

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE NEMATICIDAS BIOLÓGICOS À BASE DE
Pochonia chlamydosporia(Pc-10) e *Purpureocillium lilacinum* (Pae10) NO MANEJO DE
Meloidogyne incognita e *M. javanica* NA CULTURA DO TABACO

Angela Redolfi
Bióloga/ URI

Dissertação apresentada com um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Ênfase Fitopatologia

Porto Alegre (RS), Brasil
Maio de 2014

CIP - Catalogação na Publicação

Redolfi, Angela

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE NEMATÓCIDAS BIOLÓGICOS À
BASE DE *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) e
Purpureocillium lilacinum (Pae 10) NO MANEJO DE
Meloidogyne incognita e *M. javanica* NA CULTURA DO
TABACO / Angela Redolfi. -- 2014.

45 f.

Orientadora: Valmir Duarte.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2014.

1. *Meloidogyne incognita*. 2. *Meloidogyne*
javanica. 3. tabaco. 4. *Pochonia chlamydosporia* (Pc-
10). I. Duarte, Valmir, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais e irmãos pelos sábios ensinamentos e apoio em todos os momentos.

Ao meu amado noivo pelo incentivo, paciência, carinho e auxílio.

Aos meus amigos de trabalho e toda equipe do laboratório que muito contribuíram para meu desenvolvimento profissional e pessoal, em especial a Patrícia Lius Melo Alves e Krissie Caetano.

Aos colegas de campo Claudio Vidal de Medeiros e Elton Guske pelo profissionalismo e auxílio nos experimentos.

A Fernanda CarvalhoViana e Irving Berger que oportunizaram a realização deste sonho.

Ao meu professor orientador Valmir Duarte e coorientador Leandro Grassi de Freitas pela dedicação de seu tempo com contribuições e enriquecimento ao trabalho.

A empresa Souza Cruz, por oportunizar um ambiente de trabalho que transmite os mais altos valores de profissionalismo.

Aos demais amigos que de uma forma ou de outra cooperaram e me ajudaram nesta trajetória.

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE NEMATICIDAS BIOLÓGICOS À BASE DE *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) e *Purpureocillium lilacinum* (Pae 10) NO MANEJO DE *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* NA CULTURA DO TABACO¹

Autor: Angela Redolfi
Orientador: Valmir Duarte

RESUMO

A cultura do tabaco acumula perdas consideráveis em decorrência do ataque de nematoides das galhas e a constante busca de alternativas para controle desta praga constitui-se numa preocupação mundial. Com o intuito de avaliar a eficiência de dois agentes de controle biológico formulados à base de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) e *Purpureocillium lilacinum* (Pae 10) no manejo de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em mudas de tabaco, foram realizados os seguintes experimentos: (1) *in vitro*, no qual se testou a compatibilidade com os fungicidas à base de óxido cuproso, de metalaxil M + mancozebe ou de iprodiona, e a compatibilidade entre eles; (2) em casa de vegetação, para analisar o efeito da aplicação de produto formulado com *P. chlamydosporia* (Pc-10) e *P. lilacinum* (Pae 10) aos 5, 10, 15 e 20 dias antes do transplante, e (3) em campo para medir a eficiência de uma ou duas aplicações de produto à base de *P. chlamydosporia*. Os resultados obtidos *in vitro* indicaram que os fungos *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* não interagem entre si, e que os fungicidas testados não afetaram o desenvolvimento destes. Os experimentos em casa de vegetação indicaram que a aplicação do produto à base de *P. lilacinum* reduziu 56 e 59% na média da massa e número de ovos aos 5 e 15 dias, respectivamente, após o transplante. Ao passo que, *P. chlamydosporia* apresentou redução na média no número de ovos e na massa de ovos de *M. javanica* em todas as épocas testadas. Já em campo, o produto formulado com *P. chlamydosporia*, em uma aplicação, em solo arenoso, reduziu o número de ovos e índice de galhas, porém, não aumentou a produtividade e qualidade do tabaco nas duas áreas avaliadas. Conclui-se, portanto, que o nematicida à base de *P. chlamydosporia*, é um produto eficiente na redução de *M. incognita* e *M. javanica*.

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (45p.) Maio, 2014.

