

LEONARDO DOMINGUES DE FIGUEIREDO

**ATIVIDADE DE *Pochonia chlamydosporia* SOBRE
NEMATOIDES DO GÊNERO *Meloidogyne* NA PRESENÇA
DE MATÉRIA ORGÂNICA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

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

T

F475a
2014 Figueiredo, Leonardo Domingues de, 19-
Atividade de *Pochonia chlamydosporia* sobre nematoides
do gênero *Meloidogyne* na presença de matéria orgânica /
Leonardo Domingues de Figueiredo. – Viçosa, MG, 2014.
vi, 53f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Leandro Grassi de Freitas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Nematóide. 2. *Pochonia chlamydosporia*. 3. Fungos
nematófagos - Controle biológico. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de
Pós-graduação em Fitopatologia. II. Título.

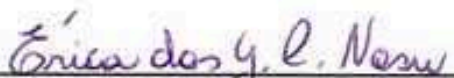
CDD 22. ed. 632.45

LEONARDO DOMINGUES DE FIGUEIREDO

**ATIVIDADE DE *Pochonia chlamydosporia* SOBRE
NEMATOIDES DO GÊNERO *Meloidogyne* NA PRESENÇA
DE MATÉRIA ORGÂNICA**

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

APROVADA: 24 de outubro de 2014.



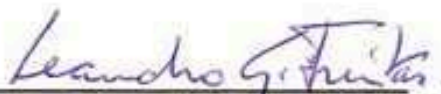
Érica das Graças Carvalho Nasu



Silamar Ferraz



Paulo Afonso Ferreira
Coorientador



Leandro Grassi de Freitas
Orientador

À minha namorada Bianca Nunes, por fazer parte dessa caminhada,

Aos amigos, pelo suporte emocional, confiança e motivação,

À minha irmã, Lílian Domingues, pelo incentivo,

Aos meus pais, Luiz e Lusia, por TUDO,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Leandro Grassi de Freitas, pela orientação, confiança e oportunidade de participar da “Família BIONEMA”.

Ao Professor Silamar Ferraz, pelo exemplo e orientações.

Ao Professor Paulo Afonso, pela amizade, conselhos e críticas neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides, Paulo, Hugo, Alessandro, Ronaldo, Murilo, Thalita, Cleiton, Nara, Ingrid, Flávia, Augusto, Marilene, Deisy, Érica, Fernanda, Viggiano, Elder, Raul, Guilherme, Dayana, Rosana, Paula, Josiane, Davi, Leandro, José Otávio, Hayala, por terem feito parte de cada momento da minha vida profissional.

Aos amigos do Mestrado e da “Pelada da Fitopatologia”, por transformarem momentos difíceis em aprendizagem.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pelos ensinamentos, apoio técnico e infraestrutura para execução desse projeto.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	6
CAPÍTULO 1 - Atividade parasítica de <i>Pochonia chlamydosporia</i> em presença de materiais orgânicos que possuem diferentes relações C/N	
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1.1 – Introdução	13
1.2 – Material e Métodos	14
1.3 – Resultados e Discussão.....	17
1.4 – Conclusões.....	24
1.5 – Referências	25
CAPÍTULO 2 - Efeito da reaplicação de <i>P. chlamydosporia</i> em diferentes intervalos de tempo para controle de <i>Meloidogyne enterolobii</i> em plantas de acerola	
RESUMO	31
ABSTRACT	32
1.1 – Introdução	33
1.2 – Material e Métodos	35
1.3 – Resultados e Discussão.....	37
1.4 – Conclusões.....	43
1.5 – Referências	44
CONCLUSÕES GERAIS	50
ANEXOS.....	51

RESUMO

FIGUEIREDO, Leonardo Domingues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2014. **Atividade de *Pochonia chlamydosporia* sobre nematoides do gênero *Meloidogyne* na presença de matéria orgânica.** Orientador: Leandro Grassi de Freitas. Coorientador: Paulo Afonso Ferreira.

Os nematoides pertencentes ao gênero *Meloidogyne* tem estado constantemente relacionados a perdas de produção em diversas culturas agrícolas no Brasil. Além disso, medidas de controle mais sustentáveis para esse patógeno tem sido cada dia mais demandadas pela sociedade e por produtores. Desta maneira, este trabalho teve o intuito de estudar a atividade parasítica do agente de controle biológico *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) em presença de matéria orgânica para os patossistemas: *Meloidogyne javanica* em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e *Meloidogyne enterolobii* em plantas de acerola (*Malpighia glabra*). Para tal, dois experimentos foram montados visando avaliar se a aplicação de materiais orgânicos de diferentes teores de carbono e nitrogênio (C:N), criariam um ambiente diversificado o bastante, para que *P. chlamydosporia* atuasse diferentemente sobre ovos de nematoides do gênero *Meloidogyne*. Ao final dos experimentos foi observado que o material com maior teor de nitrogênio estimulou a atividade do fungo sobre ovos de *M. javanica*, diferentemente do efeito negativo exercido pelo material rico em carbono. Tal conhecimento, pode melhorar a utilização de *P. chlamydosporia* ao otimizar a atividade antagonista do fungo sobre ovos de nematoides na agricultura por estimular a fase parasítica do agente de controle biológico em relação a sua fase saprofítica. Um outro trabalho foi realizado com plantas de acerola. Este analisou se a reaplicação de Pc-10 em intervalos de tempos mais curtos difeririam de espaços de tempo mais longos no controle de *M. enterolobii*. Foi observado que 3 aplicações/ano (cada 4 meses) fazem com que maiores partes aéreas e sistema radiculares sejam desenvolvidos nas plantas tratadas com o fungo, entretanto, maiores são os valores de galhas encontrados neste tratamento. Tratamentos com menores valores de aplicação por ano (2 aplicações e 1 aplicação), promoveriam maior controle de ovos de *M. enterolobii*. Neste caso, o conhecimento do intervalo de tempo ideal das reaplicações, maximiza a quantidade de produto biológico utilizado em campo, diminui custos de aplicação e aumenta a eficácia do agente de biocontrole, pois os níveis populacionais do fungo se mantêm próximo do ideal para controle de fitonematoides.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, Leonardo Domingues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, october, 2014. ***Pochonia chlamydosporia* parasitic activity against nematodes of the genus *Meloidogyne* in presence of organic materials**. Adviser: Leandro Grassi de Freitas. Co-adviser: Paulo Afonso Ferreira.

Nematodes of the genus *Meloidogyne* have been consistently related to production losses in several crops in Brazil. In addition, the society and producers have increasingly demanded more sustainable control measures to these pathogens. Thus, this work aimed to study the parasitic activity of the biological control agent *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) in the presence of organic materials in two pathosystems: *Meloidogyne javanica* in tomatoes plants (*Solanum lycopersicum*) and *Meloidogyne enterolobii* in barbados cherry plants (*Malpighia glabra*). Two experiments were performed to evaluate if the application of organic materials with different levels of carbon and nitrogen ratios (C:N) would modify beneficially the soil environment to improve *P. chlamydosporia* activity against nematodes eggs of the genus *Meloidogyne*. In this experiment was concluded that high levels of nitrogen in the organic material improved fungus control performance against *M. javanica*. Such knowledge can improve the *P. chlamydosporia* utilization in the agriculture by stimulating the parasitic phase of the fungus. Another experiment was conducted with barbados cherry plants. In this case, the experiment aimed to evaluate reapplication times to control *M. enterolobii*. It was observed that 3 application/years increased plant height and root system mass. However, the number of galls increased in the same treatment. Treatments with lower values of fungus application per year (two applications and one application) promoted better control levels of *M. enterolobii* eggs. The knowledge of the optimal fungus reapplication time maximizes the amount of biocontrol agent used in the field, decreases application costs and increases the efficacy of biocontrol agent.

INTRODUÇÃO GERAL

Os nematoides fitoparasitas constituem um fator limitante de produtividade agrícola em diferentes culturas e regiões do globo (CARNEIRO, 1992). As perdas na produção agrícola causadas pelos fitonematoides podem variar de 10 a 90% (AGUDELO, 1980; FERRAZ, 2005). O grau de dano depende da densidade populacional dos nematoides presentes, da susceptibilidade da cultura e das condições ambientais reinantes no local (SASSER, 1987).

Espécies do gênero *Meloidogyne* Goeldi (1887) são, dentre todos os fitonematoides, as maiores responsáveis por perdas na agricultura (DE GUIRAN & NETSCHER, 1970). Isto se dá devido à sua ampla distribuição geográfica, polifagia e diferença biológica ligada ao parasitismo entre populações da mesma espécie (CARNEIRO, 1992), o que dificulta a implantação de programas de resistência varietal e rotação de culturas, que são as medidas mais efetivas e viáveis em nossas condições (FERRAZ et al., 2010).

Em levantamentos da nematofauna associada a culturas olerícolas como alface, batata, batata-doce, quiabo, cenoura e tomate no Brasil, Charchar (1995) verificou grande associação dos nematoides das galhas com perdas tanto qualitativas quanto quantitativas. As espécies do gênero *Meloidogyne* detectadas com maior frequência foram *M. incognita* Chitwood e *M. javanica* Chitwood, correspondendo a 48% e 37% das amostras coletadas nas regiões produtoras, respectivamente.

A utilização de técnicas de manejo é a única forma viável de reduzir as populações do parasita para níveis inferiores àqueles capazes de causar prejuízos sem riscos de contaminação do meio ambiente. O controle biológico insere-se perfeitamente dentro desta filosofia, por fazer uso de organismos antagonistas de ocorrência natural como agentes de controle. Através do controle biológico há uma possibilidade de se

resgatar o equilíbrio populacional de nematoides no ecossistema, em inteira consonância com os demais organismos e culturas agrícolas (CAMPOS, 1992).

Diversos inimigos naturais dos nematoides são comumente encontrados nos solos, e os que apresentam maior potencial como agentes de controle biológico são as bactérias e os fungos (JATALA, 1986; STIRLING, 1991; FERRAZ & SANTOS., 1995). Os fungos nematófagos são os organismos mais estudados e apresentam estratégias sofisticadas para infectar ou capturar nematoides, podendo ser divididos em: predadores, endoparasitas, oportunistas (parasitas de ovos e de fêmeas sedentárias) e aqueles que produzem metabólitos tóxicos aos nematoides (MANKAU, 1980; JATALA, 1986; STIRLING, 1991).

Um grupo de fungos nematófagos com grande eficiência no controle biológico de nematoides são os fungos oportunistas ou parasitas de ovos e de fêmeas, com destaque para as espécies *Purpureocillium lilacinum* (Thomn.) Samson e *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & Gams, conhecido anteriormente como *Verticillium chlamydosporium* Goddard, respectivamente.

