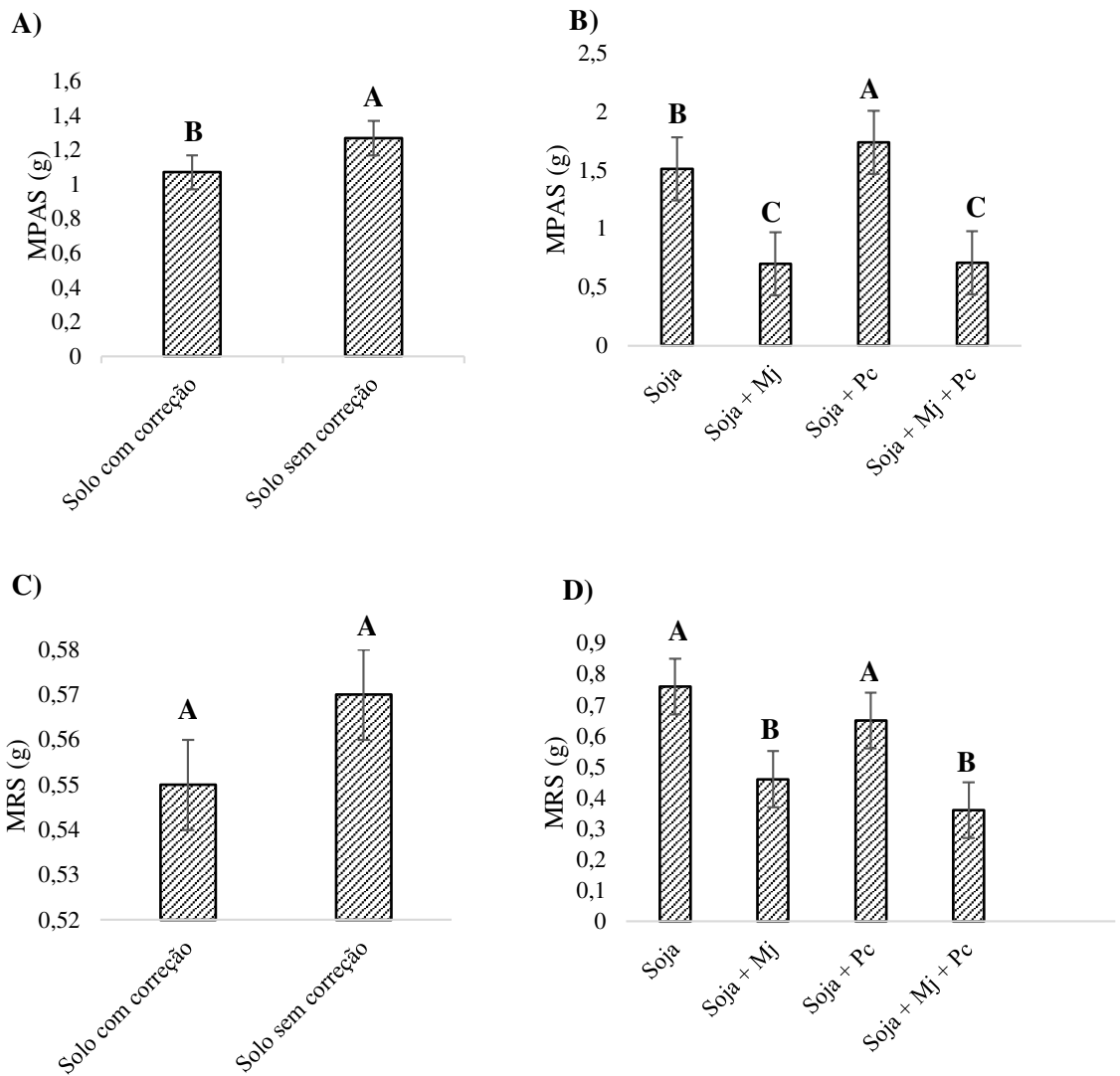


Figura 3. Promoção de crescimento de plantas de soja por *Pochonia chlamydosporia*. Médias seguidas pela mesma letra em A e C não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra em B e D não diferem pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. MPAS = Massa da parte aérea seca; MRS = Massa da raiz seca; Mj = *Meloidogyne javanica*; Pc = *Pochonia chlamydosporia*. Resultados referentes ao ensaio I. Barras com erro padrão.

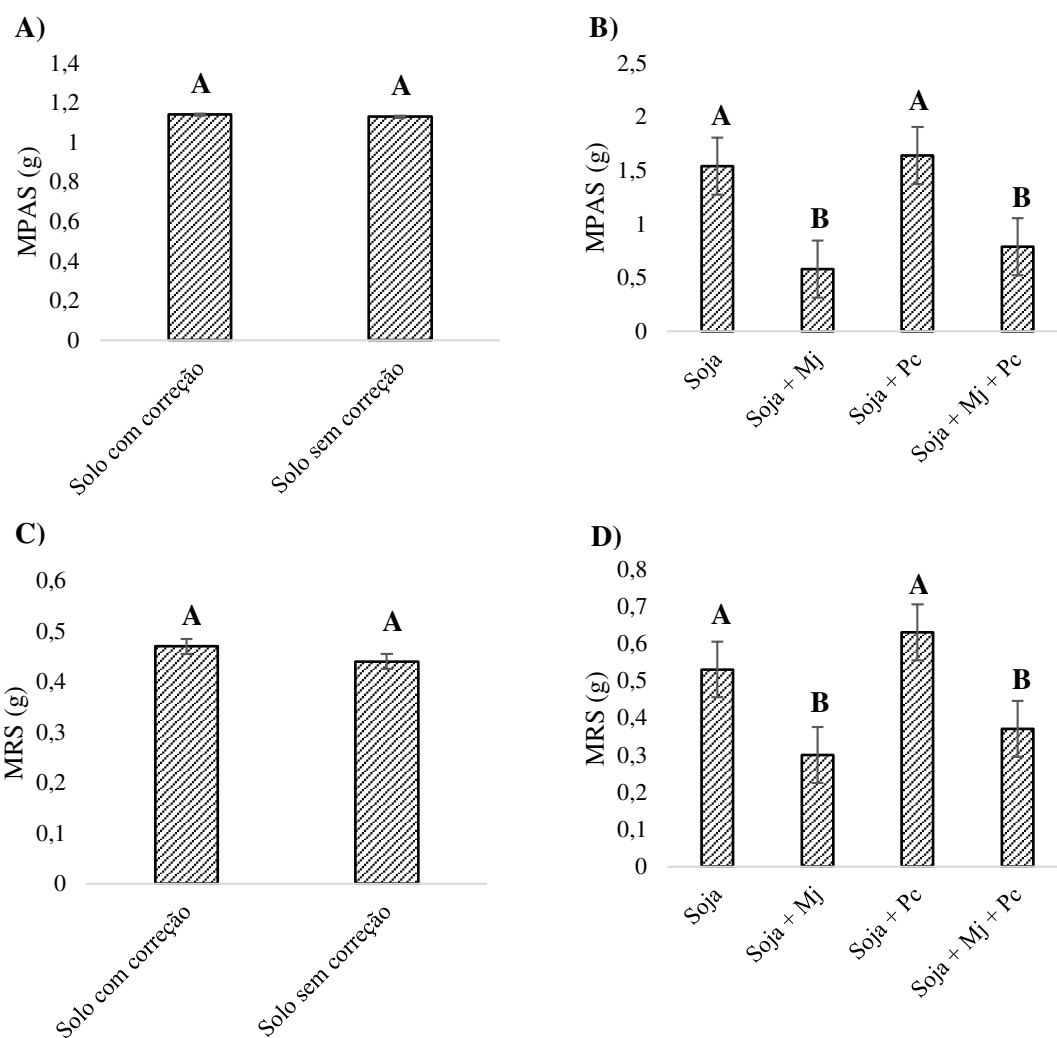


Figura 4. Promoção de crescimento de plantas de soja por *Pochonia chlamydosporia*. Médias seguidas pela mesma letra em A e C não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra em B e D não diferem pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. MPAS = Massa da parte aérea seca; MRS = Massa da raiz seca. Mj = *Meloidogyne javanica*; Pc = *Pochonia chlamydosporia*. Resultados referentes ao ensaio II. Barras com erro padrão.

A população do fungo no solo não diferiu dos tratamentos submetidos à diferentes pHs do solo e nem entre os tratamentos no mesmo valor de pH. Os resultados se repetiram nos dois ensaios (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Pochonia chlamydosporia* em solo com pH ácido e pH corrigido. Resultados de dois experimentos.

UFC.g ⁻¹ SOLO				
Tratamentos	Ensaio I		Ensaio II	
	Solo ácido	Solo corrigido	Solo ácido	Solo corrigido
Soja + Pc-10	1770,50 ^{ns}	1599,90 ^{ns}	500,00 ^{ns}	466,60 ^{ns}
Soja+Pc-10+Mj	833,20 ^{ns}	1099,80 ^{ns}	550,0 ^{ns}	866,60 ^{ns}

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

Pc-10 = Isolado do fungo *Pochonia chlamydosporia*

Mj = *Meloidogyne javanica*

4. Discussão

Sabe-se que em solos mais ácidos favorece a infecção de plantas por Mj (Wang et al., 2009). O maior número de galhas por grama de raiz observado nos tratamentos controle em solo ácido, pode ser explicado por isso. Conseqüentemente, quando Pc estava presente, foi mais eficiente em reduzir o número de galhas por grama de raiz quando a planta se encontrava em solo ácido. Além disso, o microambiente ao redor dos ovos é um dos principais fatores que estimulam a produção da enzima responsável pelo parasitismo do fungo, portanto, quanto maior for a quantidade de ovos produzidos, maior será a concentração da enzima e conseqüentemente maior o controle (Ward et al., 2012).

Ao avaliar a reprodução (n° de ovos por grama de raiz), percebemos que Pc é igualmente capaz de reduzir a reprodução do nematoide, tanto em solo ácido como em solo corrigido, em condições de experimentação *in vivo*. Estes resultados corroboram os resultados encontrados por Luambano et al., (2015) que, observaram *in vitro*, que Pc é

capaz de parasitar ovos de *M. incognita* em condições de pH variando do 3 ao 8,8, sendo maior o parasitismo em meio ácido.

A equivalente eficiência do fungo em reduzir a reprodução do nematoide em solos com valores de pHs distintos, deve-se também ao fato de Pc ter se estabelecido bem, tanto em solo ácido como em solo corrigido, o que concorda com o UFC do fungo no solo. Karakas et al., (2012) já haviam relatado em estudos desenvolvidos em condições controladas, que *P. chlamydosporia* cresce ambientes de pH variando do 4 ao 7. No entanto, deve-se ater que a atuação nematicida de um fungo usado no biocontrole, pode variar entre isolados do mesmo fungo (Kerry, 1986; Ward et al., 2012). Assim antes de recomendar algum produto biológico é importante saber as características biológicas do organismo e o ambiente ao qual ele será aplicado. No caso do fungo estudado neste trabalho, o mesmo tem potencial de controlar populações de Mj em solo ácido e alcalino.

O aumento da massa da parte aérea seca no primeiro ensaio promovido por Pc na ausência do nematoide, sugere que a interação fungo-planta é benéfica e caracteriza o fungo como um potencial agente promotor de crescimento vegetal. Os mesmos resultados foram encontrados por Monteiro (2017) que, confirmou que Pc é capaz de promover o desenvolvimento vegetativo da soja mesmo na ausência de nematoides fitoparasitas.

Alguns fatores podem ter influenciado na ação de Pc em promover o crescimento apenas de uma variável e não das demais, tais como, o baixo teor de matéria orgânica do solo utilizado nos ensaios que pode não ter favorecido a multiplicação do fungo, uma vez que ao final dos ensaios sua população se encontrava baixa. Além disso, o ambiente restrito (vasos de 2 L) pode ter limitado o crescimento das plantas e conseqüentemente reduzido a área de contato das plantas com o fungo. Em experimentos feitos por outros autores mostra que Pc é altamente eficiente em promover o crescimento de várias espécies de plantas como alface (Viggiano et al., (2012), cevada (Larriba et al., 2015), soja (Monteiro, 2017) e tomate (Monteiro et al., 2018).

5. Conclusões

Pochonia chlamydosporia é capaz de reduzir o número de ovos de Mj em plantas de soja, tanto em condições de solo ácido como em solo corrigido e adicionalmente, em solo ácido também reduz a infectividade das plantas pelo nematoide (nº de galhas por grama de raiz). O fungo ainda foi capaz de promover o desenvolvimento vegetativo da soja.

6. Referências

- Abhishek, P., & Mahalik, J. K. (2018). Efficacy of liquid formulation of biocontrol agents for management of root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in Brinjal. *Annals of Plant Protection Sciences*, 26, 202-206.
- Alleoni, L. R. F., Cambri, M. A., & Caires, E. F. (2005). Atributos químicos de um latossolo de Cerrado sob plantio direto, de acordo com doses e formas de aplicação de calcário. *Revista Brasileira de Ciência Do Solo*, 29(6), 923-934.
- Benitez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Códon, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7, 249-260.
- Boneti, J. I. S., & Ferraz, S. (1981). Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6(3), 533.
- Bontempo, A. F., Fernandes, R. H., Lopes, J., Freitas, L. G., & Lopes, E. A. (2014). *Pochonia chlamydosporia* controls *Meloidogyne incognita* on carrot. *Australasian Plant Pathology*, 43(4), 421-424.
- Caires, E., Blum, J., & Barth, G. (2003). Alterações químicas do solo e resposta da soja ao calcário e gesso aplicados na implantação do sistema plantio direto. *Revista Brasileira de Ciência do solo*, 275-286.
- CONAB. (2018). A produtividade da soja: análise e perspectivas, 1–35. Retrieved from https://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_08_02_14_27_28_10_c_ompendio_de_estudos_conab__a_produtividade_da_soja_-_analise_e_perspectivas_-_volume_10_2018.pdf
- Dias, W. P., Garcia, A., Silva, J. F. V., & Cameiro, G. E. D. S. (2010). Nematóides em soja: identificação e controle. *Embrapa Soja. Circular 76*, 1-8.
- Fageria, N. K. (2001). Efeito da calagem na produção de arroz, feijão, milho e soja em solo de cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36(11), 1419-1424.
- Gaspard, T., Jaffee, B. a, & Ferris, H. (1990). Association of *Verticillium chlamydosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with Root-knot Nematode Infested Soil. *Journal of Nematology*, 22(2), 207-213.