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF BIOLOGICAL NEMATOCIDES
FORMULATED WITH *Pochonia chlamydosporia* (PC-10)
and *Purpureocillium lilacinum* (Pae10) IN MANAGEMENT OF
Meloidogyne incognita and *M. javanica* IN THE TOBACCO CULTURE¹

Author: Angela Redolfi

Advisor: Valmir Duarte

ABSTRACT

Nematode attack results into considerable cumulative losses in the tobacco crop, so the constant search for alternatives to manage this pest constitutes a global concern. In order to evaluate the efficiency of two biological control agents formulated based on *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) and *Purpureocillium lilacinum* (Pae 10) in management of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* in the tobacco crop, the following experiments were performed (1) *in vitro*, in order to evaluate compatibility with cuprous oxide, metalaxyl M + mancozeb or iprodione fungicides and also compatibility among them; (2) in greenhouse, to analyze the effect of *P. chlamydosporia* and *P. lilacinum* at 5, 10, 15 and 20 days before transplanting, and (3) in the field to measure the effectiveness of one and two applications of *P. chlamydosporia*. Results *in vitro* showed that there is no interaction between *P. chlamydosporia* and *P. lilacinum*, and their developments were not affected by the fungicides tested. The experiments performed in the greenhouse showed a reduction of 56 and 59% in the mass and number of eggs at 5 and 15 days after application, respectively, when the nematocide formulated with *P. lilacinum* was used. On the other side, the product formulated with *P. chlamydosporia* reduced the number and mass of eggs of *M. javanica*, regardless the time of application. Regarding the field results, the nematocide formulated with *P. chlamydosporia*, in sandy soil and one application, reduced the number and index of eggs, however, with no increase of tobacco yield for both areas. We conclude the nematocide formulated with *P. chlamydosporia* is an effective component of management of *M. incognita* and *M. javanica*

¹Master of Science Dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (45p.) May, 2014.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Cultura do tabaco.....	3
2.2 Nematóide das galhas.....	4
2.3 Controle biológico.....	6
2.4 Fungos nematófagos.....	7
2.4.1 <i>Purpureocillium lilacinum</i>	9
2.4.2 <i>Pochonia chlamydosporia</i>	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Crescimento micelial de isolados de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pc-10) ou <i>Purpureocillium lilacinum</i> (Pae 10) na presença de fungicidas (óxido cuproso, metalaxil M + mancozebe ou iprodiona).....	12
3.2 Interação entre o crescimento micelial de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pc-10) e <i>Purpureocillium lilacinum</i> (Pae 10) isolados dos produtos comerciais.....	13
3.3 Avaliação da época de aplicação dos produtos à base de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pc-10) e <i>Purpureocillium lilacinum</i> (Pae 10).....	14
3.3.1 Inóculo de <i>Meloidogyne javanica</i>	14
3.3.2 Mudanças de tabaco.....	14
3.3.3 Experimento em casa de vegetação.....	15
3.4 Avaliação da eficiência agrônômica de produto biológico a base de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pc-10) em campo.....	16
3.4.1 Mudanças de tabaco.....	16
3.4.2 Experimento em campo.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19

	Página
4.1 Crescimento micelial de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pc-10) ou <i>Purpureocillium lilacinum</i> (Pae 10) na presença de fungicidas (óxido cuproso, metalaxil M + mancozebe ou iprodiona).....	19
4.2 Interação entre o crescimento micelial de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pc-10) e <i>Purpureocillium lilacinum</i> (Pae 10).....	21
4.3 Avaliação da época de aplicação de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pc-10) e <i>Purpureocillium lilacinum</i> (Pae 10).....	24
4.4 Avaliação do produto a base de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pc-10) em lavouras de tabaco.....	31
5. CONCLUSÕES.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
7. APÊNDICES.....	45

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Discriminação da concentração dos agentes biológicos contidos nos produtos comerciais utilizados. Cachoeirinha, RS, 2012.....	13
2. Fungicidas e doses testados. Cachoeirinha, RS, 2012.....	13
3. Adubações recomendadas para mudas de tabaco em vaso. Cachoeirinha, RS, 2012.....	15
4. Manejo conduzido nas áreas experimentais nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul nos anos de 2012 e 2013.....	16
5. Tratamentos com produto a base de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pc-10) em campo. Paraná e Rio Grande do Sul, 2012.....	17
6. Diâmetro do crescimento micelial de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pc-10) e <i>Purpureocillium lilacinum</i> (Pae 10) em meio de cultura BDA em crescimento isolado, comparado com crescimento pareado. Cachoeirinha, RS, 2012.....	22
7. Número de folhas e peso de folhas frescas e secas de tabaco cultivadas em vaso por 50 dias em substrato tratado com produto comercial a base de <i>Pochonia chlamydosporia</i> aos 5, 10, 15 e 20 dias antes do transplântio. Cachoeirinha, RS, 2012.....	29
8. Número de folhas e peso de folhas frescas e secas de tabaco cultivadas em vaso por 50 dias em substrato tratado com produto comercial a base de <i>Purpureocillium lilacinum</i> aos 5, 10, 15 e 20 dias antes do transplântio. Cachoeirinha, RS, 2012.....	30
9. Média do índice de galhas e o número de ovos de <i>Meloidogyne</i> spp. em lavoura de tabaco I tratada com produto comercial a base de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pc-10). Paraná, 2013.....	31
10. Média do índice de galhas e o número de ovos de <i>Meloidogyne</i> spp. em lavoura de tabaco II tratadas com produto comercial a base de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pc-10). Rio Grande do Sul, 2013.....	32