O fungo saprofítico *P. chlamydosporia* não depende da presença de ovos de nematoides no solo para a sua sobrevivência. Esse antagonista pode, em condições favoráveis, se desenvolver na matéria orgânica em campos de cultivo. Em função dessa característica, se estabelece de maneira mais fácil no solo, quando comparado com outros fungos predadores. Coloniza rapidamente ovos e fêmeas de nematoides, destruindo de uma só vez grande quantidade de indivíduos, especialmente no caso do nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) e do nematoide-dos-cistos (*Heterodera* Schmidt, *Globodera* Skarbilvitch (STIRLING, 1991).

O declínio da população de *Heterodera avenae* Wollenweber (nematoide-do-cisto-dos-cereais) foi detalhadamente estudado por Kerry (1982) em áreas agrícolas na Inglaterra. O autor concluiu que a grande população dos fungos nematófagos

Nematophthora gynophila Kerry & Crump e *V. chlamydosporium* encontrada nas áreas de plantio era o maior responsável pela supressividade.

O isolado de *P. chlamydosporia* utilizado para execução dessa dissertação foi pré-selecionado e detalhadamente estudado por Dalemolle (2008). Atualmente, o mesmo isolado é o princípio ativo de um produto em desenvolvimento pela parceria Rizoflora Biotecnologia S.A e Universidade Federal de Viçosa (UFV) para controle de fitonematoides.

Diversos autores têm verificado o efeito de combinações de uso de antagonistas sobre vigor das plantas e supressão no número de fêmeas, ovos, juvenis e galhas, principalmente envolvendo espécies de *Meloidogyne* (STIRLING, 1991; DE LEIJ et al., 1992; SIDDIQUI et al., 1999; SIDDIQUI & SHAUKAT., 2003).

Em solos supressivos, a presença de mais de um agente de biocontrole é considerada como um dos principais fatores que contribuem para este fenômeno (LEMANCEAU & ALABOUVETTE, 1991; STIRLING, 1991). Portanto, a introdução de um agente de controle biológico ou mesmo mistura deles associados a outras medidas de controle, provavelmente lograria a um maior sucesso no controle biológico em função da ampliação do espectro de atividade, podendo reunir vários mecanismos de ação contra o patógeno alvo (SIDDIQUI & SHAUKAT 2003). Algumas vantagens da combinação de antagonistas ou de algum método cultural com um agente de biocontrole podem ser listadas: a) múltiplos modos de ação contra o patógeno alvo; b) habilidade para afetar mais do que um estágio do ciclo de vida do patógeno alvo; c) atividade durante diferentes épocas na estação de crescimento; d) aumentar a consistência do controle em ampla gama de condições de solo; e) potencial para selecionar organismos que afetem mais do que um patógeno ou pragas, aumentando o espectro de uso do produto (LEMANCEAU & ALABOUVETTE, 1991; MEYER & ROBERTS, 2002).

A incorporação de material orgânico vegetal ao solo é uma medida também bem sucedida no controle de nematoides. Após a incorporação ao solo de algumas fontes de matéria orgânica, compostos nematicidas preexistentes são liberados no solo (CHITWOOD, 2002). Os mais comumente relatados são: os compostos fenólicos e taninos (MIAN & RODRIGUEZ-KABANA, 1982); glucosinolatos, presentes em *Brassica* spp. (BROWN & MORRA, 1997; AL-REHIAYANI & HAFEZ, 1998); glicosídeos cianogênicos em sorgo (*Sorghum bicolor*) e em outras gramíneas (MOJTAHEDI; SANTO; WILSON, 1993; CHEEKE, 1995); limonoides e azaractina, em plantas de nim (*Azadirachta indica*) (CHITWOOD, 2002); L-Dopa, 1-triacontanol e triacontil tetracosanato em mucuna (*Mucuna pruriens*) (NOGUEIRA et al., 1996; BARBOSA et al., 1999); furfural, em bagaço de cana-de-açúcar ou em palha de café (SIKORA; SINGH; SITARAMAIAH, 1973; ZAMBOLIM et al., 1996); ricina, em mamona (*Ricinus communis*) (RICH et al., 1989); concavalina, em feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) (MARBAN-MENDOZA, 1987); alfa-tertienil e derivados, em *Tagetes* sp. (UHLEMBROEK & BIJLOO, 1958).

Os mecanismos de ação contra nematoides também são atribuídos, em parte, a fatores como a melhoria das características físicas e químicas do solo (STIRLING, 1991), resultando em melhor desenvolvimento das plantas, além do aumento de populações de actinomicetos, algas, bactérias, fungos e outros organismos, tais como nematoides predadores. A proliferação de microrganismos resulta em aumento de atividades enzimáticas no solo e acúmulo de compostos de produtos finais específicos, os quais podem ser nematicidas. A magnitude do estímulo microbiano e a natureza qualitativa da microflora obtida em resposta dependem da natureza da matéria orgânica adicionada (RODRIGUEZ-KABANA & HOLLIS, 1965). Desta forma, a supressão de fitonematoides pelo uso de matéria orgânica é provavelmente baseada em um complexo

modo de ação envolvendo múltiplos mecanismos (CHAVARRÍA-CARVAJAL & RODRÍGUEZ-KÁBANA, 1998).

Quando os fungos nematófagos são aplicados conjuntamente a uma fonte de matéria orgânica, a possibilidade de estabelecimento destes organismos aumenta consideravelmente e, além disso, pode potencializar o controle de nematoides, liberando compostos nematicidas e melhorando a nutrição da planta hospedeira, pela liberação de nutrientes (CANNAYANE & RAJENDRAN, 2001).

Desta maneira, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade parasítica do fungo *P. chlamydosporia* (Pc-10) sobre ovos de nematoides do gênero *Meloidogyne* em presença de materiais orgânicos.

REFERÊNCIAS:

AGUDELO, F.V. Nematodes. In: SCHWARTZ, H.F.; GALVEZ, G.E. (Ed.). Bean production problems. Cali: CIAT, 1980. 315-326p.

AL-REHIAYANI, S.; HAFEZ, S.L. Host status and Green manure effect of selected crops on *Meloidogyne chitwoodi* race 2 and *Pratylenchus neclectus*. *Nematropica*, v.28, p.213-230. 1998.

BARBOSA, L.C.A.; BARCELOS, F.E.; DEMUNER, A.J.; SANTOS, M.A. Chemical constituents from *Mucuna aterrima* with activity against *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines*. *Nematropica*, v.29, p.81-88. 1999.

BROWN, P.D.; MORRA, M.J. Control of soil-borne plant pest using glucosinolate-containing plants. In: SPARKS, D.L. (Ed.). Advances in agronomy. San Diego: Academic Press, 1997. 167-215p.

CAMPOS, V.P. Perspectivas do controle biológico de fitonematóides. *Informe Agropecuário*, v.16, p.26-30. 1992.

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

CARNEIRO, R.M.D.G. Princípios e tendências do controle biológico de nematoides com fungos nematófagos. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v.27, p.113-121. 1992.

CHARCHAR, J.M. *Meloidogyne* em hortaliças. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE NEMATOLOGIA TROPICAL, 19. Programa e anais. Brasília: Sociedade Brasileira de Nematologia, 1995. 149-153p.

CHAVARRÍA-CARVAJAL, J.A.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. Changes in soil enzymatic activity and control of *Meloidogyne incognita* using four organic amendments. *Nematropica*, v.28, p.7-18. 1998.

CHEEKE, P.R. Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effects on livestock. *Journal of Animal Science*, v.73, p.909-918. 1995.

CHITWOOD, D.J. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology*, v.40, p.221-49. 2002.

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

DE GUIRAN, G.; NETSCHER, C. Les nématodes du genre *Meloidogyne*, parasites de cultures tropicales. *Cahiers ORSTOM, sér. Biol.*, v.11, p.151-185. 1970.

DE LEIJ, F.A.A.M.; DAVIES, K.G.; KERRY, B.R. The use of *Verticillium chlamydosporium* Goddard and *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr alone and in combination to control *Meloidogyne incognita* on tomato plants. *Fundamental and Applied Nematology*, v.15, p.235-242. 1992.

FERRAZ, S.; SANTOS, M.A. Controle biológico de fitonematóides pelo uso de fungos. *Revisão Anual de Proteção de Plantas*, v.3, p.283-314. 1995.

FERRAZ, L.C.C.B. Problemas nematológicos na cultura do feijão irrigado In: A. L. FANCELLI.; NETO, D.D. (Ed.). *Feijão irrigado: tecnologia & produção*. Piracicaba: ESALQ/USP/LVP. 2005. 63-72p.

FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A.; DIAS-ARIEIRA, C.R. Manejo sustentável de fitonematoides. Viçosa: Editora UFV. 2010. 304p.

JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, v.24, p.453-489. 1986.

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

LEMANCEAU, P.; ALABOUVETTE, C. Biological control of *Fusarium* diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Protection*, v.10, p.279-286. 1991.

MANKAU, R. Biocontrol: fungi as nematode control agents. *Journal of Nematology*, v.12, p.244-252. 1980.

MARBAN-MENDOZA, N.; JEYAPRAKASH, A.; JANSON, H.B.; DAMON, J.R.; ZUCKERMAN, B.M. Control of root-knot nematodes on tomato by lectins. *Journal of Nematology*, v.15, p.331-335. 1987.

MEYER, S.L.F.; ROBERTS, D.P. Combinations of biocontrol agents for management of plant-parasitic nematodes and soilborne plant pathogenic fungi. *Journal of Nematology*, v.34, p.1-8. 2002.

MIAN, I.H.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Organic amendments with high tannin and phenolic contents for control of *Meloidogyne arenaria* in infested soil. *Nematropica*, v.12, p.221-234. 1982.

MOJTAHEDI, H.; SANTO, G.S.; WILSON, J.H. Managing *Meloidogyne chitwood* on potato with rapessed as green manure. *Plant Disease*, v.77, p.42-46. 1993.

NOGUEIRA, M.A.; OLIVEIRA, J.S.; FERRAZ, S.; SANTOS, M.A. Nematicidal constituents in *Mucuna aterrima* and its activity on *Meloidogyne incognita* raça 3. *Nematologia Mediterranea*, v.24, p.249-252. 1996.

RICH, J. R.; RAHI, G. S.; OPPERMAN, C. H.; DAVIS, E. L. Influence of the castor bean (*Ricinus communis*) lectins (ricin) on motility of *Meloidogyne incognita*. *Nematropica*, v.19, p.99-103. 1989.

RODRIGUEZ - KABANA, R.G.; HOLLIS, J.P. Biological control of nematodes in rice fields: role of hydrogen sulfide. *Science*, v.148, p.524-526. 1965.

SASSER, J.N.; FRECKMAN, D.W. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J.A.; DICKSON, D.W. (Ed.). *Vistas on Nematology*. Maryland: Society of Nematologists. 1987. 7-14p.

SIDDIQUI, I.A.; SHAUKAT, S.S. Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamydosporia* for control of root-knot infecting fungi in tomato. *Journal of Phytopathology*, v.151, p.215-222. 2003.