- Hussey, R. S., & Barker, K. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57,1025-1028.
- Karakas, M., Benli, M., & Cebesoy, S. (2012). Effects of Some Cultural Conditions on the Growth of Nematophagous Fungus *Pochonia chlamydosporia* (Fungi: Clavicipitaceae) Isolated from *Meloidogyne incognita* Eggs. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(24), 4644-4647.
- Kath, J., Dias-Arieira, C. R., Ferreira, J. C. A., Homiak, J. A., Silva, C. R. Da., & Cardoso, C. R. (2017). Control of *Pratylenchus brachyurus* in soybean with *Trichoderma* spp. and resistance inducers. *Journal of Phytopathology*, 165(11-12), 791-799.
- Kerry, B. R., Irving, F., & Hornsey, J. C. (1986) Variation between strains of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. Factors affecting growth *in vitro*. *Nematologica* 32, 461-473.
- Larriba, E., Jaime, M. D. L. A., NiSPow, C., Martín-Nieto, J., & Lopez-Llorca, L.V. (2015). Endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* reveals plant growth promotion and a general defense and stress transcriptomic response. *Journal Plant Res*, 1-14.
- Luambano, N. D., Manzanilla-López, R. H., Kimenju, J. W., Powers, S. J., Narla, R. D., Wanjohi, W. J., & Kerry, B. R. (2015). Effect of temperature, pH, carbon and nitrogen ratios on the parasitic activity of *Pochonia chlamydosporia* on *Meloidogyne incognita*. *Biological Control*, 80, 23-29.
- Monteiro, T. S. A. (2017). Ação combinada de *Pochonia chlamydosporia* e outros microrganismos no controle do nematoide de galhas e no desenvolvimento vegetal. Universidade Federal de Viçosa.
- Monteiro, T. S. A., Valadares, S. V., Ney, I., Mello, K. De, Moreira, B. C., Freitas, L. G. de. (2018). Nematophagus fungi increasing phosphorus uptake and promoting plant growth. *Biological Control*, 71-75.
- Nam, H. S., Anderson, A. J., & Kim, Y. C. (2018). Biocontrol Efficacy of Formulated *Pseudomonas chlororaphis* O6 against Plant Diseases and Root-Knot Nematodes. *Plant Pathology*, 34(3), 241-249.

- Nico, A. I., Jiménez-Díaz, R. M., & Castillo, P. (2004). Control of root-knot nematodes by composted agro-industrial wastes in potting mixtures. *Crop Protection*, 23(7), 581-587.
- Olivares, C. M., & Lopez-Llorca, L. V. (2002). Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. *Revista Iberoamericana de Micología : Organo de La Asociacion Espanola de Especialistas En Micologia*, 19, 104-110.
- Podestá, G. S. de, Freitas, L. G. de, Dallemole-Giaretta, R., Zooca, R. J. F., Caixeta, L. de B., & Ferraz, S. (2013). *Meloidogyne javanica* control by *Pochonia chlamydosporia*, *Gracilibacillus dipsosauri* and soil conditioner in tomato. *Summa Phytopathologica*, 39(2), 122-125.
- Rodrigues, C. S., Laranjo, M., & Oliveira, S. (2006). Effect of heat and pH stress in the growth of chickpea mesorhizobia. *Current Microbiology*, 53(1), 1-7.
- Segers, R., Butt, T. M., Kerry, B. R., Beckett, A., & Peberdy, J. F. (1996). The role of the proteinase VCP1 produced by the nematophagous *Verticillium chlamydosporium* in the infection process of nematode eggs. *Mycological Research*, 100(4), 421-428.
- Silva, S. D., Carneiro, R. M. D. G., Faria, M., Souza, D. A., Monnerat, R. G., & Lopes, R. B. (2017). Evaluation of *Pochonia chlamydosporia* and *Purpureocillium lilacinum* for Suppression of *Meloidogyne enterolobii* on Tomato and Banana. *Nematology*, 49(1), 77-85.
- Stirling, G. R. (1991). Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects. Wallingford: CAB *International*, 282p.
- Viggiano, J. R., de Freitas, L. G., & Ferreira, P. A. (2012). Resíduo da produção de *Pochonia chlamydosporia* no desenvolvimento de mudas e plantas de alface. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 47(7), 983-990.
- Viggiano, J. R., de Freitas, L. G., & Lopes, E. A. (2014). Use of *Pochonia chlamydosporia* to control *Meloidogyne javanica* in cucumber. *Biological Control*, 69, 72-77.
- Wang, C., Bruening, G., & Williamson, V. M. (2009). Determination of preferred pH for root-knot nematode aggregation using pluronic F-127 Gel. *Journal of Chemical Ecology*, 35(10), 1242-1251.

Ward, E., Kerry, B. R., Manzanilla-López, R. H., Mutua, G., Devonshire, J., Kimenju, J., & Hirsch, P. R. (2012). The *Pochonia chlamydosporia* serine protease gene VCP1 is subject to regulation by carbon, nitrogen and pH: Implications for nematode biocontrol. *Plos One*, 7(4), 7-12.

Xiang, N., Lawrence, K. S., Kloepper, J. W., Donald, P. A., & McInroy, J. A. (2017). Biological control of *Heterodera glycines* by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on soybean. *Plos One*, 12(7), 1-19.

CAPÍTULO 3
VEICULAÇÃO DE *Pochonia chlamydosporia* POR SEMENTE OU
INCORPORAÇÃO NO SOLO: O EFEITO DE BIOCONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM SOJA

RESUMO

Diversas variáveis podem afetar a produção de soja, principalmente o parasitismo por nematoides. O controle biológico tem sido uma solução eficiente contra esse patógeno. O fungo *Pochonia chlamydosporia* (Pc) tem se mostrado uma opção importante, não só como agente de controle biológico de nematoides, mas também como promotor de crescimento de plantas. Os cientistas ainda estão procurando soluções para tornar sua aplicação mais barata e ainda mais bem-sucedida. Este trabalho provou que Pc é um fungo eficiente no controle de *Meloidogyne javanica* (Mj) e promove o crescimento da soja de acordo com os seguintes métodos de aplicação de fungos: i) tratamento de sementes (TS); ii) aplicação no sulco de plantio (SP); iii) Ambos os tratamentos anteriores combinados (TS + SP). Para ambos os ensaios, TS e SP foram igualmente eficientes em reduzir o número de galhas e ovos por grama de raiz. No primeiro ensaio, as reduções de número de ovos foram de 77% (TS), 75% (SP) e 71% (TS + SP). Além disso, para o segundo ensaio, 75% (TS), 65% (SP) e 79% (TS + SP) de redução foram observados. Da mesma forma, para o número de galhas por grama de raiz, TS reduziu 51%, SP 44% e TS + SP 41% no primeiro ensaio e 68% (TS), 61% (SP) e 59% (TS + SP) durante o segundo. Apenas os tratamentos na ausência de nematoides tiveram um aumento significativo no crescimento da soja. A massa de raízes seca foi positivamente afetada (44%) durante o primeiro ensaio, quando o fungo foi aplicado em TS e 33% quando o fungo foi aplicado em TS + SP. No entanto, para o segundo ensaio, apenas a combinação dos dois modos de aplicação aumentou esse parâmetro. Ambos os modos de aplicação permitiram ao fungo controlar Mj e também promover crescimento de raízes de soja.

Palavras-chave: biocontrole, *Meloidogyne javanica*, formas de aplicação.

CHAPTER 3

VEHICULATION OF *Pochonia chlamydosporia* BY SEEDS OR INCORPORATION IN SOIL: THE EFFECT OF BIOCONTROLE OF *Meloidogyne javanica* IN SOYBEAN

ABSTRACT

Several variables can affect soybean production, especially nematode parasitism. Biological control has been an efficient solution against this pathogen. The fungus *Pochonia chlamydosporia* (Pc) has shown to be an important option, not only as a biological control agent against nematodes, but also as plant growth promoter. Scientists are still looking for solutions to make its application cheaper and even more successful. This work proved that Pc is an efficient fungus to control *Meloidogyne javanica* (Mj) and to promote soybean growth according to the following methods of fungus applications: i) seed treatment (ST); ii) application in the planting groove (PG); iii) Both previous treatment combined (ST+PG). For both experiments, ST and PG were equally efficient to reduce number of galls and eggs per root gram. In the first assay, eggs number reduction were 77% (ST), 75% (PG) and 71% (ST+PG). In addition, for the second trial 75% (ST), 65% (PG) and 79% (ST+PG) of reduction were observed. Similarly, for number of galls per root gram, SC reduced 51%, PG 44% and ST+PG 41% in the first trial and 68% (ST), 61% (PG) and 59% (ST+PG) during the second. Only treatments in the absence of nematodes had a significant increase in soybean growth. The dry root mass was positively affected (44%) during the first test when the fungus was applied in TS and 33% when the fungus was applied in TS + SP. However, for the second test, only the combination of the two modes of application increased this parameter. Both modes of application allowed the fungus to control Mj and also promote the growth of soybean roots.

Key-works: biological control, *Meloidogyne javanica*, forms of application

1. Introdução

A soja tem sido a cultura que mais cresce anualmente em área e em produção no mundo, repercutindo em uma movimentação de bilhões de dólares no mercado mundial (Godoy & From 2016). O Brasil é um dos principais países responsáveis por essa expansão, sendo o segundo maior produtor e exportador de grãos de soja no mundo (CONAB, 2018). Entre os fatores limitantes para a produção da cultura, estão as perdas causadas por pragas e doenças. Nematoides parasitas de plantas constituem uma das principais limitações para o agronegócio brasileiro, causando prejuízos anuais de cerca de 35 bilhões de reais (Rivas, 2015). Somente para a soja as perdas podem ultrapassar 20% apenas devido a esse patógeno (Talwana et al., 2016).

Dentre os nematoides mais prejudiciais para a cultura da soja estão as espécies *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Heterodera glycines*, *Rotylenchulus reniformes*, *Pratylenchus brachyurus* e *Aphelenchoides besseyi* (Dias et al., 2010; Favoreto, 2015). Os nematoides de galhas *M. incognita* e *M. javanica* são especialmente nocivos e difíceis de manejo, devido principalmente a sua vasta distribuição geográfica e polifagia (Mendes & Rodriguez, 2000). Para controlar os nematoides de galhas, é necessário utilizar de um conjunto de medidas de manejo e assim obter um bom desenvolvimento da cultura em campo.

O uso de organismos antagonistas é uma alternativa viável para o controle de fitonematoides, e capaz de reduzir significativamente a população dos nematoides e conseqüentemente os danos às culturas (Moreira & Ferreira, 2015; Ferreira et al., 2017; Oliveira et al., 2017). Dentre os microrganismos com grande potencial para exercer este controle, destaca-se *Pochonia chlamydosporia* (Pc) (Viggiano et al., 2014; Hahn et al., 2015; Xavier et al., 2017).

Pochonia chlamydosporia é um fungo nematófago já bastante usado como agente de biocontrole devido sua habilidade em parasitar ovos e fêmeas de diversas espécies de

nematoides. Este fungo tem um grande potencial para sobreviver por longos períodos no solo independente da presença de nematoides, pois tem boa capacidade saprofítica e resistência às condições ambientais adversas por produzir estruturas de resistência, os clamidósporos (Stirling, 1991). Isso é um diferencial favorável em relação a outros fungos nematófagos que apresentam fase saprofítica limitada (Siddiqui & Mahmood, 1997).

As demonstrações experimentais da atividade nematicida de *Pc* normalmente envolve a aplicação de suspensões de propágulos do fungo diretamente no solo antes, durante ou após o plantio das culturas (Coutinho et al., 2009; Podestá et al., 2013; Fernandes et al., 2014; Bontempo et al., 2017). Há também onde a forma de aplicação do fungo foi pela sua mistura com as semente (Khan et al., 2005; Nunes et al., 2010; Nasu, 2013). Embora todas as formas de aplicação funcionem, estudos são necessários para se esclarecer qual a forma mais eficiente de aplicação.

Em culturas seminíferas, como é o caso da soja, o tratamento de sementes pode ser a alternativa mais simples de aplicação. Porém, é importante saber se essa alternativa é também a mais indicada para o controle de nematoides. O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência da forma de aplicação de *Pc* em controlar *M. javanica* e promover crescimento de plantas de soja.

2. Material e Métodos

2.1 Preparação do inóculo de *Meloidogyne javanica*

Ovos de *M. javanica* (Mj) foram utilizados como inóculo. Os mesmos foram extraídos de raízes de soja mantidas em casa de vegetação pela técnica descrita por Hussey & Barker (1973) modificado por Boneti & Ferraz (1981).