	Página
11. Características do solo nas áreas de lavouras de tabaco I e II. Paraná e Rio Grande do Sul, 2013.....	34
12. Média dos rendimentos quantitativo, qualitativo e econômico do tabaco em lavoura de tabaco I tratadas com produto comercial a base de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pc-10). Paraná, 2013.....	35
13. Média dos rendimentos quantitativo, qualitativo e econômico do tabaco em lavoura de tabaco II tratadas com produto comercial a base de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pc-10). Rio Grande do Sul, 2013.....	36
14. Média do diâmetro da colônia de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pc-10) em meio de cultura BDA com óxido cuproso, mancozebe + metalaxil M ou iprodiona aos 3, 7, 12 e 20 dias. Cachoeirinha, RS, 2012.....	45
15. Média do diâmetro da colônia de <i>Purpureocillium lilacinum</i> (Pae 10) em meio de cultura BDA com óxido cuproso, mancozebe + metalaxil M ou iprodiona aos 3, 7, 12 e 20 dias. Cachoeirinha, RS, 2012.....	45

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Diâmetro do micélio do fungo <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pc-10) em meio de cultura BDA com Cobre® (óxido cuproso), Ridomil® (mancozebe + metalaxil M) ou Rovral® (iprodiona). Cachoeirinha, RS, 2012.....	20
2. Diâmetro do micélio do fungo <i>Purpureocillium lilacinum</i> (Pae 10) em meio de cultura BDA com Cobre® (óxido cuproso), Ridomil® (mancozebe + metalaxil M) ou Rovral® (Iprodiona). Cachoeirinha, RS, 2012.....	21
3. Colônia de <i>Purpureocillium lilacinum</i> Pae 10 (Pl) em confronto direto com <i>Pochonia chlamydosporia</i> Pc-10 (Pc)[a] e controles[b,c]. Cachoeirinha, RS, 2012.....	22
4. Massa de ovos de <i>Meloidogyne javanica</i> em raízes de tabaco cultivadas em vaso por 50 dias em substrato tratado com produto comercial a base de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pc-10) aos 5, 10, 15 e 20 dias antes do transplântio. Cachoeirinha, RS, 2012.....	25
5. Número de ovos de <i>Meloidogyne javanica</i> em raízes de tabaco cultivadas em vaso por 50 dias em substrato tratado com produto comercial a base de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pc-10) aos 5, 10, 15 e 20 dias antes do transplântio. Cachoeirinha, RS, 2012.....	25
6. Massa de ovos de <i>Meloidogyne javanica</i> em raízes de tabaco cultivadas em vaso por 50 dias em substrato tratado com produto comercial a base de <i>Purpureocillium lilacinum</i> (Pae 10) aos 5, 10, 15 e 20 dias antes do transplântio. Cachoeirinha, RS, 2012.....	27
7. Número de ovos de <i>Meloidogyne javanica</i> em raízes de tabaco cultivadas em vaso por 50 dias em substrato tratado com produto comercial a base de <i>Purpureocillium lilacinum</i> (Pae 10) aos 5, 10, 15 e 20 dias antes do transplântio. Cachoeirinha, RS, 2012.....	28
8. Temperatura e precipitação média na lavoura I, de agosto de 2012 (plântio do tabaco) até fevereiro de 2013 (colheita). Paraná.....	33
9. Temperatura e precipitação média na lavoura II, de setembro de 2012 (plântio do tabaco) até março de 2013 (colheita).....	33

1 INTRODUÇÃO

Nematoides das galhas (*Meloidogynespp.*) estão entre os maiores causadores de danos em diversas culturas, dentre elas o tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Em todo o mundo, o prejuízo está estimado em mais de 150 bilhões de dólares na agricultura. No Brasil, as perdas causadas por este patógeno estão avaliadas em 5-20% (Sharma, 1994), sendo relatadas para o tabaco perdas de 14,7% anuais em decorrência do ataque de fitonematoides (Sasser & Freckman, 1987).

Os nematoides das galhas são patógenos que habitam naturalmente o solo. Ao penetrar nas raízes, deformam as células ao redor, provocando o sintoma de galha, e interferem na fisiologia de absorção e translocação de água e nutrientes para a planta. Consequentemente, a planta murcha e desenvolve sintomas relacionados às deficiências nutricionais, diminuindo a produtividade e podendo levar a planta à morte. Além dos danos diretos, os ferimentos causados na planta pelo nematoide servem de porta de entrada para outros patógenos, como fungos e bactérias (Santin, 2008).