SIDDIQUI, M.A.; EHTESHAMUL-HAQUE, S.; GHAFFAR, A. Use of *Pseudomonas aeruginosa* and fungal antagonists in the control of root-knot rot disease complex on mungbean and mashbean. *Pakistan Journal of Nematology*, v.17, p.155-167. 1999.

SIKORA, R.A.; SINGH, R.S.; SITARAMAIAH, K. Control of root-knot through organic and inorganic soil amendments. III: Effect of rice husk and sugarcane bagasse. *Haryana Journal of Horticultural Sciences*, v.2, p.123-127. 1973.

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

UHLEMBROEK, J.H.; BIJLOO, J.D. Investigations on nematicidas. Isolation and structure of nematicidal principle occurring in *Tagetes* roots. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, v.77, p.1004-1009. 1958.

ZAMBOLIM, L.; SANTOS, M.A.; BECKER, W.F.; CHAVES, G.M. Agro-waste soil amendments for the control of *Meloidogyne javanica* on tomato. *Fitopatologia Brasileira*, v.21, p.250-253. 1996.

CAPÍTULO 1

**ATIVIDADE PARASÍTICA DE *Pochonia chlamydosporia* EM PRESENÇA DE
MATERIAIS ORGÂNICOS QUE POSSUEM DIFERENTES RELAÇÕES C/N**

RESUMO

A efetividade de uma dada matéria orgânica na supressão de fitonematoide depende de sua composição química e das espécies de microrganismos que desenvolvem nela. *Pochonia chlamydosporia* é um fungo saprofítico e independe da presença de ovos de nematoides no solo para a sua sobrevivência. Este trabalho teve o intuito de analisar a atividade parasítica do antagonista em três materiais orgânicos (cama de frango, palha de café e palha de trigo) que possuem diferentes relações C/N em presença do nematoide *Meloidogyne javanica* em plantas de tomate. No primeiro experimento, todas as plantas do tratamento palha de trigo, em presença de *P. chlamydosporia* (Pc-10), morreram. Ainda para o primeiro teste, houve aumento em 48,04% em relação a controle ao se utilizar o tratamento cama de frango + Pc-10 para a variável massa da parte aérea. Entretanto, para o segundo experimento, não foi observada diferença entre os tratamentos que continham cama de frango e o controle. Quando avaliou-se a massa do sistema radicular, cama de frango + Pc-10, também foi o tratamento que proporcionou maior aumento da massa de raiz atingindo 63,24% em relação ao controle no segundo experimento. Ao se avaliar galhas/grama de raiz e ovos totais, os maiores índices de reduções também foram encontrados para o tratamento cama de frango + Pc-10 nas duas experimentações. Desta maneira, a partir dos dados encontrados, conclui-se que, a associação de *P. chlamydosporia* com cama de frango apresenta grandes potenciais para manejo de fitonematoides.

ABSTRACT

The effectiveness of organic matter in suppressing nematodes populations depends on its chemical composition and on the kind of microorganisms that grow on it. *Pochonia chlamydosporia* is a saprophytic fungus widely distributed in soil, in addition to that it can survive in organic matter in the absence of nematode eggs. This experiment aimed to evaluate the parasitic activity of *P. chlamydosporia* in the presence of three organic materials with different C:N ratio (chicken litter, wheat husk and coffee husk) against *Meloidogyne javanica*. In the first experiment all plants treated with wheat husk died during the first test and the treatment with chicken litter amendments + Pc-10 increased plant fresh weight above ground in 48,04% in relation to the control treatment. However, the same result was not found in the second test. When the root system weight was the variable analyzed, the best values found were chicken litter amendments + Pc-10 which increased 63,24% in relation to control. The greatest reduction of the number of galls per root grams and number of total eggs were found in the same treatment listed before for both experiment. Thus, the fungus association with chicken litter amendments has great potential to control nematodes.

INTRODUÇÃO

A matéria orgânica do solo é constituída por compostos de carbono em diferentes graus de associação com as fases minerais do solo originados a partir da decomposição de resíduos vegetais e animais. Tais resíduos, fornecem nutrientes que melhoram as condições do solo e também apresentam bioatividade, ou seja, efeitos estimulantes em plantas (ZANDONADI et al., 2014). Além disso, a adição de determinados materiais orgânicos ao solo pode contribuir para redução de fitonematoides (STIRLING, 1991).

A efetividade de uma dada matéria orgânica para supressão de nematoide depende de sua composição química e das espécies de microrganismos que desenvolve nela (BADRA et al., 1979). Outro fator determinante é que, quando os fungos nematófagos são aplicados conjuntamente a uma fonte de matéria orgânica, a possibilidade de estabelecimento destes organismos aumenta (CANNAYANE & RAJENDRAN., 2001). Quando um agente de biocontrole se estabelece de maneira mais eficaz no solo, maiores são as chances de atuação dos mesmos sobre as populações de organismos patogênicos às culturas agrônômicas, favorecendo maiores índices de produção no campo.

O fungo *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & Gams (anteriormente denominado *Verticillium chlamydosporium* (Goddard), teleomorfo *Metacordyceps chlamydosporia* (H.C. Evans) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (ZARE; GAMS; EVANS, 2001; ZARE; GAMS, 2005; SUNG et al., 2007) é um promissor agente de controle biológico de nematoides do gênero *Meloidogyne* e *Heterodera* (KERRY, 2000; MORTON; HIRSCH; KERRY; 2004; MANZANILLA-LÓPEZ et al., 2013).

Este fungo apresenta a vantagem de se desenvolver na superfície das raízes, colonizar as massas de ovos e eliminar de uma só vez vários ovos produzidos por um único nematoide (STIRLING, 1991). Em adição ao efeito direto do parasitismo sobre o desenvolvimento embrionário, existe o efeito enzimático sobre a casca do ovo, o que aumenta a sua permeabilidade e facilita a passagem de possíveis toxinas produzidas pelo fungo no ambiente, pois os juvenis de segundo estágio (J₂) não eclodem quando o fungo está presente (STIRLING, 1991). Outros aspectos positivos desse fungo são a capacidade de se desenvolver em matéria orgânica no solo na ausência do nematoide, produzir grande número de clamidósporos, colonizar superficialmente e endofiticamente as raízes, promover o crescimento da planta, não ser patogênico a seres humanos e outros animais e de ser facilmente produzido *in vitro*, em grandes quantidades.

Visto que *Pochonia chlamydosporia* é um fungo saprofítico e independe da presença de ovos de nematoides no solo para a sua sobrevivência, o intuito deste trabalho foi analisar a atividade parasítica do antagonista em três materiais orgânicos com diferentes relações C/N em presença do nematoide *Meloidogyne javanica* Chitwood em plantas de tomate.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides (BIONEMA-UFV) localizados no Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agricultura (BIOAGRO-MG) em casas de vegetação pertencentes ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

Obtenção e preparo do inóculo de *Meloidogyne javanica*

O inóculo de *M. javanica* foi constituído de ovos obtidos de populações puras e coletados de raízes de tomateiros, mantidos em casa de vegetação. Posteriormente, novas plantas de tomate foram inoculadas com *M. javanica*, visando o aumento da quantidade do inóculo. Estudos de padrões de isoenzimas em eletroforese foram realizados para a confirmação e verificação da ausência de contaminação com outros nematoides, antes da condução dos experimentos.

Os ovos de *Meloidogyne javanica* utilizados nos ensaios foram extraídos pela técnica de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981), no qual as raízes infestadas passaram por uma lavagem cuidadosa em água corrente. Posteriormente, estas foram cortadas em fragmentos de 1 a 2 cm, homogeneizadas e trituradas em liquidificador a baixa velocidade, em 250 mL de solução de hipoclorito de sódio a 0,5 %, durante 20 segundos. A suspensão resultante foi então passada por duas peneiras granulométricas sobrepostas, a superior de 200 ‘mesh’ (com abertura de 0,074 mm) e a inferior de 500 ‘mesh’ (com abertura de 0,025 mm). A suspensão retida na última peneira foi lavada com água, recolhida em béquer com capacidade de 250 mL e usada para as inoculações. As concentrações foram ajustadas com o auxílio da câmara de Peters.

Obtenção e preparo do inóculo de *Pochonia chlamydosporia*

O isolado Pc-10 de *P. chlamydosporia* foi repicado para placas de Petri contendo o meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) e incubados a 25 °C por 10 dias.

Posteriormente o inóculo de *P. chlamydosporia* foi produzido em arroz, na proporção de 80 mL de arroz para 60 mL de água, em sacos de polipropileno, que foram fechados e autoclavados por 30 minutos a 120 °C. Cada saco recebeu uma colônia da cultura fúngica em BDA, que ficou incubada a 25 °C durante 21 dias. Após esse período

os clamidósporos foram separados do arroz por lavagem e a suspensão de clamidósporos foi calibrada com o auxílio da câmara de Neubauer.

Experimento em casa-de-vegetação

Dois experimentos foram montados em períodos diferentes do ano (1º - Outubro/Novembro 2013 – média máxima: 29°C, média mínima: 20°C / 2º - Maio/Junho 2014 – média máxima: 33°C, média mínima: 17°C). Os testes foram montados em vasos de 2 L utilizando uma mistura de terriço e areia, na proporção 1:1, previamente tratada com Dazomet, como substrato de plantio.

A incorporação, nas doses recomendadas (400 g/ cova de plantio), dos materiais orgânicos: palha de trigo (colmo do trigo picado), palha de café (café despulpado triturado) e cama de frango (serragem em associação com excretos da produção de aves) foi realizada 14 dias antes do transplântio das mudas, as quais foram plantadas, no primeiro experimento com 21 dias e para o segundo com 45 dias de idade. Além disso, para o primeiro experimento todos os materiais testados foram finamente triturados diferentemente do segundo, no qual as partículas utilizadas tinham aproximadamente 5 mm.

Os tratamentos avaliados para o primeiro experimento foram: 1- Somente nematoide, 2- nematoide + Pc-10, 3- nematoide + Pc-10 + palha de café, 4- nematoide + Pc-10 + palha de trigo, 5- nematoide + Pc-10 + cama de frango. Para execução do segundo experimento foram utilizados os mesmos tratamentos do primeiro teste, acrescidos dos tratamentos contendo somente os materiais orgânicos e nematoides (nematoide + palha de café, nematoide + palha de trigo, nematoide + cama de frango).

Cada vaso recebeu uma planta de tomate variedade Santa Clara e após 5 dias foi realizada a infestação do solo com 3000 ovos de *M. javanica* por vaso. Na mesma data do transplântio das mudas foi feito a incorporação de 5000 clamidósporos/grama de

solo de Pc-10 em todos os tratamentos que receberiam o agente de controle biológico. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com 8 repetições na primeira execução e 6 repetições para a segunda.

Os devidos tratamentos culturais foram executados sempre que necessários durante o período de permanência das plantas na casa de vegetação. O primeiro experimento foi conduzido por 45 dias e o segundo por 60 dias.

