

THALITA SUELEN AVELAR MONTEIRO

**AÇÃO COMBINADA DE *Pochonia chlamydosporia* E OUTROS
MICROORGANISMOS NO CONTROLE DO NEMATOIDE DE GALHAS E NO
DESENVOLVIMENTO VEGETAL**

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
2017

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

T

M775a
2017 Monteiro, Thalita Suelen Avelar, 1987-
Ação combinada de *Pochonia chlamydosporia* e outros
microrganismos no controle do nematoide de galhas e no
desenvolvimento vegetal / Thalita Suelen Avelar Monteiro. - Viçosa,
MG, 2017.
vi, 100f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. Fungos nematófagos - Controle biológico. 2. *Bradyrhizobium
japonicum*. 3. *Meloidogyne javanica*. 4. Micovírus. 5. *Pasteuria
penetrans*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Fitopatologia. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22 ed. 632.45

THALITA SUELEN AVELAR MONTEIRO

AÇÃO COMBINADA DE *Pochonia chlamydosporia* E OUTROS
MICRORGANISMOS NO CONTROLE DO NEMATOIDE DE GALHAS E NO
DESENVOLVIMENTO VEGETAL

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: 31 de março de 2017


Poliane Alfenas Zerbini


Wânia dos Santos Neves


Olinto Liparini Pereira


Hêlvio Gledson Maciel Ferraz


Leandro Grassi de Freitas (Orientador)

Aos meus pais Maria da Conceição e Geraldo, minhas fontes de inspiração.
Ao Samuel pelo amor, companheirismo, dedicação e paciência.
À minha amada sobrinha Alice pela felicidade e alegria que trouxe a nossa família.
Aos meus irmãos Priscila e João Luís pelo amor e cumplicidade.
À Amora pelo fiel e incondicional amor.
Aos meus avós João e Terezinha, por tudo, sobretudo o AMOR,
DEDICO

AGRADECIMENTOS

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

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

Ao Doutor Donald Dickson e Doutora Janete Brito, pelas orientações, amizades e carinho ao longo do Período Sanduíche na University of Florida.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos transmitidos.

A professora Poliane Alfenas-Zerbini, do Departamento de Microbiologia Agrícola, pela orientação.

Aos doutores André da Silva Xavier e Ana Paula Oliveira de Barros, pelos ensinamentos, parcerias e amizades.

Ao professor Olinto Liparini Oliveira, à Pesquisadora Wânia dos Santos Neves e ao Doutor Hélio pelas sugestões na correção do trabalho.

Aos amigos e colegas do laboratório de nematologia Rosana, Raul, Paula, Fernanda, Paulo, Huarlen, Josiane, Luciana e Ponês pelo convívio, pela amizade e colaborações.

A Angélica Gouveia, pela parceria e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia em especial a Sara, Delfim e Guilherme por todas as informações e serviços prestados.

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

Ao Pedro Vidigal, pelo auxílio nas análises de Bioinformática e ensinamentos.

Ao NUBIOMOL (Núcleo de Biomoléculas), pelo suporte nas análises de Bioinformática.

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

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

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

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	5
Co-inoculação de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>Pochonia chlamydosporia</i> em soja: absorção de macro e micronutrientes e controle de <i>Meloidogyne javanica</i>	
CAPÍTULO 2	33
Estudo da interação entre os agentes de controle biológico de fitonematoides <i>Pochonia</i> <i>chlamydosporia</i> e <i>Pasteuria penetrans</i>	
CAPÍTULO 3	53
Caracterização molecular de dois micovírus co-infectando <i>Pochonia chlamydosporia</i> , agente de controle biológico de nematoides	
CONCLUSÕES GERAIS.....	100

RESUMO

MONTEIRO, Thalita Suelen Avelar, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2017. **Ação combinada de *Pochonia chlamydosporia* e outros microrganismos no controle do nematoide de galhas e no desenvolvimento vegetal.** Orientador: Leandro Grassi de Freitas. Coorientador: Silamar Ferraz.

Na natureza, um fitopatógeno geralmente está sob influência de um complexo de microrganismos, que associados garantem o equilíbrio ecológico estável. Com foco no fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*, começamos investigando sua compatibilidade com *Bradyrhizobium japonicum* em soja e a influência dessa interação sobre o controle do nematoide das galhas e sobre a absorção de nutrientes pela planta. Constatou-se que a aplicação conjunta desses dois organismos não prejudica a ação de controle de nematoides por *P. chlamydosporia* e nem a fixação de N₂ por *B. japonicum*. Adicionalmente, quando os dois agentes estavam juntos, ocorreu maior produção de nódulos da bactéria nas raízes e aumento do conteúdo de Fe na parte aérea das plantas de soja. No segundo capítulo, a compatibilidade dos agentes de controle biológico de nematoides, *P. chlamydosporia* e *P. penetrans* foi avaliada. A co-aplicação dos microrganismos possibilitou maior redução do número de ovos do nematoide do que a aplicação em separado e foi possível observar a associação do fungo nas raízes infectadas por nematoides colonizados por *P. penetrans*. Pesquisamos ainda, no terceiro capítulo, a presença de vírus em isolados de *P. chlamydosporia*. Dos dezoito isolados avaliados, apenas um (Pc-M4) estava infectado por dois vírus, um com genoma de RNA fita dupla (dsRNA) e outro de RNA fita simples sentido negativo (-ssRNA). Os nomes propostos para os micovírus são *Pochonia chlamydosporia chrysovirus 1* (PcCV1) e *Pochonia chlamydosporia negative-stranded RNA virus 1* (PcNSRV1). Ensaio biológico do isolado fúngico Pc-M4 revelaram que este foi capaz de parasitar ovos, produzir metabólitos e proteases letais aos juvenis e reduzir a reprodução do nematoide de galhas *M. javanica*. Os resultados apresentados indicam que o fungo *P. chlamydosporia* é capaz de interagir com diferentes organismos sem perder a capacidade de controlar o nematoide de galhas e de promover o crescimento vegetal, o que faz dele um excelente agente de biocontrole de nematoides.

ABSTRACT

MONTEIRO, Thalita Suelen Avelar, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2017. **Combined action between *Pochonia chlamydosporia* and other microorganisms to control root knot nematode and plant development.** Adviser: Leandro Grassi de Freitas. Co-adviser: Silamar Ferraz.

In nature, a plant pathogen is usually under the influence of a complex of microorganisms, which guarantees stable ecological balance. Focusing on the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*, we started investigating its compatibility with *Bradyrhizobium japonicum* in soybean. We also looked at the influence of this interaction on the control of the root knot nematode and on the nutrient uptake by the plant. It was found that the joint application of these two organisms does not affect the action of control of nematodes by *P. chlamydosporia* nor the fixation of N₂ by *B. japonicum*. In addition, when the two agents were together, there was a higher production of nodules of the bacteria in the roots and an increase in the Fe content in the aerial part of the soybean plants. In the second chapter, the compatibility of biological control agents of nematodes, *P. chlamydosporia* and *P. penetrans* was evaluated. The co-application of the microorganisms allowed a greater reduction in the number of nematode eggs than the separate application. It was possible to observe the association of the fungus in the roots infected by nematodes colonized by *P. penetrans*. We also investigated the presence of viruses in isolates of *P. chlamydosporia* in the third chapter. Of the eighteen isolates evaluated, only one (Pc-M4) was infected by two viruses, one with double-stranded RNA genome (dsRNA) and the other with RNA single-stranded sense negative (-ssRNA). The proposed names for the mycoviruses are *Pochonia chlamydosporia* chrysovirus 1 (PcCV1) and *Pochonia chlamydosporia* negative-stranded RNA virus 1 (PcNSRV1). Biological assays of the fungal isolate Pc-M4 revealed that it was able to parasitize eggs, produce metabolites, lethal proteases to juveniles and reduce reproduction of *M. javanica*. The results indicated that the fungus *P. chlamydosporia* is capable of interacting with different organisms without losing the ability to control the root knot nematode and to promote plant growth. This makes it an excellent biocontrol agent for plant parasitic nematodes.

INTRODUÇÃO GERAL

A necessidade do manejo alternativo de fitonematoides aumentou nas últimas décadas devido a proibição da comercialização de alguns nematicidas químicos. Nesse contexto, o controle biológico vem ganhando destaque em pesquisas e no desenvolvimento de novos produtos eficientes no manejo de fitonematoides. Esses fitopatógenos são, em sua maioria, habitantes do solo. E para que o agente de controle biológico tenha sucesso, ele necessita ter a habilidade de sobreviver nesse ambiente complexo, bem como interagir com outros organismos ali presentes.

O fungo *Pochonia chlamydosporia*, habitante da rizosfera, tem sido utilizado com sucesso em pesquisas visando o manejo de nematoides importantes na agricultura (Wang et al., 2005; Ayatollahy et al., 2008; Tobin et al., 2008; Viggiano et al., 2014). Além de ser eficiente no parasitismo de ovos, ele também tem a capacidade de promover crescimento das plantas e, na ausência de ambos, plantas e nematoides, apresentam estilo de vida saprofítico (Manzanilla-López et al., 2013). A sua rusticidade somada à capacidade de produção de estruturas de resistência facilitam a produção massal desse fungo e o uso na agricultura, o que faz dele um bom agente de controle biológico de nematoides. Em função disso, em 2016, o primeiro produto formulado com esse microrganismo foi registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Apesar de todas essas características interessantes, é importante a investigação quanto a sua compatibilidade com diferentes organismos.

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

são imprescindíveis para o desenvolvimento de novas ferramentas de manejo de nematoides.

Deve-se ainda conhecer profundamente os microrganismos utilizados no controle biológico em estudo. Trabalhos recentes têm mostrado que fungos agentes de controle biológico podem hospedar vírus (Herrero, 2016; 2017). Os vírus que infectam fungos, chamados micovírus, em sua maioria, causam infecções latentes, porém eles também são capazes de alterar a adaptabilidade do agente (causando hipovirulência), ou, em alguns casos, melhorar o desempenho do hospedeiro (Zabalgogezcoa et al., 1998; Márquez et al., 2007; Wu et al., 2007; Wang et al., 2014). Dessa forma, é muito importante a detecção de micovírus em fungos agentes de controle biológico.

Com o objetivo de compreender as relações de *P. chlamydosporia* com outros microrganismos, foram avaliadas as interações desse fungo com a bactéria fixadora de N₂ atmosférico *Bradyrhizobium japonicum*, com a bactéria agente de controle biológico de nematoides *Pasteuria penetrans* e com micovírus, visando o manejo do nematoide de galhas, *Meloidogyne javanica*.

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.
- Chaves, N.P., Pocasangre, L.E., Elango, F., Rosales, F.E., Sikora, R., 2009. Combining endophytic fungi and bacteria for the biocontrol of *Radopholus similis* (Cobb) Thorne and for effects on plant growth. *Scientia Horticulturae* 122, 472-478.
- Herrero, N., 2016. A novel monopartite dsRNA virus isolated from the entomopathogenic and nematophagous fungus *Purpureocillium lilacinum*. *Arch Virol*, 161, 3375-3384.
- Herrero, N., 2017. Identification and sequence determination of a new chrysovirus infecting the entomopathogenic fungus *Isaria javanica*. *Arch Virol* 162, 1113-1117.
- Manzanilla-Lopez, R.H., Esteves, I., Finetti-Sialer, M.M., Hirsch, P.R., Ward, E., Devonshire, J., Hidalgo-Diaz, L., 2013. *Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endoparasitic nematodes. *J Nematology* 45, 1-7.
- Márquez, L.M., Redman, R.S., Rodriguez, R.J., Roossinck, M.J., 2007. A virus in a fungus in a plant: three- way symbiosis required for thermal tolerance. *Science* 315, 513-515.
- Mendoza, A.R., Sikora, R.A., 2009. Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. *BioControl* 54, 263–272.
- Singh, U.B., Sahu, A., Sahu, N., Singh, R.K., Renu, R.P., Singh, D.P., Sarma, B.K., Manna, M.C., 2012. Co-inoculation of *Dactylaria brochopaga* and *Monacrosporium eudermatum* affects disease dynamics and biochemical responses in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) to enhance bio-protection against *Meloidogyne incognita*. *Crop Protection* 35,102-109
- Tobin, J.D., Haydocj, 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., Freitas, L.G., Lopes, E.A., 2014. Use of *Pochonia chlamydosporia* to control *Meloidogyne javanica* in cucumber. *Biological Control* 69, 72-77.
- Zabalgogezcoa, I., Benito, E.P., Ciudad, A.G., Criado, B.G., Eslava, A.P., 1998. Double-stranded RNA and virus-like particles in the grass endophyte *Epichloë festucae*. *Mycol. Res.* 102, 914-918

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

Wang, L., Jiang, J., Wang, Y., Hong, N., Zhang, F., Xu, W., Wang, G., 2014. Hypovirulence of the phytopathogenic fungus *Botryosphaeria dothidea*: association with a coinfecting chrysovirus and a partitivirus. *Journal of Virology* 88, 7517-7527.

Wu, M.D., Zhang, L., Li, G.Q., Jiang, D.H., Hou, M.S., Huang, H.C. 2007. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 97, 1590-1599.

CAPÍTULO 1

Co-inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Pochonia chlamydosporia* em soja: absorção de macro e micronutrientes e controle de *Meloidogyne javanica*

RESUMO

A fixação biológica de N₂ pela bactéria *Bradyrhizobium japonicum* é a principal fonte desse nutriente para a cultura da soja no Brasil. Outro microrganismo, o fungo *Pochonia chlamydosporia*, também tem sido aplicado nas lavouras de soja, porém, visando o controle de nematoides, patógenos que causam grandes danos nessa cultura. Neste trabalho, foi realizada a co-inoculação de ambos os microrganismos a fim de avaliar a interação destes quanto à aquisição de nutrientes e controle do nematoide das galhas em plantas de soja. Na presença de *P. chlamydosporia*, observou-se aumento do número de nódulos da bactéria em raízes de soja. Quando o fungo foi aplicado isoladamente, foi capaz de aumentar a aquisição dos macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e dos micronutrientes (Cu, Fe, Zn, Mn e B) avaliados. O conteúdo de N foi equivalente a três vezes o observado no tratamento testemunha, quando apenas *P. chlamydosporia* foi aplicado. Houve também interação positiva entre os organismos quanto à aquisição de Fe pelas plantas. Houve redução no número de ovos de *M. javanica* apenas quando o fungo *P. chlamydosporia* estava presente. Dessa forma, observamos que *B. japonicum* e *P. chlamydosporia* são compatíveis e que a presença de um não prejudica a atividade do outro, além de interagirem positivamente aumentando a nodulação e contribuindo para a melhoria do estado nutricional das plantas.

Palavras-chave: controle biológico, fixação biológica de N₂ e nematoide de galhas.

CHAPTER 1

Co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Pochonia chlamydosporia* in soybean: nutrients uptake and control of *Meloidogyne javanica*

ABSTRACT

A biological fixation of N₂ by the bacteria *Bradyrhizobium japonicum* is a major source of nutrient for a soybean crop in Brazil. Another microorganism, the fungus *Pochonia chlamydosporia*, has also been applied in soybean crops however, in order to control nematodes, pathogens that cause great damages in this crop. In this work, a co-inoculation of both microorganisms was carried out. Along with an evaluation of their interaction in search of nutrients and control of gall nematodes in soybean plants. In the presence of *P. chlamydosporia*, it was observed that the number of nodules of the bacteria in soybean roots increased. When the fungus was applied alone, it was able to increase macronutrients (N, P, K, Ca, Mg and S) and micronutrients (Cu, Fe Zn, Mn and B). The N content was equivalent to three times that observed in the control treatment, when only *P. chlamydosporia* was applied. There was also positive interaction among the organisms regarding the acquisition of Fe by plants. There was a reduction in the number of *M. javanica* eggs only when the fungus *P. chlamydosporia* was present. Thus, we observed that *B. japonicum* and *P. chlamydosporia* are compatible and that a presence of one does not impair the activity of the other. Besides that interacting positively increasing nodulation and contributing to improve the nutritional status of plants.

Key words: biological control, biological fixation of N₂ and root-knot nematode.

1. Introdução

As doenças limitam a obtenção de altos rendimentos na cultura da soja, sejam elas ocasionadas por bactérias, fungos, vírus ou nematoides. São mais de 100 espécies de nematoides patogênicas a essa cultura, sendo que no Brasil os nematoides de maior importância são *Meloidogyne* spp., *Heterodera glycines*, *Pratylenchus brachyurus* e *Rotylenchulus reniformis* (Dias et al., 2010). A principal medida de controle para esse patógeno é a da exclusão, como o uso de material vegetal propagativo sadio e água livre de fitonematoides. Após a sua entrada na área de cultivo a erradicação torna-se praticamente impossível, dessa forma o produtor tem que conviver com o nematoide e lançar mão do manejo integrado para o controle desse fitopatógeno.

Inserido no manejo integrado, o controle biológico tem-se destacado, pois numerosos fungos têm sido testados com eficiência no controle de fitonematoides na cultura da soja (Bajaj et al., 2015; Luambano et al., 2015). Alguns desses antagonistas possuem a capacidade de colonizar as raízes, o que os tornam mais eficientes, em função dos nematoides geralmente estarem restritos à rizosfera.

O fungo *Pochonia chlamydosporia* é um parasita de ovos de nematoides muito eficiente no controle do nematoide de galhas e também se comporta como fungo endofítico de raízes (Podestá et al., 2009; Dallemole-Giaretta et al., 2012; Viggiano et al., 2014; Larriba et al., 2015). Além de apresentar esses atributos, esse organismo é capaz de solubilizar formas não lábeis de fósforo, o que leva ao aumento da aquisição desse nutriente pela planta. Há também relatos de melhoria na aquisição de outros nutrientes, como N e K. (Monteiro, 2013; Zavala-Gonzalez et al., 2015). Todas essas características, quando somadas à capacidade de colonizar e matar ovos, tornam esse fungo um excelente agente de controle biológico de nematoides.

A cultura da soja tem uma grande demanda por N e o seu principal fornecimento no Brasil é pela fixação biológica de N atmosférico, que auxilia no baixo custo de produção. A bactéria *Bradyrhizobium japonicum* é amplamente utilizada nas áreas brasileiras de sojicultura. Ela é capaz de reduzir o N_2 a NH_3 , absorvido pela planta, que é possível devido à presença da nitrogenase, um complexo enzimático presente apenas em procariotos (Downie 2014), entre os quais, bactérias que se associam à cultura da soja.

Vários nutrientes influenciam na fixação de N_2 dentre os quais o fósforo (P), cálcio (Ca), enxofre (S), molibdênio (Mo), ferro (Fe), boro (Bo) e cobalto (Co). Dessa forma, a planta necessita estar com a nutrição equilibrada para que os nódulos estejam em atividade e consigam, de forma eficiente, fixar o N_2 necessário para o desenvolvimento do vegetal.

A aplicação conjunta de *B. japonicum* e micorrizas aumenta o número de nódulos nas raízes e melhora o desenvolvimento das plantas. As micorrizas são capazes de promover crescimento vegetal e aumentar a absorção de nutrientes, disponibilizando-os também a bactéria fixadora de N. Da mesma forma, bactérias e fungos endofíticos podem melhorar a eficiência de bactérias fixadoras de N (Egamberdieva et al., 2015; Subramanian et al., 2015; Tan et al., 2015), porém não há informações sobre sua interação com *P. chlamydosporia*, que apesar de resultar na melhoria da nutrição de maneira similar aos fungos micorrízicos, é um fungo endofítico, saprofítico e com ação nematicida. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar se *B. japonicum* interfere *P. chlamydosporia* no controle biológico de *Meloidogyne javanica* e examinar se *P. chlamydosporia* influencia na fixação biológica de N pela bactéria bem como na aquisição de outros nutrientes pela planta de soja.

2. Material e métodos

2.1 Obtenção e preparo do inóculo de *Meloidogyne javanica*

Foi utilizado inóculo de *M. javanica* multiplicado em tomateiro, cultivado em casa-de-vegetação. Os ovos foram extraídos segundo a técnica de Hussey e Barker (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981).

2.2 Obtenção do inóculo de *Pochonia chlamydosporia* e do *Bradyrhizobium japonicum*

O isolado do fungo *P. chlamydosporia* (Pc-10) é o componente ativo do produto Rizotec, desenvolvido pela empresa Rizoflora Biotecnologia e registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA.

O inoculante utilizado é ingrediente ativo do GRAP NOD I composto por duas estirpes (SEMIA 5079 e SEMIA 5080).

2.3 Interação dos microrganismos em casa de vegetação

Vasos com capacidade de 2L foram preenchidos com substrato constituído de solo de barranco, areia e substrato comercial Tropstato, na proporção 1:1:1 (V:V:V) (Tabela Suplementar 1). Os tratamentos foram: Testemunha, *Pochonia chlamydosporia* (Pc), *Bradyrhizobium japonicum* (Bj) e *Pochonia chlamydosporia* + *Bradyrhizobium japonicum* (Pc+Bj). Todas as parcelas foram infestadas com 5.000 ovos de *Meloidogyne javanica*. Cada parcela recebeu uma semente de soja. Nas parcelas que receberam o fungo *P. chlamydosporia*, foram adicionados 5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo. A bactéria *B. japonicum* foi adicionada às sementes na dose de 100mL.50Kg⁻¹ de sementes, nos

tratamentos em que estava presente. Os vasos permaneceram em casa de vegetação durante 60 dias. Em seguida, foram avaliadas as variáveis: número de galhas, número de ovos, massa seca total, diâmetro do caule e altura da parte aérea. O delineamento adotado foi inteiramente casualizado com 6 repetições e o ensaio repetido em duas épocas. Na primeira época, a temperatura média foi de 30°C (mínima de 18°C e máxima de 45°C) na segunda época foi de 33°C (mínima de 20°C e máxima de 45°C).

2.4 Avaliação do estado nutricional das plantas

Instalou-se um ensaio com tratamentos semelhantes ao anterior, na ausência do nematoide de galhas, para avaliar o estado nutricional das plantas. Vasos com capacidade para 4L de solo (Tabela Suplementar 2) receberam os devidos tratamentos e permaneceram em casa de vegetação por 60 dias. Após esse período, foram avaliados os parâmetros: massa seca total, diâmetro do caule e altura da parte aérea das plantas e número de nódulos. O delineamento adotado foi inteiramente casualizado com seis repetições.

Amostras da parte aérea foram enviadas ao Laboratório de Análise de Tecido Vegetal da UFV e analisadas a fim de se determinar os teores de macronutrientes e micronutrientes.

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

descrito por Bremner (1965). O Boro foi determinado pelo método da azometina-H proposto por Wolf (1974).

2.5 Unidades formadoras de colônia no solo

Ao final de cada experimento, foi coletado 1g de substrato de cada vaso para determinação da população do fungo no solo, por meio da quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC). O extrato obtido foi plaqueado em meio semi-seletivo conforme descrito por Gaspard et al. (1990), perfazendo 6 repetições por tratamento.

2.6 Avaliações da associação do fungo com a rizosfera de soja

Plântulas de soja foram cultivadas em recipientes plásticos com capacidade para 30g de substrato esterilizado (Tropstrato HT Hortalças) e receberam os tratamentos: Testemunha, Pc, Bj e Pc+Bj. O fungo foi aplicado no substrato ($5000 \text{ clamidósporos.g}^{-1}$ substrato) e a bactéria aplicada na semente na dose de 100mL.50Kg^{-1} de sementes. O delinamento utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições e as plantas permaneceram em câmara de crescimento sob 26°C durante 45 dias. A irrigação das plantas foi realizada com água esterilizada, conforme a necessidade das plantas.

Após o cultivo, aproximadamente 0,5 g de sistema radicular, em fragmentos de 1-2 cm, foi diafanizado em KOH 10% (p:v) por 12 h. Foram então realizadas sucessivas lavagens desse material e acidificação com HCl 2% (p:v) por 5 min. Em seguida, foi realizada a coloração em azul de tripano 0,05 % em lactoglicerol (p:v), à 70 °C por 15 a 20 min. As raízes foram conservadas em lactoglicerol. A associação dos fungos com o sistema radicular foi avaliada visualmente por meio de microscópio ótico.

2.7 Análise estatística

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

3. Resultados

3.1) Interação de *P. chlamydosporia* com *B. japonicum* no controle do nematoide de galhas

A aplicação de *P. chlamydosporia* (tratamentos Pc e Pc+Bj) reduziu o número de ovos.g⁻¹ (Tabela 1) em ambos experimentos. Porém, quando *B. japonicum* foi aplicada isoladamente, não houve diferença em comparação ao tratamento testemunha. Em relação a variável número de galhas, não houve diferença entre os tratamentos em nenhum dos dois ensaios (Tabela 1).

Nas variáveis relacionadas ao desenvolvimento das plantas de soja, não foi possível observar diferença estatística entre os tratamentos para diâmetro e altura, nos dois ensaios, e massa da planta seca, no ensaio 1 (Tabela 2). Todavia, em relação a massa da planta seca do experimento 2, foi possível observar que as plantas de soja no tratamento Pc+Bj diferiram estatisticamente do tratamento testemunha, aumentando a biomassa em 48%.

O fungo se estabeleceu no solo e pode ser detectado 60 dias após a aplicação dos propágulos, como observado pela UFC (Figura 1). No segundo ensaio, foi possível notar um maior desenvolvimento do fungo nos dois tratamentos em que fora aplicado (Pc e Pc+Bj) e que a presença de *B. japonicum* não interferiu na colonização do solo pelo fungo em nenhuma das duas épocas.

3.2) Interação de *P. chlamydosporia* com *B. japonicum* na aquisição de nutrientes em soja

No ensaio de aquisição de nutrientes, a presença de *P. chlamydosporia* não prejudicou o estabelecimento de *B. japonicum*. A propósito, *Pochonia chlamydosporia* interagiu positivamente com *B. japonicum* aumentando em 148% o número de nódulos em raízes de soja (Figura 2). Além disso, a presença dos dois organismos não prejudicou a aquisição de nutrientes pelas plantas tanto em relação a macro quanto a micronutrientes (Figura 3A e 3B).

Os macronutrientes (N, K, P, Ca, Mg e S) e micronutrientes (Cu, Fe, Zn, Mn e B) tiveram o seu conteúdo aumentado quando foram utilizados os tratamentos Pc, Bj e Pc+Bj (Figura 3A). Todos os tratamentos diferiram da testemunha e, quando apenas o fungo *P. chlamydosporia* foi aplicado, o conteúdo de N, K, Ca e Mg na parte aérea de soja foi equivalente a três vezes o observado no tratamento testemunha.