Os prejuízos que nematoides do gênero *Meloidogynespp.* causam em tabaco tem sido frequentemente assinalados nas regiões sul, sudeste e nordeste do Brasil (Gomes *et al.*, 2008). O nematoide da espécie *Meloidogyne javanica* é considerado um dos mais agressivos para essa cultura, principalmente pelo fato de já existir cultivares resistentes para outra espécie importante, como *M. incognita* (Sasser & Carter, 1985).

A busca de novas alternativas no controle de fitonematoides em substituição aos nematicidas convencionais constitui-se numa preocupação mundial (Ferraz & Freitas, 2004). Alguns fungos habitantes do solo estão sendo utilizados como agentes de biocontrole (Stirling, 1991). Alguns fungos nematófagos são parasitas facultativos e tem a capacidade de colonizar as raízes das plantas (Bordallo *et al.*, 2002; Ferraz & Freitas, 2004), como no caso de *Purpureocillium lilacinum* e *Pochoniachlamydosporia*, que são dois dos principais agentes utilizados no programa de controle biológico de nematoide de galhas e sua eficiência motivou inclusive o desenvolvimento de formulações comerciais no Brasil, Cuba e Portugal (Kerry, 2001; Lopes *et al.*, 2007; Ferraz *et al.*, 2010).

Estudos com agentes biológicos conduzidos em diversas culturas, a exemplo de tomateiro (Alves & Campos, 2003) e feijoeiro (Santin, 2008), tem mostrado grande potencial no controle de *Meloidogynespp.*

Portanto, os objetivos deste trabalho foram avaliar: (i) o crescimento micelial *in vitro* entre *P. chlamydosporia* (Pc-10) ou *P. lilacinum* (Pae 10) na presença de fungicidas à base de óxido cuproso, de metalaxil M + mancozebe ou de iprodiona, e a interação entre o micélio deste agentes de controle biológico; (ii) o efeito da aplicação de produto formulado com *P. chlamydosporia* (Pc-10) e *P. lilacinum* (Pae 10) aos 5, 10, 15 e 20 dias antes do transplântio, e (iii) a eficiência agrônômica de uma ou duas aplicações de produto a base de *P. chlamydosporia* (Pc-10) no manejo de *M. incognitae* e *M. javanica* em lavouras de tabaco.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura do Tabaco

A indústria de tabaco movimentava bilhões na agricultura brasileira. Entre indústrias, lavouras e empregos indiretos, o setor gera cerca de 2,5 milhões de empregos por ano. Com números expressivos e que tornam o setor um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento econômico e social de 720 municípios nos três estados do sul, o Brasil é o principal exportador mundial de tabaco. Em 2011, o país retomou o posto do segundo maior produtor, atrás apenas da China. Especialistas da indústria do tabaco se dedicam a incrementar a produtividade e qualidade do tabaco produzido de forma sustentável através de uma equipe de Orientadores Agrícolas que prestam toda a assistência técnica necessária para diversos produtores integrados, auxiliando-os a conduzir suas lavouras com sucesso (Souza Cruz, 2012).

Com a crescente busca de qualidade na produção de tabaco, a cultura necessita cada vez mais de medidas eficientes de manejo e o controle de doenças assume importância fundamental dentro da agricultura (Fernandes, 2005; Souza Cruz, 2012).

A produção de tabaco, desde o plantio até a colheita está sujeita ao ataque de insetos, fungos, bactérias, vírus e nematoides, que poderão causar danos durante todo o período em que o planta permanece na lavoura, levando à redução da qualidade e da produtividade (Souza Cruz, 1998). A maioria das doenças que afetam o tabaco são causadas por patógenos que vivem no solo, dentre eles estão os nematoides das galhas, que são uma

das principais pragas da cultura (Lucas, 1975; NC State University, 2008; Fernandes, 2005).

Juntamente com as indústrias do tabaco, agricultores integrados buscam o manejo de pragas agrícolas com o limitante de haver restrições ambientais, toxicológicas e financeiras que impossibilitam o uso de nematicidas químicos para a cultura. Além disso, a cultura busca cada vez mais reduzir a utilização de agrotóxicos e adotar medidas recomendadas como rotação de culturas e uso de cultivares resistentes, porém nem todas as cultivares de tabaco possuem resistência a mais de uma espécie do gênero *Meloidogyne* (Machado *et al.*, 2013; Souza Cruz, 2012).