Foram avaliadas as seguintes variáveis ao final dos experimentos: número de ovos totais, número de ovos por grama de raiz, número de galhas totais, número de galhas por grama de raiz, altura de planta, massa de planta fresca, que corresponde à massa de parte aérea e massa do sistema radicular.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Todas as plantas do tratamento que receberam palha de trigo em presença de *P. chlamidosporia* (Pc-10) morreram no decorrer do tempo de permanência das plantas na casa de vegetação no primeiro experimento. Devido à alta relação C/N encontrada no material testado (TABELA 4 - ANEXOS), as plantas apresentaram grande deficiência de nitrogênio em todas as repetições do tratamento, impedindo que o desenvolvimento dos vegetais se completasse.

A imobilização de N durante a decomposição de palhas de cereais é relatada em inúmeros trabalhos (RECOUS et al., 1995; HERINKSEN & BRELAND, 1999; CORBEELLS et al., 2000). Os autores Bedding & Turner (1999) demonstraram que a decomposição e a imobilização de N são potencializadas quando menores frações são incorporadas ao solo. O fracionamento do material em pedaços menores, aumenta a superfície de contato de atuação dos microrganismos presentes no solo levando a uma

menor disponibilidade de N-disponível para as plantas pela maior imobilização do nutriente na biomassa microbiana. Desta forma, o processamento do material orgânico nesse experimento em partículas menores pode ter acentuado a imobilização microbiana de N, como ocorrido em outros experimentos (CORBEELLS; HOFMAN; CLEEMPUT, 2000).

Para o segundo experimento, todos os tratamentos que continham trigo permaneceram com todas as unidades experimentais até a data de retirada do teste. Atribuiu-se à sobrevivência das plantas, o efeito positivo na mudança da idade e porte das mudas de tomate utilizadas para montagem da segunda repetição, as quais eram mais velhas e vigorosas em relação ao primeiro teste, ao material orgânico que não foi finamente moído, medidas as quais minimizaram os efeitos negativos da imobilização de N no solo.

Em relação à massa da parte aérea das plantas no primeiro teste (TABELA 1), cama de frango + Pc-10 foi o tratamento que obteve as maiores médias, com 48,04% de aumento em relação ao tratamento contendo apenas nematoide e 65,19% comparado ao tratamento com apenas Pc-10. Mian & Rodriguez-Kabana (1982) demonstraram que a aplicação de cama de frango é efetiva na promoção de crescimento de plantas. Esse efeito, pode ser atribuído ao fato que este composto orgânico pode ser usado como fonte de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e micronutrientes para as plantas (BUSH et al., 1999; QAFOKU et al., 2001). Entretanto, tal comportamento não foi observado na segunda repetição, quando os tratamentos que possuíam cama de frango apresentaram médias diferentes, apenas, dos tratamentos que continham trigo, não diferindo assim, do tratamento com apenas nematoides (TABELA 2). O maior tempo de permanência do teste em casa de vegetação em relação ao primeiro experimento pode ter afetado o crescimento radicular das plantas devido ao tamanho vaso que se torna limitante ao desenvolvimento da raiz em experimentos mais

longos. Este fato pode mascarar os efeitos no crescimento das partes aéreas das plantas em testes sob condições de casa de vegetação.

Outro dado observado foi que, no segundo experimento, o tratamento com apenas Pc-10 em presença do nematoide obteve menores valores de massa de parte aérea que o tratamento contendo somente nematoides.

TABELA 1 - Efeito da associação de *Pochonia chlamydosporia* em presença de materiais orgânicos no desenvolvimento de plantas de tomate e no controle de *M. javanica* (Experimento 1)

Tratamento	Massa parte aérea (g)	Galhas / grama de raiz	* Ovos totais	**UFC/g de solo
	Média	Média	Média	(x1000)
CONTROLE (<i>M.J</i>)	31,70 b	164,38 a	7,23 a	0
(<i>M.J</i>) + PC - 10	28,41 b	166,15 a	7,16 a	18,8
(<i>M.J</i>) + PC - 10 + PALHA DE CAFÉ	29,15 b	110,61 b	5,46 b	8,3
(<i>M.J</i>) + PC - 10 + C. FRANGO	46,93 a	78,44 b	5,19 c	23,3

*Os valores de ovos totais foram transformados para log de ovos totais, para atender as pressuposições da ANOVA. Média das 8 repetições por tratamento. Valores médios seguidos de mesma letra na coluna não são diferentes baseados no teste Duncan ($p < 0,05$). **UFC/ g de solo: População de *P. chlamydosporia* (Pc-10) no solo ao final do experimento. Valores médios de três repetições. *M.j* : *Meloidogyne javanica*.

TABELA 2 - Efeito da associação de *Pochonia chlamydosporia* em presença de materiais orgânicos no desenvolvimento de plantas de tomate e no controle de *M. javanica* (Experimento 2)

Tratamento	Massa parte aérea (g)	Massa sistema radicular (g)	Galhas / grama de raiz	* Ovos totais	**UFC/g de solo
	Média	Média	Média	Média	(x1000)
CONTROLE (<i>M.j</i>)	67,22 ab	16,19 bcd	218,25 a	5,67 a	0
<i>M.j</i> + Pc-10	49,39 cd	20,18 abc	212,68 a	5,76 a	10,0
<i>M.j</i> + CAMA DE FRANGO	80,24 a	19,96 bc	188,00 a	5,18 b	0
<i>M.j</i> + PALHA DE CAFÉ	56,56 bcd	17,7 bcd	244,66 a	5,85 a	0
<i>M.j</i> + PALHA TRIGO	30,97 e	11,40 d	212,18 a	5,78 a	0
<i>M.j</i> + CAMA DE FRANGO + Pc-10	64,68 abc	26,43 a	130,45 b	5,16 b	21,1
<i>M.j</i> + PALHA DE CAFÉ + Pc-10	56,01bcd	20,79 ab	200,00 a	5,85 a	5,5
<i>M.j</i> + PALHA TRIGO + Pc-10	39,74 de	13,62 cd	200,16 a	5,84 a	45,2

* Os dados de ovos totais os valores foram transformados para log de ovos totais, para atender as pressuposições da ANOVA. Média das 6 repetições por tratamento. Valores médios seguidos de mesma letra na coluna não são diferentes baseados no teste Duncan ($p < 0,05$). **UFC/ g de solo: População de *P. chlamydosporia* (Pc-10) no solo ao final do experimento. Valores médios de três repetições. *M.j* : *Meloidogyne javanica*

Existem muitos relatos na literatura demonstrando *P. chlamydosporia* atuaria, além de agente de biocontrole, como promotor de crescimento (HIDALGO-DIAZ et al., 2000; MONFORT et al., 2005; DALLEMOLE-GIARETTA, 2008). No entanto, para as condições testadas, tal fato não foi observado.

As pressuposições estatísticas não foram atendidas para a variável massa do sistema radicular no primeiro experimento. Porém, no segundo experimento, o tratamento cama de frango + Pc diferiu do controle e apresentou aumento de 63,24% para a variável. Ademais, houve efeito significativo no incremento da massa do sistema radicular das plantas de tomate, ao se utilizar o agente de biocontrole em associação com cama de frango em relação ao tratamento contendo apenas cama de frango, proporcionando um incremento de massa de 32,41%. Visto que a cama de frango é o material que apresenta maior teor de P e N, então era esperado que a adequada disponibilidade de P, especialmente na fase inicial, estimulasse o crescimento radicular (GRANT et al., 2001; SOUZA et al., 2007). Mas ainda, no tomateiro, a elevação no nível de N fornecido às plantas aumenta o peso de matéria seca das raízes, do caule, das folhas e dos frutos, o número de folhas, a área foliar, o florescimento, a frutificação e a produtividade (FERREIRA et al., 2003). Outro detalhe é que *P. chlamydosporia* tem hábito de crescimento endofítico. A associação de endofíticos com a planta, pode fazer com que nutrientes limitantes do solo sejam transferidos para espécie vegetal e em troca carbonos facilmente metabolizáveis são ofertados pela planta para o fungo (SMITH; GRACE; SMITH, 2009).

Ao se avaliar o número de galhas/grama de raiz no primeiro experimento, tanto cama de frango + Pc-10 como palha de café + Pc-10 foram eficiente na redução da variável em relação ao tratamento contendo apenas nematoide. Estes tratamentos

apresentaram reduções de 52,28% para cama de frango + Pc-10 e 48,61% para palha de café + Pc-10.

No segundo teste, consoante ao primeiro, o tratamento cama de frango + Pc-10 não só reduziu em 40,24% os valores da variável analisada em relação ao tratamento contendo somente nematoide, como também foi diferente do tratamento o qual continha somente cama de frango, demonstrando o efeito adicional positivo do uso do fungo com o substrato orgânico testado sobre a população do fitopatógeno. Esse mesmo efeito benéfico do uso do antagonista em associação com materiais orgânicos no controle de fitonematoides, já vem sendo relatado por outros autores (DALLEMOLE et al., 2010; PODESTÁ et al., 2013).

Segundo Ward et al (2012), em trabalhos *in vitro* analisando a expressão de mRNA relacionados a expressão de VCP1, proteína relacionada ao parasitismo de ovos de nematoides secretada por *P. chlamydosporia*, em meio de cultura contendo NH_4Cl , obtiveram que, inicialmente, a presença de tal composto inibiria a expressão de VCP1, mas que, posteriormente, este composto induziria a maior expressão da proteína em questão. Desta maneira, propõe-se a partir dos resultados encontrados nesse experimento, que íon amônio (NH_4^+), que é a forma dominante de nitrogênio em cama de frango (OVIEDO-RONDON, 2008), tenha favorecido aos maiores índices de parasitismo de ovos pelo fungo nos tratamentos com adição de cama de frango. Tal fato, potencializou a atuação do antagonista, resultando em menores números de juvenis e conseqüentemente, menos galhas/grama de raiz.

Além disso, ao se elevar o pH ou em condições de alta umidade, o íon amônio (NH_4^+) é transformado em amônia (NH_3^+) que causa plasmólise em nematoides (FERRAZ et al., 2010), impedindo que juvenis de segundo estágio (J_2) infectem as raízes, se tornem adultos e produzam ovos, o que resulta em menores índices de galhas e ovos de fitonematoides

É possível potencializar o controle do nematoide das galhas por meio da aplicação de *P. chlamydosporia* ao solo alguns dias antes do plantio da cultura principal, visando aumentar o parasitismo de ovos dos nematoides e assim reduzir o inóculo inicial do fitopatógeno. Quanto maior o tempo de contato do fungo com os ovos, mais eficiente é o parasitismo dos ovos podendo impedir a formação e a eclosão dos juvenis de segundo estágio, reduzindo assim a infecção das raízes e, por consequência, o número de galhas e de ovos produzidos (DALLEMOLE et al., 2008). Como o intervalo entre infestação do solo com ovos de *M. javanica* e *P. chlamydosporia* tiveram um intervalo de 5 dias, propõe-se então que este tempo foi suficiente para que o antagonista pudesse ter atuado nos ciclos iniciais, diminuindo a população do patógeno e consequentemente afetado o número de galhas encontrados no final do experimento.