2.2 Preparação do inóculo de *Pochonia chlamydosporia*

O inóculo de *P. chlamydosporia* (Pc) utilizado foi obtido do produto comercial Rizotec[®] a base do isolado Pc-10 do fungo.

2.3 Comparação de formas de aplicação de *Pochonia chlamydosporia*

Para cada período foi conduzido um ensaio na presença do nematoide e um em sua ausência. Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com sete repetições por tratamento. Os vasos com as plantas permaneceram durante 60 dias em casa de vegetação. Durante o período de condução do primeiro ensaio, as médias máximas e mínimas de temperatura foram de 23°C e 16,4°C, respectivamente. Na condução do segundo ensaio as média máximas e mínimas de temperatura foram de 20,3°C e 14,4 °C, respectivamente.

Foram utilizadas diferentes formas de aplicação de Pc: i) Tratamento de sementes (TS); ii) Aplicação no sulco de plantio (SP); iii) Tratamento de sementes (TS) + aplicação no sulco de plantio (SP).

- Tratamento de sementes

Para a forma de aplicação de Pc pelo tratamento de sementes, cinquenta sementes de soja foram colocadas em tubos esterilizados e em seguida foram adicionados 0,1g de Rizotec[®] juntamente com 1 mL de solução de sacarose 0,5%, que formou uma solução pegajosa com intuito de promover adesão do produto às sementes. Os tubos foram agitados manualmente e após a agitação, as sementes foram colocadas para secar.

- Aplicação no sulco de plantio

Para os tratamentos que receberam a aplicação Pc no sulco de plantio, foi utilizado uma suspensão de Pc em água, calibrada com auxílio de uma câmara de Neubauer para conter 5000 clamidósporos do fungo por cada grama de solo.

- Montagem dos ensaios

Vasos de 2 L de capacidade foram preenchidos com uma mistura de solo de barranco, areia e substrato organo-mineral (marca Topstrato) na proporção de 1:1:2 (v:v:v) previamente desinfestado com BASAMID[®] (Ingrediente ativo: Dazomete, um precursor de isotiocianato). Para os experimentos que continham nematoides, em cada vaso foram adicionados uma suspensão de 3000 ovos de Mj previamente calibrada com o auxílio de uma câmara *de Peters* e os seguintes tratamentos: i) Soja + Mj; ii) Soja + Mj + Pc-10 (TS); iii) Soja + Mj + Pc-10 (SP); iv) Soja + Mj + Pc-10 (TS + SP).

Ao final dos experimentos foram avaliados o número de galhas e o número de ovos por grama de raiz, altura das plantas, massa da parte aérea seca, massa da raiz seca e a população do fungo do solo. Os ovos foram extraídos seguindo a metodologia descrita por Hussey & Barker (1973) e os mesmos foram quantificados com auxílio de uma câmara *de Peters* em microscópio de luz. As massas da parte aérea e da raiz seca foram obtidas após a secagem das plantas em estufa a 60°C por 15 dias.

A população do fungo presente no solo foi estimada. O solo presente em cada vaso foi vertido em bandejas de plástico e posteriormente homogeneizados. Após a homogeneização, foi retirada uma porção de solo da qual 1 g foi diluído até 10^{-2} . Desta suspensão foi retirada uma alíquota de 200 μ l e em seguida espalhada em meio semi-seletivo (Gaspard, 1990) com auxílio de uma alça de Drigalsk. As placas foram mantidas no escuro em câmara de incubação a 28 °C durante 21 dias. Após esse período foi feita a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

2.4 Análise estatística

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

3. Resultados e Discussão

Nos dois ensaios todas as formas de aplicação de Pc produziram significativa redução no número de galhas e ovos por grama de raiz. No primeiro ensaio, as reduções foram de 51% (TS), 44% (SP) e 41% (TS + SP) no número de galhas por grama de raiz (Figura 1). Já para o número de ovos por grama de raiz as reduções foram de 77% (TS), 75% (SP) e 71% (TS+SP) (Figura 2). As reduções no número de galhas e ovos por grama de raiz obtidos para cada forma de aplicação de Pc, não foram estatisticamente diferentes.

Os resultados do segundo ensaio foram semelhantes aos obtidos no primeiro ensaio. Para este, as reduções foram de 68% (TS), 61% (SP) e 59% (TS + SP) para o número de galhas por grama de raiz 75% (TS), 65% (SP) e 79% (TS + SP) no número de ovos por grama de raiz (Figura 1 e 2).

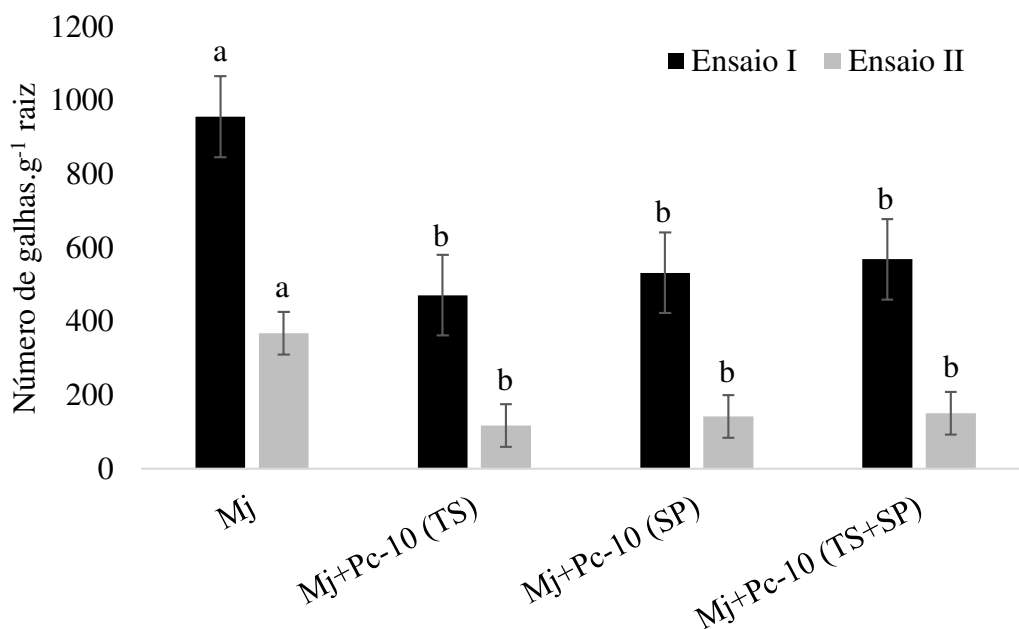


Figura 1. Efeito do modo de aplicação de *Pochonia chlamydosporia* (isolado Pc-10) em soja no número de galhas por grama de raiz provocados por *Meloidogyne javanica* após 60 dias do semeio. Médias seguidas pela mesma letra dentro de um mesmo ensaio, não diferem pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Mj = *Meloidogyne javanica*; TS = Tratamento de Sementes de soja com *Pochonia chlamydosporia*; SP = *Pochonia chlamydosporia* aplicada no sulco de plantio. Barras com erro padrão da média.

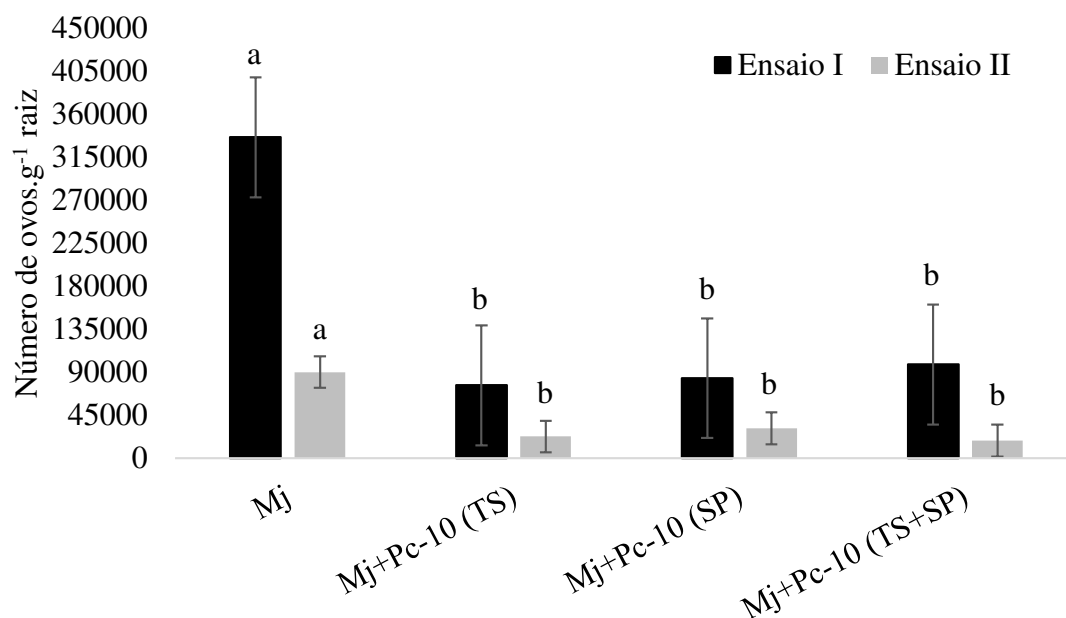


Figura 2. Efeito do modo de aplicação de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) em soja no número de galhas por grama de raiz provocados por *Meloidogyne javanica* após 60 dias do semeio. Médias seguidas pela mesma letra dentro de um mesmo ensaio, não diferem pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Mj = *Meloidogyne javanica*; TS = Tratamento de Sementes de soja com *Pochonia chlamydosporia*; SP = *Pochonia chlamydosporia* aplicada no sulco de plantio. Barras com erro padrão da média.

A efetividade de Pc em controlar Mj quando o fungo é aplicado diretamente no sulco de plantio em diferentes patossistemas é conhecida, tendo sido documentada por exemplo, por Coutinho et al., (2009). Estes autores aplicaram clamidósporos de Pc no solo em combinação com diferentes doses de farinha de sementes de mamão para o controle de Mj em tomateiro e observaram uma expressiva redução no número de ovos do nematoide em todas combinações estudadas. Também, Podestá et al., (2013) demonstraram a ação antagonista de Pc sobre Mj em plantas de tomateiro combinando clamidósporos do fungo associado à rizobactéria *Gracilibacillus dipsosauri* obtendo redução na população do nematoide. Viggiano et al., (2014) observaram redução no número de ovos de Mj em plantas de pepino cultivados em solo tratado com Pc.

Observou-se neste trabalho que a mistura de propágulos de Pc na semente, foi tão eficiente no controle de Mj quanto a aplicação no sulco de plantio ou a combinação de aplicação na semente e no sulco de plantio. Isso sugere que a inoculação do fungo pelo tratamento de sementes seria uma forma mais apropriada e simples de aplicação de Pc. Nasu et al., (2018) observaram que ao tratar sementes de soja com clamidósporos de Pc houve redução na população de *M. incognita* tanto em solo arenoso quanto em solo argiloso. Diferentemente, Nunes et al., (2010) tratando sementes de soja com Pc para fins de controle de *M. incognita*, obtiveram redução da população do nematoide, mas apenas quando adicionalmente reaplicaram o fungo na fase de pós-emergência das plantas. As evidências foram de que o tratamento de sementes teria sido ineficaz por ter envolvido o uso de suspensão de conídios do fungo e não de clamidósporos como feito no presente trabalho e usado em produtos comerciais (Hidalgo-Díaz et al., 2017). O tratamento de sementes com clamidósporos de Pc produz resultados melhores do que conídios e/ou hifas, pois os clamidósporos são estruturas que resistem às condições adversas do ambiente (Hallman et al., 2009).

A combinação dos dois métodos de aplicação teve efeito de controle equivalente dos tratamentos envolvendo apenas uma forma de aplicação, mesmo que na combinação dos métodos a concentração do fungo tenha sido maior. Estes resultados corroboram os encontrados por Dallemole-Giaretta et al., (2008) que aplicando doses crescentes do fungo (5000, 10000, 15000, 20000 e 25000 clamidósporos.g⁻¹ solo) verificaram que não houve diferença no nível de controle obtido da população de Mj em plantas de tomate. Isso indica que o aumento de concentrações do fungo não aumentam a eficiência do controle.

Aplicado no sulco de plantio e/ou no tratamento de sementes, antagonistas tem mostrado efeito significativo em reduzir populações de nematoides. Bortolini et al., (2013) afirmam que o tratamento de sementes de soja com *Purpureocillium lilacinus* co-

inoculado com *Arthrobotrys oligospora* reduz em mais de 30% o nível populacional de *Pratylenchus brachyurus* nas raízes. Nasu (2013) estudando formas de aplicação de Pc para o controle de *M. incognita* raça 3 em algodoeiro, constatou que o fungo é capaz de reduzir o número de ovos por grama de raiz, não havendo diferença se a aplicação foi no sulco de plantio ou via semente. Os presentes resultados encontrados neste trabalho se assemelham aos obtidos para este outro patossistema. No entanto, diferentemente do obtido por Nasu (2013), Pc foi capaz de reduzir o número de galhas por grama no patossistema Mj/soja conforme observado no presente trabalho.

Como foi observado em ambos os ensaios, independente da forma de aplicação do fungo haverá controle do nematoide, assim fica a critério do produtor escolher o tipo de aplicação de acordo com a tecnologia disponível. Ao final dos ensaios as populações de Pc eram equivalentes para os diferentes tratamentos, sendo que o fungo foi capaz de se estabelecer no solo independentemente da forma como foi introduzido, tanto na presença quanto na ausência de Mj (Tabela 1 e 2).