O controle correto do agente causador do desequilíbrio da planta apresenta-se como ferramenta crucial para subsidiar o desenvolvimento da produção agrícola, aliada a isso está a crescente busca por produtos orgânicos que também atinge a indústria fumageira. Neste contexto, o controle biológico se torna uma ferramenta imprescindível para o controle de pragas agrícolas do tabaco com o intuito de produzir mudas saudáveis e robustas e reduzir as perdas (Souza Cruz, 1998; NC State University, 2008; Souza Cruz, 2012).

2.2 Nematoides das galhas

Os nematoides das galhas (*Meloidogynespp.*) estão entre os maiores causadores de danos em diversas culturas, dentre elas o tabaco (*Nicotiana tabacum* L). Nas mais diversas culturas, em todo o mundo, o prejuízo anual está estimado em mais de 150 bilhões de dólares na agricultura (Sharma, 1994; Abad *et al.*, 2008). Os nematoides das galhas infectam mais de três mil espécies de plantas cultivadas e reduzem em média 5% a produção mundial. As perdas por nematoides das galhas são severas e em combinação com outros patógenos a doença pode ser ainda mais severa (Agrios, 2005; Sasser & Carter, 1985; Lucas, 1975)

Meloidogynespp. são parasitas obrigatórios e penetram nas raízes das plantas na fase ainda juvenil, atravessam o parênquima cortical e posicionam-se na periferia do cilindro vascular. O juvenil estabelece o parasitismo, incitando, mediante injeção de secreções esofagianas através do estilete, a hipertrofia e a hiperplasia das células. A fêmea torna-se então mais robusta e perde a mobilidade. Após sucessivas ecdises e desenvolvimento, as fêmeas sexualmente maduras tornam-se globosas e brancas leitosas. A reprodução nas principais espécies ocorre por partenogênese mitótica obrigatória. Cada fêmea deposita seus ovos geralmente no exterior da raiz. Os ovos são circundados por uma matriz gelatinosa secretada pela própria fêmea durante a oviposição. No interior dos ovos encontram-se juvenis que logo sofrem a primeira ecdise e eclodem. Estes então passam a migrar no solo à procura de hospedeiro (Agrios, 2005; Sasser & Carter, 1985; Lucas, 1975; Santin, 2008; Lopes, 2007).

Diversas etapas são necessárias para que ocorra o parasitismo por fitonematoides: atração do juvenil pela planta, penetração na raiz, movimentação dentro do hospedeiro, excreção dos produtos da glândula esofagiana dorsal, reconhecimento do elicitor pela planta e formação das células gigantes. Para o cumprimento de todas estas etapas, o nematoide necessita de energia e condições fisiológicas adequadas. Além disso, solo arenoso e altas temperaturas são alguns dos fatores que podem contribuir para a rápida multiplicação do nematoide (Costa *et al.*, 2000; Rocha, 2007; Santin, 2008).

Em consequência da infestação severa de nematoides, o sistema radicular pode apodrecer facilmente fazendo com que as plantas não absorvam água e nutrientes do solo de forma adequada. Plantas afetadas por nematoide de galhas são caracterizadas por apresentarem crescimento reduzido, amarelecimento das folhas e murcha nas horas mais quentes do dia. Esta doença ocorre em reboleiras no campo e plantas atacadas podem

morrer principalmente nas estações mais secas (Costa *et al.*, 2000; Souza Cruz, 1998; Lucas, 1975).

Todos nematoides fitopatogênicos são parasitas obrigatórios e alimentam-se de plantas até completar o seu desenvolvimento. Durante este tempo dispendido na rizosfera, eles são expostos a uma grande variedade de microrganismos. Nematoides fitoparasitas estabelecem interações complexas com outros microrganismos do solo, incluindo bactérias e fungos parasitas de nematoides e os fatores abióticos que os afetam. Medidas de controle como adubação verde, rotação de culturas, cultivares resistentes ou controle biológico auxiliam a reduzir a penetração e colonização por nematoides e conseqüentemente reduzem os danos na lavoura (Ciancio & Mukerji, 2010).

2.3 Controle Biológico

Atualmente o principal método de controle de nematoides das galhas é baseado no uso de fumigantes do solo ou de nematicidas organofosforados e carbamatos. A busca por produtos mais seguros e menos tóxicos tem sido constante, não apenas para atender as legislações dos países importadores de tabaco, mas principalmente para preservar a saúde dos produtores e o meio ambiente (Souza Cruz, 1998; Agrios, 2005). O controle biológico é uma ferramenta importante para o manejo de doenças e existem numerosos organismos com atividades antagonistas aos nematoides fitoparasitas (Stirling, 1991).

Produtores de diversas culturas em todo o mundo estão usando estratégias de manejo integrado para o controle de nematoides das galhas. Vários países estão reduzindo o uso de nematicidas químicos no manejo de nematoides e torna-se um desafio para os nematologistas buscar outras medidas de controle uma vez que agroquímicos são de elevado custo econômico e podem causar danos ao meio ambiente (Ciancio & Mukerji, 2010).