Ao analisar ovos totais nos dois testes, foi demonstrado que a utilização de cama de frango, em associação ou não com o fungo, resulta em menores valores médios de ovos por sistema radicular. O mesmo comportamento também foi observado no tratamento café + Pc, para o primeiro experimento.

A casca de café tem efeito nematicida conhecido por liberar furfural durante o processo de decomposição no solo, substância tóxica ao nematoide das galhas (TRONCONI et al., 1986; ZAMBOLIM et al., 1996). Porém, o fato deste material em associação ou não com o fungo, não ter reduzido o número de ovos no segundo experimento, pode ser explicado pelo tamanho das partículas do material orgânico, que nesta posterior execução, era maior (aproximadamente 5 mm), diminuindo a superfície de contato para atuação de microorganismos, afetando a liberação de furfural e comprometendo a ação nematicida do composto sobre a população do fitonematoide.

Por fim, quando se avaliou as unidades formadoras de colônias do fungo no solo (UFC/g de solo) do primeiro experimento foi observado que o maior valor encontrado foi no tratamento cama de frango em associação com o fungo e o menor em palha de

café. O efeito fungicida do composto furfural encontrado no café já é conhecido (FLOR, 1926). Atribui-se então que, os baixos valores de UFC/g de solo encontrados neste experimento para palha de café são resultados desse efeito negativo desse princípio ativo. Por outro lado, os maiores valores de UFC/g de solo encontrados em cama de frango são justificados pelo maior teor de nitrogênio no material testado, visto que este é um elemento essencial no desenvolvimento de fungos (MARZLUF, 1997). Entretanto, ao final do segundo experimento, o maior valor encontrado para a mesma variável foi no tratamento palha de trigo em associação com o antagonista, seguido do tratamento com cama de frango. A associação endofítica do fungo com raízes de solanáceas e gramíneas já é conhecida na literatura (LOPEZ-LLORCA et al., 2002; MACIÁ-VICENTE et al., 2009a, 2009b). Entretanto, não existem relatos de trabalhos que demonstrem que materiais orgânicos de gramíneas e solanáceas incorporados ao solo possam favorecer o desenvolvimento de *P. chlamydosporia* no solo. De qualquer maneira, perante ao maior desenvolvimento do fungo internamente as raízes desses determinados grupos de plantas, faz-se lógico considerar que a utilização dos restos vegetais dessas plantas pelo antagonista possa ser também preferencial.

Apesar de ser uma excelente alternativa para o manejo de fitonematoides, os agentes de controle biológico são organismos vivos. Muitas vezes, por diversos motivos, como o clima, tipo de solo, quantidade e qualidade da matéria orgânica presente no ambiente, estes organismos podem falhar ou demorar para reduzir a população de nematoides em uma determinada área. Sendo assim, os resultados aqui obtidos apontam que a aplicação cama de frango auxilia o estabelecimento de *P. chlamydosporia* no solo, bem como sua atuação sobre populações de fitonematoides do gênero *Meloidogyne*, o que minimiza as chances de insucesso da utilização do agente antagonista.

CONCLUSÕES

Cama de frango apresentou efeito significativo no controle de *M. javanica* em tomateiro. A aplicação conjunta com Pc-10 resulta em efeito adicional nesse controle.

REFERÊNCIAS:

BADRA, T.; SALEH, M.A.; OTEIFA, B.A. Nematicidal activity and composition of some organic fertilizers and amendments. *Revue de Nématologie*, v.2, p.29-36. 1979.

BENDING, G.D.; TURNER, M.K. Interaction of biochemical quality and particle size of crop residues and its effects on the microbial biomass and nitrogen dynamics following incorporation into soil. *Biology and Fertility of Soils*, v.29, p.319-327. 1999.

BONETTI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.6, 553p. 1981.

BUSH, P.B.; MERKA, L.A.; TORRENCE, J.D. Chicken litter as nutrient source for slash pine establishment in Georgia coastal plain. General Technical Report-Southern Research Station. USDA - Forest Services, v.30, p.469-473. 1999.

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

CORBEELS, M.; HOFMAN, G.; CLEEMPUT, O.V. Nitrogen cycling associated with the decomposition of sunflower stalks and wheat straw in a Vertisol. *Plant Soil*, v.218, p.71-82. 2000.

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

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; ZOOCA, R.J.F.; CAIXETA, L.B.; LOPES, E.A. Controle de *Meloidogyne javanica* por meio da aplicação de palha de café colonizada por *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. *Nematologia Brasileira*, v.34, p.137-140. 2010.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; FERRAZ, S.; NEVES, W.S.; LOPES, E.A.; COUTINHO, M.M. Efeito da concentração de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira, v.32, p.327-332. 2008.

FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A.; DIAS-ARIEIRA, C.R. Manejo sustentável de fitonematoides. Viçosa: Editora UFV, 2010. 304p

FERREIRA, M.M.M.; FERREIRA, G.B.; FONTES, P.C.R. Produção do tomateiro em função de doses de nitrogênio e da adubação orgânica em duas épocas de cultivo. Horticultura Brasileira, v.21, p.468-473. 2003.

FLOR, H.H. Fungicidal activity of furfural. Journal of Science, v.1, p.199-227. 1926.

GRANT, C.A.; TOMASIENWICZ, D.J.; FLATEN, D.N.; SHEPPARD, S.C.A. Importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. Informações Agronômicas, v.95, p.1-5. 2001.

HENRIKSEN, T.M.; BRELAND, T.A. Nitrogen availability effects on carbon during fungal and bacterial growth, and enzyme activity during decomposition of wheat in soil. Soil Biology Biochemistry, v.31, p.1121-1134. 1999.

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

HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter, v.57, p.1025-1028. 1973.

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

LOPEZ-LLORCA, L. V.; BORDALLO, J. J.; MONFORT, E.; LÓPEZ-SERNA, M. L. Use of light and scanning electron microscopy to examine colonisation of barley rhizosphere by the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium*. *Micron*, v.3, p.61-67. 2002.

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

MACIÁ-VICENTE, J. G.; ROSSO, L. C.; CIANCIO, A.; JANSSON, H. B.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Colonisation of barley roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*: Effects on plant growth and disease. *Annals of Applied Biology*, v.155, p.391-401. 2009b.

MANZANILLA-LOPEZ, R.H.; ESTEVES, I.; FINETTI-SIALER, M.; HIRSCH, P.R.; WARD, E. *Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endoparasitic nematodes. *Journal of Nematology*, v.45, p.1-7. 2013.

MARZLUF, G.A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the Fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.61, p.17-32. 1997.

MIAN, I.H.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Survey of the nematicidal properties of some organic materials available in Alabama as amendments to soil for control of *Meloidogyne arenaria*. *Nematropica*, v.12, p.235-246. 1982.

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

MORTON, C.O.; HIRSCH, P.R.; KERRY, B.R. Infection of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi-a review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. *Nematology*, v.6, p.161-170. 2004.

OVIEDO-RONDON, E. Technologies to mitigate the environmental impact of broiler production. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37, p.239-252. 2008.

PODESTÁ, G.S.; FREITAS, L.G.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; ZOOCA, R.J.F.; CAIXETA, L.B.; FERRAZ, S. *Meloidogyne javanica* control by *Pochonia chlamydosporia*, *Gracilibacillus dipsosauri* and soil conditioner in tomato. *Summa Phytopathologica*, v.39, p.122-125. 2013.

QAFOKU, O.S.; CABRERA, M.L.; WINDHAM, W.R.; HILL, N.S. Rapid method to determine potentially mineralizable nitrogen in broiler litter. *Journal of Environmental Quality*, v.30, p.217-221. 2001.

RECOUS, S.; ROBIN, D.; DARWIS, D.; MARY, B. Soil inorganic N availability: Effect on maize residue decomposition. *Soil Biology Biochemistry*, v.27, p.1529-1535. 1995.

SMITH, F.A.; GRACE, E.J.; SMITH, S.E. More than a carbon economy: nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, v.182, p.347-358. 2009.

SOUZA, F.S.; FARINELLI, R.; ROSOLEM, C.A. Desenvolvimento radicular do algodoeiro em resposta à localização do fertilizante. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.31, p.387-392. 2007.

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

SUNG, G.H.; HYWEL-JONES, N.L.; SUNG, J.M.; LUANGSAARD, J.; SHRESTHA, B. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*, v.57, p.55-59. 2007.

TRONCONI, N.M.; FERRAZ, S.; SANTOS, J.M.; REGAZZI, A.J. Avaliação do efeito da palha de café, misturado ao solo, no desenvolvimento de *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887, em mudas de cafeeiro. *Nematologia Brasileira*, v.10, p.85-102. 1986.

WARD, E.; KERRY, B.R.; MANZANILLA-LÓPEZ, R.H.; MUTUA, G.; DEVONSHIRE, J. The *Pochonia chlamydosporia* serine protease gene *vcp1* is subject to regulation by carbon, nitrogen and pH: Implications for Nematode Biocontrol. *PLoS ONE*, v.7, p.1-12. 2012.

ZAMBOLIM, L.; SANTOS, M.A.; BECKER, W.P.; CHAVES, G.M. Agro-waste soil amendments for the control of *Meloidogyne javanica*. *Fitopatologia Brasileira*, v.21, p.250-253. 1996.

ZANDONADI, D.B.; SANTOS, M.P.; MEDICI, L.O.; SILVA, J. Ação da matéria orgânica e suas frações sobre a fisiologia de hortaliças. *Horticultura Brasileira*, v.32, p.14-20. 2014.

ZARE, R.; GAMS, W. A monograph of *Verticillium* section Prostrata. A Supplement to Rostaniha. *Botanical Journal of Iran*, v.109, p.655-656. 2005.

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

CAPÍTULO 2

EFEITO DA REAPLICAÇÃO DE *Pochonia chlamydosporia* EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO PARA CONTROLE DE *Meloidogyne enterolobii* EM PLANTAS DE ACEROLA.

RESUMO

O Brasil é um dos maiores produtores de acerola do mundo e apresenta grande potencial de exploração da cultura nos próximos anos. Concomitantemente à expansão dos campos de cultivos, maiores também são os relatos de áreas infestadas com *Meloidogyne enterolobii*. A ineficiência dos produtos químicos fazem com que novas alternativas de controle sejam pesquisadas no manejo deste fitonematoide. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar qual o intervalo de reaplicação ideal do fungo *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) em plantas de acerola em presença de húmus de minhoca. Verificou-se que 3 aplicações/ano do fungo foram mais eficientes em aumentar a altura de plantas e a massa do sistema radicular em 45,8% e 86,0%, respectivamente em relação ao tratamento sem aplicação de Pc-10. Porém, os maiores índices de galhas/grama de raiz também foram encontrados para o tratamento 3 aplicações/ano com aumento de 18,24% em relação ao tratamento que não teve aplicação do agente de controle biológico. Quando se avaliou os valores de ovos/grama de raiz, foi observado que 2 aplicações/ano e 1 aplicação/ano foram mais eficientes em relação aos demais tratamentos. Desta maneira, concluiu-se então que 3 aplicações/ano são mais eficientes em potencializar o crescimento vegetal, mas aplicações mais espaçadas podem ter melhor controle sobre populações de *M. enterolobii* em plantas de acerola.