O conteúdo de todos os micronutrientes aumentou nos tratamentos com o fungo e/ou com a bactéria, quando comparados ao tratamento testemunha, com destaque ao Ferro (Fe), que teve seu conteúdo aumentado em seis vezes em relação ao tratamento testemunha, quando na co-inoculação (Figura 3B).

Todos os microrganismos aplicados isoladamente ou em conjunto promoveram crescimento vegetal e não diferiram entre si estatisticamente, como observado nas variáveis massa da planta seca, diâmetro do caule e altura (Tabela 3 e Figura 4). Quando *B. japonicum* e *P. chlamydosporia* estavam juntos houve incremento de aproximadamente 205% de massa da planta seca. Em relação à altura das plantas, quando *P. chlamydosporia* estava presente, detectou-se maiores comprimentos da parte aérea, 67% (Pc) e 73% (Pc+Bj).

3.3) Unidades formadoras de colônia no solo e associação do fungo com a rizosfera de soja

Após 60 dias de cultivo de soja, o fungo *P. chlamydosporia* ainda estava presente no solo e os valores das unidades formadoras de colônias entre os tratamentos Pc+Bj e Pc foram similares (Figura 5). No ensaio de colonização da rizosfera pelo fungo, pode-se notar a capacidade de *P. chlamydosporia* se associar a raízes de soja na presença ou ausência de *B. japonicum* (Figura 6).

4. Discussão

4.1 Interação de *P. chlamydosporia* com *B. japonicum* no controle do nematoide das galhas

A utilização de *B. japonicum* não compromete a ação do fungo *P. chlamydosporia* no controle do nematoide de galhas, *M. javanica*. Porém, quando apenas a bactéria *B. japonicum* foi aplicada à semente, não houve redução do número de ovos do nematoide. Resultados semelhantes foram encontrados por Puertas et al. (2006), em que a bactéria foi compatível com o fungo *P. chlamydosporia*, e que por si só não foi capaz de reduzir o número de J2 no solo. Por outro lado, os resultados aqui encontrados diferem de alguns apresentados na literatura, que relatam que bactérias fixadoras de N atmosférico foram capazes de reduzir a população do nematoide das galhas (Siddiqui et al., 2001; Hallmann et al., 2001). Esse controle seria relacionado à capacidade de *B. japonicum* produzir metabólitos antimicrobianos, com ação também contra nematoides, além de possuir lecitinas que se ligam a carboidratos presentes na cutícula do nematoide (Lotan et al. 1975; Zuckerman 1983).

A variável número de galhas por planta nem sempre está diretamente relacionada ao número de ovos por planta. Nesse trabalho, quando foi quantificado o número de

galhas, não houve separação por tamanho, sendo que em uma mesma galha poderia ter um número maior de fêmeas e por consequência, maior número de ovos produzidos. Foi observado que as galhas presentes no tratamento testemunha (dados não mostrados) apresentavam tamanhos superiores as galhas dos tratamentos com o fungo *Pochonia chlamydosporia*, indicando que a não diferença estatística entre os tratamentos para a variável número de galhas deve-se pela pouca representatividade da método de quantificação utilizado.

4.2 Interação de *P. chlamydosporia* com *B. japonicum* na aquisição de nutrientes em soja

Os resultados obtidos da interação de *P. chlamydosporia* com *B. japonicum* na nutrição de soja podem estar associados à capacidade do fungo, que é um saprófita facultativo, em degradar compostos orgânicos e disponibilizar nutrientes a partir da matéria orgânica do solo. A capacidade de *P. chlamydosporia* em aumentar o conteúdo de nutrientes foi relatada por Monteiro (2013) em tomate. Além disso, esse fungo ainda produz AIA e solubiliza fósforo (Zavala-Gonzalez et al., 2015).

O Nitrogênio (N) é o nutriente mais requerido pela cultura da soja, e boa parte desse elemento é direcionada ao enchimento dos grãos, que possuem teor elevado de proteína. Em relação ao teor desse nutrientes em plantas de soja, detectou-se que todos os tratamentos diferiram da testemunha. O conteúdo de N foi equivalente a três vezes o observado no tratamento testemunha, quando apenas *P. chlamydosporia* foi aplicado. Observou-se ainda que a presença de *P. chlamydosporia* não prejudica a fixação biológica de N₂ pela bactéria,. Esse resultado corrobora um ensaio prévio no qual *P. chlamydosporia* aumentou a aquisição de N por plantas de tomate (Monteiro, 2013).

O Fósforo (P) é muito importante no processo de fixação biológica de Nitrogênio (FBN), porque o gasto de ATP para fixar N é muito alto. Dessa forma, quando a planta tem uma boa absorção de P auxilia na FBN, por esse motivo o uso de micorrizas em plantas leguminosas tem sido indicado pois aumentam a aquisição de P e ajudam *B. japonicum* na nodulação e subsequente fixação de N₂ (Wang et al., 2011).

Pochonia chlamydosporia, quando aplicado sozinho, aumentou o conteúdo de P em relação à testemunha, assim como já observado em trabalhos anteriores (Monteiro, 2013). Isso pode estar relacionado a sua capacidade de solubilizar P-inorgânico (Zavala-Gonzales et al., 2015).

Nos eventos iniciais de infecção da bactéria, o Ca é um elemento muito importante na formação da estrutura do nódulo, e em baixa concentração, a fixação de N₂ é reduzida (Banath et al., 1966). Quando a bactéria e o fungo foram aplicados, separadamente ou em conjunto, foram capazes de aumentar significativamente o conteúdo de Ca em relação ao tratamento testemunha.

O Fe é um elemento essencial tanto para cultura da soja quando para bactéria fixadora de N₂. Esse nutriente é componente de várias enzimas, tais como, nitrogenase, transportadores de elétron de ferredoxina, legumoglobina e várias hidrogenases. Por esse motivo, grande quantidade de Fe é necessária para a formação dos nódulos (Abdelmajid et al., 2008). Quando a bactéria e o fungo foram aplicados conjuntamente proporcionaram maior conteúdo de Fe, que foi diretamente proporcional ao aumento do número de nódulos.

Incremento do número de nódulos em decorrência da simbiose de *B. japonicum* com a bactéria *Stenotrophomonas rhizophila* foi relatado por Egamberdieva et al. (2015). Esse autores observaram que na presença de ambos os organismos houve aumento do número de nódulos em plantas de soja. Resultado similar ao que foi encontrado aqui, na

ação simbiótica de *P. chlamydosporia* e *B. japonicum*, que juntos aumentaram a nodulação em raízes de soja.

Raízes noduladas têm mostrado maior concentração de AIA que raízes não noduladas, o que indica que níveis de auxina em leguminosas são necessários para formação de nódulos (Theunis, 2005; Ghosh & Basu, 2006; Spaepen et al., 2007). Isso foi comprovado pela capacidade de *B. japonicum* mutante, que produz 30 vezes mais AIA, causar aumento na nodulação quando comparada com uma estirpe selvagem (Kaneshiro & Kwolek, 1985). *Pochonia chlamydosporia* também produz AIA (Zavala-Gonzalez et al., 2015), dessa forma, a presença de dois organismos produtores de hormônios importantes para o desenvolvimento vegetal pode ter auxiliado no incremento da massa das plantas secas.

4.3 Unidades formadoras de colônia no solo e associação do fungo com a rizosfera se soja

A concentração do fungo aplicada foi de 5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo, porém foi recuperado apenas 2080 e 2330 UFC.g⁻¹ de solo nos tratamentos Pc e Pc+Bj, respectivamente. Isso não aconteceu no ensaio de controle de *M. javanica*, em que detectou-se maiores concentrações do fungo no solo. O maior número de UFC na presença do nematoide está relacionado à presença de ovos e a liberação dos exsudatos radiculares, já que raízes infectadas liberam maior concentração de exsudatos radiculares que estimulam o crescimento do fungo (Bourne e Kerry, 1999).

A presença de clamidósporos de *P. chlamydosporia* associados às raízes de soja indica que a ação do fungo como promotor de crescimento vegetal e sua capacidade de aumentar conteúdo de nutrientes estão relacionadas ao crescimento do fungo na rizosfera de soja. Além disso, o fungo foi detectado em raízes com e sem a colonização de *B.*

japonicum, implicando que a presença da bactéria não prejudica o desenvolvimento do fungo na rizosfera de soja.

5. Conclusões

Além de *P. chlamydosporia* ser eficiente no controle de nematoides, mostramos aqui que esse fungo também promove crescimento da soja, aumenta a aquisição de nutrientes pela planta e ainda interage positivamente com *B. japonicum*, aumentando a nodulação e o conteúdo de Fe.

REFERÊNCIAS (normas segundo revista Crop Protection)

- Abdelmajid, K., Karim, B.H., Chedly, A., 2008. Symbiotic response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to iron deficiency. *Acta Physiol. Plant.* 30, 27–34.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC (1975) Official methods of analysis. 12.ed. Washington, 1094p.
- Banath, C.L., Greenwood, E.A.N., Loneragan, J.F., 1966. Effects of calcium deficiency on symbiotic nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 41, 760-763.
- Batista, A.C., Fonseca, O.M., 1965. *Pochonia humicola* n. gen. e n. sp., uma curiosa entidade fúngica dos solos do Nordeste do Brasil. *Publ. Inst. Micol. Recife* 462, 1-11.
- Bajaj, R., Hu, W., Huang, Y., Chen, S., Prasad, R., Varma, A., Bushley, K.E., 2015. The beneficial root endophyte *Piriformospora indica* reduces egg density of the soybean cyst nematode. *Bio. Control* 90, 193-199
- Boneti, J.I.S., Ferraz, S., 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* p.553.
- Bourne, J.M., Kerry, B.R., 1999. Effect of the host plant on the efficacy of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent of root-knot nematodes at different nematode densities^[11] and fungal application rates. *Soil Biol. Biochem.* 31, 75-84.
- Braga, J.M., Defelipo, B.V., 1974. Determinação espectrofotométrica de P em extratos de solo e material vegetal. *Revista Ceres* 21:73-85.
- Bremner, J.M., 1965. Total nitrogen. In: BLACK, C.A. (ed). *Methods of soil analysis*. Madison, American Society of Agronomy, 1149-1178.
- Dias, W.P., Garcia, A., Silva, J.F.V., Carneiro, G.E.S., 2010. Nematoides em soja; Identificação e Controle. Circular técnica, 76. Londrina, PR. P.1-8.
- Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L.G., Lopes, E.A., Pereira, O.L., Zooca, R.J.F., Ferraz, S., 2012. Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. *Crop Prot.* 42:102-107.
- Downie, J.A., 2014. Legume nodulation. *Curr. Biol.* 24,184-190.
- Egamberdieva, D., Jabborova, D., Berg, G., 2015. Synergistic interactions between *Bradyrhizobium japonicum* and the endophyte *Stenotrophomonas rhizophila* and their effects on growth, and nodulation of soybean under salt stress. *Plant Soil* 405: 35–45.
- Gaspard, J.T., Jaffee, B.A., Ferris, H., 1990. Association of *Verticillium chlamydosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with root-knot nematode infested soil. *J. Nematol* 22, 207-213.
- Ghosh, S., Basu, P.S., 2006. Production and metabolism of indole acetic acid in roots and root nodules of *Phaseolus mungo*. *Microbiol. Res.* 161, 362–366.

Hallmann, J., Quadts-Hallmann, A., Miller, W.G., Sikora, R.A., Lindow, S.E., 2001. Endophytic Colonization of Plants by the Biocontrol Agent *Rhizobium etli* G12 in Relation to *Meloidogyne incognita* Infection. *Phytopathology* 91, 415-422.

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

Johnson, C.M., Ulrich, A., 1959. Analytical methods for use in plants analyses. Los Angeles, University of California 766, 32-33.

Kaneshiro, T., Kwolek, W.F., 1985. Stimulated nodulation of soybeans by *Rhizobium japonicum* mutant (B-14075) that catabolizes the conversion of tryptophan to indol-3yl-acetic acid. *Plant Sci.* 42, 141-146.

Kerry, B.R., 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 38,423-441.

Larriba, E., Jaime, M.D.L.A., Nislow, 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. *J. Pl. Res.* 128, 665-678.

Lotan, R., Sharon, N., Mirelman, D., 1975. Interaction of wheat and gram agglutinin with bacterial cells and cell wall polymers. *Euro. J. Biochem.* 55, 257-262

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 Prot.* 71, 45–50.

Monteiro, T.S.A., 2013. Controle biológico do nematoide das galhas, *Meloidogyne javanica*, e promoção de crescimento vegetal com os fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia flagrans*. Dissertação de Mestrado (Departamento de Fitopatologia-UFV), 55p.

Podestá, G.S., Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L.G., Lopes, E.A., Ferraz, S., Zooca, R.J.F., 2009. Atividade nematófaga de *Pochonia chlamydosporia* em solo natural ou autoclavado sobre *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira* 33, 191-193.

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.

Scherer, H.W., Pacyna, S., Spoth, K.R., Schulz, M., 2008. Low levels of ferredoxin, ATP and leghemoglobin contribute to limited N₂ fixation of peas (*Pisum sativum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.) under S deficiency conditions. *Biol. Fertil. Soils* 44, 909-916.

Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant Signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 425-448.

- Siddiqui, I.A., Amer-Zareen, S., Shaukat, S., Javed-Zaki, M., 2001. Evaluation of Rhizobia for the Control of *Meloidogyne javanica* in *Vigna mungo*. Pak. J. Biol. Sci. 4,1124-1125.
- Subramanian, P., Kim, K., Krishnamoorthy, R., Sundaram, S., Sa, T. 2015. Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* MN110. Plant Growth Regul. 76, 327–332.
- Tan, K.Z., Radziah, O., Halimi, M.S., Khairuddin, A.R., Shamsuddin, Z.H., 2015. Assessment of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and rhizobia as multi-strain biofertilizer on growth and N₂ fixation of rice plant. Australian J. Crop Sci. 12, 1257-1264.
- Theunis, M., 2005. IAA biosynthesis in rhizobia and its potential role in symbiosis. PhD thesis, Universiteit Antwerpen.
- Varin, S., Cliquet, J-B., Personeni, E., Avice, J-C., Lemauiel-Lavenant, S., 2010. How does sulphur availability modify N acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.)? J. Exp. Bot. 61, 225–234.
- Viggiano, J.R., Freitas, L.G., Lopes, E.A., 2014. Use of *Pochonia chlamydosporia* to control *Meloidogyne javanica* in cucumber. Bio. Control 69, 72-77.
- Wang, X., Pan, Q., Chen, F., Yan, X., Liao, H., 2011. Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. Mycorrhiza 21, 173-181.
- Wolf, B., 1974. Improvements in the azomethine-H method for determination of boron. Comm. Soil Sci. Plant Anal., 5, 39-44.
- Zavala-Gonzalez, E.A., Escudero, N., Lopez-Moya, F., Aranda-Martinez, A., Exposito, A., Ricaño-Rodríguez, J., Naranjo-Ortiz, M.A., Ramírez-Lepe, M., Lopez-Llorca, L.V., 2015. Some isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* promote root growth and reduce flowering time of tomato. Ann. App. Biol. 166, 472-483.
- Zuckerman, B.M., 1983. Hypotheses and possibilities of intervention in nematode chemoresponses. J. Nematol. 15,173-182.

Tabela 1. Número de ovos e de galhas de *M. javanica*.g-1 raiz de soja nas épocas 1 e 2

Tratamentos	Ensaio 1		Ensaio 2	
	Ovos.g-1 raiz	Galhas.g-1 raiz	Ovos.g-1 raiz	Galhas.g-1 raiz
Testemunha	93013.6 b	1057.3 a	954289.5 b	1227.1 a
Pc	53302.5 a	947.1 a	557246.8 a	914.5 a
Bj	88777.3 b	945.3 a	988226.3 b	976.6 a
Pc+Bj	45221.8 a	906.5 a	582869.2 a	1081.6 a
CV	16.60%	18.09%	15.29%	21.84%

Médias Seguidas de mesma letra não diferem entre si quanto ao número de ovos de acordo com o teste Duncan a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Desenvolvimento de plantas de soja inoculadas com *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e *Bradyrhizobium japonicum* (Bj)

Tratamentos	Ensaio 1*			Ensaio 2*		
	Diâmetro	Massa da planta Seca	Altura	Diâmetro	Massa da planta Seca	Altura
Testemunha	0.43 a	12.76 a	121.7 a	0.61 a	14.75 b	126.7 a
Pc	0.42 a	13.47 a	127.8 a	0.58 a	17.29 ab	146.0 a
Bj	0.43 a	14.34 a	133.7 a	0.61 a	19.29 ab	131.7 a
Pc+Bj	0.42 a	13.95 a	128.8 a	0.58 a	21.80 a	128.0 a
CV	10.95%	8.99%	11.45%	7.76%	15.70%	11.46%

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

*presença de *M. javanica*.

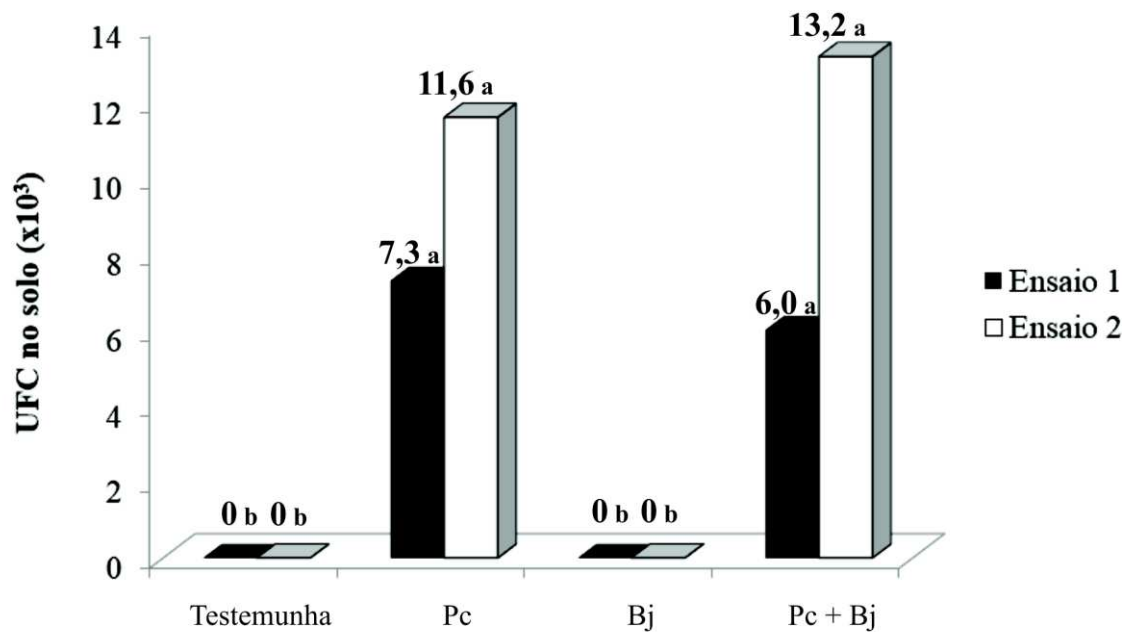


Figura 1. Unidades formadoras de colônia (UFC) do fungo *Pochonia chlamydosporia*, no solo. O fungo foi aplicado nas concentrações de 0 clamidósporos.g⁻¹ (Testemunha), 5.000 clamidósporos.g⁻¹ (Pc), 0 clamidósporos.g⁻¹ (Bj) e 5.000 clamidósporos.g⁻¹ (Pc+Bj), nos ensaios 1 e 2. Todos os tratamentos na presença do nematoide *Meloidogyne javanica*. Ensaios 1 e 2 foram analisados separadamente. Médias Seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste Duncan, a 5% de probabilidade.

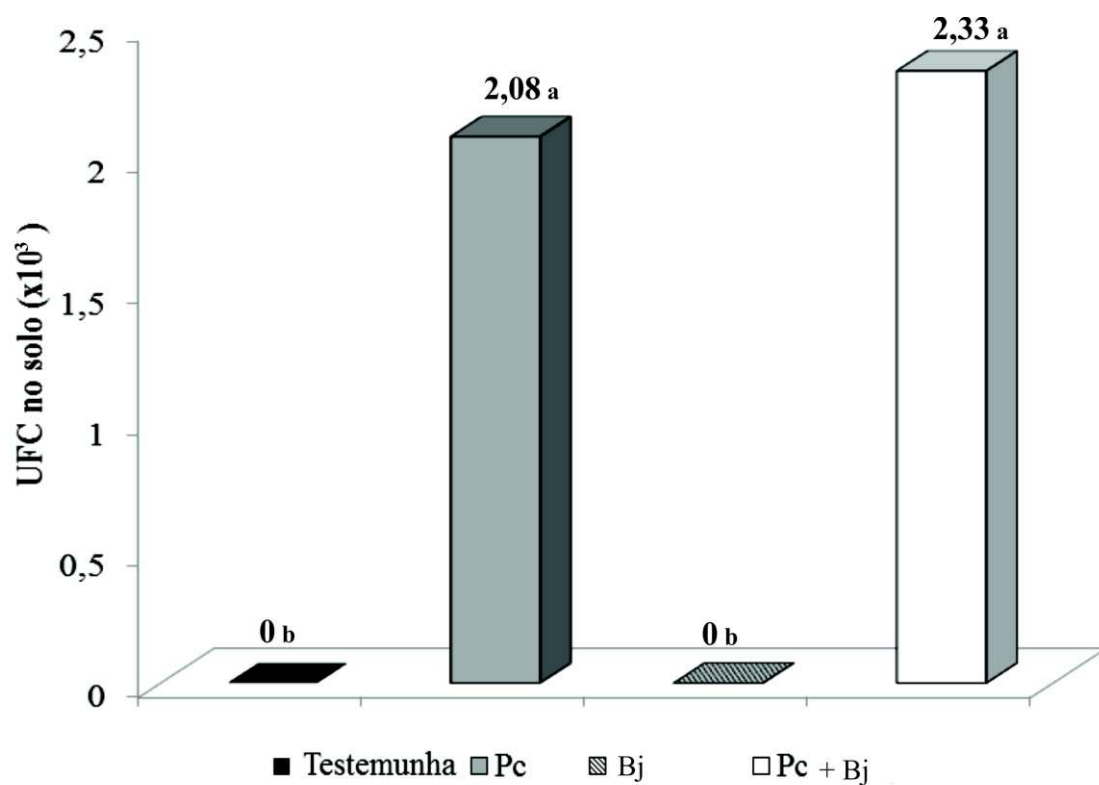


Figura 2. Unidades formadoras de colônia (UFC). O fungo foi aplicado nas concentrações de 0 clamidósporos.g⁻¹ (Testemunha), 5.000 clamidósporos.g⁻¹ (Pc), 0 clamidósporos.g⁻¹ (Bj) e 5.000 clamidósporos.g⁻¹ (Pc+Bj), na ausência do nematoide *M. javanica*. Médias Seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste Duncan, a 5% de probabilidade.

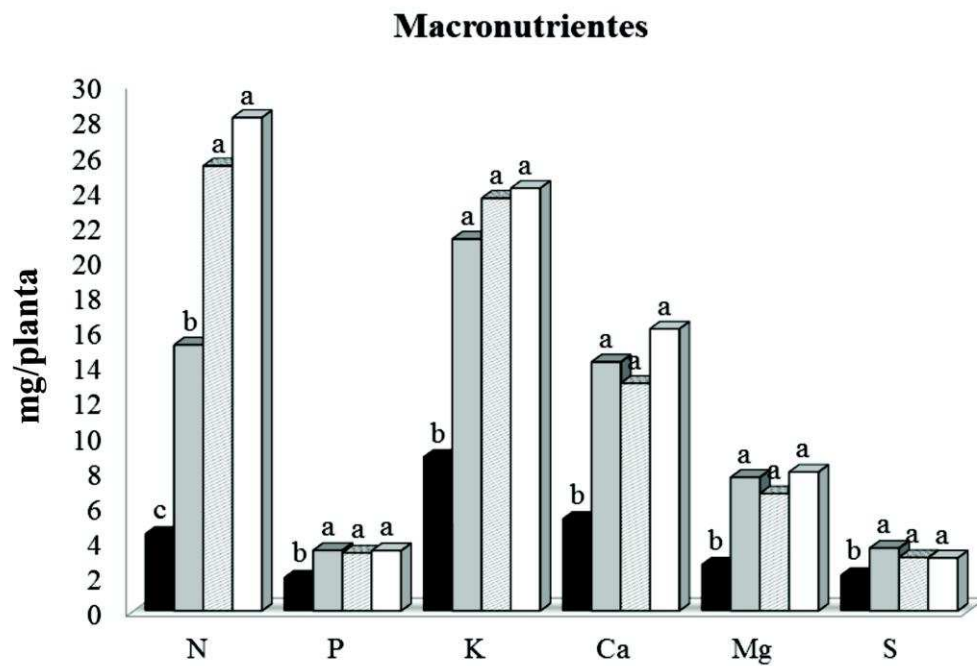
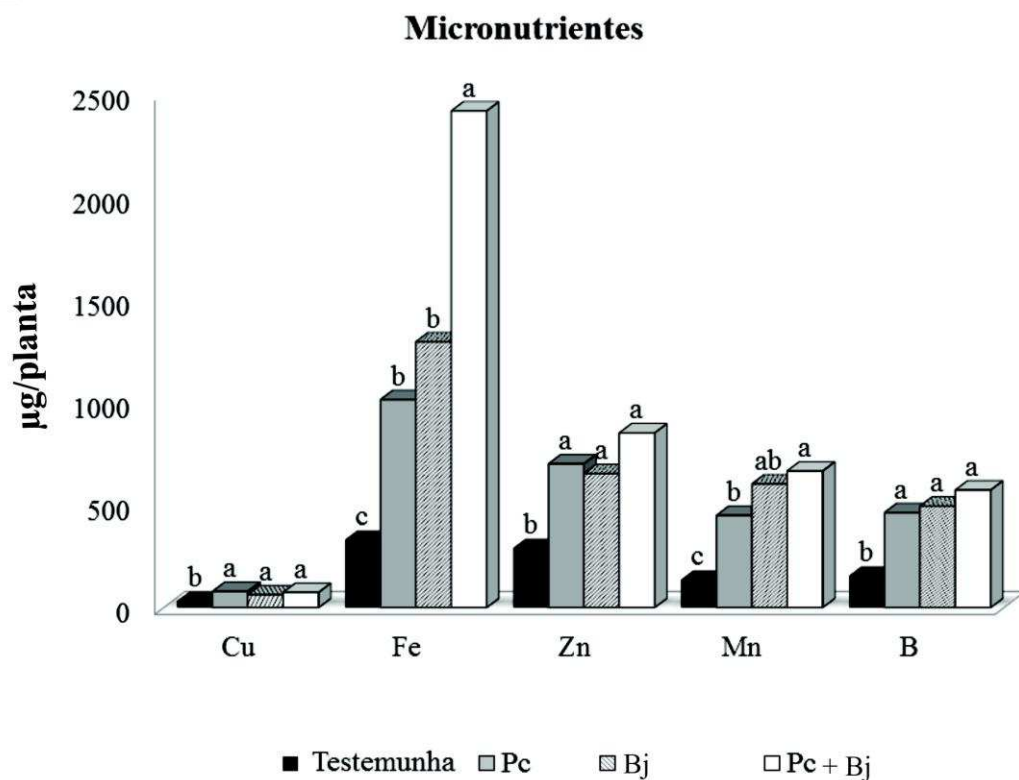
A**B**

Figura 3. Conteúdo de micronutrientes (A) e macronutrientes (B) por parte aérea de soja. Médias Seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan, a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Desenvolvimento de plantas de soja inoculadas com *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e *Bradyrhizobium japonicum* (Bj)*

Tratamentos	Diâmetro	Altura	Massa Seca Total
Testemunha	0.41 b	67.30 c	5.52 b
Pc	0.63 a	113.50 a	15.24 a
Bj	0.63 a	93.33 b	15.54 a
Pc+Bj	0.62 a	116.50 a	16.84 a
CV	9.33 %	16,78 %	16.6 %

Médias Seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan, 5% de probabilidade.
 *ausência de *M. javanica*.