O controle biológico de fitonematoides consiste na redução de populações de nematoides por meio da ação de organismos vivos (Stirling, 1991), e estaprática de manejo está sendo vista com grande interesse entre os nematologistas. O biocontrole de nematoides fitoparasitas tem sido reportado em diversos países (Chen *et al.*, 1994; Podestá, 2010; Manzanilla-López *et al.*, 2013) e muitos agentes de biocontrole têm sido desenvolvidos em formulações comerciais (Khan *et al.*, 2001; Ferraz & Freitas, 2004).

Agentes microbianos podem ser antagonistas e produzir compostos bioativos que matam ou afetam o desenvolvimento dos nematoides, ser parasitas e destruir os nematoides colonizando-os ou podem competir por recursos. Alguns agentes de controle biológico tem se mostrado promissores, mas são ainda considerados duvidosos sobre sua efetividade (Ciancio & Mukerji, 2010).

O estudo dos mecanismos de ação dos antagonistas é de fundamental importância para se obter um controle biológico mais efetivo. Experimentos de seleção de microrganismos com potencial para o controle biológico de fitopatógenos podem ser realizados *in vivo* e *in vitro*, em condições controladas ou em condições naturais. Ambos os métodos são complementares (Lucas, 1975; Sasser & Carter, 1985).

Diversos agentes de controle biológico para controle de nematoides das galhas estão sendo formulados comercialmente, porém, é imprescindível avaliar estes agentes com a cultura que se deseja trabalhar. Estudos conduzidos mostram que os agentes de controle biológico, quando aplicados no campo, podem falhar em controlar a doença, principalmente por sua inabilidade de competir com a nova microflora e se estabelecer na rizosfera (Khan *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2013)

2.4 Fungos Nematófagos

Fungos nematófagos podem ser agrupados como fungos predadores que apresentam estruturas especializadas de captura e secretam substâncias que prendem o nematoide;

fungos endoparasitas de juvenis que produzem pequenos esporos que permanecem dormentes até a adesão a um nematoide e fungos parasitas de ovos e fêmeas, que produzem enzimas que degradam as cascas dos ovos facilitando a rápida colonização do fungo no ambiente onde está inserido (Carneiro 1992, Podestá, 2010). Dentre os fungos nematófagos, os parasitas de ovos e fêmeas estão entre os mais eficientes na redução da população de nematoides (Sasser & Carter, 1985; Carneiro, 1992).

Fungos parasitas de ovos diferem dos outros antagonistas devido a sua incapacidade de atuar no estágio juvenil dos nematoides, uma vez que estes tenham saído dos ovos, de maneira que muitas vezes seu efeito só é observado após uma eficiente colonização da rizosfera e consequente colonização dos ovos oriundos da primeira geração dos nematoides das raízes (Rao, 2008; Podestá, 2010).

Muitos fungos endoparasitas possuem habilidade de colonizar e parasitar eficientemente os nematoides das galhas. Alguns atuam como parasitas obrigatórios de nematoides, mas a maioria atua como saprófita facultativo, podendo sobreviver no solo de matéria orgânica na ausência de nematoides, o que faz deles os agentes com maior potencial de biocontrole (Carneiro, 1992; Ciancio & Mukerji, 2010). Um número considerável de fungos está sendo submetido para registro no Ministério da Agricultura como colonizadores de ovos e cistos de nematoides, mas apenas as espécies *Purpureocillium lilacinum*, *Pochonia chlamydosporia* e *Dactylella oviparasitica* estão sendo estudadas com maiores detalhes (Carneiro, 1992).

2.4.1 *Purpureocillium lilacinum*

Purpureocillium lilacinum é um fungo ascomiceto comum do solo com propriedades nematófagas e tem sido estudado por mais de duas décadas como agente potencial para controle de nematoide de galhas e outros nematoides fitoparasitas de lavouras. Devido a seus resultados positivos como agente de biocontrole na agricultura, muitas empresas estão investindo em pesquisas com este fungo (Hewlett *et al.*, 1988; Kiewnick and Sikora, 2006; Li *et al.*, 2013). Este organismo tem se mostrado muito efetivo como parasita de ovos e cistos e comporta-se como um organismo oportunista com pouca especificidade de hospedeiro (Sasser & Carter, 1985; Nunes, 2008). Este fungo é capaz de utilizar uma ampla faixa de substrato além de ser compatível com diferentes fungicidas e nematicidas. Quando aplicado no solo e em ambiente favorável, o fungo se estabelece, cresce e dissemina-se rapidamente por um curto período de tempo. Em experimentos de laboratório *P. lilacinum* infectou ovos de *Meloidogynespp.* e destruiu juvenis no interior destes, confirmando sua eficácia como parasita (Hewlett *et al.*, 1988; Nunes, 2008).