ABSTRACT

Brazil is one of the biggest producers of barbado cherry in the world and its potential has increased in the last years. Concomitantly the area expansion, the number of damage caused by *Meloidogyne enterolobii* on the field has been increasing along the country. The performance of chemical products has not been satisfactory as the farmers need. Due to that, the biological control represents a good option for nematodes management in barbados cherry. The purpose of this work was to evaluate application times of *Pochonia chlamydosporia* on barbados cherry plant in a greenhouse experiment. As result was found that 3 application/year of *P. chlamydosporia* was the best treatment to increase plant height (45,8%) and root mass (86,0%) in relation to treatment control. However, the same treatment increased the number of total galls in 18,24% comparing to the control. The biggest reducing of eggs were found in 2 application/year and 1 application/year treatments. Thus, 3 application/year is better to improve plant development. But, 2 application/year and 1 application/year result in better control of *M. enterolobii* population on barbado cherry.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de acerola (*Malpighia glaba* L), destacando-se a região Nordeste, com uma produção de aproximadamente 22.500 toneladas de frutos (BASF, 2006). Esta planta, também conhecida como cereja-das-antilhas, é uma fruta originária da região do mar do Caribe (LOURENZANI, 2009). O fruto é rico em vitamina C (ácido ascórbico), fonte de pró-vitamina A (COSTA et al., 2001). Além disso, nela podem ser encontradas vitaminas do complexo B como tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3) e minerais como cálcio, ferro e fósforo, embora para P os teores sejam baixos (MERCALI et al., 2014). Recentemente, têm-se constatado no Brasil, considerável expansão da área cultivada com acerola, principalmente, por suas qualidades nutricionais, facilidades de cultivo e ótima adaptação edafoclimática. (CRISÓSTOMO & NAUMOV, 2009).

Nos últimos anos, as lavouras vêm apresentando um decréscimo nas produções em razão da ocorrência de nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.), um dos principais problemas que afetam a cultura da aceroleira no Brasil (CAVICHOLI et al., 2014). Dentre as espécies que atacam a cultura, cita-se *Meloidogyne enterolobii* Yang & Eisenback como uma das mais problemáticas em questão de manejo, por se tratar de espécie uma polífaga e agressiva, de elevada capacidade reprodutiva em diversos hospedeiros (GUIMARÃES et al., 2003).

As dificuldades no controle passam desde a inexistência de materiais resistentes para plantio (SILVA; KNASUSKI, 2012; FREITAS, 2012) até a ineficácia dos produtos químicos, tais como carbofuran e fenamifós, os quais no trabalho de Moreira & Neto (2001) não foram eficientes em reduzir as populações do fitopatógeno no solo. Outro fato importante é que, nem sempre a utilização de agrotóxicos é permitida em determinados tipos de cultivos de acerola, como por exemplo, os cultivos orgânicos.

Estes, quando vistoriados por alguma entidade certificadora, ficam sujeitos a normas rígidas quanto ao uso indiscriminados de determinados grupamentos químicos para controle de doenças de plantas.

Condizente aos princípios da agricultura orgânica, o controle biológico de fitonematoides é uma medida de manejo interessante nestas situações. Através do controle biológico há uma possibilidade de se resgatar o equilíbrio populacional de nematoides no ecossistema natural, em inteira consonância com os demais organismos e usuários do ecossistema agrícola (CAMPOS, 1992).

Muitos trabalhos relacionados ao controle biológico de fitonematoides, apontam o fungo endoparasita de ovos *Pochonia chlamydosporia* como excelente opção para o controle de fitonematoides (JATALA, 1986; KERRY et al., 1982, SIDDIQUI; MAHMOOD, 1996; CHEN; DICKSON, 2004; MANZANILLA-LÓPEZ et al., 2013). Além disso, seu efeito positivo de biocontrole já tem sido relatado na literatura por inúmeros autores (VIAENE & ABAWI., 2000; BOURNE, 2001; KHAN et al., 2005, WANG et al., 2005; COUTINHO et al., 2009, SIDDIQUI et al., 2009; MOOSAVI et al., 2010; DALLEMOLE-GIARETTA et al., 2012, VIGGIANO et al., 2012), mas pouco ainda se sabe sobre o aplicação do fungo em espécies perenes, onde técnicas de manejo se tornam ainda mais restritivas, devido a permanência das plantas no campo durante todo o ano. A eficácia de *P. chlamydosporia* em estratégias de manejo integrado em sistemas produtivos ainda carece de avaliações (KERRY & BOURNE, 2002).

Desta maneira, este trabalho tem como objetivo avaliar qual o intervalo de tempo ideal de aplicação do fungo *P. chlamydosporia* para controle de *M. enterolobii* em plantas de acerola.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides (BIONEMA-UFV) localizados no Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agricultura (BIOAGRO-MG) em casas de vegetação pertencentes ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

Obtenção e preparo do inóculo de *Meloidogyne enterlobii*

O inóculo de *M. enterlobii* foi constituído de ovos obtidos de populações puras e coletados de raízes de tomateiro, mantidos em casa de vegetação. Posteriormente, novas plantas de tomate foram inoculadas com *M. enterlobii*, visando o aumento da quantidade do inóculo. Estudos de padrões de isoenzimas em eletroforese foram realizados para a confirmação e verificação da ausência de contaminação com outros nematoides, antes da condução dos experimentos.

Os ovos de *M. enterlobii* utilizados nos ensaios foram extraídos pela técnica de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981), onde as raízes infestadas passaram por uma lavagem cuidadosa em água corrente. Posteriormente, estas foram cortadas em fragmentos de 1 a 2 cm, homogeneizadas e trituradas em liquidificador a baixa velocidade, em 250 mL de solução de hipoclorito de sódio a 0,5 %, durante 20 segundos. A suspensão resultante foi então passada por duas peneiras granulométricas sobrepostas, a superior de 200 'mesh' (com abertura de 0,074 mm) e a inferior de 500 'mesh' (com abertura de 0,025 mm). A suspensão retida na última peneira foi lavada com água, recolhida em béquer com capacidade de 250 mL e usada para as inoculações. As concentrações foram ajustadas com o auxílio da câmara de Peters.

Obtenção e preparo do inóculo de *Pochonia chlamydosporia*

O isolado de Pc-10 de *P. chlamydosporia* foi repicado para placas de Petri contendo o meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA), e incubados a 25 °C por 10 dias.

Posteriormente o inóculo de *P. chlamydosporia* foi produzido em arroz, na proporção de 80 mL de arroz para 60 mL de água, em sacos de polipropileno, que foram fechados e autoclavados por 30 minutos a 120 °C. Cada saco recebeu um disco de micélio da cultura fúngica em BDA, que ficou incubada a 28 °C durante 21 dias. Após esse período a suspensão de clamidósporos foi calibrada com o auxílio da câmara de Neubauer.

Experimento em casa-de-vegetação:

O teste foi montado em vasos de 7 litros, contendo solo não estéril como substrato (TABELA 5 - ANEXOS). Foi realizado o levantamento inicial da população de nematoides do solo para detecção da presença de espécimes do gênero *Meloidogyne*, o qual apresentou resultado negativo para a espécie em questão.

Cada vaso recebeu uma muda de acerola (Variedade - AC 69) proveniente da empresa Amway-Nutrilite-Ubajara (CE) com 8 meses de idade e após 2 semanas foi realizado a infestação do solo com 5.000 ovos de *M. enterolobii* por vaso. Em seguida, após 2 semanas da infestação, foi feita uma incorporação superficial de 103g de húmus/vaso em todos os tratamentos e adicionado 5000 clamidósporo/g de solo sobre a superfície do substrato nos tratamentos que receberiam o inóculo fúngico.

A incorporação da matéria orgânica em todos os tratamentos, foi realizada com auxílio de uma pá de jardinagem até uma profundidade de 10 cm. Reaplicações do material orgânico foi realizado a cada três meses e os devidos tratos culturais foram

executados durante os 12 meses de execução da experimentação sempre que necessários.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com 7 repetições com os seguintes tratamentos: 1- *M. enterolobii* (sem aplicação de Pc-10), 2- *M. enterolobii* + 12 aplicações de Pc-10 por ano (aplicação todo mês), 3- *M. enterolobii* + 6 aplicações de Pc-10 por ano (aplicação a cada 2 meses), 4- *M. enterolobii* + 3 aplicações de Pc-10 por ano (aplicação a cada 4 meses), 5- *M. enterolobii* + 2 aplicações de Pc-10 por ano (aplicação a cada 6 meses), 6- *M. enterolobii* + 1 aplicação de Pc-10 por ano (aplicação a cada 12 meses).

Na data da retirada das plantas, estas foram medidas na região compreendida entre o colo e a gema apical e após obtidas as alturas das plantas, cortadas na base do colo e pesadas para determinação da massa de parte aérea fresca. As raízes foram lavadas em balde com água, de forma delicada para evitar a perda de massa de ovos.

Foram avaliadas as seguintes variáveis: número de ovos totais, número de ovos por grama de raiz, número de galhas totais, número de galhas por grama de raiz, altura da planta, massa da planta fresca, que corresponde à massa da parte aérea, massa do sistema radicular, diâmetro do porta-enxerto, diâmetro do enxerto, peso de folhas e peso de folhas secas.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Foi observado aumento na altura das plantas de acerola em três dos cinco tratamentos testados em relação a testemunha. Quando o fungo foi aplicado 3 vezes/ano (cada 4 meses), as médias foram maiores que os demais tratamentos, exceto para 6 aplicações (cada 2 meses), no qual não verificou-se diferença do tratamento citado anteriormente. Houve um aumento na altura de 45,8% para o melhor tratamento em relação ao tratamento sem aplicação de Pc-10 (FIGURA 1). As menores médias para

esta variável foram observadas no tratamento sem aplicação de Pc-10 e 2 aplicações/ano (cada 6 meses), respectivamente.

FIGURA 1: Efeito do número de reaplicações de *Pochonia chlamydosporia* em presença de matéria orgânica no desenvolvimento de plantas de acerola após 12 meses de condução do experimento.



Ao avaliar o peso do sistema radicular, constatou-se que todos os tratamentos, os quais receberam o fungo *Pochonia chlamydosporia*, diferiram do tratamento que não recebeu o antagonista (TABELA 1). Anuente, aos resultados encontrados para altura de plantas, observou-se que os maiores incrementos médios numéricos encontrados para tal variável foram nos tratamentos: 3 aplicações/ano (86,03%) e 6 aplicações/ano (50,87%), respectivamente, relativos ao tratamento sem aplicação do fungo.