Tabela 1. Densidade populacional de *Pochonia chlamydosporia* após 60 dias de aplicação em três métodos na presença de *Meloidogyne javanica*.

	UFC/g Solo	
	Ensaio I	Ensaio II
Soja+Mj+Pc-10 (TS)	7233,00 ^{ns}	1767,00 ^{ns}
Soja+Mj+Pc-10 (SP)	6333,00 ^{ns}	1667,00 ^{ns}
Soja+Mj+Pc-10 (TS+SP)	7833,00 ^{ns}	2317,00 ^{ns}
MÉDIA	7133,00	1917,00
CV (%)	40,31	31,24

ns = não significativo a 5% pelo teste F.

UFC = Unidades Formadoras de Colônia

TS = Fungo aplicado no Tratamento de Sementes

SP = Fungo aplicado no Sulco de Plantio

Tabela 2. Densidade populacional de *Pochonia chlamydosporia* após 60 dias de aplicação em três métodos na ausência de *Meloidogyne javanica*.

UFC/g Solo		
	Ensaio I	Ensaio II
Soja+Pc-10 (TS)	5300,00 ^{ns}	3967,00 ^{ns}
Soja+Pc-10 (SP)	7416,00 ^{ns}	2366,00 ^{ns}
Soja+Pc-10 (TS+SP)	7367,00 ^{ns}	4317,00 ^{ns}
MÉDIA	6694,33	3550,00
CV (%)	22,72	44,56

ns = não significativo a 5% pelo teste F.

UFC = Unidades Formadoras de Colônia

TS = Fungo aplicado no Tratamento de Sementes

SP = Fungo aplicado no Sulco de Plantio

Quando os ensaios foram realizados na ausência do nematoide, Pc foi capaz de incrementar a massa seca de raiz em 44% quando aplicado no sulco de plantio e 33% quando aplicado no tratamento de sementes mais a aplicação no sulco de plantio, no primeiro ensaio (Tabela 3). No segundo ensaio, apenas o tratamento em que fungo foi aplicado das duas formas promoveu aumento significativo da massa da raiz seca (44%) em relação à testemunha (Tabela 3). O incremento na massa de raízes por Pc é conhecido para várias culturas, como trigo (Monfort et al., 2005), tomate (Escudeiro et al., 2012), acerola (Figueiredo et al., 2014) e bananeira (Silva, 2016).

As demais variáveis tanto na presença quando na ausência de Mj não foram alteradas em função das formas de aplicação do fungo em nenhum dos ensaios. A única exceção foi observada para a massa da parte aérea seca. Para esta, obteve-se valores inferiores em todos os tratamentos comparados à testemunha nos primeiros ensaios (Tabelas 3 e 4). Isso pode ter sido devido à adição de substrato ao solo, o que pode ter favorecido a fase saprofítica do fungo, assim ele deixou de exercer suas habilidades endofíticas e promover o crescimento das plantas.

Tabela 3. Desenvolvimento de plantas de soja expostas a *Pochonia chlamydosporia* com diferentes formas de aplicação em substrato livre de *Meloidogyne javanica*.

Tratamentos	Ensaio I			Ensaio II		
	APA (cm)	MPAS (g)	MRS (g)	APA (cm)	MPAS (g)	MRS (g)
Soja	82,4 a	9,299 a	1,142 b	62,2 a	4,713 a	0,919 b
Soja+Pc-10 (TS)	93,8 a	6,802 b	1,432 ab	64,0 a	4,619 a	1,110 ab
Soja+Pc-10 (SP)	94,0 a	6,173 b	1,647 a	63,8 a	4,099 a	1,079 ab
Soja+Pc-10 (TS+SP)	97,6 a	5,976 b	1,514 a	64,4 a	4,837 a	1,321 a
MÉDIA	91,95	7,06	1,43	63,6	4,57	1,11
CV (%)	15,51	12,57	16,56	11,11	20,74	24,31

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

APA = Altura da Parte Aérea

MPAS = Massa da Parte Aérea Seca

MRS = Massa da Raiz Seca

TS = Fungo aplicado no Tratamento de Sementes

SP = Fungo aplicado no Sulco de Plantio

Tabela 4. Desenvolvimento de plantas de soja expostas a *Pochonia chlamydosporia* com diferentes formas de aplicação com *Meloidogyne javanica* presente no substrato.

Tratamentos	Ensaio I			Ensaio II		
	APA (cm)	MPAS (g)	MRS (g)	APA (cm)	MPAS (g)	MRS (g)
Soja+Mj	82,6 a	6,328 a	1,500 a	52,8 a	3,403 a	0,747 a
Soja+Mj+Pc-10 (TS)	92,4 a	3,030 b	1,280 a	57,8 a	3,347 a	0,887 a
Soja+Mj+Pc-10 (SP)	85,0 a	4,044 b	1,380 a	57,8 a	3,693 a	0,818 a
Soja+Mj+Pc-10 (TS+SP)	84,2 a	4,230 b	1,632 a	62,0 a	3,415 a	0,870 a
MÉDIA	86,05	4,41	1,45	57,6	3,46	0,83
CV (%)	18,63	31,56	19,36	17,08	37,23	34,20

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

APA = Altura da Parte Aérea

MPAS = Massa da Parte Aérea Seca

MRS = Massa da Raiz Seca

TS = Fungo aplicado no Tratamento de Sementes

SP = Fungo aplicado no Sulco de Plantio

4. Conclusões

Conclui-se que independente da forma de aplicação de Pc, o fungo é capaz de controlar Mj e que é dispensável a combinação de dois métodos de aplicação do fungo para fins de controle.

Pochonia chlamydosporia consegue se estabelecer e multiplicar no solo independente da forma de aplicação ou da presença de nematoide. Além disso, quando aplicado unicamente no solo ou em combinação com tratamento de sementes promoveu incremento na massa da raiz seca na ausência do nematoide.

5. Referências

- Ayatollahy, E., Fatemy, S., & Etebarian, H. R. (2008). Potential for biological control of *Heterodera schachtii* by *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* on sugar beet. *Biocontrol Science and Technology*, 18, 157-167.
- Baker, K., & Cook, R. (1974). Biological control of plant pathogens. W.H. Freeman Company, San Francisco, USA, p.433.
- Bettiol, W. (2014). Control Biológico de Enfermedades en Brasil: Del Laboratorio al Control Masivo en el Campo, 30-32.
- Boneti, J. I. S., & Ferraz, S. (1981). Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6(3), 533.
- Bortolini, G. L., Araújo, D. V., Zavislak, F. D., Junior, J. R., & Krause, W. (2013). Controle de *Pratylenchus brachyurus* via tratamento de sementes de soja. *Enciclopédia Biosfera*, 9(17), 818-830.
- Bontempo, A. F., Fernandes, R. H., Lopes, J., Freitas, L. G., & Lopes, E. A. (2014). *Pochonia chlamydosporia* controls *Meloidogyne incognita* on carrot. *Australasian Plant Pathology*, 43(4), 421-424.
- Bontempo, A. F., Lopes, E. A., Fernandes, R. H., Freitas, L. G. de, & Dallemole-Giaretta, R. (2017). Dose-response effect of *Pochonia chlamydosporia* against *Meloidogyne incognita* on carrot under field conditions. *Revista Caatinga*, 30(1), 258-262.
- CONAB. (2018). A produtividade da soja: análise e perspectivas, 1–35. Retrieved from https://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_08_02_14_27_28_10_c ompendio_de_estudos_conab__a_produtividade_da_soja_-_analise_e_perspectivas_-_volume_10_2018.pdf
- Coutinho, M. M., Freitas, L. G., Dallemole-Giaretta, R., Neves, W. S., Lopes, E. A., & Ferraz, S. (2009). Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pochonia chlamydosporia* e farinha de sementes de mamão. *Nematologia Brasileira*, 33(2), 169-176.
- Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L. G. de, Ferraz, S., Neves, W. S., & Everaldo, A. (2008). Efeito da Concentração de Clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no Controle de *Meloidogyne javanica**, *Nematologia Brasileira*, 327-332.

- Dias, W. P., Garcia, A., Silva, J. F. V., & Cameiro, G. E. D. S. (2010). Nematóides em soja: identificação e controle. *Embrapa Soja. Circular 76*, 1-8.
- Escudero, N., & Lopez-Llorca, L. V. (2012). Effects on plant growth and root-knot nematode infection of an endophytic GFP transformant of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Symbiosis*, 57(1), 33-42.
- Favoreto, L., Meyer, M. C., Kleper, D., Campos, L. J. M., & Paiva, E. V. (2015). Ocorrência de *Aphelenchoides* sp. em plantas de soja com sintomas de Soja Louca II. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Londrina. (pp. 82-83).
- Fernandes, R. H., Vieira, B. S., Fuga, C. A. G., & Lopes, E. A. (2014). *Pochonia chlamydosporia* e *Bacillus subtilis* no controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em mudas de tomateiro. *Bioscience Journal*, 30(1), 194-200.
- Ferreira, R. J., Soares, P. L. M., Carvalho, R. B., Santos, J. M., Batista, E. S. P., & Barbosa, J. C. (2017). Espécies de *Bacillus* no controle dos nematoides das galhas e no desenvolvimento de cana-de-açúcar. *Nematropica*, 47(2), 106-113.
- Figueiredo, L. D. (2014). Atividade de *Pochonia chlamydosporia* sobre nematoides do gênero *Meloidogyne* na presença da matéria orgânica (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Gaspard, T., Jaffee, B. A., & Ferris, H. (1990). Association of *Verticillium chlamydosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with Root-knot Nematode Infested Soil. *Journal of Nematology*, 22(2), 207-213.
- Godoy, A. M., & From, D. A. (2016). A cadeia de suprimentos da soja x as perdas na logística de transporte. *Vitrine Produção Acadêmica*, 4(1), 93-98.
- Hahn, M. H., Kuhn, O. J., Stangarlin, J. R., Gonçalves, E. D. V., Cruz, M. I. F., Henkemeier, N. P., & Dildey, O. D. F. (2015). Controle Alternativo Sobre *Meloidogyne incognita* em Soja. *Scientia Agraria Paranaensis*, 14(sup), 281-285.
- Hallman, J., Davies, K. G., & Sikora, R. (2009). Biological Control Using Microbial Pathogens, Endophytes and Antagonists In: Perry, R. N., Moens, M., & Starr, J. L. Root-knot nematodes Wallingford Oxfordshire UK CAB International.

- Hidalgo-Díaz, L., Franco-Navarro, F., & Freitas, L. G. (2017). *Pochonia chlamydosporia* Microbial Products to Manage Plant-Parasitic Nematodes: Case Studies from Cuba, México and Brazil. In R. H. Manzanilla-López & L. V. Lopez-Llorca (Ed. Springer). Sustainability in Plant and Crop Protection: Perspectives in Sustainable Nematode Management Through *Pochonia chlamydosporia* Applications for Root and Rhizosphere Health.
- Hussey, R. S., & Barker, K. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57, 1025-1028.
- Jacobs, H., Gray, S. N., & Crump, D. H. (2003). Interactions between nematophagous fungi and consequences for their potential as biological agents for the control of potato cyst nematodes. *Mycological Research*, 107, 47-56.
- Silva, J. G. (2016). *Pochonia chlamydosporia* para o manejo de *Meloidogyne javanica* e promoção de crescimento em mudas de bananeira 'prata-anã'(Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Khan, M. R., Mohiddin, F. A., Khan, S. M., & Khan, B. (2005). Effect of Seed Treatment With Certain Biopesticides on Root-Knot of Chickpea. *Nematologia Mediterranea*, 33, 107-112.
- Mendes, M. L., & Rodriguez, P. B. N. (2000). Reação de cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] aos nematóides de galhas *Meloidogyne javanica* e a *M. incognita* Raça 1, 2, 3 e 4. *Nematologia Brasileira*, 24 (2), 211-217.
- Monfort, E., Lopez-Llorca, L. V., Jansson, H. B., Salinas, J., Park, J. O., & Silvasithamparam, K. (2005). Colonization of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root-rot. *Soil Biology & Biochemistry*, 37, 1229-1235.
- Moreira, F. J. C., & Ferreira, A. C. S. (2015). Controle alternativo de nematoide das galhas (*Meloidogyne enterolobii*) com cravode defunto (*Tagetes patula* L.), incorporado ao solo. *Holo*, 1, 99-110.
- Nasu, E. D. G. C. (2013). Tratamento de sementes de soja e algodão com *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne incognita* e histopatologia da interação tritrófica (Tese de doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

- Nasu, É. das G. C., Amora, D. X., Monteiro, T. S. A., Alves, P. S., de Podestá, G. S., Ferreira, F. C., & de Freitas, L. G. (2018). *Pochonia chlamydosporia* applied via seed treatment for nematode control in two soil types. *Crop Protection*, *114*, 106-112.
- Nunes, H. T., Monteiro, A. C., & Pomela, A. W. V. (2010). Uso de agentes microbianos e químico para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja. *Acta Scientiarum - Agronomy*, *32*(3), 403-409.
- Oliveira, G. R. F., Silva, M. S., Proença, S. L., Bossolani, J. W., Camargo, J. A., Franco, F. S., & Sá, M. E. (2017). Influência do *Bacillus subtilis* no controle biológico de nematoides e aspectos produtivos do feijoeiro. *Brazilian Journal of Biosystems Engineering*, *11*(1), 47-58.
- Pacheco, P. V. M. (2018). Biocontrole de *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus* por *Pochonia chlamydosporia* e *Trichoderma* sp. em soja e milho (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Podestá, G. S., Freitas, L. G. de, Dallemole-Giaretta, R., Zooca, R. J. F., Caixeta, L. de B., & Ferraz, S. (2013). *Meloidogyne javanica* control by *Pochonia chlamydosporia*, *Gracilibacillus dipsosauri* and soil conditioner in tomato. *Summa Phytopathologica*, *39*(2), 122-125.
- Rivas, L. (2015). Por ano, nematoides causam prejuízos de R\$ 35 bilhões ao agronegócio nacional, Recuperado em 20 setembro, 2018 de https://www.agrolink.com.br/noticias/por-ano--nematoides-causam-prejuizos-de-r--35-bilhoes-ao-agronegocio-nacional_343212.html
- Sasser, J. N., & Fackman, D.W. A. (1987). World perspective on Nematology: the role of the society. In: Veech, J. A., & Dickson, D. W. (eds) vistas on nematology: a commemoration of the 25th anniversary of the society of nematologists. Society of nematologists, Lakeland, FL., p. 7-14.
- Siddiqui, Z. A., & Mahmood, I. (1997). Biological Control of Plant Parasitic Nematodes By Fungi: a Review. *Bioresource Technology*, *58*, 229-239.
- Stirling, G. R. (1991). Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects. Wallingford: CAB *International*, 282p.
- Talwana, H., et al. (2016). Agricultural nematology in East and Southern Africa: problems, management strategies and stakeholder linkages'. *Pest Management*

Science, 72(2), 226-245.