O processo de infecção de ovos de *Meloidogynespp.* por *P. lilacinum* inicia-se com o crescimento da hifa do fungo sobre a matriz gelatinosa que recobre a massa de ovos do nematoide. A colonização ocorre pela simples penetração da parede do ovo por uma hifa individual, auxiliadas por atividades mecânicas e/ou enzimáticas. Após penetração, os ovos são completamente colonizados pelo fungo (Sasser & Carter, 1985).

Bons resultados com o uso de *P. lilacinum* em casa de vegetação e experimentos de campo tem confirmado este agente como um microrganismo promissor no controle biológico de *Meloidogynespp.* (Sasser & Carter, 1985; Nunes, 2008).

2.4.2 *Pochonia chlamydosporia*

Pochonia chlamydosporia também tem sido apontado como um dos mais promissores agentes de biocontrole de nematoides. O fungo é capaz de sobreviver na ausência do hospedeiro, visto que produz clamidósporos que são estruturas de resistência e sobrevivência, o que o torna mais resistente a condições adversas do ambiente (Nunes, 2008; Dallemole-Giaretta *et al.*, 2008).

Pochonia chlamydosporia também é capaz de utilizar a matéria orgânica do solo como fonte de nutrientes e de predação ovos não associados às raízes ou em restos culturais, o que sugere que este antagonista possa sobreviver no solo na ausência de plantas (Stirling, 1991). No solo, os clamidósporos germinam e o micélio formado prolifera, coloniza o sistema radicular e parasita as massas de ovos formadas nas superfícies das galhas (Bourne *et al.*, 1996). É possível potencializar o controle do nematoide por meio da aplicação de *P. chlamydosporia* alguns dias antes do transplante da cultura visando aumentar o parasitismo de ovos e assim reduzir o inóculo inicial do fitopatógeno (Dallemole-Giaretta *et al.*, 2008).

A eficiência do fungo em parasitar os ovos de *Meloidogynespp.* ainda no solo e conseqüentemente, reduzir o número de nematoides que irão penetrar nas raízes do hospedeiro, está também relacionada com a temperatura e o estágio de desenvolvimento do embrião dentro do ovo. Em geral, os isolados de *P. chlamydosporia* colonizam os ovos na fase de multiplicação celular e desenvolvimento embrionário mais rapidamente que os ovos com juvenis (Kerry & Bourne, 1996; Lopes *et al.*, 2007).

Além da concentração de fungo, que altera o nível de controle, é importante monitorar a época de aplicação do fungo no solo que pode reduzir em mais de 90% a população de nematoides. Este parasita pode sobreviver também na ausência do hospedeiro, visto que comporta-se como saprófita. Como os ovos são o inóculo inicial dos

nematoídes no solo e também são importantes fonte de alimento para o fungo, a aplicação de *P. chlamidosporia* antes do plantio da cultura, propicia maior tempo de contato entre eles, podendo, desta forma, reduzir o número de juvenis que penetram nas raízes (Deleij *et al.*, 1993; Nunes, 2008; Podestá, 2010).

Geralmente a introdução de *P. chlamydosporia* no solo de forma prática, eficiente e integrada ao sistema produtivo é um desafio. *P. chlamydosporia* é capaz de sobreviver na rizosfera de muitas espécies de plantas e utilizar a matéria orgânica como fonte adicional de nutrientes, no entanto, a microbiota nativa do solo e a espécie hospedeira pode determinar a proliferação do antagonista (Ferraz & Freitas, 2004; Podestá *et al.*, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos *in vitro* e em vaso foram conduzidos em laboratório e em casa de vegetação da Souza Cruz S/A localizado no município de Cachoeirinha, RS. Os experimentos em campo foram conduzidos em lavouras experimentais de tabaco nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná.

3.1 Crescimento micelial de isolados de *Pochonia chlamydosporia*(Pc-10) ou *Purpureocillium lilacinum*(Pae 10) na presença de fungicidas (óxido cuproso, metalaxil M + mancozebe ou iprodiona)

Os produtos biológicos (Tabela 1) foram adquiridos diretamente com os fornecedores e mantidos em laboratório. As amostras do produto comercial contendo conídios de *P. lilacinum*, isolado UEL Pae 10 e clamidósporos de *P. chlamydosporia*, isolado UFV Pc-10, foram coletadas em condições assépticas, diluídas respectivamente na concentração 0,3 e 1g para 100 mL de água destilada autoclavada e realizadas diluições seriadas até 10^{-5} . Uma alíquota de 150 μ l de cada diluição foi introduzida em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA em três repetições. As colônias foram incubadas a 27°C por sete dias e fotoperíodo de 12 h.