TABELA 1 - Efeito do número de aplicações/ano de *Pochonia chlamydosporia* em presença de matéria orgânica no desenvolvimento de plantas de acerola e no controle de *M. enterolobii*.

Nº de Aplicações	Altura (cm)	Massa da raiz (g)	**Galhas/grama de raiz	**Ovos / grama de raiz	* UFC/g de solo
	Média	Média	Média	Média	(x1000)
0	114,54 d	72,95 c	4,29 b	1,27 a	0
1	137,75 bcd	108,36 ab	4,66 ab	0,90 b	8,3
2	123,62 cd	103,42 b	4,70 ab	0,87 b	10
3	167,00 a	135,71 a	5,08 a	1,01 ab	15,3
6	151,25 ab	110,06 ab	4,71 ab	1,13 ab	12,1
12	140,00 bc	103,65 b	4,55 ab	1,17 ab	8,3

Média de 7 repetições. Valores médios seguidos de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Duncan ($p < 0,05$). * UFC/ g de solo: População de *P. chlamydosporia* (Pc-10) no solo ao final do experimento. Valores médios de três repetições. ** Os dados de galhas/grama de raiz e ovos/grama de raiz foram transformados para raiz quadrada de galhas/grama de raiz e raiz quadrada de ovos/grama de raiz, para atender as pressuposições da ANOVA.

O fungo *P. chlamydosporia* coloniza endofiticamente células da epiderme e do córtex do sistema radicular de plantas de cevada e de tomate, formando um emaranhado de hifas semelhantes àquelas formadas por micorrizas arbusculares (LOPEZ-LLORCA et al., 2002). Estudos recentes mostram que a promoção de crescimento podem ser atribuídos a secreção de metabolitos secundários promotores de crescimento (giberelinas, auxinas, citocininas) por um fungo endofítico na rizosfera (HAMAYUN et al., 2010). Não obstante, fungos simbiontes podem transferir nutrientes limitantes do solo, incluindo fósforo, nitrogênio e enxofre, para as plantas hospedeiras, e estas, reciprocamente, transferem carboidratos para o fungo (KIERS, et al., 2011). Essas interações influenciam na nutrição da planta e taxa de crescimento do hospedeiro (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011; SINGH, 2011; IQBAL et al., 2013), o que pode explicar a promoção de crescimento notada, tanto para altura das plantas como para massa do sistema radicular.

Para a variável galhas/grama de raiz, notou-se um incremento no número de galhas em relação ao controle quando foram feitas 3 aplicações/ano (cada 4 meses). Os demais tratamentos não diferiram da testemunha. Alguns autores relatam na literatura, efeito positivo da aplicação do fungo na redução do número de galhas de fitopatógenos do gênero *Meloidogyne* em determinadas culturas anuais (DALLEMOLE-GIARETTA

et al., 2008; 2014; COUTINHO et al., 2009; PODESTÁ et al., 2009; VIGGIANO et al., 2014). Entretanto, como observado por Carneiro et al (2011), *P. chlamydosporia* não se mostrou efetivo em reduzir as infecções de J₂ em plantas de goiabas infestadas com uma população de *M. enterolobii*. O mesmo foi observado neste experimento em plantas de acerola. Após um ano de condução do experimento, o fungo se mostrou ineficiente em reduzir o número de galhas, durante o período de condução do experimento (12 meses), demonstrando que o efeito antagônico do fungo sobre as infecções de J₂ em plantas perenes pode ser diferenciado.

Bailey et al (2008), estudaram a “Pathozone” (região do solo em torno da raiz no qual um inóculo deve estar presente e se ele estiver presente existe alguma chance de infectar a raiz, termo definido por Gilligan (1985), de *M. incognita* Chitwood em plantas de tomate. Para os autores, a probabilidade de infecção não é constante quando um inóculo está situado dentro da “Pathozone”, mas é dependente da distância entre inóculo e hospedeiro. Mesmo que possa ocorrer infecções no sistema radicular por nematoides fora da “Pathozone”, a probabilidade decai muito rapidamente com a distância entre o inóculo e a raiz em crescimento. No mesmo trabalho, algumas razões são apontadas para explicar tal fenômeno como: a concentração de nematoide que diminui, devido ao movimento aleatório dos nematoides (“Random Walk”) (FELTHAM et al., 2002) e o fato da porção susceptível da raiz não incluir a porção inteira do sistema radicular, mas sim, sendo restrita a zona de alongação, exatamente anterior a coifa. O autor, juntamente com seus colaboradores, concluíram que o fungo não previne a infestação inicial da raiz pelo juvenil de segundo estágio (J₂), como observado nesta experimentação.

Partindo dos resultados obtidos neste experimento para massa da raiz, especulamos então que, o crescimento radicular e conseqüentemente um maior volume de raiz obtidos nos tratamentos com o fungo, aumentariam as chances de infecção dos J₂

nas raízes, devido a maior área de superfície suscetíveis a penetração pelo juvenil. Além disso, pode ter ocorrido o incremento de novas infecções por nematoides antes considerados fora da “Pathozone”. Basicamente, com o maior desenvolvimento da raiz, os nematoides, antes distantes do sistema radicular, estariam mais próximos da rizosfera, o que facilitaria o acesso dos mesmos às raízes.

Para este experimento, por se tratar de uma espécie perene e de um experimento de longa duração, foi adotado que aplicação do agente de biocontrole, seria posteriormente à inoculação dos ovos de *M. enterolobii*, de forma que o inóculo adicionado a cada unidade experimental fosse preservado. Desta maneira, ao utilizarmos essa metodologia, era esperado que mais juvenis estariam viáveis para infecção inicial das plantas, o que priorizaria o efeito das reaplicações sobre os ciclos subsequentes do patógeno e não um efeito inicial dos tratamentos sobre a população de *M. enterolobii*. Dallemole-Giaretta et al (2008), propõe que, quanto maior o tempo de contato do fungo com os ovos, mais eficiente é o parasitismo inicial, podendo impedir a formação e a eclosão dos juvenis de segundo estágio (J_2), reduzindo assim a infecção das raízes e, por consequência, o número de galhas e de ovos produzidos.

Não existem relatos na literatura que mostram qual seria o intervalo ideal de aplicação de *P. chlamydosporia* em plantas perenes. De acordo com os dados obtidos nas condições de condução deste experimento, 2 aplicações/ano (cada 6 meses) e apenas 1 aplicação/ano (cada 12 meses), se mostraram mais eficientes em relação a testemunha no controle do número de ovos/grama de raiz. O fato de reaplicações em tempos mais curtos do agente de biocontrole não terem sido eficiente no controle de *M. enterolobii* neste experimento, pode ser explicado por um possível processo de autoinibição do fungo, fenômeno observado para outras espécie fúngicas como *Duddingtonia flagrans* Cooke (MONTEIRO, 2013), *Geotrichum candidum* Link (ROBINSON et al., 1989), *Trichoderma atroviride* P. Karst, *Uromyces phaseoli* G. Winter, *Puccinia graminis*

Pers., *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, *Penicillium paneum* Frisvad, *Fusarium oxysporum* Schlecht. (ABIGAIL et al., 2011). Aplicações mais espaçadas (a cada 6 e 12 meses) fariam com o inóculo fúngico permanecesse em quantidade ideal, sofrendo, desta maneira, menor efeito de autoinibição, resultando em maiores índices de parasitismo de ovos de *M. enterolobii*. Outro fato que reforça essa hipótese foi que os valores de unidades formadoras de colônia (UFC/g de solo) de *P. chlamydosporia* no solo ao final do experimento foram idênticos tanto para aplicações mais frequentes (12 aplicações/ ano) quanto para aplicações mais espaçadas (1 aplicação/ano), o que demonstra que existe um nível populacional ótimo para um determinado propósito biológico exercido pelo fungo no ambiente. Um exemplo desse fato observado nesse trabalho foi que o tratamento que promoveu os maiores valores de crescimento vegetativo (3 aplicações/ano) foi também o que obteve os maiores valores de UFC/g de solo ao final do experimento, comportamento exatamente oposto, quando leva-se em consideração variáveis que avaliam o efeito do fungo sobre a reprodução do nematoide, obtendo, para este último caso, os melhores resultados em tratamentos que obtiveram baixos valores de UFC/g de solo. Vale ressaltar que ainda não existe nenhum trabalho na literatura avaliando possíveis moléculas produzidas por *P. chlamydosporia* que comprovem esse autocontrole populacional promovido pelo antagonista.

Este é o primeiro trabalho avaliando o número ideal de aplicações de *P. chlamydosporia* para controle de *M. enterolobii* em plantas de acerola (*Malpighia glaba* L) e mesmo que os dados obtidos nessa experimentação sejam promissores, faz-se pertinente, avaliar os resultados encontrados com cautela. A adoção da extração proposta por Hussey & Barker (1973) neste experimento e a época de retirada do experimento (Agosto - meio da estação de inverno, época de temperaturas baixas em Viçosa-MG) desfavoreceram a obtenção de muitos ovos para análise da variável.

Boneti & Ferraz (1981) modificaram a metodologia proposta por Hussey & Barker (1973), adicionando também uma etapa onde os fragmentos de raízes são triturados no liquidificador. Como realizado no trabalho pioneiro dos autores para *M. exigua* em raízes de cafeeiro, essa metodologia é geralmente utilizada para espécie de nematoides que aloca as massa de ovos internamente a raiz, diferentemente da espécie em avaliação neste experimento. A diferença marcante da técnica modificada para a primeira é que, para a segunda, a etapa adicional faz com que as massas internas sejam expostas no processo de trituração, contribuindo para um maior número de ovos coletados.

Sendo assim, diante dos poucos valores de ovos coletados após o processo de extração e da ausência de trabalhos com *P. chlamydosporia* em plantas de acerola no controle de fitonematoides, é plausível considerar que, a repetição deste experimento, utilizando a metodologia proposta por Boneti & Ferraz (1981) na etapa de extração dos ovos, além da adequação da retirada do experimento em época com temperaturas mais elevadas, seja necessária para consolidar que reaplicações a cada seis e doze meses sejam efetivas no controle de populações de *M. enterolobii* em plantas de acerola.

CONCLUSÕES

O tratamento com 3 aplicações/ano (cada 4 meses) é eficiente em promover o crescimento vegetal e 2 aplicações/ano (cada 6 meses) e 1 aplicação/ano (cada 12 meses) seriam mais eficientes em controlar *M. enterolobii* em plantas de acerola.

REFERÊNCIAS:

ABIGAIL, C.L.; PALMA-GUERRERO, J.; GLASS, N.L. The social network: deciphering fungal language. *Nature*, v.9, p.440-451. 2011.