- Tobin, J. D., Haydock, P. P. J., Hare, M. C., Woods, S. R., & Crump, D. H. (2008). Effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* and fosthiazate on the multiplication rate of potato cyst nematodes (*Globodera pallida* and *G. rostochiensis*) in potato crops grown under UK field conditions. *Biological Control*, 46, 194-201.
- Viggiano, J. R., de Freitas, L. G., & Lopes, E. A. (2014). Use of *Pochonia chlamydosporia* to control *Meloidogyne javanica* in cucumber. *Biological Control*, 69, 72-77.
- Wang, K., Riggs, R. D., & Crippen, D. (2005). Isolation, selection and efficacy of *Pochonia chlamydosporia* for control of *Rotylenchulus reniformis* on cotton. *Phytopathology*, 95, 890-893.
- Xavier, D. M., Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L. G. de., Lopes, E. A., Gardiano, C. G., & Ferraz, S. (2017). Combination of isolates of *Pochonia chlamydosporia* for the control of *Meloidogyne javanica* in tomato. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Science*, 33(1), 24-27.

CAPÍTULO 4

ASSOCIAÇÃO RADICULAR E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE CULTURAS DE COBERTURA POR *Pochonia chlamydosporia*

RESUMO

O acúmulo de resíduos agrícolas no solo tem sido uma grande preocupação para as principais culturas do mundo. Várias gramíneas e leguminosas são cultivadas como culturas secundárias apenas para fornecer uma boa cobertura do solo a uma cultura econômica primária. *Pochonia chlamydosporia* (Pc) é um fungo endofítico polífago, e muitos estudos demonstraram sua capacidade de promover o crescimento das plantas. Espera-se que uma associação entre Pc e a cultura hospedeira possa resultar facilmente em maior volume de massa de parte aérea da planta. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade do isolado Pc-10 de Pc em colonizar as raízes de *Pennisetum glaucum* (ADR 300, ADR 500 e ADRG 9050), *Urochloa ruziziensis*, *Crotalaria spectabilis*, *Stylosanthes* sp., seu potencial para se estabelecer em camadas mais profundas no perfil do solo e promover o crescimento das plantas. Em um primeiro momento, um ensaio *in vitro* foi realizado para verificar a capacidade de Pc de colonizar o sistema radicular de todas as plantas mencionadas anteriormente. Além disso, foram realizados dois ensaios em casa de vegetação para avaliar a sobrevivência do fungo ao longo do perfil do solo e a atividade do fungo como promotor do crescimento das plantas. Como resultado, Pc colonizou todas as plantas analisadas. Clamidósporos, conídios e hifas podem ser facilmente observados dentro das células das raízes das plantas. Além disso, todas as plantas testadas aumentaram a altura quando associadas com Pc. A porcentagem de aumento em termos de matéria seca total foi de 28% para ADR 300, ADR 500 (17%), *U. ruziziensis* (16%) e *C. spectabilis* (30%). A mesma melhora foi notada no volume de raízes das plantas na presença de Pc. ADR 300 aumentou significativamente o volume da raiz em 65% comparado ao tratamento sem Pc. *U. ruziziensis* e *C. spectabilis* também apresentaram aumento significativo no volume radicular em 88% e 64%, respectivamente, na presença de Pc. Através da amostragem do perfil do solo, provamos que, o fungo pode ser recuperado até 50 cm abaixo do solo quando associado a *P. glaucum* (ADR 300, ADR 500 e ADRG 9050), *U. ruziziensis*, *C. spectabilis*, *Stylosanthes* sp. Este é o primeiro relato da colonização dessas espécies de plantas por Pc e a primeira observação do clamidósporo de Pc no interior das células das plantas vivas.

Palavras-chave: Endofitismo, Fungo nematófago, Plantio direto, Promoção de crescimento.

CAPÍTULO 4

RADICULAR ASSOCIATION AND GROWTH PROMOTION OF COVERAGE CULTURES BY *Pochonia chlamydosporia*

ABSTRACT

The accumulation of agricultural waste in the soil has been a major concern for major crops in the world. Several grasses and legumes are cultivated as secondary crops only to provide good soil cover to a primary economic crop. *Pochonia chlamydosporia* (Pc) is a polyphagous endophytic fungus, and many studies have demonstrated its ability to promote plant growth. It is expected that an association between Pc and a host crop can easily results in bigger volume of plant shoot mass. The objective of this work was evaluate the ability of the isolate Pc-10 from Pc in colonizing the roots of *Pennisetum glaucum* (ADR 300, ADR 500 and ADRG 9050), *Urochloa ruziziensis*, *Crotalaria spectabilis*, *Stylosanthes* sp, its potential to established in deeper layer in the soil profile and to promote plant growth. In a first moment, one *in vitro* trial was performed to check the ability of Pc to colonize the root system of all plants previously mentioned. In addition, two greenhouse trials were set to evaluate fungus survival along the soil profile and fungus activity as plant growth promoter. As a result, Pc colonized all plants analyzed. Chlamydospores, conidia and hyphae could be easily observed within the root cells of plants. Moreover, all tested plants increased height when associated with Pc. The percentage of increase in terms of total dry matter were 28% to ADR 300, ADR 500 (17%), *U. ruziziensis* (16%) and *C. spectabilis* (30%). The same improvement was noticed in the plants root volume in the presence of Pc. ADR 300 significantly increased root volume by 65% compared to treatment without Pc. *U. ruziziensis* and *C. spectabilis* also showed a significant increase in root volume by 88% and 64%, respectively, in the presence of Pc. By sampling soil profile, we proved that, the fungus could be recovered until 50cm under the ground when associated with *P. glaucum* (ADR 300, ADR 500 and ADRG 9050), *U. ruziziensis*, *C. spectabilis*, *Stylosanthes* sp. This is the first report of the colonization of these plant species by Pc and the first observation of *P. chlamydosporia*'s chlamidospore inside live plants cells.

Key-words: endophytic, nematophagous fungus, direct planting, growth promotion

1. Introdução

Sistema de plantio direto (SPD) se tornou a forma dominante para grandes culturas anuais no Brasil. Atualmente são mais de 30 milhões de hectares plantados sob esse sistema de cultivo (FEBRAPDP, 2016). Benefícios conhecidos são: o aumento do teor de matéria orgânica no solo; melhoria e manutenção da fertilidade; reciclagem de nutrientes; melhoria na estruturação e reversão da descompactação do solo; diminuição da incidência de pragas e doenças; redução da propagação de plantas daninhas (Ambrosano et al., 2005).

A produção de fitomassa na entressafra para formação de palhada é importante no plantio direto, sendo fundamental que se obtenha uma cobertura adequada do solo (Menezes & Leandro, 2004).

É sabido que alguns fungos atuam como promotores de crescimento vegetal, (Stewart & Hill, 2014; Barretto et al., 2018) e que tem sido usados para este fim. A ação desses organismos se dá por meio da disponibilização de nutrientes para as plantas, seja direta ou indiretamente pelo aumento de exploração do solo pelo sistema radicular. Recentemente foi documentado que o fungo *Pochonia chlamydosporia* (Pc), agente de controle biológico de nematoides e promotor de crescimento vegetal, aumenta o teor de nutrientes em plantas não somente pela produção de hormônio vegetal como a auxina, e também pela disponibilização de fósforo pela produção de ácidos orgânicos e enzimas fosfatases que agem na solubilização do fosfato, disponibilizando esse nutriente para as plantas (Gouveia, 2018).

Pochonia chlamydosporia, já foi reportado colonizando endofiticamente raízes de diversas espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas promovendo o crescimento vegetativo dessas culturas. Apenas micélio e conídios desse fungo foram encontrados no interior das células vegetais. As estruturas de resistência de Pc, os clamidósporo, foram observados formados externamente no rizoplano das plantas (Bordallo et al., 2002;

Macia-Vicente et al., 2009; Dallemole-Giaretta et al., 2015; Larriba et al., 2015).

O uso de Pc como agente de biocontrole de nematoides tem se propagado no Brasil. Várias culturas podem ser beneficiadas pela ação nematicida do fungo (Dallemole-Giaretta et al., 2014; Hanh et al., 2015). O manejo de nematoides dependem de uma integração de diversos métodos (Ferraz & Brown, 2016). A rotação e/ou sucessão de culturas com espécies de plantas antagonistas e/ou resistentes à nematoides, tem sido uma importante ferramenta na redução de populações desse organismo (Ferraz et al., 2012). Espécies de crotalária, milheto, braquiária e estilozantes, estão entre as plantas utilizadas em cultivos na entressafra, auxiliando na formação de palhada e redução de populações de nematoides (Inomoto, et al., 2008; Obici et al., 2011; Gardiano et al., 2014; Rodrigues et al., 2014; Debiasi et al., 2016).

A combinação da aplicação de Pc com plantas usadas na entressafra poderia trazer benefícios para o controle de nematoides, mas nunca foi investigada. Conjecturou-se que caso Pc fosse capaz de colonizar culturas de entressafra, isso poderia promover seu crescimento e conseqüentemente aumentar o volume de palhada. Além disso, poderia aumentar a população do fungo no solo tornando menos favorável para o estabelecimento e multiplicação de nematoides fitoparasitas.

O objetivo desse trabalho foi avaliar se o isolado Pc-10 de Pc é capaz de colonizar raízes de *Pennisetum glaucum* (milhetos das variedades ADR 300, ADR 500 e ADRG 9050), *Urochloa ruziziensis*, *Crotalaria spectabilis* e *Stylosanthes* sp., se estabelecer ao longo do perfil do solo e promover crescimento vegetativo dessas plantas de cobertura.

2 Material e Métodos

2.1 Obtenção das sementes

Foram estudadas três cultivares de milho (ADR 300, ADR 500 e ADRG 9050), uma espécie de braquiária (*Urochloa ruziziensis*), uma de estilosantes (*Stylosanthes* sp.) e uma de crotalária (*Crotalaria spectabilis*). Todas as sementes foram obtidas da empresa ATTO Adriana Sementes

2.2 Preparo do inóculo de *Pochonia chlamydosporia*

O isolado Pc-10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Pc), pertencente à coleção de fungos do laboratório de controle biológico de fitonematoides da Universidade Federal de Viçosa, foi usado como inóculo fúngico. O fungo foi cultivado em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) onde permaneceu crescendo no escuro por 21 dias em câmara de incubação a uma temperatura de 28 °C.

Para o ensaio de promoção de crescimento foi utilizado como inóculo fúngico o produto comercial Rizotec[®], do qual foi preparado uma suspensão de clamidósporos de Pc calibrada para conter cerca de 5000 clamidósporos.g⁻¹ de solo.

2.3 Colonização de raízes de plantas de cobertura por *Pochonia chlamydosporia*

As sementes das cultivares de *P. glaucum*, *U. ruziziensis*, *Stylosanthes* sp. e *C. spectabilis* foram desinfestadas em solução de álcool 70% durante 1 min. Em seguida, foram imersas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 0,5% por 3 min e posteriormente lavadas três vezes por 1 min em água destilada esterilizada. Após passarem pelo processo de desinfestação, as sementes foram transferidas para placas de Petri contendo meio BDA onde permaneceram até a germinação e emissão da radícula. Para garantir a não interferência de qualquer microrganismo, as plântulas formadas na placa de Petri foram imersas em solução de hipoclorito a 0,5% por 1 min e em seguida

lavadas 3 vezes em água destilada esterilizada.

Tubos de ensaio de 80 cm³ foram preenchidos até 50% de sua capacidade com uma mistura de solo de barranco e areia na proporção de 1:1 (v:v) previamente tratado com BASAMID[®] (Ingrediente ativo: Dazomete, um precursor de isotiocianato). Posteriormente receberam as plântulas em condições axênicas e quatro discos de 1 cm de diâmetro de micélio do fungo Pc. Em cada tubo foram adicionados 10 ml de água destilada esterilizada com intuito de manter umidade para o crescimento tanto da planta quanto do fungo, em seguida os tubos foram tampados, vedados com filme de PVC, acondicionados em suportes e levados à câmara de crescimento a uma temperatura variando entre 25-28°C por um fotoperíodo de 16 horas luz durante 30 dias. Preparou-se um conjunto de doze tubos para cada cultura, seis tubos com Pc e seis tubos sem a incorporação do fungo (testemunhas).