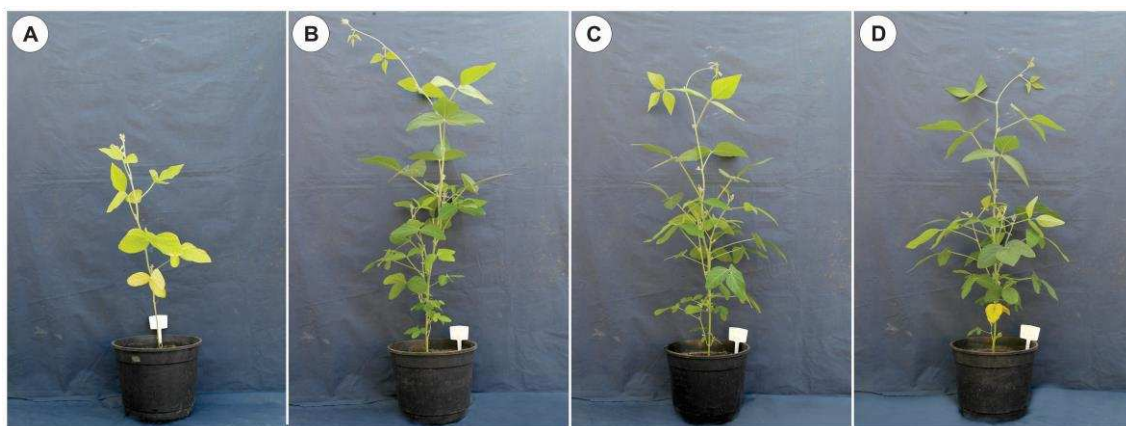


Figura 4. Plantas de soja representantes de cada tratamento: A) Testemunha, B) *P. chlamydosporia*, C) *B. japonicum* e D) *P. chlamydosporia* + *B. japonicum*.

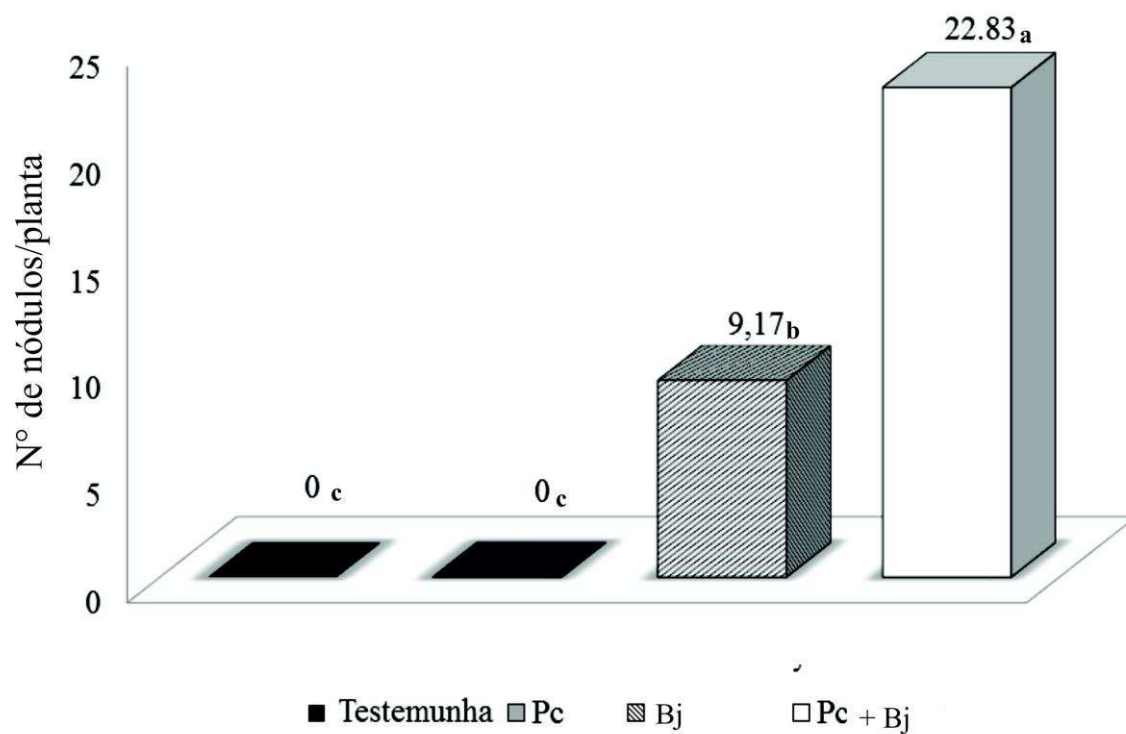


Figura 5. Número de nódulos por raiz de soja. O fungo foi aplicado nas concentrações de 0 clamidósporos.g⁻¹ (Testemunha), 5.000 clamidósporos.g⁻¹ (Pc), 0 clamidósporos.g⁻¹ (Bj) e 5.000 clamidósporos.g⁻¹ (Pc+Bj), na ausência do nematoide *M. javanica*. Médias Seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste Duncan, a 5% de probabilidade.

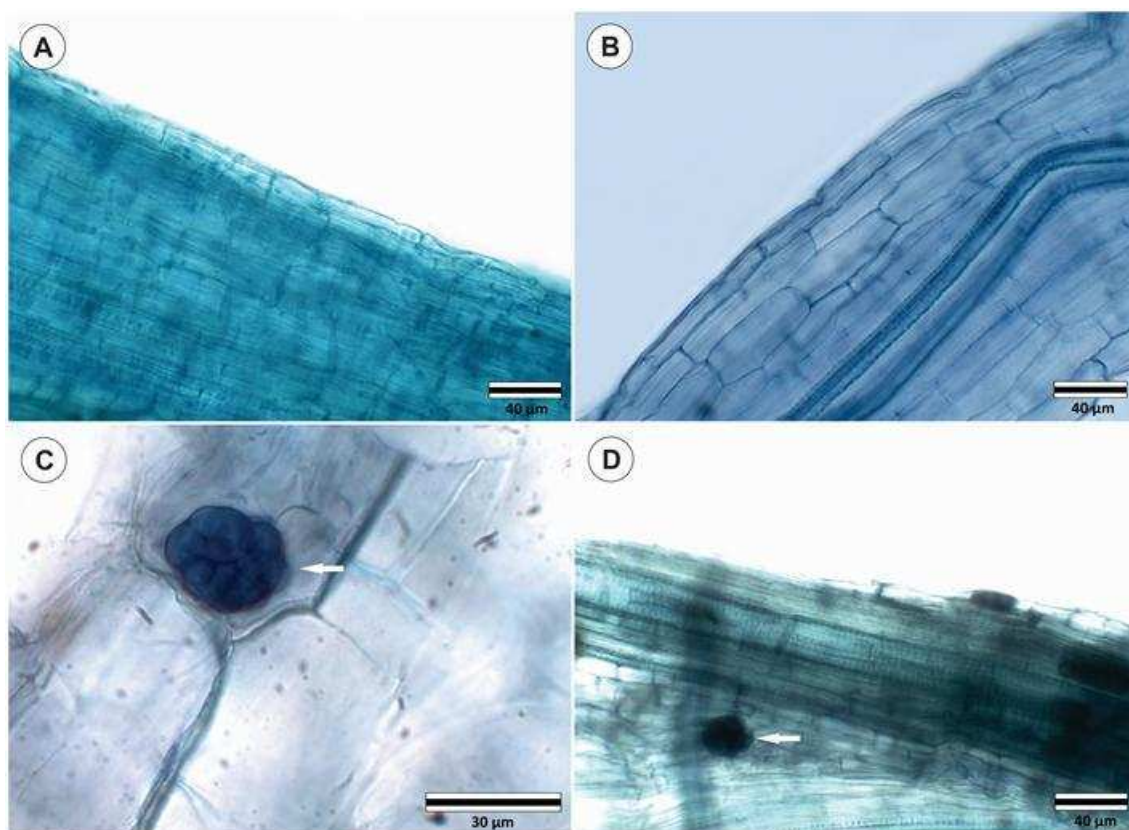


Figura 6. Raízes de soja tratadas com A: Testemunha; B: *B. japonicum*; C: *P. chlamydosporia* e D: *B. japonicum* e *P. chlamydosporia* e coradas com azul de tripano. Setas=clamidósporos do fungo *P. chlamydosporia*.

Tabela Suplementar 1. Caraterização química do solo usado no experimento em casa de vegetação para controle de nematoides¹

pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	MOS
H ₂ O	mg/dm ³		cmol _c /dm ³				dag/Kg
5.97	600.8	724	6.06	4.04	0,00	3.1	7.78

¹ pH em água usando relação solo/solução de 1:2.5; P e K - Mehlich-1 Extrator; Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺- KCl extrator (1.0 mol L⁻¹); H+Al – Extrator de Acetato de Calcio 0.5 mol L⁻¹ (pH 7.0); MOS- Matéria Orgânica do Solo.

Tabela Suplementar 2. Caracterização química do solo usado no experimento em casa de vegetação o para aquisição de nutrientes¹

pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al
H ₂ O	mg/dm ³		cmol _c /dm ³			
6.52	183.8	492	5.65	4.44	0,00	3.6

¹ pH em água usando relação solo/solução de 1:2.5; P e K - Mehlich-1 Extrator; Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺- KCl extrator (1.0 mol L⁻¹); H+Al – Extrator de Acetato de Calcio 0.5 mol L⁻¹ (pH 7.0).

CAPÍTULO 2

Interação entre os agentes de controle biológico de fitonematoides *Pochonia chlamydosporia* e *Pasteuria penetrans*

RESUMO

O controle biológico de nematoides tende a ser mais efetivo quando é realizado por mais de um agente, já que quando as condições não são adequadas para um pode ser para o outro, ou ainda os agentes de biocontrole podem ter ações complementares, como é o exemplo do fungo *Pochonia chlamydosporia* e *Pasteuria penetrans*. *Pochonia chlamydosporia* parasita ovos de nematoides e a bactéria *P. penetrans* previne a fêmea de produzir ovos e, quando em alta concentração no solo, impede a locomoção de juvenis do nematoide e sua penetração nas raízes. Foi avaliada a interação de *P. chlamydosporia* e *P. penetrans* quanto a capacidade de controlar o nematoide de galhas e investigada a capacidade da bactéria se desenvolver na presença do fungo. Detectou-se todos os estágios de desenvolvimento da bactéria no interior da fêmeas, na presença e ausência do fungo, bem como a associação do fungo às células gigantes induzidas por fêmeas parasitadas pela bactéria. Além disso, observou-se redução de ovos em 80% quando os dois agentes foram aplicados juntos. Dessa forma, *P. chlamydosporia* e *P. penetrans* podem ser utilizados juntos para o manejo do nematoide de galhas.

Palavras-chave: compatibilidade, *Meloidogyne javanica* e nematoide de galhas.

CHAPTER 2

Interaction between biological control agents of plant parasitic nematodes

Pochonia chlamydosporia and *Pasteuria penetrans*

ABSTRACT

The biological control of nematodes tends to be more effective when it is carried out by more than one agent. This is because when the conditions are not suitable for one, they can be suitable for the other. Furthermore, the biocontrol agents can complement the actions, for example the fungus *Pochonia chlamydosporia* and the bacteria *Pasteuria penetrans*. *Pochonia chlamydosporia* parasite eggs of nematodes and the bacterium *P. penetrans* prevents the production of eggs from the female. When its in high concentration into the soil it can prevent the locomotion of nematode juveniles and their penetration into the roots. The interaction between *P. chlamydosporia* and *P. penetrans* was evaluated regarding the capacity of control of root-knot nematode and about the capacity of the bacteria to develop in the presence of the fungus. All stages of bacterial development within females were detected in the presence and absence of the fungus. As well as an association of the fungus with the giant cells induced by females parasitized by the bacterium. In addition, egg reduction was observed at 80% when two agents were applied together. In this way, *P. chlamydosporia* and *P. penetrans* can be used to manage root-knot nematode.

Keywords: compatibility, *Meloidogyne javanica* and root-knot nematode.

1. Introdução

Nematoides estão entre os fitopatógenos que causam maiores perdas na agricultura (Perry et al., 2009). Eles são vermes que, em sua maioria, infectam raízes e podem sobreviver por anos no solo na ausência das plantas hospedeiras. Por estarem protegidos pelas barreiras físicas do solo e das raízes, os fitonematoides são praticamente impossíveis de serem erradicados. Para manter suas populações em níveis que não cheguem a causar perdas na produtividade, o equilíbrio entre esses patógenos e seus antagonistas deve ser restabelecido através do aumento de matéria orgânica do solo, do uso de plantas não hospedeiras e da introdução de agentes de controle biológico eficazes, de preferência em conjunto e inserido no contexto de manejo integrado.

O principal gênero de nematoide fitoparasita é o *Meloidogyne* conhecido como nematoides das galhas, devido a capacidade de parasitar uma diversidade de culturas bem como estar amplamente disseminado nas áreas agrícolas. Entre os agentes utilizados no biocontrole de nematoides desse gênero, destacam-se *Pasteuria penetrans* e o fungo *Pochonia chlamydosporia*.

Bactérias do gênero *Pasteuria* são gram-positivas e formadoras de esporos de resistência, reconhecidas por sua rusticidade e eficiência no controle dos nematoides da galhas. Dentre as seis espécies de *Pasteuria* descritas na literatura (*P. penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae*, *Pasteuria ramosa*, *Pasteuria usage* e *Pasteuria hartismeri*), *P. ramosa* é a única parasita de crustáceo. As demais são parasitas de nematoides e, geralmente, possuem alto grau e especificidade (Davies e Curtis, 2011). *Pasteuria penetrans* reduz a produção de ovos pela fêmea do nematoide das galhas e a penetração dos juvenis nas raízes (Davies et al., 2008). A infecção do nematoide pela bactéria se inicia com a adesão de endósporos na cutícula de juvenis de segundo estágio (J2) seguida da penetração na parede do corpo do nematoide após ele ter iniciado sua

alimentação nas células gigantes (Chen et al., 1997). *Pasteuria penetrans* tem sido associada com solos supressivos a nematoides, uma vez que a fêmea do nematoide tem a capacidade reprodutiva inviabilizada e nela só são produzidos endósporos da bactéria (Stirling, 1984; Brown et al., 1985; Bird, 1896; Bird e Brisbane, 1988; Minton e Sayre, 1989; Davies et al., 1991; Oostendorp et al., 1991; De Leij et al., 1992; Webelzahl-Fulton et al., 1996; Trudgill et al., 2000; Cetintas e Dickson, 2004). Após os endósporos serem liberados no solo, eles podem aderir na cutícula dos nematoides, que terão a locomoção comprometida ou infectarão as raízes iniciando o sítio de alimentação. Nas fêmeas, serão produzidos novos endósporos de *P. penetrans*, reduzindo significativamente a reprodução do nematoide na área de cultivo.

Pochonia chlamydosporia é um fungo de comportamento multitrófico, atuando como saprófita, endofítico e parasita de ovos e fêmeas de fitonematoides (Morgan-Jones et al., 1983; Lopez-Llorca et al., 2002). O fungo coloniza preferencialmente ovos recém formados a aqueles com juvenis desenvolvidos (Mogan-Jonas et al., 1983; Manzanilla-López et al., 2014). Os eventos envolvidos no parasitismo de ovos por *P. chlamydosporia* consistem em adesão, penetração e colonização. O fungo produz apressórios rudimentares, similares aos produzidos por fungos fitopatogênicos necrotróficos (Gayad, 1961), a exemplo de *Bipolaris sorokiniana* (Kumar et al., 2002). Essas estruturas são utilizadas para adesão e subsequente penetração de *P. chlamydosporia* no ovo de nematoides, sendo que não foram observadas no parasitismo de fêmeas.

Sabe-se que a bactéria *P. penetrans* se multiplica dentro de fêmeas de fitonematoides, que passam então a produzir endósporos da bactéria ao invés de seus próprios ovos. O fungo *P. chlamydosporia*, por sua vez, parasita os ovos e fêmeas. O fungo sendo colonizador de fêmeas e a bactéria sendo dependente da fêmea para a produção de endósporos, a aplicação conjunta poderia resultar no impedimento da

reprodução da bactéria. São poucas as informações a respeito dessa interação, apesar de existir relato de que a aplicação conjunta de ambos os microrganismos controlou *Meloidogyne incognita* (De Leij et al., 1992). Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi investigar a interação de *Pasteuria penetrans* e *Pochonia chlamydosporia* para o controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro, enfocando principalmente na capacidade da bactéria se desenvolver na presença do fungo.

2. Material e métodos

2.1 Multiplicação de *Pasteuria penetrans*

A bactéria *Pasteuria penetrans* (Pp) foi multiplicada em *Meloidogyne javanica* infectando tomateiro como descrito por Stirling e Wachtel (1980). As fêmeas foram extraídas manualmente das galhas radiculares com o auxílio de pinça e estilete, maceradas em tubo com auxílio de pistilo e os endósporos filtrados em malha de 21 µm e armazenados a -4°C.

2.2 Obtenção de *Pochonia chlamydosporia*

Para esse estudo utilizou-se o produto Rizotec, registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle de *Meloidogyne javanica*, que contém em sua formulação o isolado do fungo *P. chlamydosporia* (Pc-10) na concentração de $5,0 \times 10^7$ clamidósporos do fungo/g de solo.

2.3 Multiplicação do nematoide de galhas

O nematoide utilizado nesse ensaio foi o *M. javanica*, o qual foi multiplicado em raízes de tomateiros mantidos em casa de vegetação. Para a obtenção do ovos, as raízes foram retiradas do solo, lavadas e trituradas em liquidificador em baixa velocidade,

por 20 segundos, em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % de cloro ativo. A suspensão aquosa e o macerado de raiz foram vertidos sobre duas peneiras granulométricas sobrepostas [aberturas de malha de 0,074 mm (200 mesh) sobre uma de 0,025 mm (500 mesh)] e os ovos do nematoide, retidos na última peneira, foram recolhidos em um frasco tipo béquier.

2.4 Obtenção de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*

Os ovos extraídos das raízes de tomateiros foram colocados sobre papel filtro em contato com água dentro de funil de Baermann (1917) e deixados por 48 horas em incubadora a 24°C. Os J2 eclodidos foram colocados em água dentro de um Becker, que foi aerada recebendo influxo de ar com o auxílio de uma bombinha de aquário.

2.5 Interação dos agentes de biocontrole em casa de vegetação

Vasos com capacidade de 2L de substrato (caracterizado na Tabela Suplementar 1) receberam os seguintes tratamentos: Testemunha, *P. chlamydosporia* (Pc), *P. penetrans* (Pp) e *P. chlamydosporia* + *P. penetrans* (Pc+Pp). Mudanças de tomate Santa Clara de 21 dias de idade foram transplantadas nos vasos. Nos tratamentos compostos por Pc, foram aplicados 5.000 clamidósporos.g⁻¹ de substrato 15 dias antes da infestação com o nematoide. Todos os tratamentos receberam 150 J2 de *M. javanica*/vaso. Nos tratamentos em que a bactéria *P. penetrans* foi aplicada, os endósporos foram colocados em contato direto com os juvenis durante 24h em suspensão aquosa aerada, logo após foi quantificado o número de endósporos por juvenil até que foi atingida a média de 8 endósporos/juvenil do nematoide. A mesma aeração foi utilizada nos tratamentos sem a bactéria.

Os vasos permaneceram em casa de vegetação durante 60 dias e a temperatura ambiente média foi de 27,5°C (Mínima 15°C e Máxima: 40°C). As variáveis avaliadas foram: número de galhas, número de ovos, massa seca da planta, unidades formadoras de colônia (UFC) de Pc no solo e porcentagem de fêmeas com endósporos da bactéria. O delineamento inteiramente casualizado foi utilizado, com 7 repetições por tratamento. As plantas foram adubadas de acordo com a necessidade da cultura.

2.5.1 Avaliação do experimento

A) Número de galhas: quantificação do número de galhas em todo o sistema radicular.

B) Número de ovos: os ovos foram extraídos segundo a técnica de Boneti e Ferraz (1981).

C) Unidades formadoras de colônia: 1g de solo de cada vaso foi utilizado para determinação da população do fungo no solo. Após duas diluições em água esterilizada a suspensão de 200 µL foi plaqueada em meio semi-seletivo, conforme descrito por Gaspard et al. (1990), perfazendo 3 repetições por tratamento.

D) Porcentagem de fêmeas infectadas: para visualização da bactéria no interior das fêmeas, as fêmeas foram fixadas em formaldeído (37%), ácido acético e álcool etílico (50%) (FAA) na concentração 1:1:10 e as lâminas com as fêmeas infectadas foram montadas utilizando-se o corante azul de algodão em lactofenol. Foram coletadas 20 fêmeas por repetição e determinada a presença ou ausência da bactéria no seu interior.

2.5.2) Captura de imagens dos estágios de desenvolvimento da bactéria: imagens foram capturas de fêmeas infectadas com *P. penetrans* em microscópio estereoscópico.

2.5.3) Avaliações da associação dos fungos com a rizosfera de tomate: plantas de tomate foram cultivadas em vasos com capacidade para 500g de substrato (Tropstrato HT Hortaliças) esterilizado e recebeu os tratamentos: Testemunha, Pc, Past e Pc+Past. O

fungo foi aplicado no solo em quantidade para gerar a concentração no solo de 5000 clamidósporos.g⁻¹ e a bactéria colocada em contato com o J2 de *M. javanica*, como descrito em 2.4, com modificação para o número de juvenis aplicados no solo na quantidade de 100/ vaso. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições, e as plantas permaneceram em câmara de crescimento a 28°C por 60 dias. A irrigação das plantas foi realizada com água esterilizada, conforme a necessidade hídrica das plantas. Após o cultivo, procedeu-se a coloração do fungo no interior das raízes. Aproximadamente 0,5 g de sistema radicular, em fragmentos de 1-2 cm, foi diafanizado em KOH 10% (p:v) por 12 h. Foram então realizadas sucessivas lavagens desse material e acidificação com HCl 2% (p:v) por 5 min. Em seguida, foi realizada a coloração em azul de tripano 0,05 % em lactoglicerol (p:v), à 70 °C por 15 a 20 min. As raízes foram conservadas em lactoglicerol. A associação dos fungos com o sistema radicular foi avaliada visualmente e registrada por fotomicrografia de luz.

2.6 Análise estatística

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

3. Resultados

Os organismos aplicados separadamente ou em conjunto foram capazes de reduzir o número de ovos do nematoide de galhas (Tabela 1). O melhor tratamento foi Pc+Past, com redução do número de ovos em aproximadamente 80%, em relação a testemunha.

Todos os tratamentos reduziram o número de galhas em relação à testemunha e o tratamento que mais proporcionou redução dessa variável foi Pc+Past com diminuição de aproximadamente 66%.

Para Massa Seca Total de tomate, não foi possível notar diferença entre os tratamentos, porém em relação à altura de planta, todos os tratamentos diferiram da testemunha. Os tratamentos Pc e Pc+Past apresentaram os maiores valores de diâmetro do caule (Tabela 1).

A porcentagem de fêmeas infectadas foi de 86 e 81% para os tratamentos Past e Pc+Past (Figura 1A) sendo possível observar diferentes estruturas da bactéria e que a mesma conseguiu completar o seu ciclo de vida, mesmo na presença do fungo (Figura 2). Além disso, o fungo associou-se às raízes e às células gigantes induzidas por fêmeas infectadas por *P. penetrans* (Figura 3).

O fungo foi capaz de se estabelecer no solo e permanecer após 60 dias da inoculação, em médias semelhantes de UFC para os tratamentos Pc e Pc+Past, o que indica que a presença da bactéria não prejudicou o desenvolvimento do fungo no solo (Figura 1B).

4. Discussão

Em ambientes naturais, um patógeno, na maioria das vezes, não tem que lidar com apenas um antagonista de cada vez. A atividade de um complexo de microrganismos proporciona um balanço mais estável do que a atividade de microrganismos isoladamente (Cook and Baker, 1983). O efeito aditivo entre *P. chlamydosporia* e *P. penetrans* foi observado nesse trabalho, em que o tratamento Pc+Past foi superior aos demais com forte redução do número de galhas e de ovos de *M. javanica*.