BAILEY, D.J.; BIRAN, G.L.; KERRY, B.R.; GILLIGAN, C.A. Pathozone dynamics of *Meloidogyne incognita* in the rhizosphere of tomato plants in the presence and absence of the nematophagous fungus, *Pochonia chlamydosporia*. *Plant Pathology*, v.57, p.354-362. 2008.

BONETTI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.6, p.553. 1981.

BOURNE, J.M. Making a soil suppressive to root- knot nematodes by applications of *Verticillium chlamydosporium*. *IOBC / WPRS Bulletin*, v.24, p.25-30. 2001.

CAMPOS, V.P. Perspectivas do controle biológico de fitonematóides. *Informe Agropecuário*, v.16, p.26-30. 1992.

CARNEIRO, R.M.D.G.; HIDALGO-DIAZ, L.; MARTINS, I.; SILVA, K.F.A.; SOUSA, M.G.; TIGANO, M.S. Effect of nematophagous fungi on reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on guava (*Psidium guajava*) plants. *Nematology*, v.13, p.721-728. 2011.

CAVICHIOLO, J.C.; GARCIA, M.J.M.; BRIDA, A.L.; WILCKEN, S.R.S. Reação de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.) à *Meloidogyne enterolobii*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.36, p.156-160. 2014.

CHEN, S.; DICKSON, D.W. 2004. Biological control of nematodes by fungal antagonists. In: *Nematology-Advances and perspectives. Nematode Management and Utilization*. Tsinghua: University Press-CABI Publishing, v.2, p.979-1039.

COSTA, M.J.C.; TERTO, A.L.Q.; SANTOS, L.M.P.; RIVERA, M.A.A; MOURA, L.S.A. Supplementation with west Indian cherry and its effects on the blood levels of vitamin C and hemoglobin in preschool children. *Revista de Nutrição da PUCCAMP*, v.14, p.13-20. 2001.

COUTINHO, M.M.; FREITAS, L.G.; DALLEMORE-GIARETTA, R.; NEVES, W.S.; LOPES, E.A.; FERRAZ, S. Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pochonia chlamydosporia* e farinha de sementes de mamão. *Nematologia Brasileira*, v.33, p.169-175. 2009.

CRISÓSTOMO, L.A.; NAUMOV, A. Adubando para alta produtividade e qualidade: fruteiras tropicais do Brasil. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009. 238p.

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

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A.; PEREIRA, O.L.; ZOOCA, R.J.F.; FERRAZ, S. Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. *Crop Protection*, v.42, p.102-107. 2012.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; FERRAZ, S.; NEVES, W.S.; LOPES, E.A.; COUTINHO, M.M. Efeito da concentração de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira*, v.32, p.327-332. 2008.

FELTHAM, D.L.; CHAPLAIN, M.A.J.; YOUNG, I.M.; CRAWFORD, J.W. A mathematical analysis of a minimal model of nematode migration in soil. *Journal of Biological Systems*, v.10, p.15-32. 2002.

FREITAS, V.M. Resistência genética de goiabeira de reação de espécies frutíferas visando ao manejo de *Meloidogyne enterolobii*. Universidade de Brasília, 2012. 92p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Agronomia e Medicina, Brasília, DF.

GILLIGAN, C.A. Probability models for host infection by soilborne fungi. *Phytopathology*, v.75, p.61-7. 1985.

GUIMARÃES, L.M.P.; MOURA, R.M.; PEDROSA, E.M.R. Parasitismo de *Meloidogyne mayaguensis* em diferentes espécies botânicas. *Nematologia Brasileira*, v.27, p.139-145. 2003.

HAMAYUN, M.; KHAN, S.A.; KHAN, A.L.; KHAN, D.S.; TANG, J.; HUSSAIN, B.; AHMAD, Y.; ANWAR; LEE, I.J. Growth promotion of Cucumber by pure cultures of gibberellin-producing *Phoma* sp. GAH7. *W. J. Microbiology Biotechnology*, v.26, p.889- 894. 2010.

HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter*, v.57, p.1025-1028. 1973.

IQBAL, J.; NELSON, J.A.; MCCULLEY, R.L. Fungal endophyte presence and genotype affect plant diversity and soil-to-atmosphere trace gas fluxes. *Plant Soil*, v.364, p.15-27. 2013.

JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, v.24, p.453-489. 1986.

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

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

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

KIERS, E.T.; DUHAMEL, M.; BEESETTY, Y.; MENSAH, J.A.; FRANKEN, O.; VERBRUGGEN, E.; FELLBAUM, C.R.; KOWALCHUK, G.A.; HART, M.M.; BAGO, A.; PALMER, T.M.; WEST, S.A.; VANDENKOORNHUYSE, P.; JANSMA, J.; BÜCKING, H. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science*, v.333, p.880-882. 2011.

LOURENZANI, W.L. A Cadeia Produtiva da Acerola na Região Nova Alta Paulista. In: 47^o Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia rural. Porto Alegre, RS. 2009. 25p.

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

MANZANILLA-LÓPEZ, R.H.; ESTEVES, I.; FINETTI-SIALER, M.; HIRSCH, P.R.; WARD, E. *Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endoparasitic nematodes. *Journal of Nematology*, v.47, p.1-7. 2013.

MERCALI, G.D.; SCHWARTZ, S.; MARCZAK, L.D.F.; TESSARO, I.C.; SASTRY, S. Ascorbic acid degradation and color changes in acerola pulp during ohmic heating: Effect of electric field frequency. *Journal of Food Engineering*, v.123, p1-7. 2014.

MONTEIRO, T.S.A. Controle biológico do nematoide das galhas, *Meloidogyne javanica*, e promoção de crescimento vegetal com os fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia flagrans*. Universidade Federal de Viçosa, 2013. 55p. Tese (Mestrado) - Departamento de Fitopatologia, Viçosa, MG.

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

MOREIRA, W.A.; NETO, D.H. Attack by gall nematode (*Meloidogyne mayaguensis*) to seedlings of guava obtained from cuttings and grafting. Comunicado

Técnico/Embrapa Semi-Árido, Petrolina, PE. 2001. 107p.

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

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living in side plants: bacterial endophytes. Curr. Opin. Plant Biol., v.14, p.435-443. 2011.

ROBINSON, P.M.; MCKEE, N.D.; THOMPSON, L.A.A. Autoinhibition of germination and growth in *Geotrichum candidum*. Mycological Research, v.93, p.214-222. 1989.

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

SIDDIQUI, Z.A.; MAHMOOD, I. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: A review. Bioresource Technology, v.58, p.229-39. 1996.

SILVA, G.S.; KRASUSKI, I.A. Reação de algumas espécies frutíferas tropicais a *Meloidogyne enterolobii*. Nematologia Brasileira, v.36, p.1-2. 2012.

SINGH, L.P.; GILL, S.G.; TUTEJA, N. Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. Plant Signal Behavior, v.6, p.175-191. 2011.

BASF - UNIDADES DE PRODUTOS PARA FRUTICULTURA. Frutas para exportação. Atualidades Agrícolas, v.6, p.16-29. 2006.

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

VIGGIANO, J.R.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A. Use of *Pochonia chlamydosporia* to control *Meloidogyne javanica* in cucumber. *Biological Control*, v.69, p.72-77. 2014.

VIGGIANO, J.R.; FREITAS, L.G.; FERREIRA, P.A. Resíduo da produção de *Pochonia chlamydosporia* no desenvolvimento de mudas e plantas de alface. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v.47, p.983-990. 2012.

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

CONCLUSÕES GERAIS

Cama de frango apresentou efeito significativo no controle de *M. javanica* em tomateiro. A aplicação conjunta com *P. chlamydosporia* resulta em efeito adicional nesse controle.

Em plantas de acerola, a aplicação *P. chlamydosporia* 3 vezes/ano (cada 4 meses) é eficiente em promover o crescimento vegetal e 2 aplicações/ano (cada 6 meses) e 1 aplicação/ano (cada 12 meses) são mais eficientes em controlar *M. enterolobii* em plantas de acerola.

ANEXOS:

TABELA 3 - Análise química do solo previamente tratado com Dazomet utilizado nos experimentos com três materiais orgânicos que possuem diferentes relações C/N em testes em casa de vegetação em plantas de tomate para controle de *M. javanica*.

Referência	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Zn	B	Fe	Mn	Cu	pH	Al ⁺³	H + Al	SB	CTC (t)	CTC (T)	V	P-rem	MO
	mg/dm ³		cmolc/dm ³			mg/dm ³				H ₂ O	cmolc/dm ³		cmolc/dm ³			%	mg/L	dag/Kg
Solo	75,2	55	4,1	1,2	3,7	0,3	33,3	58,9	0,8	6,4	0,0	1,65	5,44	5,44	7,09	77	27,9	27,9

P - - K - Fe - Zn - Mn -Cu - Extrator Mehlich 1

B - Extrator água quente

pH em água, KCl e CaCl₂ - Relação 1: 2,5

H + Al - Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol/L - pH 7,0

SB = Soma de Bases Trocáveis

CTC (t) - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva

CTC (T) - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva a pH 7,0

V = Índice de Saturação de Bases

TABELA 4 - Análise química dos três materiais orgânicos com diferentes relações C/N utilizados em testes sob casa de vegetação em plantas de tomate para controle de *M. javanica*

MATERIAIS ORGÂNICOS	C/N	N	K	Ca	Mg	S	CO	P	Z	Fe	Mn	Cu	B	pH
		%						ppm						H ₂ O
TRIGO	53,46	0,68	0,80	0,13	0,05	0,03	36,35	0,12	34	881	112	6	5,2	6,8
PALHA DE CAFÉ	15,83	2,06	3,52	0,70	0,14	0,16	32,60	0,22	11	935	53	20	34,9	5,9
CAMA DE FRANGO	6,54	3,60	1,68	9,48	0,41	0,40	23,55	1,29	205	1078	195	28	29,6	6,9

*Teores Totais, determinados no extrato ácido (ácido nítrico com ácido perclórico)

*N - Método do Kjeldahl

*CO - Método Walkley - Black

TABELA 5 - Análise química do solo não esterilizado utilizado no experimento de acerola.

Referência	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Zn	B	Fe	Mn	Cu	pH	Al ³⁺	H + Al	SB	CTC (t)	CTC (T)	V	P-rem	MO
	mg/dm ³		cmolc/dm ³			mg/dm ³				H ₂ O	cmolc/dm ³		cmolc/dm ³			%	mg/L	dag/Kg
Solo	1,1	2,0	4,1	0,0	0,2	0,1	12,8	0,6	0,4	5,2	0,0	1,0	0,1	0,1	1,1	10	22,1	1,15

P - - K - Fe - Zn - Mn -Cu - Extrator Mehlich 1

B - Extrator água quente

pH em água, KCl e CaCl₂ - Relação 1: 2,5

H + Al - Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol/L - pH 7,0

SB = Soma de Bases Trocáveis

CTC (t) - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva

CTC (T) - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva a pH 7,0

V = Índice de Saturação de Bases