2.4 Avaliação da colonização das raízes

A colonização de raízes por Pc das espécies vegetais foi avaliada após 30 dias de incubação. As plantas foram retiradas dos tubos e as raízes lavadas em água corrente até a total remoção do substrato. As raízes foram fragmentadas em pedaços de 2 cm de comprimento e submetidas ao processo de clareamento em uma solução de hidróxido de potássio (KOH) 10% (p/v) a 90°C por 30 min em Banho Maria. Em seguida, as raízes foram recolhidas em peneiras e lavadas em água corrente até a total remoção do KOH. Subsequentemente, os fragmentos radiculares foram imersos em solução de ácido clorídrico (HCl) 1% (p/v) por 10 min. Após a remoção do HCl, as raízes foram imersas em azul de tripano 0,05% em lactoglicerol (p/v) e mantidas a temperatura ambiente por 12h. Por fim, as raízes foram retiradas e armazenadas em solução de lactoglicerol (Phillips & Hayman, 1970; Brundrett, 1996). A presença do fungo na raiz foi verificada pela visualização em microscópio de luz da marca OLYMPUS CX41 e as imagens foram

capturadas com o fotodocumentador BUC2B-500C/BESTSCOPE.

2.5 Promoção de crescimento de plantas de cobertura por *Pochonia chlamydosporia*

Vasos de 2 L de capacidade receberam uma mistura de solo de barranco e areia na proporção de 1:1 (v:v) previamente tratado com BASAMID[®] (Ingrediente ativo: Dazomete, um precursor de isotiocianato). O conteúdo dos vasos foi irrigado durante 20 dias após o tratamento a fim de eliminar qualquer resíduo do produto químico. Em seguida, cada vaso recebeu 4 sementes das culturas de *P. glaucum*, *U. ruziziensis*, *Stylosanthes* sp. e *C. spectabilis* (previamente desinfestadas como descrito anteriormente) das quais apenas uma permaneceu após a germinação. Além disso, os vasos receberam uma suspensão em água de clamidósporos de Pc (produto comercial Rizotec[®]) equivalente a 5000 clamidósporos por cada grama de solo. A testemunha não foi tratada com o fungo. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação durante 60 dias, exceto para *U. ruziziensis* que permaneceu até os 90 dias pois o crescimento é mais lento.

Os experimentos para cada cultura foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento. Os tratamentos foram compostos unicamente pela ausência e presença do fungo em cada cultura. As médias foram comparadas pelo teste F a 5% ($p < 0,05$) de significância, sendo avaliados altura da parte aérea (exceto para *U. ruziziensis*), massa da matéria seca total, volume radicular e número de perfilho (apenas para *U. ruziziensis*).

2.5 Capacidade de sobrevivência de *Pochonia chlamydosporia* ao longo do perfil do solo

Para avaliação da sobrevivência de Pc no perfil do solo, tubos de PVC do tipo usado em construção civil com 10 cm de diâmetro, foram seccionados em fragmentos de 12,5 cm. Grupos de quatro secções foram unidos com fitas adesivas, para posterior separação (Figura 1A). Na base de cada tubo foi afixada uma placa de papelão com perfurações de 0,5 cm de diâmetro para permitir a drenagem sem perdas de solo durante e após a irrigação (Figura 1B). Os tubos receberam 2 L de substratos composto de uma mistura de solo de barranco e areia 1:1 (v:v) com textura franco-argilo-arenoso tratado com BASAMID®. Foram preparados 4 tubos para cada espécie vegetal e em seguida, foram adicionadas 4 sementes previamente desinfestadas (como descrito anteriormente) por tubo sendo mantida apenas uma após a germinação. Cada tudo recebeu uma suspensão em água de clamidósporos de Pc calibrada para conter 5000 clamidósporos por grama de solo. As testemunhas, não receberam aplicação do fungo. Os tubos permaneceram na posição vertical mantidos por uma armação de bambu construída na bancada de uma casa de vegetação (Figura 1C)

Após 60 dias (Figura 1D), a parte aérea das plantas foi removida e cada tubo cuidadosamente seccionado com auxílio de uma faca. Para *U. ruziziensis* a retirada da parte aérea foi aos 90 dias. O solo presente em cada secção foi homogeneizados em bandejas de plástico (Figura 1E e 1F). Após a homogeneização, foi retirada uma porção de solo da qual 1 g foi diluído até 10^{-2} . Desta suspensão foi retirada uma alíquota de 200 μ l e em seguida espalhada em meio semi-seletivo (Gaspard, 1990) com auxílio de uma alça de Drigalsk. As placas foram mantidas a 28°C por 21 dias e após esse período foi quantificada as unidades formadoras de colônia (UFC).

2.6 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Para o ensaio de promoção de crescimento, as médias foram comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade.

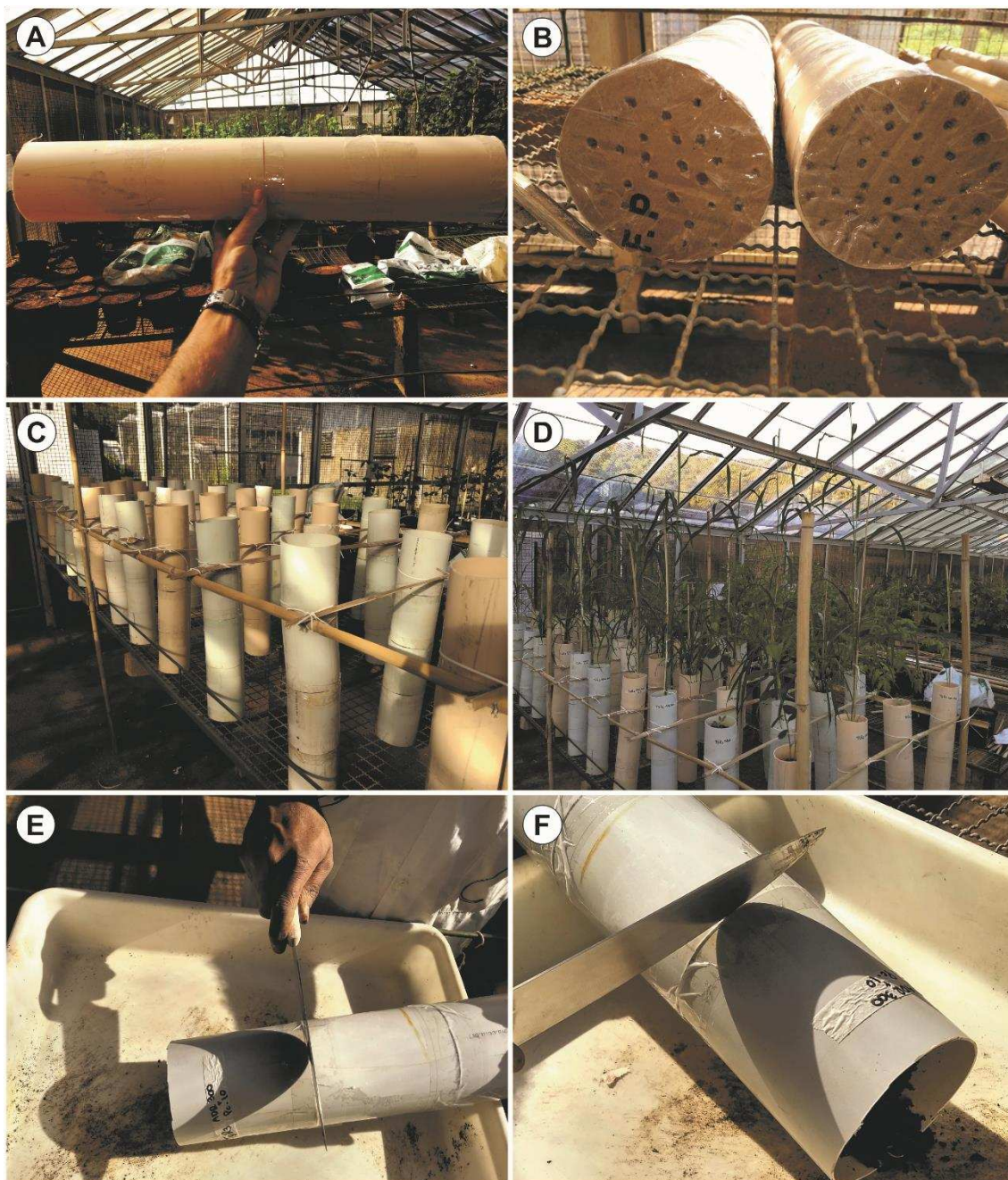


Figura 1. Montagem do experimento de distribuição no perfil do solo do fungo *Pochonia chlamydsporia* inoculado em *Pennisetum glaucum* (ADR 300, ADR 500, ADRG 9050), *Urochloa ruziziensis*, *Stylosanthes* sp. e *Crotalaria spectabilis*. A- Tubo de PVC seccionado e as partes unidas por fita adesiva; B- Base do tubo vedado com papelão perfurado; C- Estrutura experimental completa; D- 60 dias após a montagem do experimento; E e F- Separação das secções para coleta de amostras para avaliação.

3. Resultados

3.1 Colonização de raízes de plantas de cobertura por *Pochonia chlamydosporia*

Os testes realizados *in vitro* demonstraram a capacidade de Pc colonizar as raízes de todas as espécies vegetais avaliadas. A metodologia utilizada sugere a colonização intracelular do sistema radicular por Pc. Estruturas do fungo como clamidósporos, conídios e hifas foram observados em um plano de foco interno às células vegetais (Figura 2). Não foi observada nenhuma estrutura fúngica nos tratamentos em que não houve aplicação do fungo (testemunhas).

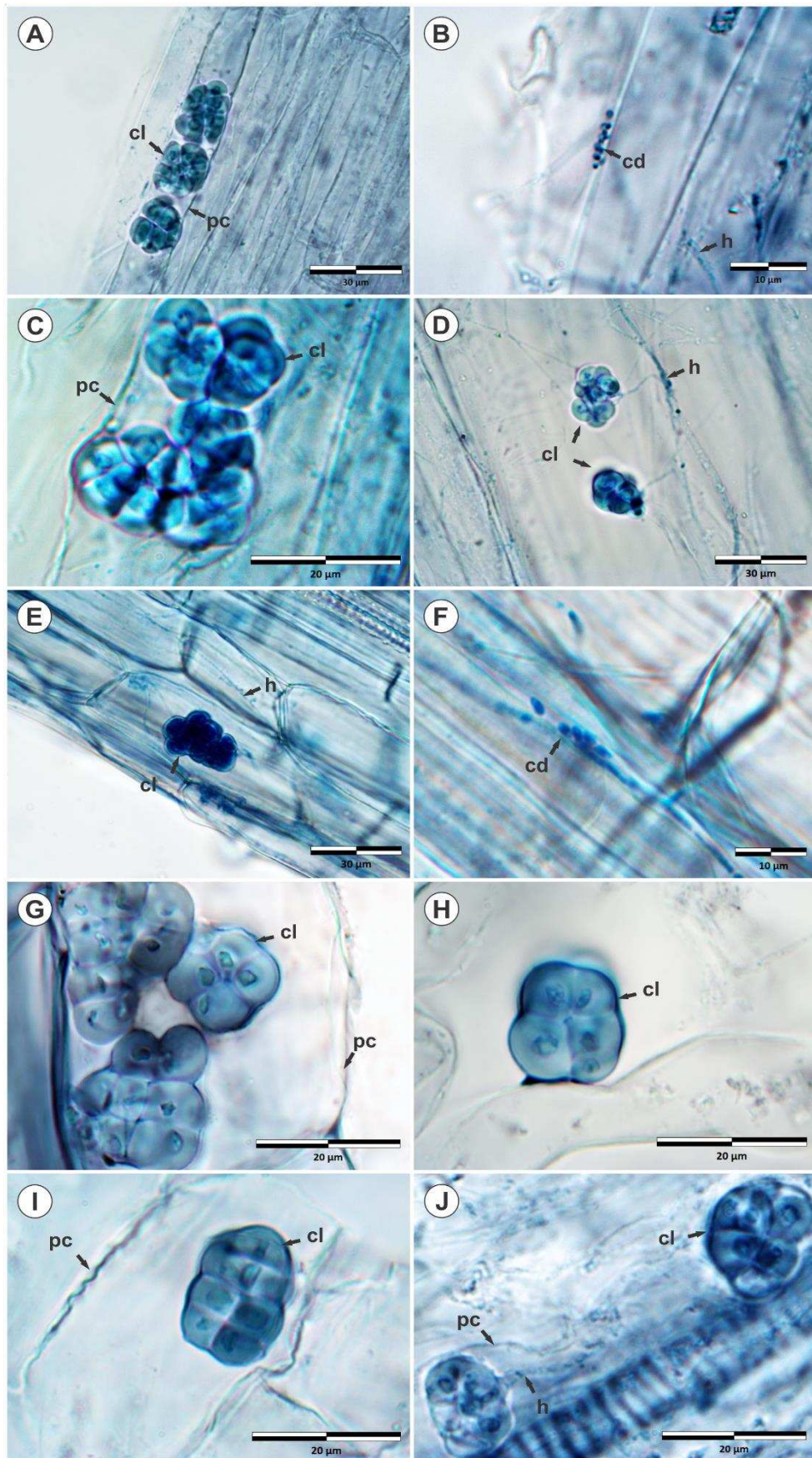


Figura 2. Estruturas de *Pochonia chlamydosporia* formadas no sistema radicular de plantas inoculadas. A - F, *Pennisetum glaucum*; A – B, cv. ADR 300; C – D cv. ADR 500; E - F, cv. ADRG 9050; G - H, *Crotalaria spectabilis*; I, *Urochloa ruziziensis*; J, *Stylosanthes* sp. pc – parede celular; cl - clamidósporo; cd - conidio; h - (hifa).