O J2 infectado pela bactéria pode ter a sua capacidade de migração em direção a raiz alterada e morrer por inanição ou pode colonizar a raiz, induzir a formação das células gigantes que levam a origem das galhas. A fêmea infectada pela bactéria tem a sua capacidade reprodutiva inviabilizada, e todo o corpo do nematoide fica preenchido por endósporos de *P. penetrans* no final de seu ciclo de vida (Bird, 1896). Entretanto, sempre há J2 do nematoide que escapam à adesão e infecção pela bactéria, seja pela aleatoriedade da distribuição dos endósporos no solo e do movimento do J2 até a raiz, seja pelo não reconhecimento entre esporo bacteriano e cutícula do nematoide, que previne a adesão. Esses J2, mesmo em pequena proporção, acabam produzindo ovos e mantendo a população do nematoide, até em pequena taxa de crescimento. São sobre esses ovos que o fungo *P. chlamydosporia* vem auxiliar na redução da população do nematoide, reduzindo ainda mais os números de ovos e galhas no tratamento Pc+Past, em relação ao tratamento Pc apenas.

Além da ação direta sobre o parasitismo de ovos, o fungo *P. chlamydosporia* também é capaz de induzir resistência local da planta ao nematoide. As plantas de tomate desse ensaio foram colocadas em contato com o fungo 15 dias antes da infestação do solo com os juvenis, assim, o fungo pode ter induzido resistência da planta ao nematoide, como previamente relatado por Medeiros et al. (2015). Esses autores observaram que plantas colonizadas pelo fungo *P. chlamydosporia* têm elevadas atividades das enzimas polifenoloxidase e peroxidase evidenciando indução de resistência local em raízes de tomate e, associando a isso, redução do número de galhas de *M. javanica*. Resultado semelhante foi encontrado no tratamento Pc com redução de aproximadamente 45% no número de galhas. A atividade do fungo, provavelmente, foi uma soma dos efeitos de parasitismo de ovos e de fêmeas, com a da indução de resistência pelo fungo.

A temperatura ao longo do ensaio, com média de 27,5°C, foi favorável para a atividade do fungo, que tem como temperatura ideal em torno de 25°C (Manzanilla-Llopez et al., 2013). A temperatura alta pode reduzir a atividade enzimática de proteases importantes no parasitismo do *P. chlamydosporia*. Em condições de longos períodos com temperaturas superiores a 30°C o fungo também torna-se menos eficiente, pois os nematoides completam sua fase embrionária e eclodem do ovo muito rapidamente, escapando da colonização dos ovos pelo fungo (Kerry, 2000).

Apesar de *P. penetrans* produzir endósporos, semelhantemente a bactérias termófilas, ela é uma bactéria mesófila que se desenvolve bem em temperaturas entre 25-30°C (Stirling et al., 1990; Hatz e Dickson, 1992 ; Chen e Dickson, 1998; Javed et al., 2002). Essa bactéria é um parasita obrigatório e, por isso, muito dependente das mesmas condições ideais para o desenvolvimento do seu hospedeiro.

A bactéria foi capaz de completar o seu ciclo de vida em todos os tratamentos em que foi aplicada (Pp e Pc+Pp) durante os 60 dias de duração do ensaio. Isso indica que a presença do fungo no tratamento Pc+Pp não atrapalha o desenvolvimento dessa bactéria que é intimamente relacionada ao seu hospedeiro. Mesmo o fungo sendo capaz de colonizar as fêmeas, isso não impediu o desenvolvimento da bactéria no interior do nematoide e consequente sua produção de endósporos.

A colonização do solo pelo fungo foi avaliada por meio da contagem de UFC e os resultados indicam que a presença da bactéria não influenciou no desenvolvimento e multiplicação do fungo no solo. *Pochonia chlamydosporia* foi aplicado na concentração de 5.000 clamidósporos.g⁻¹ de solo e recuperado no decorrer dos 60 dias do ensaio nas concentrações de 7.071 clamidósporos.g⁻¹ no tratamento Pc e 6.857 clamidósporos.g⁻¹ no tratamento Pc+Past, dessa forma, além do fungo ter permanecido no solo ele ainda foi capaz de se multiplicar.

Em relação às variáveis da planta, não houve diferença entre os tratamentos em relação a massa seca total das plantas de tomate, entretanto, as plantas tratadas com o fungo tiveram maiores diâmetro e altura. *Pochonia chlamydosporia* apresenta um pronunciado efeito de promoção de crescimento vegetal, seja por produzir auxina, seja por explorar maior volume de solo e, ou, seja por solubilizar e aumentar sua absorção pelas raízes (Zavala-Gonzalez et al., 2015; Monteiro, 2013). O volume de substrato de 2000 mL por vaso talvez não permitiu que o fungo proporcionasse um pleno efeito de promoção de crescimento nesse experimento.

O uso combinado de *P. chlamydosporia* e de *P. penetrans* proporcionou controle do *M. incognita* (De Leij et al., 1992) reduzindo significativamente o número de ovos e de galhas. Os autores ainda observaram que a presença do fungo não afetou a infecção da fêmea pela bactéria. Resultados semelhantes foram encontrados nesse trabalho, porém esse é o primeiro registro da interação desses organismos no manejo de *M. javanica* e na reprodução da bactéria.

5. Conclusões

Pasteuria penetrans possui varias características interessantes para um agente de controle biológico, sobrevive muitos anos no solo devido a produção de endósporos de dormência, fácil dispersão e multiplicação. Essas características da bactéria adicionadas aos atributos gerados pelo fungo *P. chlamydosporia* como: endofítico de raízes, promotor de crescimento vegetal, parasita de ovos e fêmeas, produtor de estrutura de resistência (clamidósporos), fazem com que a utilização em conjunto facilite o manejo integrado de fitonematoides e em consequência, reduza os danos causados pelo nematoide de galhas.

REFERÊNCIAS de acordo com a revista *Scientia Horticulturae*

- Baermann, G., 1917. Eine einfache methode zur auffindung von *Ancylostomum* (Nematoden) larven in erdproben, Gennesk. Tijds. Ned. Ind. 57,131-137.
- Bird, A.F., (1986). The influence of the actinomycete, *Pasteuria penetrans*,^[1] on the host-parasite relationship of the plant-parasitic nematode, *Meloidogyne javanica*. *Parasitology* 93, 571-580.
- Bird, A.F., Brisbane, P.G., 1985. The influence of *Pasteuria penetrans* in field soils on the reproduction of root-knot nematodes. *Revue de Nematologie* 11, 75-81.
- Boneti, J.I.S., Ferraz, S., 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, p.553.
- Brown, S.M., Kepner, J.L., Smart, G.C., 1985. Increased crop yields following application of *Bacillus panetrans* in field plots with *Meloidogyne incognita*. *Soil Biology and Biochemistry* 17,483-486.
- Cetintas, R., Dickson, D.W., 2004. Persistence and suppressiveness of *Pasteuria penetrans* to *Meloidogyne arenaria* race 1. *Journal of Nematology* 36, 540-549.
- Chen, Z.X., Dickson, D.W., 1998. Review of *Pasteuria penetrans*: Biology, ecology, and biological control potential. *Journal of Nematology* 30, 313-340.
- Chen, Z.X., Dickson, D.W., Mitchell, D.J., 1997) Suppression mechanisms of *Meloidogyne arenaria* race 1 by *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology* 29, 1-8.
- Cook, R.J., Baker, K.F., 1983. Why biological control? In: Cook RJ, Baker KF (eds), *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. American Phytopathological Society, St Paul, MN, pp 1-29.
- Davies, K.G., Curtis, R.H.C., 2011. Cuticle surface coat of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 49, 135-156.
- Davies, K.G., Lair, V., Kerry, B.R. 1991. The motility, development and infection of *Meloidogyne incognita* encumbered with spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. *Revue de Nematologie* 14, 611-618.
- Davies, K.G., Rowe, J., Williamson, V.M., 2008. Cuticle variation amongst amphimictic and parthenogenetic populations of nematode (*Meloidogyne* spp.) as exhibited by a bacterial parasite (*Pasteuria penetrans*). *International Journal for Parasitology* 38, 851-860.
- De Leij, F., Davies, K.G., Kerry, B.R., 1992. The use of *Verticillium chlamydosporia* Goddard and *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr alone and in combination to control *Meloidogyne incognita* on tomato plants. *Fundamental and Applied Nematology* 15, 235-242.

Gaspard, J.T., Jaffee, B.A., Ferris, H., 1990. Association of *Verticillium chlamydosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with root-knot nematode infested soil. *Journal of Nematology* 22, 207-213.

Gayad, S.K., 1961. Production of symptoms of barley leaf spot disease by cultural filtrates of *Helminthosporium sativum*. *Nature* 191, 725-726.

Hatz, B., Dickson, D.W., 1992. Effect of temperature on attachment, development, and interactions of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology* 24, 512-521.

Javed, N., Khan, H.U., Hussain, Z., Ashfaq, M., 2002. Effect of temperature, soil pH, agitation intervals and soil types on the spore attachment of *Pasteuria penetrans* to root knot-nematodes, *Meloidogyne javanica*. *Pakistan Journal of Plant Pathology* 4, 66-67.

Kumar, J., Schafer, P., Huckelhoven, R., Langen, G., Baltruschat, H., Stein, E., Nagarajan, S., Kogel, K.H. 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Mol Pl Pathol* 3, 185-195.

Lopez-Llorca, L.V., Olivares-Bernabeu, C., Salinas, J., Jansson, H.B., Kolattukudy, P.E., 2002. Pre-penetration events in fungal parasitism of nematode eggs. *Mycological Research* 106, 499-506.

Manzanilla-López, R.H., Devonshire, J., Ward, E., Hirsch, P.R., 2014. A combined cryo-scanning electron microscopy/cryoplaning approach to study the infection of *Meloidogyne incognita* eggs by *Pochonia chlamydosporia*. *Nematology* 16, 1059-1067.

Manzanilla-López, R.H., Esteves, I., Finetti-Sialer, M.M., Hirsch, P.R., Ward, E., Devonshire, J., Hidalgo-Diaz, L. 2013. *Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endoparasitic nematodes. *J Nematology* 45, 1-7.

Medeiros, H.A., Resende, R.S., Ferreira, F.C., Freitas, L.G., Rodrigues, F.Á. 2015. Induction of resistance in tomato against *Meloidogyne javanica* by *Pochonia chlamydosporia*. *Nematoda* 2, e10015.

Minton, N.A., Sayre, R.M., 1989. Suppressive influence of *Pasteuria penetrans* in Georgia soils on reproduction of *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology* 21, 574-575.

Monteiro, T.S.A., 2013. Controle biológico do nematoide das galhas, *Meloidogyne javanica*, e promoção de crescimento vegetal com os fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia flagrans*. Dissertação de Mestrado (Departamento de Fitopatologia-UFV), 55p.

Morgan-Jones, G., White, J.F., Rodriguez-Kabana, R., 1983. Phytonematode pathology: ultrastructural studies. I. Parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs by *Verticillium chlamydosporium*. *Nematropica* 13, 245-260.

- Oostendorp, M., Dickson, D.W., Mitchell, D.J., 1991. Population development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology* 23, 58-64.
- Perry, R.N., Moens, M., Starr, J.L., 2009. Root-knot nematodes. CAB International, Wallingford, 531p.
- Stirling, G.R., 1984. Biological control of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. *Phytopathology* 74, 55-60.
- Stirling, G.R., Sharma, R.D., Perry, J., 1990. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in soil and its effects on infectivity. *Nematologica* 36, 246-252.
- Stirling, G.R., Wachtel, M.F., 1980. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologica* 26, 308-312.
- Trudgill DL, Bala G, Blok VC, Daudi A, Davies KG, Fargette M, Gowen SR, Madulu J D, Mateille T, Mwageni W, Netscher C, Phillips MS Abdoussalam S, Trivino GC, Voyoulallou E (2000) The importance of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and factors affecting the utility of *Pasteuria penetrans* as a biocontrol agent. *Nematology* 2, 823-845.
- Zavala-Gonzalez EA, Escudero N, Lopez-Moya F, Aranda-Martinez A, Exposito A, Ricaño-Rodríguez J, Naranjo-Ortiz MA, Ramírez-Lepe M, Lopez-Llorca LV (2015) Some isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* promote root growth and reduce flowering time of tomato. *Annals of Applied Biology* 166, 472-483.
- Weibelzahl-Fulton, E., Dickson, D.W., Whitty, E.B., 1996. Suppression of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* by *Pasteuria penetrans* in field soil. *Journal of Nematology* 28, 43-49.

Tabela 1. Número de ovos e galhas de *Meloidogyne javanica*.g⁻¹ de raiz, altura, diâmetro e massa seca total de plantas de tomate.

Tratamentos	Ovos.g ⁻¹ raiz	Galhas.g ⁻¹ raiz	Altura	Diâmetro	Massa Seca Total
Testemunha	15392.42 d	64.13714 d	143.86 b	0.70 b	34.61429 a
Pc	9015.86 c	34.94143 c	158.57 a	0.80 a	33.73429 a
Past	4927.01 b	45.45857 b	152.71 a	0.75 ab	34.38286 a
Pc+Past	2991.96 a	21.87429 a	153.43 a	0.79 a	35.50286 a
CV	20.18%	19.97%	4.40%	6.51%	3.48%

Pc: *Pochonia chlamydosporia*; Past: *Pasteuria penetrans* e Pc+Past: *P. chlamydosporia* com *P. penetrans*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan, a 5% de probabilidade.

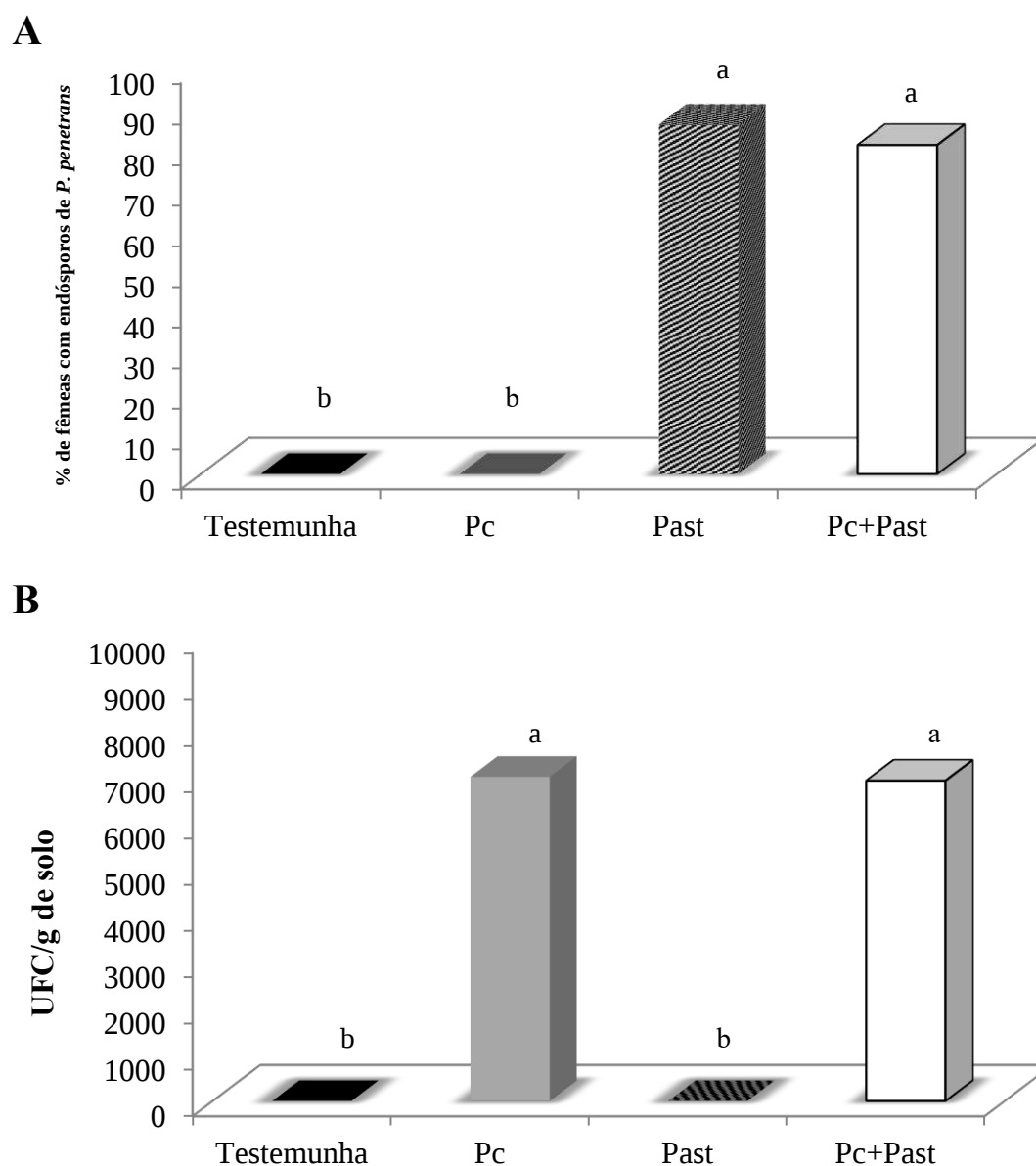


Figura 1. A: Porcentagem fêmeas de *M. javanica* infectadas por *P. penetrans*. **B:** Unidades formadoras de colônia (UFC) do fungo *Pochonia chlamydosporia*, no solo, aplicado nas concentrações de 0 clamidósporos.g⁻¹(Testemunha), 5.000 clamidósporos.g⁻¹ (Pc), 0 clamidósporos.g⁻¹ (Past) e 5.000 clamidósporos.g⁻¹ (Pc+Past). Medias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan, a 5% de probabilidade.

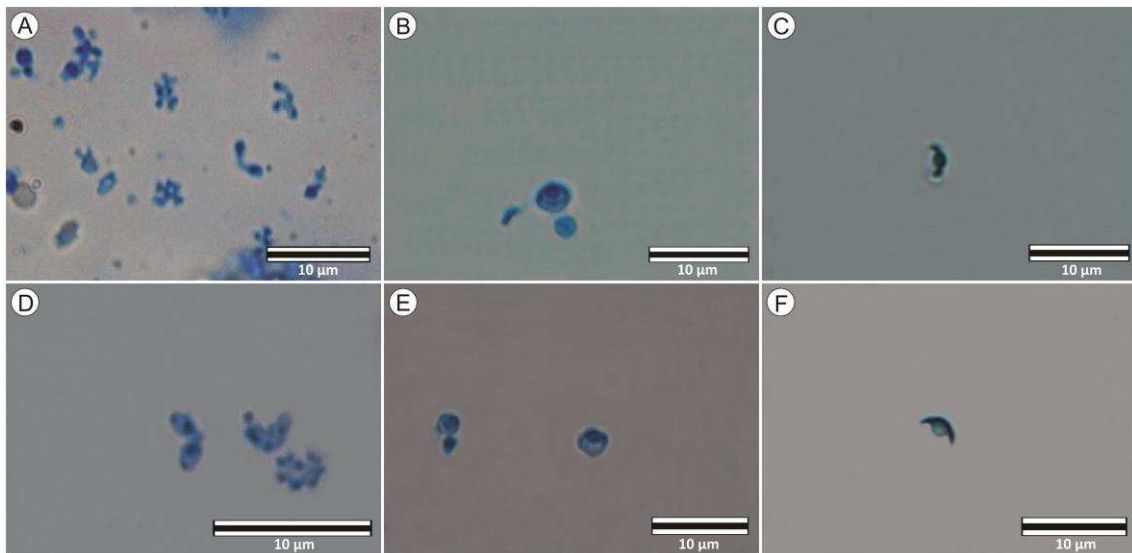


Figura 2. Estruturas da bactéria *P. penetrans* coradas com azul de algodão A-C: Tratamento apenas *P. penetrans*; D-F: Tratamento com *P. chlamydosporia* e *P. penetrans*. A, B, D e E: células em estágios vegetativos; C e F: Endósporos maduros.

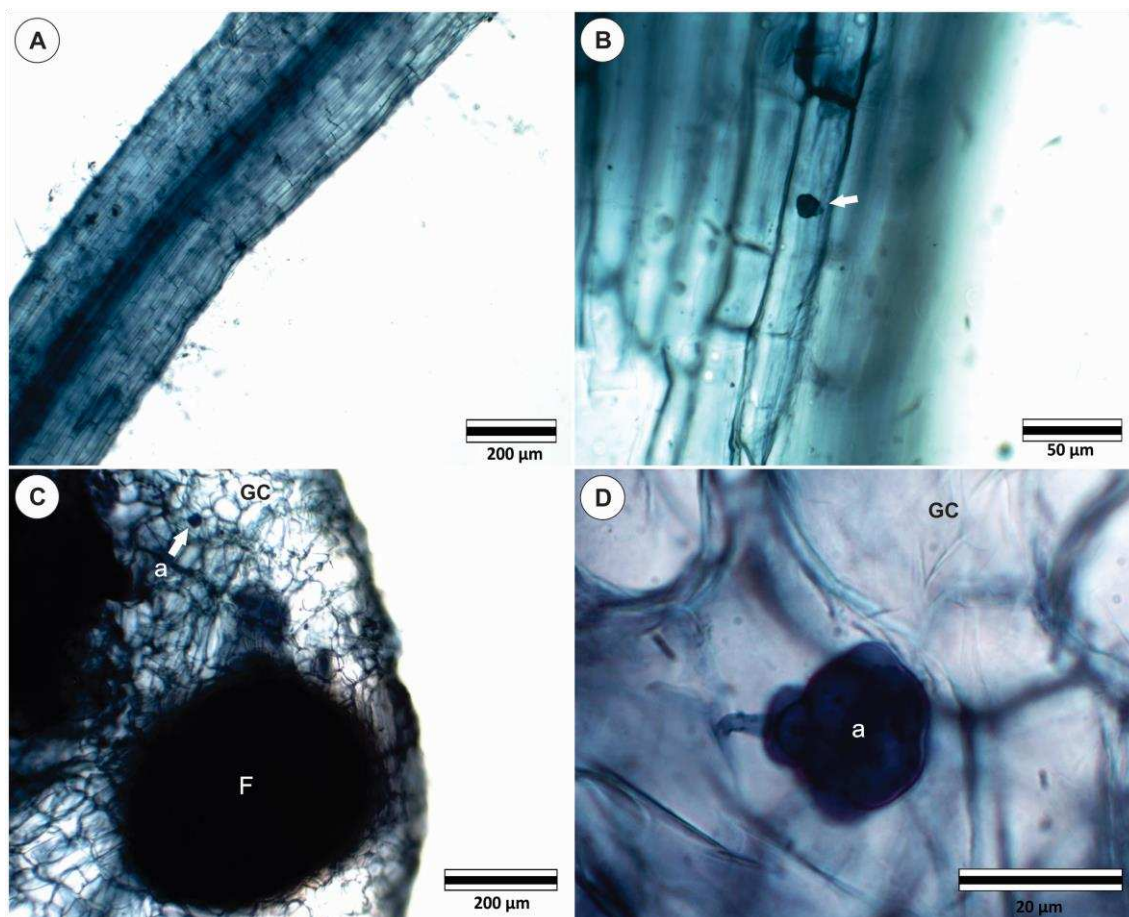


Figura 3. Raízes de tomateiro colonizadas por *P. chlamydosporia* e coradas com azul de tripano. A: Testemunha; B: *P. chlamydosporia*; C: *P. chlamydosporia*+*P. penetrans*. c': clamidósporo associado as células gigantes (GC); f: fêmea de *M. javanica* infectada por *P. penetrans*. Seta: clamidósporo.

Tabela Suplementar 1. Caraterização química do solo usado no experimento em casa de vegetação¹.

pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al
H ₂ O	mg/dm ³		cmol _c /dm ³			
6.52	183.8	492	5.65	4.44	0,00	3.6

¹ pH em água usando relação solo/solução de 1:2.5; P e K - Mehlich-1 Extrator; Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺- KCl extrator (1.0 mol L⁻¹); H+Al – Extrator de Acetato de Cálcio 0.5 mol L⁻¹ (pH 7.0); MOS- Matéria Orgânica do Solo.

CAPÍTULO 3

Caracterização molecular de dois micovírus co-infectando *Pochonia chlamydosporia*, agente de controle biológico de nematoides

RESUMO

Os micovírus têm sido descritos infectando fungos de diferentes grupos, podendo alterar características fenotípicas dos isolados infectados. O fungo *Pochonia chlamydosporia* é utilizado no controle de fitonematoides, entretanto trabalhos que descrevem a presença de vírus e seus possíveis efeitos em *P. chlamydosporia* são escassos. Neste trabalho, detectamos no isolado Pc-M4 de *P. chlamydosporia* a presença de dois vírus, um com genoma de RNA fita dupla (dsRNA) e outro de RNA fita simples sentido negativo (-ssRNA). Os micovírus encontrados foram provisoriamente denominados *Pochonia chlamydosporia chrysovirus 1* (PcCV1) e *Pochonia chlamydosporia negative-stranded RNA virus 1* (PcNSRV1). O genoma do PcCV1 é composto por 4 segmentos de dsRNA com tamanhos de 3,4, 2,9, 2,7 e 2,4 kb que codificam para RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), proteína capsidial (CP), protease 2 e protease 3, respectivamente. A análise das sequências do PcCV1 mostrou que ele apresenta identidade de sequências com membros da família *Chrysoviridae*, enquanto o PcNSRV1, com um único segmento de -ssRNA de 6,1 kb mostrou identidade com membros da família *Mymonaviridae*. Análise filogenética baseada na RdRp indica que PcCV1 é um novo micovírus pertencente a família *Chrysoviridae*. Ensaio biológico do isolado fúngico Pc-M4 revelou que este foi capaz de parasitar ovos, produzir metabólitos e proteases letais aos juvenis e reduzir a reprodução do nematoide de galhas *M. javanica*. Este é o primeiro relato de micovírus infectando o fungo *P. chlamydosporia*.

Palavras-chave: controle biológico, infecção mista, micovirose e nematoides.