3.2 Promoção de crescimento de plantas de cobertura por *Pochonia chlamydosporia*

Pochonia chlamydosporia promoveu incremento na altura de todas as espécies avaliadas (Tabela 1; Figura 3). A massa seca total foi aumentada pela presença de Pc em 28% para *P. glaucum* (ADR 300), 17% para (ADR 500), 16% para *U. ruziziensis* e 30% para *C. spectabilis* em comparação a testemunha sem Pc. *P. glaucum* cv. ADR 300, *U. ruziziensis* e *C. spectabilis* tiveram seus volumes radiculares acrescidos em 65,56, 88,20 e 63,83%, respectivamente comparados a testemunha (Tabela 1).

Tabela 1. Promoção de crescimento de culturas de cobertura tratadas com *Pochonia chlamydosporia* após 60 dias em casa de vegetação.

Culturas de cobertura	APA (cm)		MMST (g)		VR (cm ³)		N° Perfilhos	
	Sem Pc-10	Com Pc-10	Sem Pc-10	Com Pc-10	Sem Pc-10	Com Pc-10	Sem Pc-10	Com Pc-10
<i>P. glaucum</i> ADR 300	150,8	162,6**	28,6	36,8**	18,0	29,8**	-	-
<i>P. glaucum</i> ADR 500	148,8	181,2**	34,9	41,0**	22,0	32,0 ^{ns}	-	-
<i>P. glaucum</i> ADRG 9050	66,8	81,4**	25,9	31,1 ^{ns}	21,0	24,4 ^{ns}	-	-
<i>U. ruziziensis</i>	-	-	64,9	75,3**	33,9	63,8**	12,4	14,8 ^{ns}
<i>C. spectabilis</i>	68,4	89,0**	14,7	19,1**	9,4	15,4**	-	-
<i>Stylosanthes</i> sp.	42,6	61,2**	4,7	4,7 ^{ns}	6,2	8,1 ^{NS}	-	-

^{ns} não significativo; **Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade;

APA = Altura da Parte Aérea

MMST = Massa da Matéria Seca Total

VR = Volume Radicular

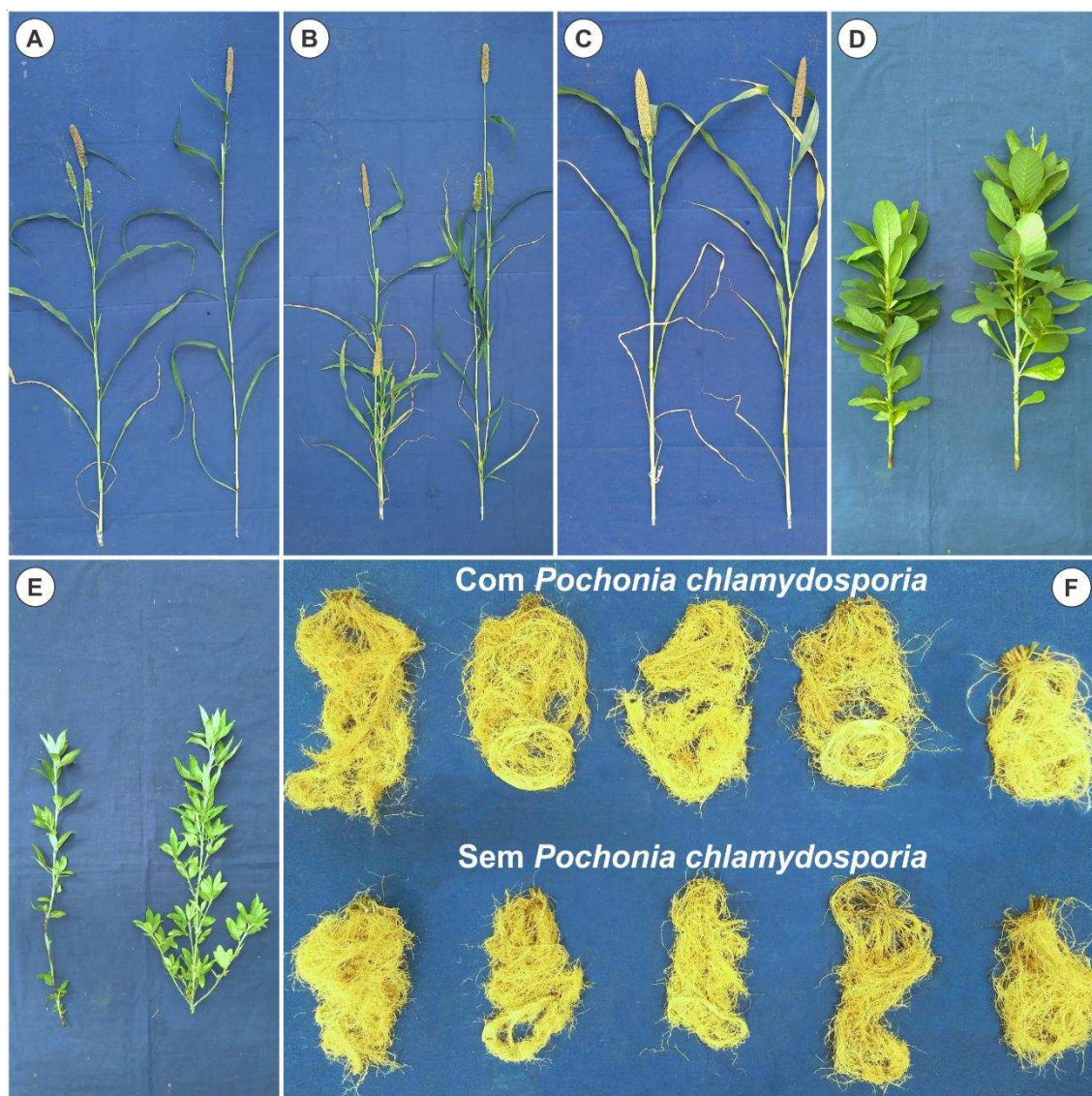


Figura 3. Plantas de cobertura inoculadas (a direita de cada foto) e não inoculadas (a esquerda de cada foto) com *Pochonia chlamydosporia*. A – C *Pennisetum glaucum*; A, cv. ADR 300; B, cv. ADR 500; C, cv. ADRG 9050; D – *Crotalaria spectabilis*; E – *Stylosanthes* sp.; F – Sistema radicular de *Urochloa ruziziensis* exposto x não exposto a *Pochonia chlamydosporia*.

3.4 Sobrevivência de *Pochonia chlamydosporia* ao longo do perfil do solo

A população de Pc foi homogênea no perfil do solo cultivado com milho (cultivar ADR 300), não diferindo entre as profundidades estudadas. Para a cultivar ADR 500 a população diminuiu expressivamente na última camada, aproximadamente 46% com relação aos 12,5 primeiros centímetros. Já para a cultivar ADRG 9050, a população do fungo teve uma queda nos primeiros 25 - 37,5 cm e se restabeleceu na maior profundidade. Em substrato cultivado com *Stylosanthes* sp. e *C. spectabilis*, a população do fungo foi maior nos primeiros 12,5 cm (Tabela 2).

Tabela 2. Unidades Formadoras de Colônias de *Pochonia chlamydosporia* no perfil do solo submetido ao plantio de culturas de cobertura. Análise realizada até a profundidade de 50 cm de profundidade.

Culturas de cobertura	UFC por grama de solo			
	Profundidade (cm)			
	0,0 – 12,5	12,5 – 25,0	25,0 – 37,5	37,5 – 50
ADR 300	10687,5 a	13250,0 a	12376,3 a	14332,5 a
ADR 500	17375,0 ab	21915,0 a	10750,0 ab	9332,5 b
ADR 9050	7699,3 a	1276,3 bc	500,0 c	5333,8 ab
<i>U. ruziziensis</i>	3625,0 ab	1291,3 b	2083,8 ab	4957,5 a
<i>Stylosanthes</i> sp.	17333,8 a	2166,3 b	2815,0 b	2148,8 b
<i>C. spectabilis</i>	7416,3 a	2292,5 b	1541,3 b	2460,0 b

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

4. Discussão

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a primeira evidência de Pc colonizando culturas de cobertura e é a primeira vez que se observa clamidósporos desse fungo no interior de células vegetais.

A colonização radicular de várias espécies vegetais por Pc já foi demonstrada em vários trabalhos. Lopez-Llorca et al., (2002) documentaram com técnicas de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz, a penetração de células epidérmicas e corticais de raiz de cevada (*Hordeum vulgare*) por Pc e seu estabelecimento endofítico. Escudero & Lopez-Llorca (2012) comprovaram utilizando microscopia confocal a laser e com métodos de expressão de proteína fluorescente a colonização de raiz de tomateiro por Pc. Embora populações de Pc já tenha sido quantificada na rizosfera de algumas destas culturas como milho e crotalária (Bourne et al., 1996), nunca foi fotodocumentada a colonização endofítica desse fungo em suas raízes, sendo no presente trabalho a primeira demonstração visual.

O reflexo da colonização de Pc nas raízes das espécies aqui estudadas, foi um aumento do seu desenvolvimento vegetativo. A promoção de crescimento de plantas por Pc pela sua associação com raízes de plantas já foi confirmado em várias pesquisas (Escudero & Lopez-Llorca, 2012; Dallemole-Giaretta et al. 2015b). No grupo de plantas estudado, todas as plantas tratadas com Pc apresentaram aspectos de crescimento vegetativo aumentado em relação à testemunha. Apenas para *P. glaucum* cv. ADRG 9050 e *Stylosanthes* sp., essa promoção se limita à altura da parte aérea. No entanto, o fungo se associou às raízes utilizando-as para meios de sobrevivência e multiplicação.

A melhoria no crescimento das culturas de cobertura testadas, sugerem que seu uso poderia aumentar o volume de palhada em uma área destinada ao plantio direto, contribuindo para as melhorias da qualidade do solo e para o controle prévio de populações de nematoides fitoparasitas. Isso se somaria ao controle de diversos

organismos nocivos, tais como fungos fitopatogênicos (Görge et al., 2009; Linhares et al., 2016) e plantas daninhas (Bortoluzzi & Eltz, 2001; Fileti et al., 2011; Lima et al., 2014). Um aumento na população de Pc em solos tratados seria uma outra consequência.

Os nematoides parasitas de plantas são um dos principais alvos quando se utiliza espécies de plantas para fins de adubação verde e/ou forragem. Crotalária e estilosantes já foram confirmadas reduzindo população *Pratylenchus brachyurus* quando utilizadas na entressafra com a soja (Vedoveto et al., 2013; Rodrigues et al., 2014). Gardiano et al., (2014) estudaram o efeito de diversas espécies vegetais, comumente utilizadas como adubo verde, sobre a população de *Rotylenchulus reniformis* onde encontraram *Urochloa ruziziensis*, estilosantes (*Stylosanthes capitata*) e milheto (variedade BRS1501) diminuindo expressivamente a população do nematoide na área com fatores de reprodução próximo a zero. Essas culturas já foram descritas agindo no controle de outras espécies de nematoides como *Meloidogyne javanica* (Miyamoto et al., 2016), *Meloidogyne incognita* (Santana et al., 2012), *Meloidogyne exigua* (Amaral & Carvalho, 2002), *Pratylenchus zea* (Obici et al., 2011), *Heterodera glycines* (Valle et al., 1996) e *Helicotylenchus multicinctus* (Bringel & Silva, 2000).

A colonização e promoção de crescimento aqui evidenciadas propõe uma ótima alternativa para o manejo de fitonematoides, pois Pc tem sido é um fungo nematófago eficiente em controlar várias espécies desse patógeno (Wang et al., 2005; Ayatollahy et al., 2008; Tobin et al., 2008; Podestá et al., 2016). Dessa forma, a aplicação conjunta do fungo com culturas de cobertura durante a entressafra seria uma excelente forma de introduzir Pc na área antes da cultura de interesse econômico. O fungo ao se multiplicar nas raízes dessas plantas e se distribuir pelo perfil do solo, ele poderia agir sobre ovos de nematoides presentes no solo e em restos de cultura, reduzindo assim o inóculo inicial de nematoides no solo para a próxima safra.

A ocorrência de Pc em profundidades de até 50 cm pode ser explicada pela

lixiviação de seus propágulos ao se realizar a irrigação, corroborando os resultados encontrados por De Leij et al., (1993) e Nasu et al., (2018). Além da lixiviação, a presença de raízes nessa profundidade pode ter favorecido o seu estabelecimento, já que o fungo colonizou raízes de todas espécies estudadas. A capacidade de Pc em se distribuir até profundidades mais elevadas é mais importante quando o objetivo é sua utilização para promover crescimento vegetativo do que para o controle de fitonematoides, pois as principais espécies parasitadas pelo fungo vivem preferencialmente nos primeiros 30 cm do solo (Ferraz & Brown, 2016).

5. Conclusões

Conclui-se que o fungo Pc é capaz de colonizar todas as culturas de cobertura testadas. Além disso, é capaz de promover crescimento vegetativo dessas culturas, exceto para ADRG 9050 e *Stylosanthes* sp. Este é o primeiro relato e comprovação da colonização desse fungo nessas espécies vegetais. Também pela primeira vez são obtidas indícios e evidências parciais de formação intracelular de clamidósporos de Pc.

Embora a população do fungo estivesse maior em certa profundidade, é certo sua capacidade de sobrevivência ao longo do perfil do solo, pelo menos até a profundidade aqui avaliada, de 50 cm.

6. Referências

- Amaral, D. R., Oliveira, D. F., Campos, V. P., & Carvalho, D. A. (2002). Efeito de Alguns Extratos vegetais na Eclosão, Mobilidade, Mortalidade e Patogenicidade de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. *Nematologia Brasileira*, 26, 43-48.
- Ambrosano, E. J., Guiraldo, N., Cantarella, H., Rossetto, R., Mendes, P. C. D., Rossi, F., Ambrosano, G. M. B., Arevalo, R. A., Schammas, E. A., Junior, I. A., & Foltran, D. E. (2005). Plantas para cobertura do solo e adubação verde aplicadas ao plantio direto. Piracicaba, KP Potafos. 16p.
- Ayatollahy, E., Fatemy, S., & Etebarian, H. R. (2008). Potential for biological control of *Heterodera schachtii* by *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* on sugar beet. *Biocontrol Science and Technology*, 18(2), 157-167.
- Barretto, V. C. M., Barretto, F. R. M., Gonçalves, L. E. N., Peixoto, G. H. S., Lima, M. L. P., & Carvalho, D. D. C. (2018). Desenvolvimento inicial de plantas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* inoculadas com *Pisolithus* spp. provenientes de povoamento de *Pinus* spp. *Ecologia e Nutrição Florestal*, 6(1), 1-7.
- Bettiol, W., Maffia, L. A., & Castro, M. L. M. P. (2014) Control biológico de enfermedades de plantas en Brasil. In: Bettiol, W., Rivera, M.C., Mondino, P., Montealegre, A., Jaime, R., Colmenárez, Y.C. Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe, (pp.404).
- Bordallo, J. J., Lopez-Llorca, L. V., Jansson, H. B., Salinas, J., Persmark, L., & Asensio, L. (2002). Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. *New Phytologist*, 154(2), 491-499.
- Bortoluzzi, E. C., & Eltz, F. L. F. (2001). Manejo Da Palha De Aveia Preta Sobre As Plantas Daninhas E Rendimento De Soja Em Semeadura Direta. *Ciência Rural*, 31(2), 237-243.
- Bourne, J. M., Kerry, B. R., & De Leij, F. A. A. M. (1996). The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the Nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* goddard. *Biocontrol Science and Technology*, 6(4), 539-548.
- Bringel, J. M. M., & Silva, G. S. (2000). Efeito antagônico de algumas espécies de plantas a *Helicotylenchus multicinctus*. *Nematologia Brasileira* 24(2), 179-181.

- Brundrett, M. (1996). Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research.
- Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L. G. de., Xavier, D. M., Zooca, R. J. F., Ferraz, S., & Lopes, E. A. (2014). Incorporação ao solo de substrato contendo micélio e conídios de *Pochonia chlamydosporia* para o manejo de *Meloidogyne javanica*. *Ciência Rural* 44(4), 629-633.
- Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L. G. de, Lopes, E. A., Silva, M. D. C. S. da, Kasuya, M. C. M., & Ferraz, S. (2015). Promotes the growth of tomato and lettuce plants. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 37(4), 417.
- Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L. G. de, Lopes, E. A., Silva, M. D. C. S. da, Kasuya, M. C. M., & Ferraz, S. (2015). *Pochonia chlamydosporia* promotes the growth of tomato and lettuce plants. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 37(4), 417.
- Dalmago, G. A., Bergamaschi, H., Bergonci, J. I., Krüger, C. a. M. B., Comiran, F., & Heckler, B. M. M. (2009). Retenção e disponibilidade de água às plantas, em solo sob plantio direto e preparo convencional. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 13(54), 855-864.
- De Leij, F. A. A. M., Kirkwood, I. A., Barba, J., Leijdens, M. B., & Brookes, P. C. (1993). Growth and Survival of *Verticillium chlamydosporium* Goddard, a Parasite of Nematodes, in Soil. *Biocontrol Science and Technology*, 3(3), 355-365.
- Debiasi, H., Franchini, J. C., Dias, W. P., Ramos Junior, E. U., & Balbinot Junior, A. A. (2016). Práticas culturais na entressafra da soja para o controle de *Pratylenchus brachyurus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(10), 1720-1728.
- Escudero, N., & Lopez-Llorca, L. V. (2012). Effects on plant growth and root-knot nematode infection of an endophytic GFP transformant of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Symbiosis*, 57(1), 33-42.
- FEBRAPDP. (2016). Federação brasileira de plantio direto e irrigação. Retrieved from <http://www.febrapdp.org.br/>
- Ferraz, L. C. C. B., & Brown, D. J. F. (2016). Nematologias de plantas: fundamentos e importância, 251p.
- Fileti, M. S., Pinotti, E. B., Epiphanyo, P. D., Barros, B. M. C., Silva, T. F., Giroto, M., Silva, D. P., Bosque, G. G., & Lima, F. C. C. (2011). Utilização de palhada no controle de planta daninha. *Revista científica eletrônica de agronomia*, 1677-0293.

- Gao, F. K., Dai, C. C., & Liu, X. Z. (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 4(13), 1346-1351.
- Garcia, T. V., Knaak, N., & Fiuza, L. M. (2015). Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 82, 1-9.
- Gardiano, C. G., Krzyzanowski, A. A., & Saab, O. J. G. A. (2014). Eficiência de espécies de adubos verdes sobre a população do nematoide reniforme. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(2), 719-726.
- Gaspard, T., Jaffee, B. A., & Ferris, H. (1990). Association of *Verticillium chlamydosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with Root-knot Nematode Infested Soil. *Journal of Nematology*, 22(2), 207-213.
- Görgen, C. A., da Silveira Neto, A. N., Carneiro, L. C., Ragagnin, V., & Junior, M. L. (2009). Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 44(12), 1583-1590.
- Gouveia, A. S. (2018). Análise de extratos fúngicos relacionados ao controle biológico de fitonematoides e à promoção de crescimento vegetal (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Hahn, M. H., Kuhn, O. J., Stangarlin, J. R., Gonçalves, E. D. V., Cruz, M. I. F., Henkemeier, N. P., & Dildey, O. D. F. (2015). Controle Alternativo Sobre *Meloidogyne incognita* em Soja. *Scientia Agraria Paranaensis*, 14, 281-285.
- Inomoto, M. M., Antedomênico, S. R., Santos, V. P., Silva, R. A., & Almeida, G. C. (2008). Avaliação em casa de vegetação do uso de sorgo, milho e crotalária no manejo de *Meloidogyne javanica*. *Tropical Plant Pathology*, 33(2), 125-129.
- Lahoz, E., Contillo, R., & Porrone, F. (2004). Induction of systemic resistance to *Erysiphe orontii* cast in tobacco by application on roots of an isolate of *Gliocladium roseum* bainier. *Journal of Phytopathology*, 152(8-9), 465-470.
- Larriba, E., Jaime, M. D. L. A., NiSPow, C., Martín-Nieto, J., & Lopez-Llorca, L. V. (2015). Endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* reveals plant growth promotion and a general defense and stress transcriptomic response. *Journal of Plant Research*, 128(4), 665-678.

- Lima, S. F., Timossi, P. C., Almeida, D. P., & Silva, U. R. da. (2014). Palhada de braquiária *ruziziensis* na supressão de plantas daninhas na cultura da soja, 541-551.
- Linhares, C. M. de S., Freitas, F. C. L. de., Ambrósio, M. M. de Q., Cruz, B. L. S. da, & Dantas, A. M. de M. (2016). Efeito de coberturas do solo sobre a sobrevivência de *Macrophomina phaseolina* no feijão-caupi. *Summa Phytopathologica*, 42(2), 155-159.
- Lopez-Llorca, L. V., Bordallo, J. J., Salinas, J., Monfort, E., & López-Serna, M. L. (2002). Use of light and scanning electron microscopy to examine colonisation of barley rhizosphere by the nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium*. *Micron*, 33(1), 61-67.
- Marcía-Vicente, J. G., Rosso, L. C., Ciancio, A., Janson, H. B., & Lopez-Llorca, L. V. (2009). Colonisation of roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamyosporia*: effects on plant growth and disease. *Annals of Applied Biology*, 155, 391-401.
- Menezes, L. A. S., & Leandro, W. M. (2004). Avaliação De Espécies De Coberturas Do Solo. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 34(3), 173-180.
- Miamoto, A., Dias-Arieira, C. R., Cardoso, M. R., & Puerari, H. H. (2016). Penetration and Reproduction of *Meloidogyne javanica* on Leguminous Crops. *Journal of Phytopathology*, 164(11-12), 890-895.
- Nasu, E. G. C. (2013). Tratamento de sementes de soja e algodão com *Pochonia chlamyosporia* no controle de *Meloidogyne incognita* e histopatologia da interação tritrófica (Tese de doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Nasu, É. das G. C., Amora, D. X., Monteiro, T. S. A., Alves, P. S., de Podestá, G. S., Ferreira, F. C., & de Freitas, L. G. (2018). *Pochonia chlamyosporia* applied via seed treatment for nematode control in two soil types. *Crop Protection*, 114, 106-112.
- Obici, L. V., Dias-Arieira, C. R., Klosowski, E. S., Fontana, L. F., Cunha, T. P. L., Santana, S. M., & Biela, F. (2011). Efeito de plantas leguminosas sobre *Pratylenchus zae* e *Helicotylenchus dihystera* em solos naturalmente infestados. *Nematropica* 41, 215-222.

- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158.
- Podestá, G. S. de., Amora, D. X., Maffia, L. A., Nasu, E. G. C., Ferraz, S., & Freitas, L. G. (2016). Effect of time between soil infestation with *Pochonia chlamydosporia* and planting on the efficacy of the fungus in managing *Meloidogyne javanica*. *Crop Protection*, 90, 77-83.
- Rodrigues, D. B., Vinicius, M., Vedoveto, V., Roldi, M., Fiore, H., Molin, D., & Campus, U. R. (2014). Crop rotation for *Pratylenchus brachyurus* control in Soybean. *Nematropica*, 44(2), 146-151.
- Santana, S. D. M., Dias-arieira, C. R., Biela, F., Loeiro, T. P., Marcelo, F., Roldi, M., & Abe, H. F. (2012). Plantas Antagonistas No Manejo De *Meloidogyne incognita* , Em Solo Arenoso De Área. *Nematropica*, 42, 287-294.
- Stewart, A., & Hill, R. Applications of Trichoderma in plant growth promotion. In: Biocontrol and plant growth promotion (pp. 415-425). New Zealand: Copyright.
- Tobin, J. D., Haydock, P. P. J., Hare, M. C., Woods, S. R., & Crump, D. H. (2008). Effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* and fosthiazate on the multiplication rate of potato cyst nematodes (*Globodera pallida* and *G. rostochiensis*) in potato crops grown under UK field conditions. *Biological Control*, 46(2), 194-201.
- Valle, L. A. C. do, Ferraz, S., Dias, W. P., & Teixeira, D. A. (1996). Controle do Nematóide do cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe) com gramíneas forrageiras. *Nematologia Brasileira*.
- Vedoveto, M. V. V., Dias-Arieira, C. R., Rodrigues, D. B., Arieira, J. O., Roldi, M., & Severino, J. J. (2013). Adubos verdes no manejo de *Pratylenchus brachyurus* em soja. *Nematropica*, 43(2), 226-232.
- Wang, K., Riggs, R. D., & Crippen, D. (2005). Isolation, Selection, and Efficacy of *Pochonia chlamydosporia* for Control of *Rotylenchulus reniformis* on Cotton. *Phytopathology*, 95(8), 890-893.
- Zare, R., Gams, W. & Evans, H.C. (2001). A revision of *Verticillium* section V. *Prostrata*. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthra*. *Nova Hedwigia*, 73(1-2): 51-86.

Conclusões Gerais

- O fungo *P. chlamydosporia* crescer na presença das bactérias diazotróficas *B. japonicum* e *A. brasilense* e, que a presença delas não interfere na capacidade do fungo em controlar o nematoide de galhas *M. javanica* em soja. As bactérias quando aplicadas isoladamente também reduziram a reprodução do nematoide, sendo essa a primeira evidência de *A. brasilense* causando essa redução, no entanto, não se sabe o mecanismo pelo qual isso acontece.
- O fungo é capaz de controlar o nematoide em solo ácido, assim, pode ser recomendado para o controle desses organismos nos campos de produção de soja, mesmo que se por ventura a correção do solo não tenha sido feita ou ainda que a correção não tenha atingido o efeito esperado.
- O modo de aplicação de *P. chlamydosporia* no sistema de produção da soja, não interfere em sua capacidade em controlar o nematoide de galhas *M. javanica*, nem em sua capacidade de se estabelecer no solo. Assim, a forma de aplicação pode ser escolhida de acordo com a tecnologia disponível ao produtor.
- A interação de *P. chlamydosporia* com culturas de cobertura, mostra uma forma interessante de introduzir o fungo na área, pois, além de promover crescimento dessas culturas e conseqüentemente aumentar o volume de palhada no solo, o fungo, juntamente com as propriedades antagonistas das culturas, podem atuar na redução do inóculo inicial de um possível nematoide presente na área.
- *Pochonia chlamydosporia* traz benefícios para a cultura da soja, assim como para culturas usadas em sucessão, promovendo o desenvolvimento vegetativo e reduzindo populações de nematoides.