CHAPTER 3

Molecular characterization of two mycovirus co-infecting *Pochonia chlamydosporia*, agent of biological control of nematodes

ABSTRACT

The mycoviruses have been described as infecting fungi of different groups, and can modify phenotypic characteristics of the infected isolates. The fungus *Pochonia chlamydosporia* is used to control plant parasitic nematodes, however studies that describe the presence of viruses and their possible effects on *P. chlamydosporia* are scarce. In this work we detected the presence of two viruses, isolated in Pc-M4 of *P. chlamydosporia*, one with a double-stranded RNA genome (dsRNA) and another with RNA single-stranded negative sense (-ssRNA). The mycoviruses were provisionally named *Pochonia chlamydosporia* chrysovirus 1 (PcCV1) and *Pochonia chlamydosporia* negative-stranded RNA virus 1 (PcNSRV1). The PcCV1 genome consists of 4 dsRNA segments with sizes 3.4, 2.9, 2.7 and 2.4 kb that encode RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), capsid protein (CP), protease 2 and protease 3 respectively. Analysis of PcCV1 sequences show that it exhibits sequence identity with members of the *Chrysoviridae* family, while PcNSRV1, with a single segment of the 6.1 kb -ssRNA, shows identity with members of the *Mymonaviridae* family. Phylogenetic analysis based on RdRp indicates that PcCV1 is a new mycovirus belonging to the family *Chrysoviridae*. Biological analysis of the fungal isolate Pc-M4 revealed that it was able to parasitize eggs, produce metabolites and lethal proteases to juveniles and reduce reproduction of *M. javanica*. This is the first report of mycovirus infecting the fungus *P. chlamydosporia*.

Keywords: biological control, mix infection, mycoviroses, nematode.

1. Introdução

Pochonia chlamydosporia é um fungo utilizado no controle biológico de fitonematoides por possuir atributos interessantes, como bom parasita de ovos e de fêmeas e facilidade de cultivo *in vitro*. Porém, diferentes isolados da mesma espécie de *P. chlamydosporia* possuem comportamentos distintos no biocontrole de fitonematoides, como observado por Dallemole-Giaretta et al (2013). Vários são os fatores que influenciam a eficiência do agente de controle biológico. Desde as condições de crescimento e armazenamento do antagonista até a interação com outros organismos. Interações de *P. chlamydosporia* com bactérias e fungos no manejo de fitonematoides tem sido estudadas (De Leij et al., 1992; Puertas et al., 2006), entretanto a presença de vírus em isolados de fungos dessa espécie ainda não foi explorada.

Vírus podem infectar fungos e causar alterações fisiológicas nos seus hospedeiros. O primeiro relato foi em 1962 em *Agaricus bisporus*, cogumelos cultivados, causando má formação e má desenvolvimento dos corpos de frutificação, levando a perdas na produtividade de cogumelos. Muitos micovírus descritos permanece latente e não induzem sintomas (Person et al., 2009), outros podem interagir de forma benéfica, como por exemplo os vírus presentes nos fungos endofíticos *Curcularia protuberate* e *Epichloë festucae* que possibilitam a sobrevivência de espécies vegetais colonizadas pelos fungos infectados em condições de altas temperaturas (Zabalgogezcoa et al., 1998; Márquez et al., 2007). Porém, alguns micovírus podem prejudicar o desempenho do seu hospedeiro, fazendo com que os fungos infectados apresentem o fenótipo de hipovirulência. A utilização desses fungos infectados por vírus que induzem a hipovirulência tem sido bem explorada no controle biológico de fungos patogênicos de plantas (Wu et al., 2007; Wang et al., 2014).

Micovírus que causam hipovirulência são bem apreciados no controle de fungos parasitas de plantas, porém aqueles que infectam agentes de controle biológico e prejudicam a sua ação não desejados, já que podem reduzir o antagonismo do agente, bem como a eficiência no controle. Dessa forma, é muito importante a detecção desses organismos em agentes de biocontrole a fim de evitar a utilização de estirpes hipovirulentas.

Metarhizium anisopliae é um fungo entomopatogênico usado no biocontrole de insetos e a ele foi associado um micovírus de dsRNA. Aos isolados infectados com a estirpe do micovírus foram relacionadas características como: alteração morfológica na colônia e na produção de esporos, sugerindo assim que genes virais interferem em diferentes características fenotípicas do fungo infectado. Além disso, foi realizado um estudo sobre secreção de endoquitinase, enzima importante no parasitismo desse biocontrolador, e isolados livres do vírus obtiveram uma maior secreção de endoquitinase quando comparados com isolados infectados pelo vírus, o que pode comprometer a ação desse agente (de la Paz Gimenez-Pecchi et al., 2002). O entendimento dessas interações é muito importante para a seleção do agente de controle biológico.

Na maioria dos relatos, as micoviruses são causadas por um único isolado viral, porém infecção com dois ou mais micovírus é comum ocorrer, gerando a chamada co-infecção ou infecção mista. Recentemente, foi relatado a presença de três vírus infectando o fungo fitopatogênico *Sclerotinia nivalis*, que, segundo os autores, não tem ação aparente no crescimento da colônia e no parasitismo do patógeno (Wu et al., 2016). Em outra infecção mista por dois micovírus (megabirnavírus e partitivírus) no fungo endofítico *Rosellinia necatrix*, foi observado o fenômeno de hipovirulência causado por um megabirnavírus somente quando este estava na presença do partitivírus (Sasaki et al., 2016). A compreensão das interações dos micovírus com o seus hospedeiros e a

descoberta de novos micovírus têm sido foco de muitas investigações e deve ser cada vez melhor exploradas. Nesse estudo, micovírus co-infectando *Pochonia chlamydosporia* foram caracterizados e analisadas as características do fungo hospedeiro.

2. Material e Métodos

2.1 Cultivo e screening dos isolados fúngicos

Dezoito isolados de *Pochonia chlamydosporia* foram avaliados quanto a presença de micovirus com genoma de dsRNA (Tabela Suplementar 1). Os fungos foram cultivados em meio BD por 15 dias a 26°C, sob agitação e mantidos estocados a 4°C.

2.2 Extração de dsRNA

Micélio fúngico foi submetido a extração de dsRNA de acordo com a metodologia descrita por Morris & Dodds (1979). Após a extração de dsRNA, as amostras foram tratadas com DNase (Promega) e S1nuclease (Promega), para remover resíduos de DNA e ssRNA. Em seguida, as amostras de dsRNA foram analisadas em corrida por eletroforese em gel de agarose 0.8% (w/v) e coradas com brometo de etídio, conforme técnica padrão (Sambrook et al., 2001).

2.3 Sequenciamento do genoma dos micovirus e montagem do genoma

A) Sequenciamento, de novo assembly e análises de bioinformática

O sequenciamento no Illumina HiSeq produziu 25.045.168 leituras pareadas (*paired reads*) contendo sequências de 100nt. As sequências das *reads* foram analisadas usando o software CLC Genomics Workbench versão 6.5.1 (CLCbio). As *reads* foram trimadas usando o filtro de qualidade Q30 (excluindo as bases sequenciadas com probabilidade de erro maior do que 0,001), os nucleotídeos ambíguos foram removidos e

as sequências menores que 50nt foram excluídas do conjunto de dados. Após esse processamento, 20.204.102 sequências foram selecionadas (80,67%).

Para a análise do transcriptoma do fungo, as *reads* selecionadas foram alinhadas nas sequências do genoma nuclear de dois isolados do fungo *Pochonia chlamydosporia*, isolados 170 (Código de acesso no GenBank: LSBJ01000000) e 123 (AOSW01000000). Em seguida, as *reads* não mapeadas foram alinhadas no genoma mitocondrial do *P. chlamydosporia* isolado 170 (KF479445), como detalhado no tópico 2.4-B.

As sequências das 14.349.461 reads que não alinharam nos genomas de referência foram selecionadas e montadas em *contigs* usando o algoritmo de De Novo Assembly do CLC Genomics Workbench, sendo obtidos 1.898 *contigs* com tamanhos entre 500 e 6.175nt.

As Open Reading Frames (ORFs) presentes nas sequências dos contigs foram preditas usando a ferramenta Find Open Reading Frames do CLC Genomics Workbench e a ferramenta ORFfinder do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). As ORFs identificadas foram funcionalmente anotadas por meio de pesquisas de similaridade usando o software BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Nessa análise, as sequências dos contigs e das proteínas codificadas pelas ORFs foram alinhadas com as sequências disponíveis no GenBank (NCBI, 2016) e UniProt (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2014).

A análise dos motivos conservados foi realizada em CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>) e Uniprot (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2014).

B) Análise filogenética

Alinhamentos múltiplos de sequências de aminoácidos dos isolados PcCV1 e outros membros das famílias *Chrysoviridae*, *Totiviridae* e *Partiviridae*, disponíveis em banco de dados, e de PcNSRV1 com membros da Ordem *Mononegavirales* disponíveis no GenBank foram gerados usando ClustalW. Árvore filogenética foi construída usando máxima verossimilhança com valores de bootstrap de 1000 repetições e visualizada usando o software MEGA 7.

Matriz de identidade de sequências foi gerada por meio do relacionamento par a par entre sequências de aminoácidos de RdRp de membros das famílias *Totiviridae*, *Chrysoviridae* e *Partitiviridae* disponíveis no GenBank com PcCV1 e membros da Ordem *Mononegavirales* também disponíveis no banco de dados com PcNSRV1. Utilizou-se o programa SDT v. 1.0 (Muhire et al., 2013).

Para confecção da árvore filogenética e da matriz de identidade foram utilizados membros da Tabela Suplementar 2 e 3.

2.4 Caracterização morfológica, molecular e biológica do isolado fúngico

A) Morfologia

Discos de micélio do fungo foram plaqueados em meio BDA, mantidos a 26°C por 15 dias e avaliados, visualmente, quanto a pigmentação da colônia. O comprimento e a largura dos conídios e dos clamidósporos e comprimento das fiálides foram mensurados com auxílio de microscópio ótico.

B) Caracterização Molecular

As sequências das *reads* de Pc-M4 foram mapeadas no genoma mitocondrial do isolado 170 (Código de acesso no GenBank: KF479445) e gerado o gráfico de cobertura, que indica a variação do número de sequências alinhadas ao longo do genoma. A

representação esquemática do genoma foi obtida usando o software CLC Genomics Workbench versão 6.5.1.

Os genes ribossomais do isolado Pc-M4 foram alinhados com genes do isolado 170 de *P.chlamydosporia* disponíveis no GenBank.

C) Parasitismo de ovos

Parasitismo de ovos *in vitro*

Os ovos de *M. javanica* foram extraídos de raízes de tomate pela técnica de Boneti e Ferraz (1891) e submetidos à assepsia por meio de três lavagens de 20 minutos em suspensão de Cloranfenicol 300ppm + Ampicilina 200ppm e duas lavagens em água estéril. Entre uma lavagem e outra, os tubos foram centrifugados a 1750 rpm para concentrar os ovos no fundo. Todo o procedimento foi realizado em tubos de eppendorf, dentro da câmara de fluxo laminar, com exceção da centrifugação, na qual os tubos foram fechados. O fungo foi repicado para o centro de placas de petri contendo meio ágar-água (AA 2%). Após quatro dias, os ovos desinfestados foram colocados à distância de 1cm da borda da placa. As placas foram mantidas em BOD por 10 dias a 26°C. Placas com AA e apenas os ovos foram utilizadas como tratamento testemunha. Posteriormente, imagens dos ovos foram capturadas em Microscópio ótico.

D) Ação de proteases extracelulares e metabólitos sobre juvenis

D.1) Produção, extração, atividade e caracterização de proteases do isolado Pc-M4

Produção de proteases: discos de micélio do isolado Pc-M4 foram repicados para placas de Petri contendo o meio BDA e armazenadas por sete dias. Desse crescimento micelial, 6 discos foram transferidos para frascos previamente autoclavados com meio sólido contendo 5g de farelo trigo lavado e uma solução composta por K_2HPO_4

(5,0 g/L), MgSO_4 (0,10 g/L) e extrato de levedura (10 g/L), para produção de proteases. Os recipientes foram mantidos em BOD à 28°C por 12 dias (Gouveia et al., 2016).

Extração das enzimas: após o cultivo do fungo foi feito a extração da enzima acrescentando 40 mL de água destilada sob agitação por 1h a 180 RPM a 25°C. Em seguida, o líquido foi filtrado em bomba a vácuo em filtro de Whatman 1. Após essa primeira filtragem, a suspensão foi centrifugada por 30min em 10.000 RPM. O sobrenadante foi filtrado em malha de 0,22 μm obtendo o extrato bruto utilizado nas análises posteriores (Gouveia et al., 2016).

Atividade proteolítica: avaliou a atividade proteolítica dos isolados pelo método caseinolítico. Para o preparo da reação utilizou: 50 μl de extrato bruto ou enzima parcialmente purificada, 450 μl de tampão citrato fosfato 60 mM pH 6,0 e 500 μl de caseína 1% pH 7,0 que permaneceu 15 minutos em banho termostático. Interrompeu-se a reação com 1 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Em seguida, centrifugou-se o meio preparado a 10.000g por 10 minutos e selecionou-se o sobrenadante para a determinação da absorvância em espectrofotômetro a 280 nm. Construiu-se uma curva padrão de tirosina para a quantificação da atividade enzimática a qual definiu-se uma unidade de protease como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μg de tirosina por minuto nas condições do ensaio (Malathi e Chakraborty, 1991).

Ultrafiltração: para a concentração do extrato bruto de Pc-M4 dispôs do processo de ultrafiltração, com uma membrana de poliétersulfona (Milipore) de porosidade 10 kDa (Benito et al., 2002; Tunlid et al., 1994).

Cromatografia de troca iônica: empregou-se a resina Q Sepharose Fast Flow (Sigma), a qual aplicou 3 mL da amostra obtida com a ultrafiltração e a fase móvel foi o tampão Soresen 60mM pH 8. Manteve-se o fluxo constante 0,5 mL/min com auxílio de

uma bomba peristáltica Econo (BIO-RAD), coletando as frações de 3 em 3 mL com um coletor automático. Selecionou-se aquelas que apresentaram maior atividade enzimática para o preparo do “pool”. Avaliou-se atividade proteolítica e o teor de proteínas do “pool” (Tabela Suplementar 3) (Wang et al., 2009 modificado).

Cromatografia de afinidade: o “pool” obtido na cromatografia de troca aniônica foi aplicado na HiTrap benzamidine FF (Amersham), equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,4 acrescido de 500 mM de NaCl. Para a eluição utilizou o tampão glicina HCl 50mM pH3. Para evitar a desnaturação da enzima, imediatamente, acrescentou nas frações 150 µl de tampão glicina NaOH 1M pH 9 (Toubarro et al., 2009 modificado).

Caracterização das proteases parcialmente purificadas: as proteases parcialmente purificadas do isolado foram caracterizadas em relação a temperatura, pH de máxima atividade e quanto a classe. Quanto a temperatura, determinou-se a atividade enzimática com tampão citrato fosfato 60 mM pH 6 em diferentes valores de temperatura (25, 35, 45, 55 e 65°C). Em relação ao pH ideal, determinou-se atividade enzimática em diferentes valores de pH: 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0 para a enzima presente no extrato. Na faixa de pH 4 a 8 utilizou-se o tampão citrato fosfato 60mM e para pH 9 tampão glicina-NaOH 50mM. A classe foi determinada pelo contato das proteases com o inibidor, PMSF, na concentração de 10mM durante a reação de atividade proteolítica.

SDS-PAGE: Acompanhou-se as etapas de purificação por SDS-PAGE 10% corado com prata. Estimou-se a massa molecular de proteínas por comparação com o padrão de peso molecular (Laemmli, 1970).

D.2) Ação das proteases parcialmente purificadas na mortalidade de J2 e desenvolvimento do nematoide de galhas

Ovos de *Meloidogyne javanica* foram colocados em funil de Baerman por 48h para obtenção de juvenis de segundo estágio (J2). Os juvenis foram coletados e submetidos aos tratamentos: testemunha (100 µl de água estéril), proteases parcialmente

purificadas Pc-M4 (80 µl + 20 µl de água estéril) e proteases inativadas por imersão em temperatura elevada Pc-M4 (80 µl + 20 µl de água estéril). No tratamento protease inativada, a amostra foi previamente aquecida a 100°C por um tempo de 20 minutos. O tratamento proteases parcialmente purificadas foi identificado como “+proteases” e proteases inativadas como “-proteases” Para observação de danos nos ovos, foi realizado o mesmo ensaio com ovos. Em seguida, foram submetidos aos testes de mortalidade de J2 e ação das proteases no desenvolvimento dos nematoides. Imagens dos juvenis e ovos, após 48 horas da aplicação dos tratamentos, foram capturadas em microscópio ótico.

Mortalidade de J2: cada tratamento recebeu aproximadamente 20 juvenis e foi repetido 6 vezes. A leitura de mortalidade de juvenis foi realizada as 12, 24, 36 e 48 horas após o tratamento e, para certificar que os juvenis paralisados estavam mortos, foi adicionado NaOH a 0,1N, como proposto por Chen e Dickson (2000).

Ação das proteases parcialmente purificadas no desenvolvimento do nematoide de galhas: 40 juvenis de segundo estágio receberam os devidos tratamentos e cada tratamento foi repetido 6 vezes. Após 48 horas os juvenis foram colocados em vasos com solo esterilizado e com uma planta de tomate cultivar Santa Clara de 21 dias. Essas plantas permaneceram em câmara de crescimento a 28°C por 30 dias e então avaliados os parâmetros: número de galhas e de ovos por sistema radicular.

E) Controle do nematoide de galhas

O fungo foi cultivado em meio sólido composto por arroz triturado. Sacos plásticos contendo 300g de arroz e 100mL de água foram autoclavados e receberam 6 discos de micélio do isolado Pc-M4. Após o armazenamento por 30 dias a 26°C, foram coletados os conídios.

O nematoide *Meloidogyne javanica* foi multiplicado em plantas de tomate mantidas em casa de vegetação e os ovos extraídos pela técnica de Boneti e Ferraz (1981).

Mudas de tomate Santa Clara com 27 dias foram transplantadas em vasos de 2L. Solo esterilizado (Tabela Suplementar 4) foi infestado com *M. javanica* (3.000 ovos por vaso) e o isolado Pc-M4 nas concentrações 0, 5.000, 10.000, 15.000 e 20.000 conídios.g⁻¹. Após 60 dias, foram avaliados o número de galhas e de ovos, altura e massa seca total. A temperatura ambiente média foi de 26°C (Mínima 15°C e Máxima: 41°C).

Para certificar que o fungo estava presente no solo, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) por meio do plaqueamento de solo em meio semi-seletivo como proposto por Gaspard et al. (1990).

2.9 Análise estatística

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

3. Resultados

Dos dezoito isolados fúngicos analisados, apenas no isolado Pc-M4 foi detectado a presença de dsRNA, sugerindo a infecção por micovírus. A análise do perfil de bandas de dsRNA revelou a presença de 4 segmentos de dsRNA no isolado Pc-M4 com tamanhos compreendidos entre 2.4 e 3.4 kb (Figura1A).

3.1 Sequenciamento do genoma dos micovírus e análises de bioinformática e filogenética

A análise das sequências obtidas mostrou que o isolado Pc-M4 apresenta uma infecção mista por dois vírus, um vírus dsRNA com quatro segmentos genômicos e um de ssRNA negativo, nomeados como Pochonia chlamydosporia doble-stranded RNA

chrysovirus 1 (PcCV1) e *Pochonia chlamydosporia* negative-stranded RNA virus 1 (PcNSRV1), respectivamente.

A organização do genoma do PcCV1 está ilustrada na Figura 1B . Os segmentos foram identificados de 1-4 de acordo com o seu tamanho e todos possuem identidade de sequências com micovírus da família *Chrysoviridae* (Tabela Suplementar 5). O segmento 1 possui comprimento de 3.468 nucleotídeos e contém uma única *Open Reading Frame* (ORF) que codifica para a RdRp, proteína com 1.088 aminoácidos (Figura 1B). Análise de BLASTP revelou que esse segmento tem máxima identidade de 63% com a polimerase de *Colletotrichum gloeosporioides chrysovirus 1* (*E-value*: 0; *query cover*: 99%).

A proteína capsidial possui 903 aminoácidos e é codificada pelo segmento 2 de de RNA (Figura 1B). Essa proteína tem maior identidade de 57% com *Colletotrichum gloeosporioides chrysovirus 1* (*E-value*: 0; *query cover*: 99%) (Tabela Suplementar 5).

Os segmentos 3 e 4 codificam putativas proteases. O segmento 3 possui 2.790 nucleotídeos com uma ORF que codifica para uma proteína de 824 aminoácidos e com identidade de 55% com *Colletotrichum gloeosporioides chrysovirus 1* (*E-value*: 0; *query cover*: 99%) (Figura 1B e Tabela Suplementar 2). O segmento 4 tem comprimento de 2.478 nucleotídeos e uma ORF que gera uma protease de 647 aminoácidos com máxima identidade de 33% com *Amasya cherry disease associated chrysovirus* (*E-value*: 8.00e10 e *query cover*: 17%) e de 26% com *Colletotrichum gloeosporioides chrysovirus 1* (*E-value*: 1.00E-06; *query cover*: 39%) (Figura 1B e Tabela Suplementar 5).

Todos os segmentos de PcCV1 possuem tamanhos que não correspondem exatamente a banda no gel (Figura 1A). Aparentemente, as UTRs não estão completas e pode estar faltando nucleotídeos nas extremidades 5' e 3'.

O PcNSRV1 tem genoma composto por um segmento com comprimento de 6175 nucleotídeos e apresenta uma ORF que codifica a proteína L-replicase (Figura 2). Esse

vírus apresenta identidade com vírus da ordem *Mononegavirales* e tem baixa identidade com sequências depositadas, com identidade máxima de 38% com *Soybean leaf-associated negative-stranded RNA virus 1* (*E-value*: 0 e *query cover*: 91%) (Tabela Suplementar 6).

Análises filogenéticas da sequência de aminoácidos de RdRp codificada pelo segmento 1 de PcCV1 e RdRps de membros representativos de dez gêneros da família *Chrysoviridae*, treze gêneros da *Totiviridae* e dezenove da *Partitiviridae* indicam que a putativa RdRp de PcCV1 agrupou com integrantes da família *Chrysoviridae*, a qual possui apenas um gênero, *Chrysovirus*, indicando que o PcCV1 é um novo membro desse gênero (Figura 3). Similar a filogenia, a matriz de identidade gerada com sequências de aminoácidos de RdRp mostrou identidade com membros das três famílias com PcCV1 e que esse micovírus apresenta maior identidade com os indivíduos da família *Chrysoviridae*, como observado pelas cores mais quentes (Figura 4).

Árvore filogenética gerada com membros da ordem *Mononegavirales* e PcNSRV1 indica um forte relacionamento entre PcNSRV1 com membro da família *Mymonaviridae* (Figura 5). Essa família possui apenas o táxon *Sclerotinia sclerotimonavirus* (sinonímia: SsNSRV1), os outros membros são apenas propostos e ainda não foram aceitos pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV). A matriz de identidade gerada entre PcNSRV1 e membros da ordem *Mononegavirales* também suporta esse relacionamento (Figura 6).

Análise dos domínios conservados da L-replicase de SsNSRV1 e de membros propostos à família *Mymonaviridae* (SsNRV2, SsNRV3, SsNRV4, SlaNRV1, SlaNRV2, SlaNRV3 e SlaNRV4) com o PcNSRV1 indica que eles compartilham os domínios pfam 00946 e pfam 14318 e que o TIGR04198 não está presente em PcNSRV1 e SlaNSRV2

(Figura 7). A arquitetura do domínio pfam 00946 é preservada tanto em posição quanto em extensão em todas as sequências analisadas.

3.2 Caracterização molecular, morfológica e biológica do isolado fúngico Pc-M4

O isolado Pc-M4 pertencente a espécie *Pochonia chlamydosporia* como observado por meio de análise do seu transcriptoma (Figura 8A). Esse fungo tem 99% de identidade com *Metacordyceps chlamydosporia* (anamorfo de *Pochonia chlamydosporia*). A cobertura média do transcriptoma do Pc-M4 às sequências do *M. chlamydosporia* foi de 1.416 vezes.

Os alinhamentos dos genes ribossomais de Pc-M4 com isolado 170 de *P. chlamydosporia* suportam identidade de 98% para subunidade maior e 99% para a subunidade menor, reforçando a taxonomia do isolado Pc-M4 (Figura 8B).

Esse isolado possui conídios hialinos medindo de 2.0-3.5x1.5-3.0 μm , dictioclamidósporos de 15.0-27.0 μm e fiálides com 20.0-55.0 μm de comprimento (Tabela 1).

B) Parasitismo de ovos

O fungo Pc-M4 foi capaz de parasitar ovos do nematoide de galhas (Figura 9B e 9C). O desenvolvimento de estruturas do fungo foram observadas sobre a casca dos ovos. Pode-se observar arranjo em cadeia dos conídios e intenso crescimento micelial sobre os ovos.

C) Ação de proteases extracelulares e metabólitos sobre juvenis e no desenvolvimento do nematoide de galhas

As proteases presentes no extrato de Pc-M4 possuem atividade máxima em temperatura a 45°C e pH 7 (Figura 10). Ao analisar a susceptibilidade das enzimas parcialmente purificadas ao inibidor de serino proteases (PMSF) verificou-se 100% de inibição com o PMSF, o que indica que as proteases produzidas pertencem à classe das serino-proteases. O gel de SDS-PAGE indica a presença dois componentes protéicos de aproximadamente 35 kDa e 60 kDa, tamanhos aproximados das serino proteases de *P. chlamydosporia*, VCP1 e SCP1, respectivamente, que são bem caracterizadas e estudadas (Segers et al., 1994; Larriba et al., 2012).

Mortalidade de J2: 48h após o tratamento dos juvenis com as proteases parcialmente purificadas do Pc-M4 observou-se 100% de mortalidade dos nematoides, porém quando foram aplicadas as protease inativadas de Pc-M4 houve mortalidade de 72% (Figura 11 C).

Os juvenis de segundo estágio e ovos foram observados em microscópio ótico 48h após serem tratados e, na presença das proteases do fungo Pc-M4, houve uma intensa desorganização do intestino do nematoide de galhas (Figura 12-E) quando comparado com intestino de J2 tratado apenas com água estéril (Figura 12-D). Além disso, na presença das proteases de Pc-M4 pode-se observar a eclosão precoce do *M. javanica* em estágio de J1.

Ação das proteases no desenvolvimento do nematoide de galhas: Os tratamentos com proteases ativas (+protease) e inativadas (-protease) foram capazes de impedir que o nematoide induzisse a formação das galhas e se reproduzisse, com isso não foi observada nenhuma galha e nenhum ovo nas raízes de tomateiro após 30 dias da infestação do solo com os juvenis tratados (Figura 11 A e B).

E) Controle do nematoide de galhas

O incremento nas doses de conídios do isolado Pc-M4 de *P. chlamydosporia* causou redução no número de ovos e galhas de *M. javanica* com maior redução no tratamento 10.000 conídios.g⁻¹. Observou-se efeito quadrático para essas duas variáveis (Figura 13 A e B). A massa total das plantas secas aumentou linearmente em função da adição de conídios no solo (Figura 13 C). Após os 60 dias da aplicação do fungo no solo, foi possível detectá-lo em todos os tratamentos em que foi aplicado com maior concentração no tratamento 15000 conídios.g⁻¹ (Figura 13 D).

4. Discussão

É comum a presença de mais de um vírus em mesmo isolado fúngico. Em alguns casos a capacidade de causar hipovirulência por um micovírus é alterada na ausência de outro (Sasaki et al., 2016). Porém, no fungo fitopatogênico *Sclerotinia nivalis*, a co-infecção por três micovírus não tem ação aparentemente sobre o desenvolvimento do fungo, causando micovirose latentes (Wu et al., 2016).

O isolado Pc-M4 do agente de controle biológico *P. chlamydosporia* está infectado por dois micovírus (PcCV1 e PcNSRV1) e, devido a baixa identidade das sequências desses vírus com sequências depositados no NCBI (Tabela Suplementar S1), foram propostas duas novas espécies virais.

Apesar da amostra destinada ao sequenciamento ter sido tratada com S1 nuclease, foi possível detectar a presença do vírus –ssRNA no sequenciamento, pois a sua forma intermediária de replicação encontra-se em dsRNA. Esse vírus tem a maior identidade de sequência com o único membro (*Sclerotinia sclerotimonavirus* (SsNSRV-1)) da recém proposta família *Mymonaviridae* (Afonso et al., 2016). Em análises BLASTP foi possível observar que a única ORF produzida pelo vírus PcNSRV1 codifica para a L-replicase

(RdRp) similar a L-replicase do SsNSRV-1. O vírus de *Sclerotinia sclerotiorum* possui 5 ORFs, o que não foi observado no genoma do vírus –ssRNA do *P. chlamydosporia*. Acredita-se que o genoma pode estar parcial ou esse vírus ter apenas uma ORF. Caso esse vírus tenha apenas uma ORF que codifique para a L-replicase e perdido as demais, ele é capaz de se manter no hospedeiro como ocorre em outras viroses (Donaire et al., 2016a; 2016b).

Parte das sequências analisadas está parcial e seria necessário as sequências completas bem como mais membros para compreendermos melhor o relacionamento do PcNSRV1 com outros indivíduos.

Análise Filogenética baseada no alinhamento de sequências de RdRp agrupou PcCV1 na família *Chrysoviridae* o que concorda com o BLASTP gerado para os seus quatro segmentos, indicando que esse vírus é um novo membro da família *Chrysoviridae*.

Filogenia com base no alinhamento de sequências da L-Replicase do PcNSRV1 com membros da ordem Mononegavirales suporta forte relacionamento de PcNSRV1 com SsNSRV1, mesmo tendo baixa identidade como apresentado pela matriz de identidade e pelo BLASTP. Isso indica que esses membros podem ser, futuramente, separados em famílias distintas.

O domínio pfam 00946, também conhecido como domínio mononegaviral de RdRp, é conservado entre indivíduos da ordem Monogegavirales e está presente no PcNSRV1. Porém o domínio TIGR04198 pode estar degenerado ou ter sido perdido em PcNSRV1, uma vez que está ausente na sua L-replicase.

É a primeira vez que micovírus são relatados infectando o fungo de controle biológico *P. chlamydosporia*. O isolado infectado é capaz de crescer sobre os ovos, produzir metabólitos e proteases letais aos juvenis e controlar o nematoide de galhas. Isso

indica que a presença dos vírus não impossibilita que o fungo exerça sua atividade de parasitismo de ovos.

Pochonia chlamydosporia é um fungo que produz proteases que auxiliam no momento da penetração nos ovos e ainda produz toxinas, dentre elas as aurovertins. Das 19 aurovertins caracterizadas, *P. chlamydosporia* produz 4, as quais tem ação sobre a mortalidade de juvenis e tem sido associadas a danos no intestino de nematoides de vida livre (Niu et al., 2010; Wang et al., 2015; Degenkolb e Vilcinskas, 2016). Nos ensaios da ação de proteases na mortalidade e desenvolvimento dos nematoides, observamos que, tanto no tratamento com proteases ativas quando proteases inativas, houve mortalidade de J2 e controle de 100% de ovos. Esses resultados indicam que isso não se deve apenas a ação das proteases, mas também a possível ação de metabólitos, como as toxinas, as quais não foram aqui caracterizadas. A amostra que contém a protease parcialmente purificada foi aquecida (100°C) por um tempo de 20 minutos, o que é suficiente para desnaturar as enzimas e manter os metabólitos. Portanto, são necessárias maiores investigações para a confirmação da presença e ação destes compostos.

Registramos pela primeira vez que proteases do fungo estão associadas a desorganização do intestino de *M. javanica* bem como a eclosão prematura de J1. A maioria dos nematoides fitopatogênicos eclodem no estágio 2 de desenvolvimento, porém alguns metabólitos produzidos por microrganismos e por plantas podem estimular a eclosão prematura por afetar a permeabilidade da casca do ovo (Mercer et al., 1992; Askary, 2015). Isso pode bloquear o desenvolvimento do nematoide, impedindo a sua sobrevivência no meio externo.

Nematoides do gênero *Meloidogyne* são os nematoides mais importantes na agricultura devido à sua ampla disseminação, à capacidade de causar doenças em diferentes espécies vegetais e gerar enormes prejuízos. O fungo *P. chlamydosporia* pode

reduzir os danos causados pelos nematoide de galhas parasitando ovos e fêmeas do nematoide, bem como induzindo resistência da planta ao patógeno (Viggiano et al., 2014; Medeiros et al. 2015). Foi possível observar a capacidade do fungo em se desenvolver sobre os ovos de *M. javanica*, *in vitro*, impossibilitando a eclosão dos juvenis de segundo estágio e consequente não invasão dos tecidos da raiz.

Na maioria das pesquisas com *P. chlamydosporia* no controle de nematoides, aplica-se clamidósporos, porém no ensaio em casa-de-vegetação foram aplicados conídios, já que esse fungo apenas produziu grandes concentrações de clamidósporos com oito meses de incubação em placa de petri a 26°C (dados não apresentados). Além disso, a tentativa de produção massal de clamidósporos falhou, pois Pc-M4 não produziu clamidósporos em meio sólido composto por arroz e armazenado durante 90 dias a 26°C (dados não mostrados). Nesse meio de crescimento, diferentes isolados de *P. chlamydosporia* produzem grandes concentrações de clamidósporos em 21 dias de armazenamento (Araújo, 2014). A utilização de produtos de controle biológico em que o agente produz estruturas de resistência, como exemplo dos clamidósporos, garante uma melhor estabilidade do organismo, uma vez que ele somente germinará quando condições ambientais forem favoráveis ao seu desenvolvimento. Apesar disso, a aplicação de conídios do fungo no solo infestado com *M. javanica* proporcionou redução em até 60% do número de ovos e em até 35% do número de galhas em raízes de tomateiro.

Todas essas características do Pc-M4 de parasitar ovos, controlar nematoides e produzir clamidósporos após longos períodos de armazenamento não podem ser aqui associadas a presença das micoviroses, uma vez que não foi comparado com isolado livre dos vírus. A fim de elucidar essas questões, haverá a necessidade de melhor investigação utilizando isolado curado ou transfectado com as partículas virais.

REFERÊNCIAS (normas de acordo com Virology)

- Afonso, C.L., Amarasinghe, G.K., Bányai, K., Bào, Y., Basler, C.F., et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch Virol.* 2016; 161:2351–2360.
- Altschul, S.F. et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215: 403–410.
- Araújo, E.O., 2014. Diversidade patogênica e genética de *Pochonia chlamydosporia* para o controle de *Meloidogyne enterolobii*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 64p
- Askary, T.H., 2015. Nematophagous Fungi as Biocontrol Agents of Phytonematodes. In: *Biocontrol Agents of Phytonematodes*, CABI, 482pp
- Benito, M.J., Rodríguez, M., Nunez, F., Asensio, M.A., Bermudez, M.E., Córdoba, J.J. Purification and characterization of an extracellular protease from *Penicillium chrysogenum* Pg222 active against meat proteins. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68: 3532-3536.
- Boneti, J.I.S., Ferraz, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatol Bras.* 1981; p.553.
- Chen, S.Y., Dickson, D.W.A. technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. *J Nematol.* 2000; 32:117-121.
- Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L.G., Lopes, E.A., Pereira, O.L., Zooca, R.J.F., Ferraz, S. Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. *Crop Prot.* 2012; 42:102-107.
- De La Paz Giménez-Pecchi, M.P., Bogo, R.M., Santi, L., Moraes, C.K., Corrêa, T.C., Vainstein, M.H., Schrank, A. Characterization of Mycoviruses and Analyses of Chitinase Secretion in the Biocontrol Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Curr Microbiol.* 2002; 45:334-339.
- De Leij, F., Davies, K.G., Kerry, B.R. The use of *Verticillium chlamydosporia* Goddard and *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr alone and in combination to control *Meloidogyne incognita* on tomato plants. *Fundam Appl Nematol.* 1992; 15:235-242.
- Degenkolb, T., Vilcinskis, A. Metabolites from nematophagous fungi and nematocidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part I: metabolites from nematophagous ascomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016; 100:3799–3812.
- Donaire, L., Pagán, I., Ayllón, M.A. Characterization of Botrytis cinerea negative-stranded RNA virus 1, a new mycovirus related to plant viruses, and a reconstruction of host pattern evolution in negative-sense ssRNA viruses. *Virology.* 2016a; 499: 212–218.
- Donaire, L., Rozas, J., Ayllón, M.A. Molecular characterization of Botrytis ourmia-like virus, a mycovirus close to the plant pathogenic genus Ourmia- virus. *Virology.* 2016b; 489: 158–164.

Gaspard, J.T., Jaffee, B.A., Ferris, H. Association of *Verticillium chlamydosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with root-knot nematode infested soil. J Nematol. 1990; 22:207-213.

Gouveia, A.S., Soares, F.E.F., Morgan, T., Sufiate, B.L., Tavares, G.P., Braga, F.R., Monteiro, T.S.A., Geniêr, H.L.A., Freitas, L.G., Queiroz, J.H.. Enhanced production of *Monacrosporium thaumasium* protease and destruction action on root knot nematode *Meloidogyne javanica* eggs. Rhizosphere 2017; 3: 13–15.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227:680–685.

Larriba, E., Martín-Nieto, J., Lopez-Llorca, L.V. Gene cloning, molecular modeling, and phylogenetics of serine protease P32 and serine carboxypeptidase SCP1 from nematophagous fungi *Pochonia rubescens* and *Pochonia chlamydosporia*. Can J Microbiol. 2012; 58:815-827.

Malathi, S., Chakraborty, R. Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. Appl. Environ. Microbiol. 1991; 57: 712-716.

Márquez, L.M., Redman, R.S., Rodriguez, R.J., Roossinck, M.J. A virus in a fungus in a plant: three- way symbiosis required for thermal tolerance. Science. 2007; 315: 513–515.

Medeiros, H.A., Resende, R.S., Ferreira, F.C., Freitas, L.G., Rodrigues, F.A. Induction of resistance in tomato against *Meloidogyne javanica* by *Pochonia chlamydosporia*. Nematoda. 2015; 2:1-8.

Mercer, C.F., Greenwood, D.R., Grant, J.L., 1992. Effect of plant and microbial chitinases on the eggs and juvenil of *Meloidogyne hapla* chitwood (nematoda: Tylenchida). Nematoda 38:227-236.

Morris, T.J., Dodds, J.A. Isolation and analysis of double- stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. Phytopathology. 1979; 69:854–858.

Muhire, B., Martin, D.P., Brown, J.K., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Zerbini, F.M., Rivera-Bustamante, R., Malathi, V., Briddon, R.W., Varsani, A. A genome-wide pairwise-identity-based proposal for the classification of viruses in the genus *Mastrevirus* (family *Geminiviridae*). Arch Virol. 2013; 158:1411-1424.

NCBI. Nucleotide database. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>>. Acesso em: 1 março de 2016.

Niu, X., Wang, Y., Chu, Y., Xue, H., Li, N., Wei, L., Mo, M., Zhang, K. Nematode toxic aurovertin-type metabolites from a root-knot nematode parasitic fungus *Pochonia chlamydosporia*. J Food Agric Chem. 2010; 58:828-834

Pearson, M.N., Beever, R.E., Boine, B., Arthur, K. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. Mol Plant Pathol. 2009; 10:115-128.

Puertas, A., de la Noval, M.B., Martínez, B., Miranda, I., Fernández, F., Hidalgo-Díaz,

L. Interacción de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* con *Rhizobium* sp., *Trichoderma harzianum* y *Glomus clarum* en el control de *Meloidogyne incognita*. Rev. Protección Veg. 2006; 22:80-89.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 2001. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sasaki, A., Kanematsu, S., Onoue, M., Oikawa, Y., Nakamura, H., Yoshida, K. Artificial infection of *Rosellinia necatrix* with purified virus particles of a member of the genus Mycoreovirus reveals its uneven distribution in single colonies. Phytopathology. 2007: 97:278–286.

Sasaki, A., Nakamura, H., Suzuki, N., Kanematsu, S. Characterization of a new megabirnavirus that confers hypovirulence with the aid of a co-infecting partitivirus to the host fungus, *Rosellinia necatrix*. Virus Res. 2016: 219:73–82.

Segers, R., Butt, T., Kerry, B.R., Peberdy, J.F. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* produces a chymoeslastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins in situ. Microbiology. 1994; 140:2715-2723.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a hub for protein information. Nucleic Acids Research, v. 43, n. D1, p. D204-212, 27 out. 2014.

Toubarro, D., Lucena-Robles, M., Nascimento, G., Costa, G., Montiel, R. An apoptosis-inducing serine protease secreted by the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. Int. J. Parasitol. 2009; 39:1319–1330.

Tunlid, A., Rosen, B.E., Rask, L. Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode- trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. Microbiology. 1995; 140: 1687-1695.

Viggiano, J.R., Freitas, L.G., Lopes, E.A. Use of *Pochonia chlamydosporia* to control *Meloidogyne javanica* in cucumber. Bio Control. 2014; 69:72-77.

Zabalgogezcoa, I., Benito, E.P., Ciudad, A.G., Criado, B.G., Eslava, A.P. Double-stranded RNA and virus-like particles in the grass endophyte *Epichloë festucae*. Mycol. Res. 1998; 102:914-918.

Wang, B., Liu, X., Wu, W., Liu, X., Li, S. Purification, characterization, and gene cloning of an alkaline serine protease from a highly virulent strain of the nematode-endoparasitic fungus *Hirsutella rhossiliensis*. Microbiol Res. 2009; 164:665-673.

Wang, L., Jiang, J., Wang, Y., Hong, N., Zhang, F., Xu, W., Wang, G. Hypovirulence of the phytopathogenic fungus *Botryosphaeria dothidea*: association with a coinfecting chrysovirus and a partitivirus. J Virol. 2014; 88:7517-7527.

Wang, Y-L., Li, L-F., Li, D-X., Wang, B., Zhang, K., Niu, X. Yellow pigment aurovertins mediate interactions between the pathogenic fungus *Pochonia chlamydosporia* and its nematode host. J Agric Food Chem. 2015; 63:6577-6587.

Wu, M.D., Deng, Y., Zhou, Z., He, G., Chen, W., Li, G. Characterization of three mycoviruses co-infecting the plant pathogenic fungus *Sclerotinia nivalis*. *Virus Res.* 2016; 223:28–38.

Wu, M.D., Zhang, L., Li, G.Q., Jiang, D.H., Hou, M.S., Huang, H.C. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology.* 2007; 97:1590–1599.

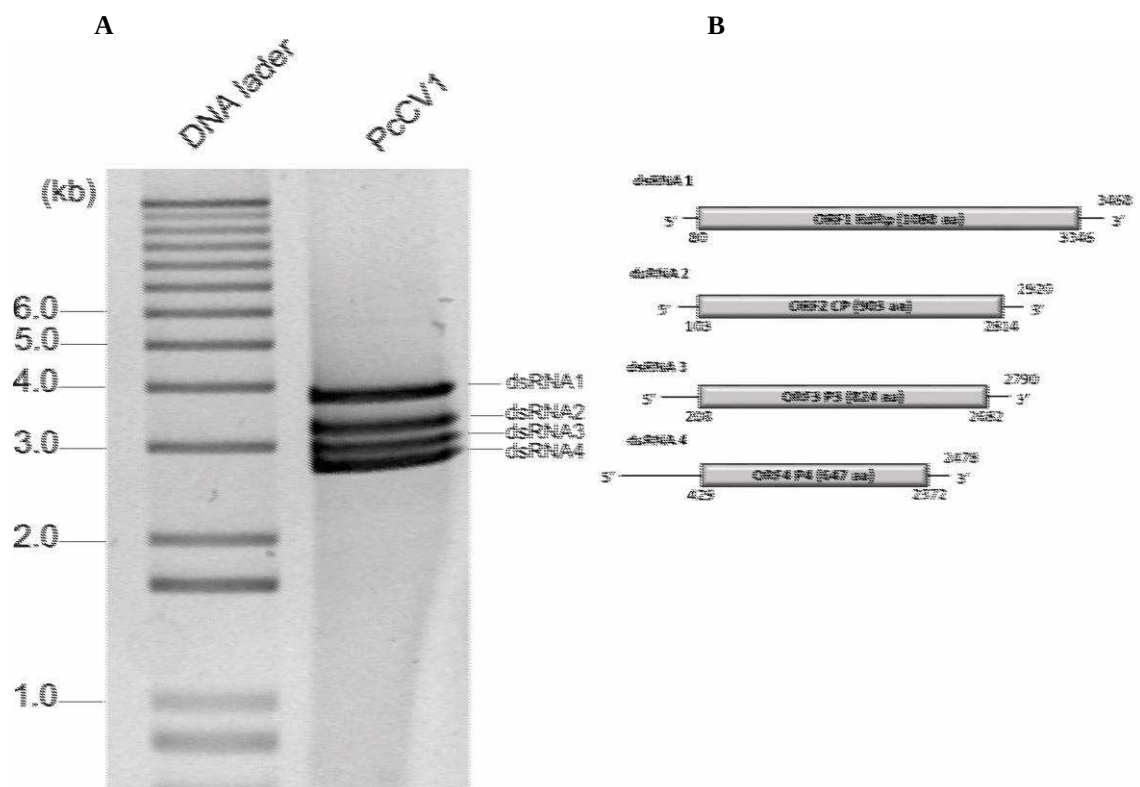


Figura 1. A: Eletroforese em gel de agarose a 0,8% de dsRNA da amostra extraída do isolado Pc-M4 de *P. chlamydosporia*. A amostra foi tratada com DNase e S1 Nuclease (Promega). Tamanhos dos dsRNAs (direita) e marcador 1kb DNA ladder (Invitrogen, CA, USA) são expressos em Kilobases (kb). B: representação esquemática da organização do genoma do chrysovirus PcCV1.



Figura 2. Representação esquemática da organização do genoma de PcNSRV1.

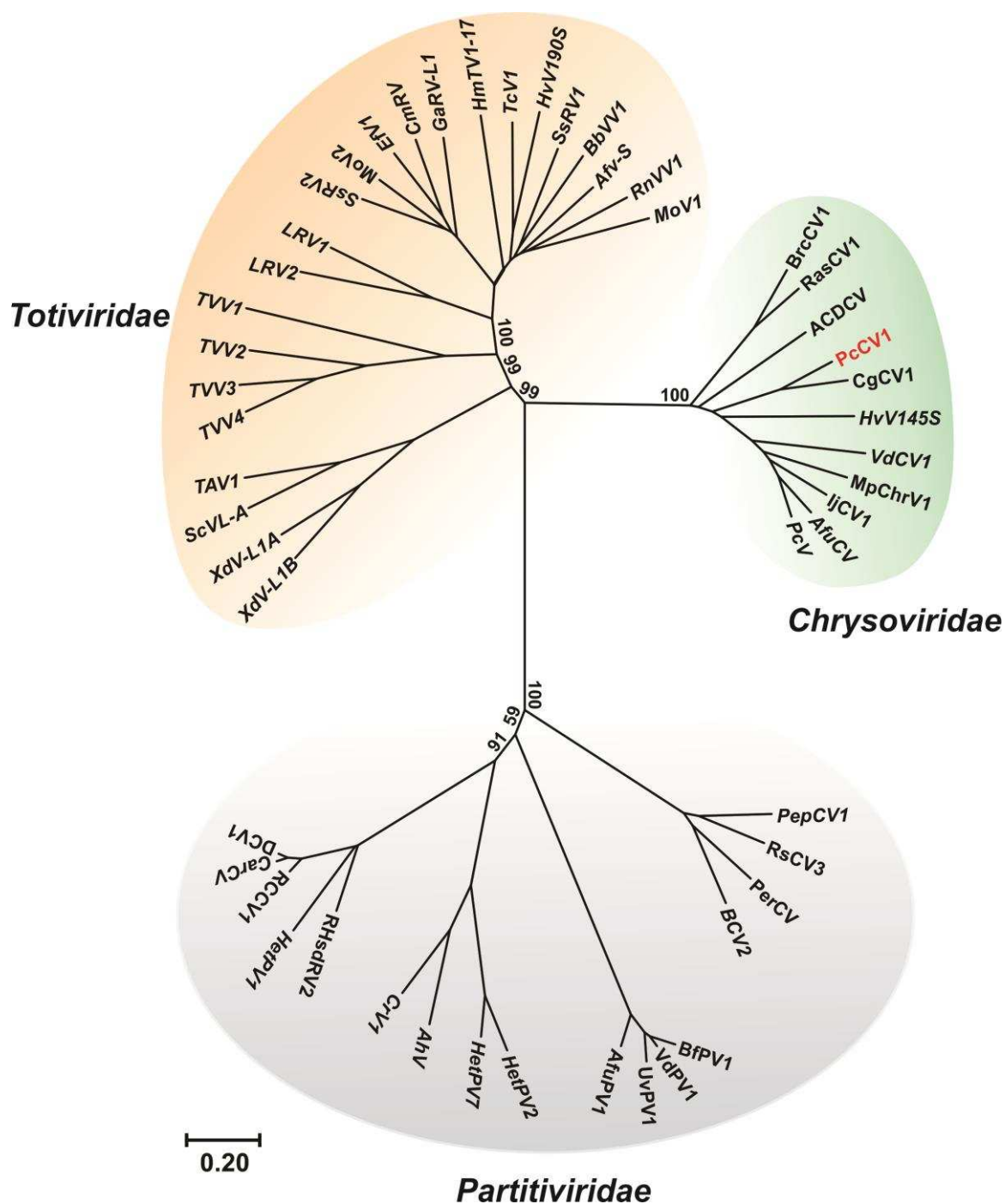


Figura 3. Árvore filogenética gerada usando máxima verossimilhança no software MEGA 7. Sequências de aminoácidos de RNA polimerases dependente de RNA (RdRp) de membros das famílias *Chrysoviridae*, *Partitiviridae* e *Totiviridae* disponíveis no GenBank juntamente com PcCV1 foram alinhadas com ClustalW. Valores de bootstrap de 1000 repetições foram usados e os números abaixo dos ramos indicam a porcentagem do bootstrap para cada grupo.

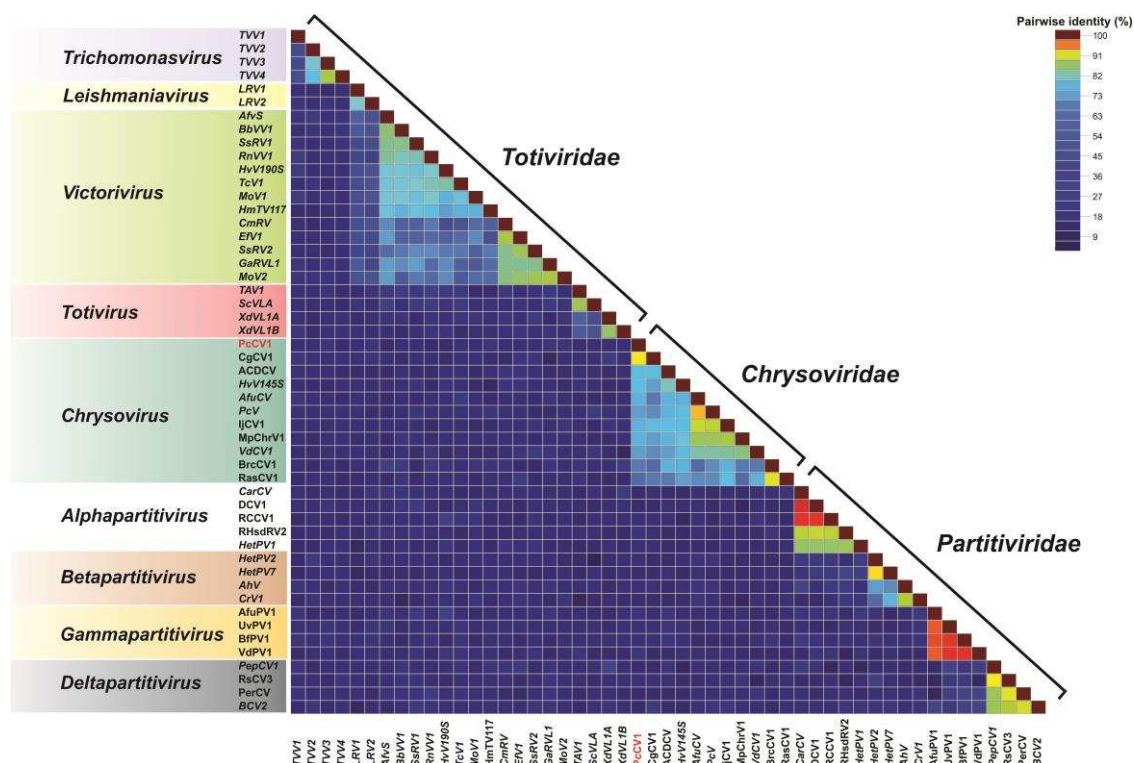


Figure 4. Matriz de identidade de sequências. Relacionamento entre sequências de aminoácidos de RdRp de membros das famílias *Totiviridae*, *Chrysoviridae* e *Partitiviridae* com PcCV1 (grafado em vermelho). Utilizou-se o programa SDT.

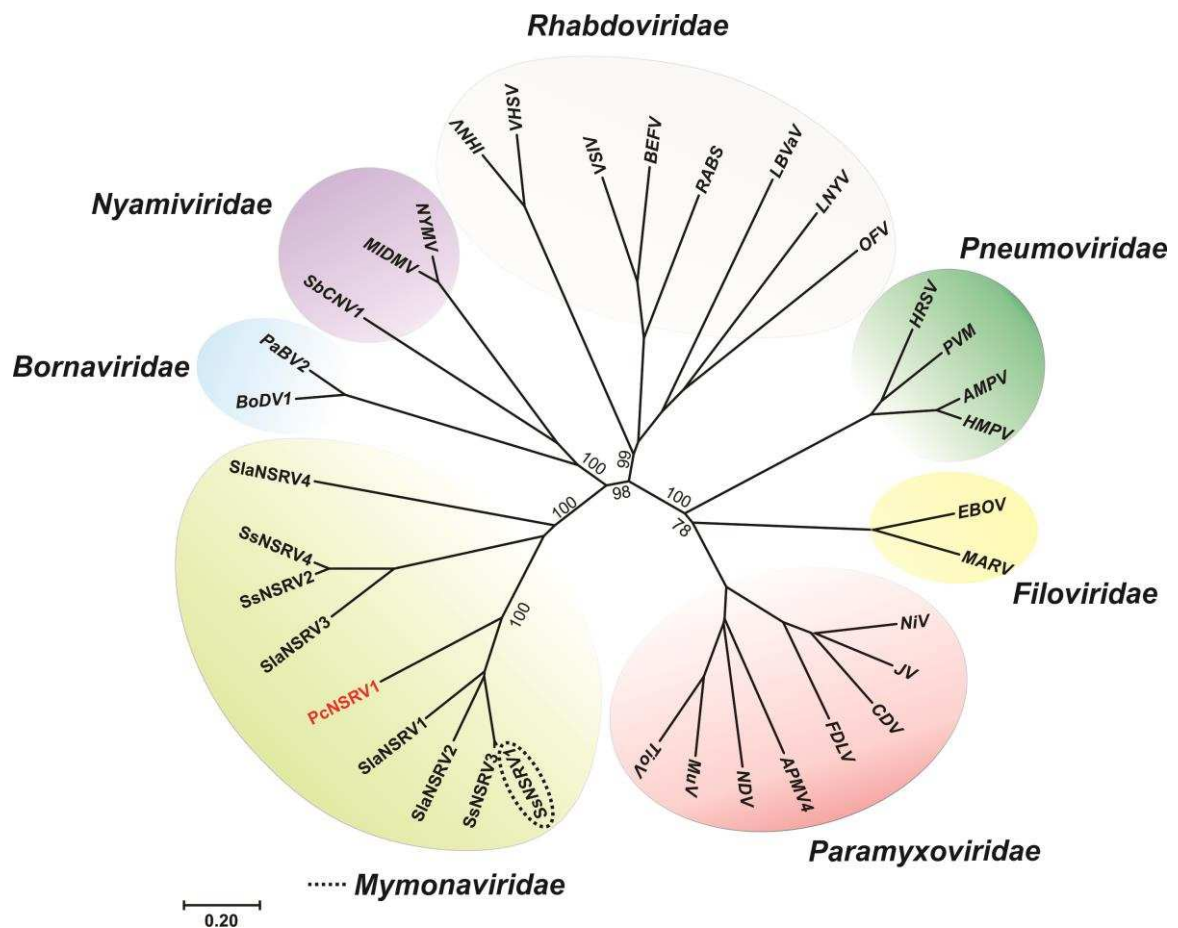


Figura 5. Árvore filogenética gerada usando máxima verossimilhança no software MEGA 7. Sequências de aminoácidos de L-replicase de membros da ordem *Mononegavirales* e PcNSRV1 foram alinhadas com ClustalW. Valores de bootstrap de 1000 repetições foram usados e os números abaixo dos ramos indicam a porcentagem do bootstrap para cada grupo.

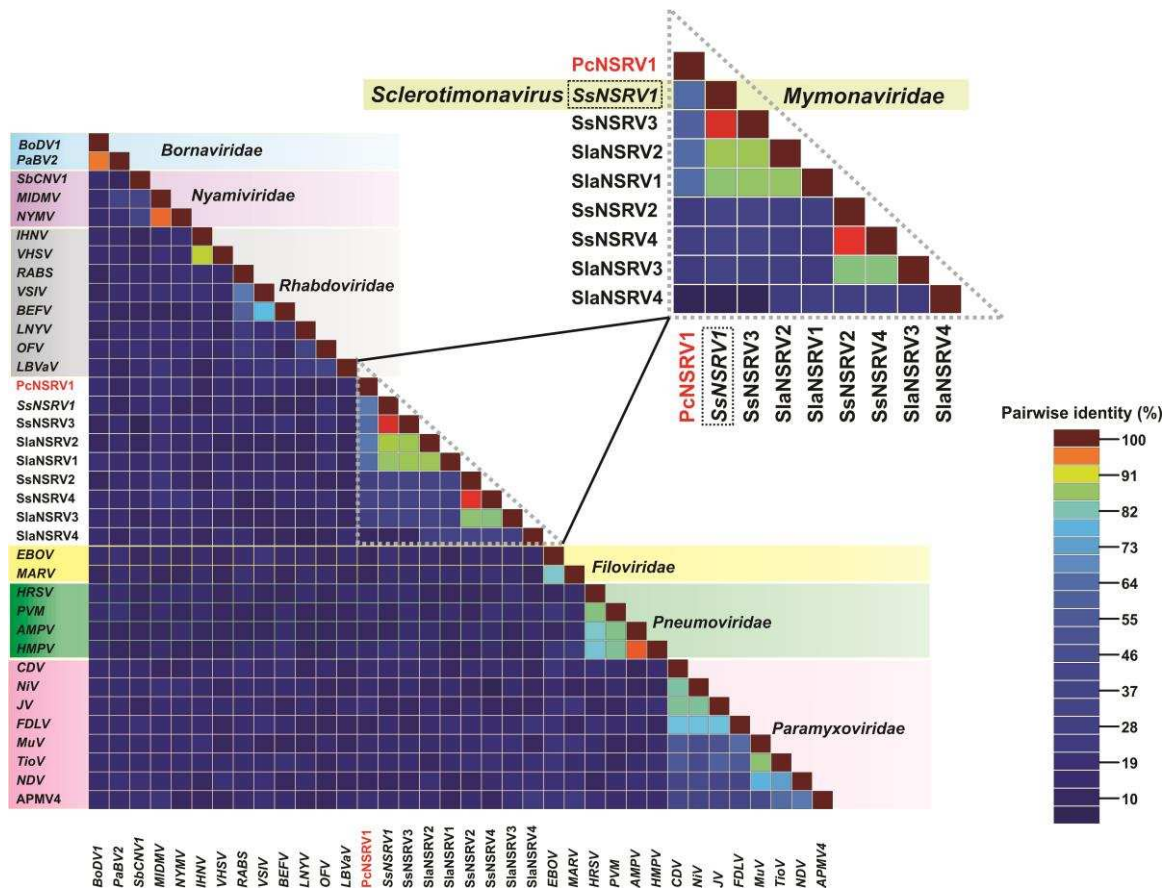


Figura 6. Matriz de identidade de seqüências. Relacionamento entre seqüências de aminoácidos de L-Replicase de membros da Ordem Mononegavirales com PcNSRV1 (grafado em vermelho). Utilizou-se o programa SDT.

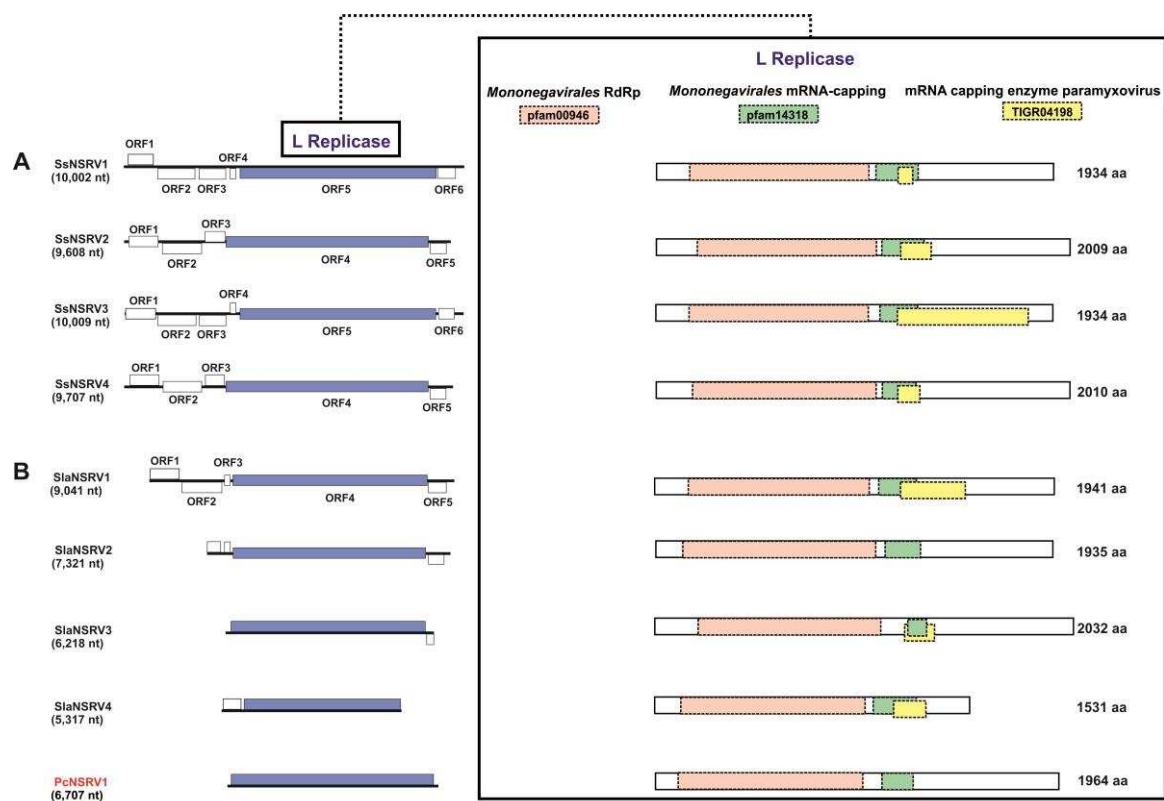
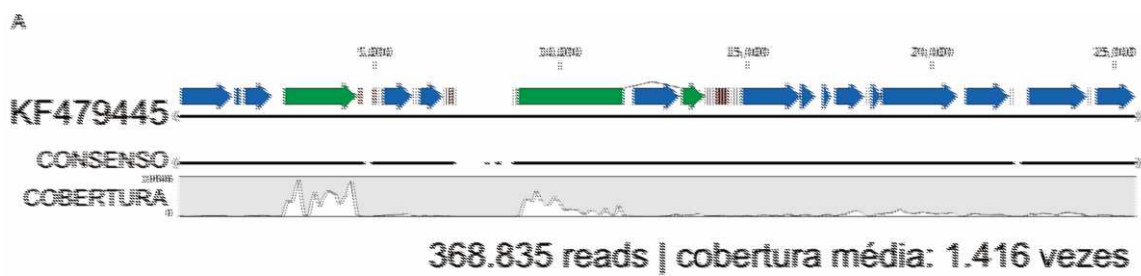


Figura 7. Comparação dos genomas completos (A) e genomas parciais de vírus relacionados a PcNSRV1. Quadro: Representação dos domínios presentes na L-Replicase.



B

Gene	Tamanho	Alinhamento	E-value	Acesso
Subunidade maior do ribossomo	4721	4630/4723 (98%)	0.00	KF479445
Subunidade menor do ribossomo	1511	1497/1511 (99%)	0.00	KF479445

Figura 8. A: Alinhamento das *reads* no genoma mitocondrial da *P. chlamydosporia*. Os genes codificadores de proteínas (azul), os genes de rRNA (verde) e os genes de tRNA (vermelho) estão destacados. O consenso representa as regiões do genoma nas quais as sequências das *reads* foram alinhadas. O gráfico de cobertura indica a variação do número de sequências alinhadas ao longo do genoma. A representação esquemática do genoma foi obtida usando o software CLC Genomics Workbench versão 6.5.1. B: Alinhamento das sequências dos genes ribossomais do isolado Pc-M4 com os genes do *P. chlamydosporia* isolado 170.

Tabela 1. Coloração da colônia e tamanho dos dictioclamidósporos, conídios e fiálides do isolado PCM4 de *Pochonia chlamydosporia*, cultivados em meio de cultura BDA por 15 dias, a 26° C, no escuro.

ID Isolado	Coloração da Colônia		Clamidósporos*		Conídios		Fiálides
	Reverso da Placa	Superfície da Placa	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura	Comprimento
PCM4	Amarela	Branca	15.0-27.0	18.0-30.0	2.0-3.5	1.5-3.0	20.0-55

* Apenas para produção de clamidósporos placas foram armazenados oito meses.

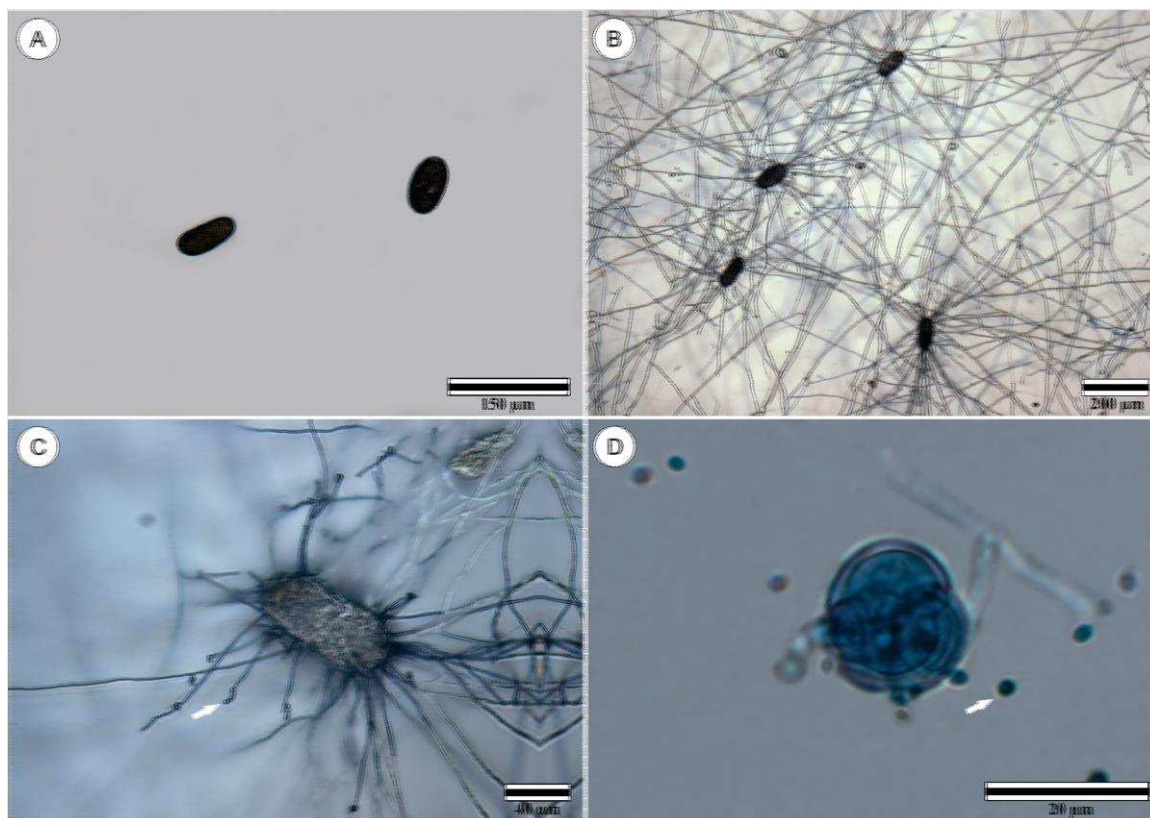


Figura 9. Parasitismo de ovos de *M. javanica* por *P. chlamydosporia* (A: Controle, B e C: isolado Pc-M4 de *P. chlamydosporia*); D: conídios e clamidósporos de Pc-M4. Setas=conídios.

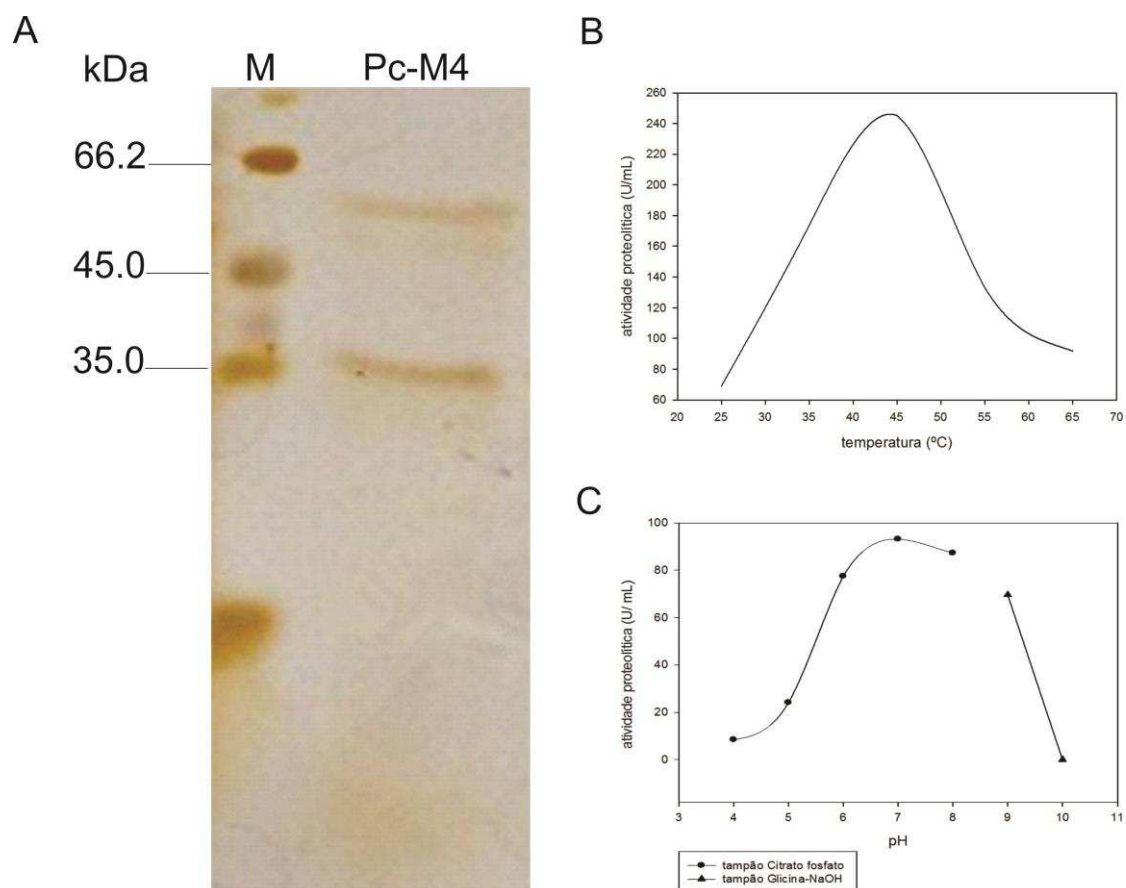


Figura 10. SDS/PAGE do purificado fúngico de *Pochonia chlamydosporia* apresentando dois componentes protéicos com aproximadamente 35 e 60 kDa. Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática das proteases de Pc-M4.

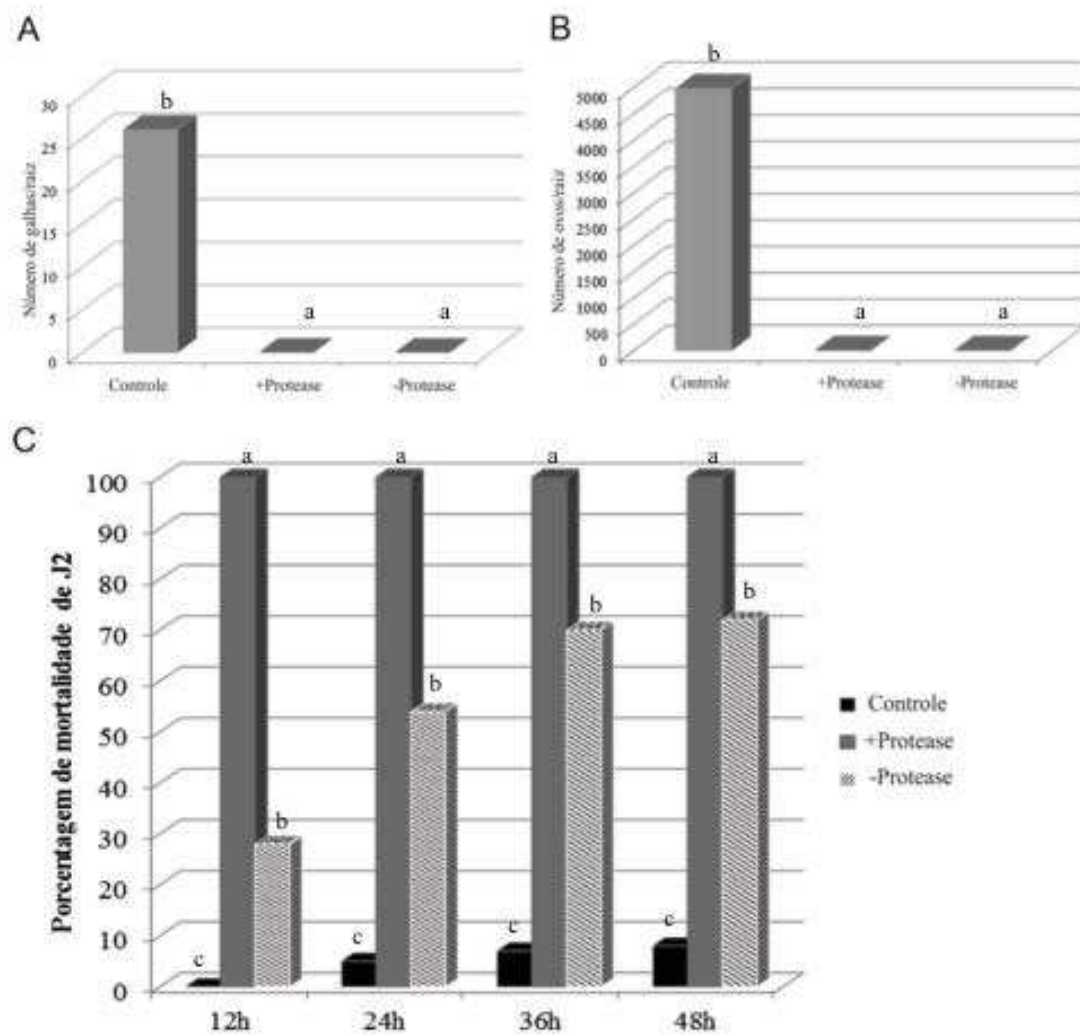


Figura 11. Número de galhas (A) e de ovos (B) de *M. javanica* por sistema radicular de tomate, previamente infestado com 40 J2 tratado com água esterilizada (controle), proteases ativas (+proteases) e proteases inativas (-proteases). Porcentagem de mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) após 12h, 24h, 36h e 48h do tratamento com água estéril, +protease e -protease (C). Em C os dados foram analisados separadamente nas horas 12h, 24h, 36h ou 48h. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan, a 5% de probabilidade.

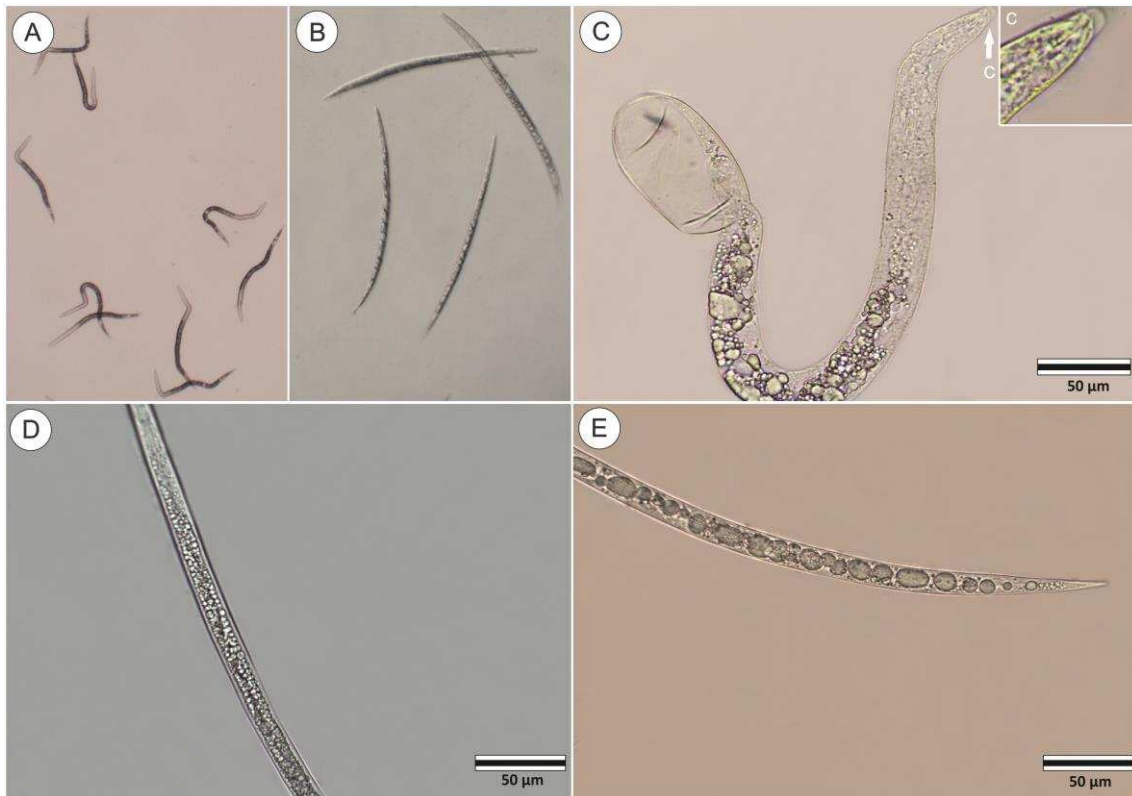


Figura 12. Juvenis de *Meloidogyne javanica* após 48 h de tratamento. A e D: J2 tratados com apenas água estéril; B e E: J2 tratados com proteases ativas do Pc-M4; C: J1 eclodido e c: troca de cutícula.

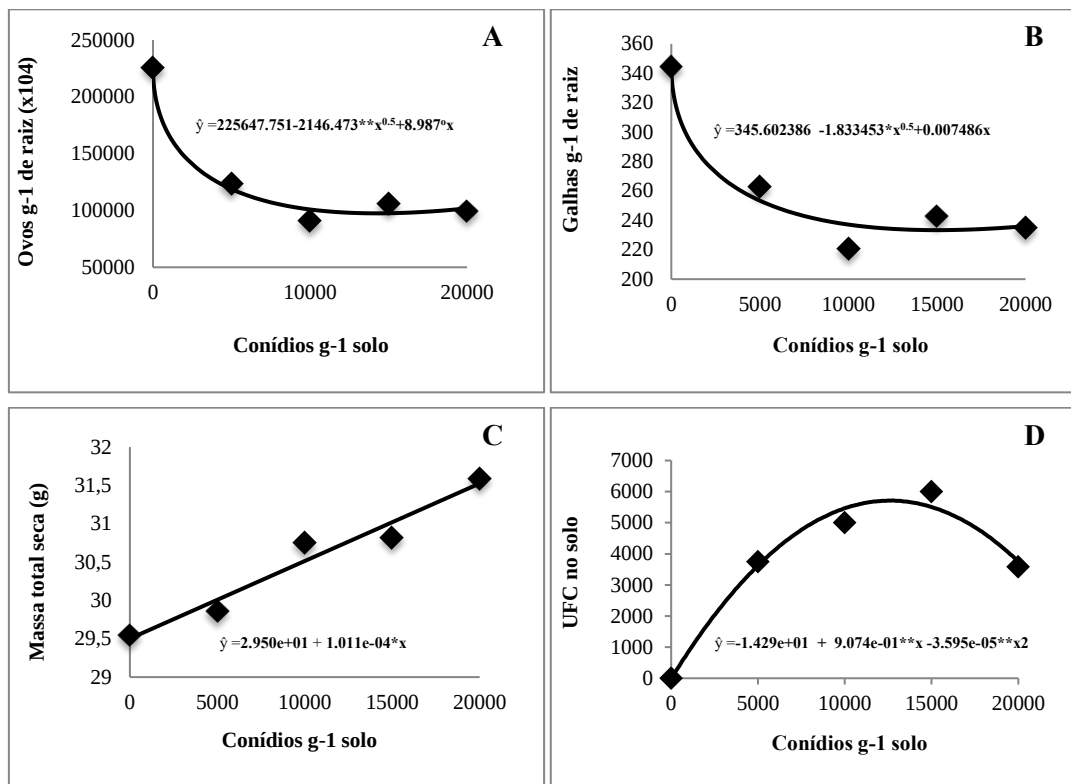


Figura 13. Ovos (A) e galhas (B) de *M. javanica*.g⁻¹ de raiz, massa total da planta seca (C) e unidades formadoras de colônia (UFC) de *P. chlamydosporia* (D), em função da aplicação do fungo no solo (0; 5.000; 10.000; 15.000 e 20.000 conídios.g⁻¹ de solo).

Tabela Suplementar 1. Identificação e origem dos isolados

Id- Isolado	Variedade	Origem
PC-01	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i>	Viçosa-MG
PC-02	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Viçosa-MG
PC-03	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Viçosa-MG
PC-04	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Viçosa-MG
PC-05	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i>	Mariópolis- PR
PC-07	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Viçosa-MG
PC-10	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Viçosa-MG
PC-12	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i>	Viçosa-MG
PC-13	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Mariópolis- PR
PC-14	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i>	Viçosa-MG
PC-15	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Viçosa-MG
PC-18	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i>	Venda Nova do Imigrante-ES
PC-19	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Viçosa-MG
PC-21	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Viçosa-MG
PC-22	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Viçosa-MG
PC-24	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i>	Viçosa-MG
PC-28	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Mariópolis-PR
PC-M4	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i>	Maria da Fé - MG

Tabela Suplementar 2. Acessos dos virus utilizados na Filogenia de Pc-M4

Família	Gênero	Espécies	Acesso GenBank
			dsRNA1 (RdRp)
Cryoviridae	Chrysovirus	<i>Amasya cherry disease associated chrysovirus (ACD-CV)</i>	YP_001531163.1
		<i>Aspergillus fumigatus chrysovirus (AfuCV)</i>	CAX48749.1
		<i>Cryphonectria nitschkei chrysovirus (CnV1)</i>	ACT79256.1
		<i>Helminthosporium victoriae 145S virus (HvV145S)</i>	YP_052858.1
		<i>Penicillium chrysogenum virus (PcV)*</i>	YP_392482.1
		<i>Verticillium dahliae chrysovirus (VdCV1)</i>	ADG21213.1
		<i>Isaria javanica chrysovirus 1 (IjCV1)</i>	YP_009337840.1
		<i>Colletotrichum gloeosporioides chrysovirus 1 (CgCV1)</i>	ALW95408.1
		<i>Macrophomina phaseolina chrysovirus 1 (MpChrV1)</i>	ALD89090.1
		<i>Brassica campestris chrysovirus 1 (BrCV1)</i>	AKU48197.1
		<i>Raphanus sativa chrysovirus 1 (RasCV1)</i>	AFE83590.1
		<i>Botryosphaeria dothidea chrysovirus (BdCV1)</i>	AJD14830.1
		<i>Magnaporthe oryzae chrysovirus 1]</i>	YP_003858286.1
		<i>Fusarium oxysporum f. sp. dianthi mycovirus 1 ()</i>	YP_009158913.1
	Victorivirus	<i>Aspergillus foetidus slow virus 1 (Afv-S)</i>	CCD33024.
		<i>Beauveria bassiana victorivirus 1 (BbVV1)</i>	AMQ11131.1
		<i>Coniothyrium minitans RNA virus (CmRV)</i>	ALM62231.1
		<i>Epichloe festucae virus 1 (EfV1)</i>	CAK02788.1
		<i>Gremmeniella abietina RNA virus L1 (GaRV-L1)</i>	AAK11656.1
		<i>Helicobasidium mompa totivirus 1-17 (HmTV1-17)</i>	NP_898833.1
		<i>Helminthosporium victoriae virus 190S (HvV190S)*</i>	NP_619670.2
		<i>Magnaporthe oryzae virus 1 (MoV1)</i>	YP_122352.1
		<i>Magnaporthe oryzae virus 2 (MoV2)</i>	YP_001649206.1
		<i>Rosellinia necatrix victorivirus 1 (RnVV1)</i>	BAN51775.1
		<i>Sphaeropsis sapinea RNA virus 1 (SsRV1)</i>	NP_047558.1
		<i>Sphaeropsis sapinea RNA virus 2 (SsRV2)</i>	NP_047560.1
		<i>Tolypocladium cylindrosporum virus 1 (TcV1)</i>	YP_004089630.1
	Totivirus	<i>Tuber aestivum virus 1 (TAV1)</i>	ADQ54106.1
		<i>Saccharomyces cerevisiae virus L-A (ScV-L-A)*</i>	NP_620495.1
		<i>Scheffersomyces segobiensis virus L (SsV-L)</i>	AGG68771.1
		<i>Xanthophyllomyces dendrorhous virus L1A (XdV-L1A)</i>	AFH09412.1
		<i>Xanthophyllomyces dendrorhous virus L1B (XdV-L1B)</i>	AFH09414.1
	Giardiavirus	<i>Giardia lamblia virus (GLV)*</i>	NP_620070.1
	Leishmanivirus	<i>Leishmania RNA virus 1 (LRV1)*</i>	APU54698.1
		<i>Leishmania RNA virus 2 (LRV2)</i>	AHK06416.1
	Trichomonasvirus	<i>Trichomonas vaginalis virus 1 (TVV1)*</i>	YP_009162330.1
		<i>Trichomonas vaginalis virus 2 (TVV2)</i>	AKE98370.1

Partitiviridae	Deltapartitivirus	<i>Trichomonas vaginalis virus 3</i> (TVV3)	AKE98372.1
		<i>Trichomonas vaginalis virus 4</i> (TVV4)	AED99798.1
		<i>Pepper cryptic virus 1</i> (PepCV1)*	JN117276
		<i>Raphanus sativus cryptic virus 3</i> (RsCV3)	FJ461349
		<i>Persimmon cryptic virus</i> (PerCV)	HE805113
	Gammapartitivirus	<i>Beet cryptic virus 2</i> (BCV2)	HM560703
		<i>Botryotinia fuckeliana partitivirus 1</i> (BfPV1)	AM491609
		<i>Verticillium dahliae partitivirus 1</i> (VdPV1)	KC422244
		<i>Ustilaginoidea virens partitivirus 1</i> (UvPV1)	KC503898
		<i>Aspergillus fumigatus partitivirus 1</i> (AfuPV1)	FN3768473
	Betapartitivirus	<i>Heterobasidion partitivirus 2</i> (HetPV2)	HM565953
		<i>Heterobasidion partitivirus 7</i> (HetPV7)	JN606091
		<i>Atkinsonella hypoxylon virus</i> (AhV)*	L39125
		<i>Ceratocystis resinifera virus 1</i> (CrV1)	AY603052
	Alphapartitivirus	<i>Rhizoctonia solani dsRNA virus 2</i> (RHsdRV2)	KF372436
		<i>Heterobasidion partitivirus 1</i> (HetPV1)	HQ541323
		<i>Red clover cryptic virus 1</i> (RCCV1)	KF484724
		<i>Carrot cryptic virus</i> (CarCV)	FJ550604
		<i>Dill clover cryptic virus 1</i> (DCV1)	KF484726

Tabela Suplementar 3. Atividade enzimática das proteases semi-purificadas

Etapa	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Extrato Bruto	15072,5	60,2	250,5	100	1
Ultrafiltração	16231,7	35,2	462	107,6	1,84
Q-Sepharose	10797,8	2,9	1803,9	71,6	7,2
Benzamidina-FF	8208,8	0,87	12483,4	54,4	49,8

Tabela Suplementar 4.Caraterização química do solo usado no experimento em casa de vegetação¹.

pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	MOS
H ₂ O	mg/dm ³		cmol _c /dm ³				dag/kg
5.83	258.4	632	18.22	3.73	0,00	3.3	10,21

¹ pH em água usando relação solo/solução de 1:2.5; P e K - Mehlich-1 Extrator; Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺ - KCl extrator (1.0 mol L⁻¹); H+Al – Extrator de Acetato de Calcio 0.5 mol L⁻¹ (pH 7.0); MOS- Matéria Orgânica do Solo.

Tabela Suplementar 5. Sumário dos resultados de BLASTp alinhados com ORF1, ORF2, ORF3 e ORF4 de Pc-M4.

Descrição	ORF1 tamanho (aa)	Total Score	Query cover	E-value	Identidade (%)	Acesso	Positive
RNA-directed RNA-polymerase [Colletotrichum gloeosporioides chrysovirus 1	1088	1467	99%	0	63%	ALW95408.1	79%
putative RNA polymerase [Fusarium oxysporum chrysovirus 1	858	1134	78%	0	63%	ABQ53134.1	76%
RNA-dependent RNA polymerase [Helminthosporium victoriae 145S virus	1086	810	98%	0	41%	YP_052858.1	58%
RNA-dependent RNA polymerase [Isaria javanica chrysovirus 1	1117	773	100%	0	39%	YP_009337840.1	58%
hypothetical protein [Wuhan insect virus 30]	1113	766	98%	0	39%	APG76049.1	57%
RNA-dependent RNA polymerase [Macrophomina phaseolina chrysovirus 1]	1105	756	97%	0	39%	ALD89090.1	58%
RNA-dependent RNA polymerase [Verticillium dahliae chrysovirus 1]	1108	753	96%	0	38%	ADG21213.1	57%
RNA-dependent RNA polymerase [Aspergillus fumigatus chrysovirus]	1114	733	95%	0	39%	CAX48749.1	57%
RNA-dependent RNA polymerase [Penicillium chrysogenum virus]	1117	717	97%	0	37%	YP_392482.1	56%
RNA-dependent RNA polymerase [Amasya cherry disease associated chrysovirus]	1087	713	98%	0	36%	CAH03664.1	56%
putative RNA-dependent RNA polymerase [Amasya cherry disease associated chrysovirus]	1087	710	98%	0	36%	YP_001531163.1	56%
RNA-dependent RNA polymerase [Cryphonectria nitschkei chrysovirus 1]	962	706	83%	0	41%	ACT79258.1	59%
RNA-dependent RNA polymerase [Cryphonectria nitschkei chrysovirus 1]	962	706	83%	0	41%	ACT79255.1	59%
RNA-dependent RNA polymerase [Cryphonectria nitschkei chrysovirus 1]	962	705	83%	0	41%	ACT79256.1	59%
putative RNA-dependent RNA polymerase [Grapevine associated chrysovirus-1]	957	697	87%	0	39%	ADO60926.1	57%
putative RNA-dependent RNA polymerase [Brassica campestris chrysovirus 1]	1146	686	97%	0	35%	AKU48197.1	56%
putative RNA-dependent RNA polymerase [Raphanus sativas chrysovirus 1]	1138	651	95%	0	35%	AFE83590.1	54%
putative RNA-dependent RNA polymerase [Anthurium mosaic-associated virus]	1099	423	92%	1.00E-126	31%	ACU11563.1	49%
putative RNA-dependent RNA polymerase [Persea americana chrysovirus]	1093	418	96%	7.00E-125	28%	AJA37498.1	50%
Descrição	ORF2 Tamanho (aa)	Total Score	Query cover	E-value	Identidade (%)	Acesso	Positive
coat protein [Colletotrichum gloeosporioides chrysovirus 1	900	664	99%	0	39%	ALW95409.1	57%
putative capsid protein [Helminthosporium victoriae 145S virus]	895	349	61%	8.00E-103	34%	YP_052859.1	52%
putative coat protein [Amasya cherry disease associated chrysovirus]	994	315	58%	2.00E-89	34%	YP_001531162.1	53%
putative coat protein [Amasya cherry disease associated chrysovirus]	993	314	58%	3.00E-89	34%	CAH03665.1	53%
coat protein [Fusarium oxysporum chrysovirus 1]	216	284	23%	1.00E-86	60%	ABQ58816.1	76%
hypothetical protein [Wuhan insect virus 30]	807	259	60%	2.00E-70	29%	APG76051.1	48%
capsid protein [Isaria javanica chrysovirus 1]	974	247	56%	2.00E-65	31%	YP_009337889.1	47%
major capsid protein [Penicillium chrysogenum virus]	982	237	60%	7.00E-62	29%	YP_392483.1	46%
capsid protein [Aspergillus fumigatus chrysovirus]	953	279	65%	1.00E-61	29%	CAX48751.2	46%
capsid protein [Macrophomina phaseolina chrysovirus 1]	991	224	61%	1.00E-57	27%	ALD89091.2	45%
capsid protein [Cryphonectria nitschkei chrysovirus 1]	906	223	60%	2.00E-57	28%	ACT79251.1	47%
capsid protein [Cryphonectria nitschkei chrysovirus 1]	905	222	60%	5.00E-57	28%	ACT79252.1	46%
capsid protein [Cryphonectria nitschkei chrysovirus 1]	906	219	60%	5.00E-56	27%	ACT79254.1	46%
capsid protein [Verticillium dahliae chrysovirus 1]	1016	205	60%	4.00E-51	26%	ADG21214.1	47%

putative viral coat protein [Brassica campestris chrysovirus 1]	1116	179	52%	1.00E-42	27%	AKU48196.1	47%
putative coat protein [Raphanus sativas chrysovirus 1]	1101	168	50%	5.00E-39	26%	AFE83591.1	47%
Descrição	ORF3 Tamanho (aa)	Total Score	Query cover	E-value	Identidade (%)	Acesso	Positive
putative protease [Colletotrichum gloeosporioides chrysovirus 1]	823	926	99%	0	55%	ALW95410.1	71%
Hv145SV-protein 3 [Helminthosporium victoriae 145S virus]	839	413	99%	3.00E-128	34%	YP_052860.1	52%
hypothetical protein [Wuhan insect virus 30]	844	375	100%	6.00E-114	30%	APG76050.1	48%
putative protease [Amasya cherry disease associated chrysovirus]	884	365	95%	2.00E-109	30%	YP_001531161.1	47%
putative protease [Amasya cherry disease associated chrysovirus]	884	364	95%	3.00E-109	30%	CAH03666.1	47%
putative protease [Grapevine chrysovirus]	852	325	96%	9.00E-95	29%	AFX73020.1	46%
putative cysteine protease [Cryphonectria nitschkei chrysovirus 1]	824	318	95%	2.00E-92	28%	ADG27459.1	45%
P4 [Macrophomina phaseolina chrysovirus 1]	843	315	99%	3.00E-91	28%	ALD89093.2	46%
hypothetical protein [Aspergillus fumigatus chrysovirus]	847	299	99%	2.00E-85	26%	CAX48755.1	44%
ovarian tumor protease [Verticillium dahliae chrysovirus 1]	823	287	97%	3.00E-81	27%	ADG21216.1	45%
OTU proteinase [Cryphonectria nitschkei chrysovirus 1]	829	277	96%	2.00E-77	27%	ABI20757.1	44%
hypothetical protein [Penicillium chrysogenum virus]	847	276	96%	6.00E-77	26%	YP_392485.1	45%
putative protease [Isaria javanica chrysovirus 1]	843	235	96%	2.00E-62	25%	YP_009337841.1	43%
hypothetical protein [Grapevine associated chrysovirus-3]	457	186	49%	8.00E-48	31%	ADO60935.1	48%
putative viral protease [Brassica campestris chrysovirus 1]	1021	183	76%	4.00E-44	24%	AKU48195.1	43%
Descrição	ORF4 Tamanho (aa)	Total Score	Query cover	E-value	Identidade (%)	Acesso	Positive
hypothetical protein [Amasya cherry disease associated chrysovirus]	677	74.7	21%	2.00E-10	30%	CAH03667.1	50%
Hv145SV-protein 4 [Helminthosporium victoriae 145S virus]	713	74.7	20%	3.00E-10	31%	YP_052861.1	49%
hypothetical protein ACDACVs4_gp01 [Amasya cherry disease associated chrysovirus]	677	73.2	17%	8.00E-10	33%	YP_001531160.1	52%
RNA-dependent RNA polymerase [Verticillium dahliae chrysovirus 1]	1108	63.5	52%	9.00E-07	20%	ADG21213.1	36%
RNA-directed RNA-polymerase [Colletotrichum gloeosporioides chrysovirus 1]	1088	63.2	39%	1.00E-06	26%	ALW95408.1	42%
putative RNA-dependent RNA polymerase [Grapevine associated chrysovirus-1]	957	61.6	54%	4.00E-06	22%	ADO60926.1	37%
RNA-dependent RNA polymerase [Helminthosporium victoriae 145S virus]	1086	61.2	37%	5.00E-06	22%	YP_052858.1	35%
hypothetical protein [Wuhan insect virus 30]	1113	60.1	51%	1.00E-05	21%	APG76049.1	36%
P3 [Macrophomina phaseolina chrysovirus 1]	886	59.3	39%	2.00E-05	25%	ALD89092.1	43%
putative RNA-dependent RNA polymerase [Amasya cherry disease associated chrysovirus]	1087	59.3	35%	2.00E-05	24%	YP_001531163.1	41%
RNA-dependent RNA polymerase [Aspergillus fumigatus chrysovirus]	1114	59.3	62%	2.00E-05	21%	CAX48749.1	37%
RNA-dependent RNA polymerase [Amasya cherry disease associated chrysovirus]	1087	57	35%	9.00E-05	23%	CAH03664.1	40%
putative RNA-dependent RNA polymerase [Brassica campestris chrysovirus 1]	1146	57	23%	1.00E-04	24%	AKU48197.1	40%
RNA-dependent RNA polymerase [Isaria javanica chrysovirus 1]	1117	57	56%	1.00E-04	21%	YP_009337840.1	39%
RNA-dependent RNA polymerase [Penicillium chrysogenum virus]	1117	56.6	43%	1.00E-04	21%	YP_392482.1	37%
RNA-dependent RNA polymerase [Cryphonectria nitschkei chrysovirus 1]	962	56.2	52%	2.00E-04	20%	ACT79258.1	34%
RNA-dependent RNA polymerase [Cryphonectria nitschkei chrysovirus 1]	962	55.8	62%	2.00E-04	20%	ACT79255.1	34%
RNA-dependent RNA polymerase [Cryphonectria nitschkei chrysovirus 1]	962	55.1	52%	4.00E-04	20%	ACT79256.1	34%

RNA-dependent RNA polymerase							
[Macrophomina phaseolina chrysovirus 1]	1105	53.9	41%	0.001	23%	ALD89090.1	39%

Tabela Suplementar 6. Sumário dos resultados de BLASTp : sequencias alinhadas com ORF de PcNSRV1.

Description	ORF1 Tamanho (aa)	Total Score	Query cover	E- value	Identi- dade (%)	Acesso	Similaridade
RNA-dependent RNA polymerase [Soybean leaf-associated negative-stranded RNA virus 1]	1941	1160	91%	0	38%	ALM622 20.1	55%
gp5 [Sclerotinia sclerotiorum negative-stranded RNA virus 3]	1934	1138	91%	0	38%	YP_0091 29259.1	55%
large polymerase [Sclerotinia sclerotiorum negative-stranded RNA virus 1]	1934	1135	91%	0	38%	YP_0090 94317.1	55%
RNA-dependent RNA polymerase [Soybean leaf-associated negative-stranded RNA virus 2]	1935	1121	96%	0	36%	ALM622 27.1	54%
RNA-dependent RNA polymerase [Sclerotinia sclerotiorum negative-stranded RNA virus 4]	2010	457	77%	7.00E-128	27%	ALD8914 0.1	44%
RNA-dependent RNA polymerase [Sclerotinia sclerotiorum negative-stranded RNA virus 2]	2009	449	76%	2.00E-125	27%	ALD8914 5.1	43%
RNA-dependent RNA polymerase, partial [Soybean leaf-associated negative-stranded RNA virus 3]	2032	488	68%	9.00E-122	28%	ALM622 28.1	45%
RNA-dependent RNA polymerase, partial [Soybean leaf-associated negative-stranded RNA virus 4]	1531	402	52%	1.00E-111	29%	ALM622 29.1	46%
RNA-dependent RNA polymerase [Hubei rhabdo-like virus 4]	1949	398	63%	8.00E-109	27%	YP_0093 36595.1	45%
hypothetical protein [Parasitella parasitica]	862	285	27%	8.00E-77	30%	CEP1281 8.1	51%
RNA-dependent RNA polymerase [Wuchan romanomermis nematode virus 2]	2058	291	53%	2.00E-75	26%	YP_0093 42285.1	43%
RNA-dependent RNA polymerase [Hubei rhabdo-like virus 3]	2023	278	59%	1.00E-71	26%	YP_0093 36889.1	43%
RNA-dependent RNA polymerase [Tacheng Tick Virus 6]	2083	276	49%	7.00E-71	25%	YP_0093 04420.1	43%
L protein [Berant virus]	2014	249	54%	1.00E-62	24%	AOC5508 1.1	43%
RNA-dependent RNA polymerase [Sierra Nevada virus]	1917	241	46%	3.00E-60	24%	YP_0090 44201.1	42%
RNA-dependent RNA polymerase [Midway nyavirus]	1935	239	45%	9.00E-60	25%	YP_0029 05331.1	42%
RNA-dependent RNA polymerase [Sanxia Water Strider Virus 4]	2108	233	41%	9.00E-58	24%	YP_0092 88955.1	42%
RNA-dependent RNA polymerase [Nyamanini nyavirus]	1936	227	45%	5.00E-56	25%	YP_0029 05337.1	41%
RNA-dependent RNA polymerase [Hubei rhabdo-like virus 7]	1997	223	45%	7.00E-55	24%	YP_0093 37121.1	42%
hypothetical protein MYCFIDRAFT_84735 [Pseudocercospora fijiensis CIRAD86]	437	205	20%	1.00E-53	32%	XP_0079 32388.1	49%
RNA-dependent RNA polymerase [Beihai rhabdo-like virus 5]	1920	219	46%	1.00E-53	25%	YP_0093 33422.1	42%
putative RNA dependent RNA polymerase [Soybean cyst nematode socyvirus]	2086	216	45%	1.00E-52	24%	YP_0090 52467.1	41%

CONCLUSÕES GERAIS

- A aplicação conjunta de *B. japonicum* e *P. chlamydosporia* não prejudica a ação de controle de nematoides pelo fungo e nem a fixação de N₂ pela bactéria. Ao contrário, quando os dois agentes estavam juntos, verificou-se maior produção de nódulos da bactéria nas raízes e ainda aumento no conteúdo de Fe na parte aérea das plantas de soja. O fungo *P. chlamydosporia* é capaz de aumentar a aquisição de macro e micronutrientes em plantas de soja quando aplicado isoladamente.
- Os agentes de controle biológico de nematoides *P. chlamydosporia* e *P. penetrans*, quando aplicados em conjunto, possibilitaram maior redução do número de ovos do nematoide do que quando aplicados em separado. Foi possível observar por microscopia a associação do fungo nas raízes infectadas por nematoides colonizados pela bactéria.
- Foram caracterizados os primeiros micovírus infectando isolado de *P. chlamydosporia*. Os vírus foram nomeados como *Pochonia chlamydosporia* chrysovirus 1 (PcCV1) e pertence a família *Chrysoviridae* e *Pochonia chlamydosporia* negative-stranded RNA virus 1 (PcNSRV1), associado a membro da família *Myomonaviridae*. Ensaios biológicos do isolado fúngico Pc-M4 revelaram que este foi capaz de parasitar ovos, produzir metabólitos e proteases letais aos juvenis e reduzir a reprodução do nematoide de galhas *M. javanica*, mesmo estando infectado por vírus
- Os resultados apresentados nessa Tese indicam que o fungo *P. chlamydosporia* é capaz de interagir com diferentes organismos sem perder a capacidade de controlar o nematoide de galhas.