Discos de micélio de 5 mm dos isolados de *P. lilacinum* e *P. chlamydosporia* com sete dias de idade foram transferidos para o centro de cada placa de Petri contendo meio de cultura com os fungicidas e incubadas a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ em fotoperíodo de 12 h por 20 dias. O meio de cultura BDA com os fungicidas foi preparado conforme a técnica descrita por

Edgington *et al.* (1971), modificada por Menten *et al.* (1976), em que o BDA foi diluído em erlenmeyers e após esterilização, quando o meio atingiu a temperatura ao redor de 40°C, BDA fundente, foram adicionados os fungicidas a base de óxido cuproso (Cobre Atar BR[®]), metalaxil M + mancozebe (Ridomil Gold MZ[®]) ou iprodiona (Rovral[®]) (Tabela 2) e vertidos em placas de Petri de 8 mm. Os diâmetros de crescimento das colônias foram registrados aos 3, 7, 12 e 20 dias. A testemunha consistiu de discos de BDA. O delineamento foi completamente ao acaso com 12 tratamentos e seis repetições.

TABELA 1. Discriminação da concentração dos agentes biológicos contidos nos produtos comerciais utilizados. Cachoeirinha, RS, 2012.

Agente	Concentração (UFC/g)	Dose (g/ha)
<i>Purpureocillium lilacinum</i> Pae 10	1x10 ¹⁰	600
<i>Pochonia chlamydosporia</i> Pc-10	2x10 ⁷	2 000

Para fins de cálculo as dosagens foram preparadas considerando uma calda de 200L.

TABELA 2. Fungicidas e doses testados. Cachoeirinha, RS, 2012.

Fungicida	Ingrediente ativo	Dose (g/5 L)
Cobre Atar BR [®]	Óxido Cuproso	12,0
Ridomil Gold MZ [®]	Mancozebe+ Metalaxil-M	20,0
Rovral [®]	Iprodiona	2,5

3.2 Interação entre o crescimento micelial de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) e

Purpureocillium lilacinum (Pae 10) isolados dos produtos comerciais

Discos de micélio de 5 mm dos isolados de *P. lilacinum* (Pae 10) e *P. chlamydosporia* (PC-10) com sete dias de idade foram transferidos para a superfície de placas de Petri de 9 mm contendo meio de cultura BDA equidistantes 4 cm e incubados a 27 ± 2°C com fotoperíodo de 12 h por 20 dias. A testemunha consistiu de discos de meio

de cultura BDA de 5 mm. O diâmetro de crescimento das colônias foi registrado aos 3, 7, 12 e 20 dias. O delineamento foi completamente ao acaso com dois tratamentos e seis repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística não paramétrica pelo teste de Wilcoxon com o auxílio do pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS).

3.3 Avaliação da época de aplicação dos produtos à base de *Pochonia chlamydosporia*(Pc-10) e *Purpureocillium lilacinum*(Pae 10)

3.3.1 Inóculo de *Meloidogyne javanica*

Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) previamente inoculadas com *M. javanica*, oriundo de lavoura de tabaco, foram mantidas em casa de vegetação para posterior extração dos ovos de acordo com a técnica modificada de Hussey & Barker (1973): o sistema radicular com sintomas de galhas foi cuidadosamente lavado, cortado em fragmentos de 2 cm e macerado em 500 mL de água destilada em liquidificador doméstico na velocidade média por 30 s. A suspensão foi passada em peneira de 20 mesh, sobreposta às peneiras de 60 e 500 mesh. O resíduo retido nesta última peneira foi transferido para tubo de centrífuga com auxílio de pisseta com água, adicionado um grama de Caolin e centrifugado por 10 min a 1800 rpm. O sobrenadante foi descartado, adicionado 200 mL de sacarose e centrifugado novamente por 2 min a 1800 rpm. O sobrenadante foi transferido para peneira 500 mesh, lavado e coletado em 100 mL de água destilada. Os ovos de nematoides retidos nesta suspensão foram contados com auxílio de microscópio óptico e câmera de Peters e a concentração padronizada para 100 ovos/ mL.

3.3.2 Mudanças de tabaco

Sementes de tabaco Virgínia CSC 463 foram semeadas em quatro datas diferentes (a cada cinco dias: 5, 10, 15 e 20 dias em sequência), em bandejas de 25 células contendo substrato Mec Plant. As bandejas foram mantidas em lâmina de água de 1 cm. Uma

adubação (1g/ L de NPK 20-10-20) foi realizada após a germinação e a outra depois de 17 dias.

3.3.3 Experimento em casa de vegetação

Uma mistura de dois lotes de substrato Mec Plant (Lote 52 IAC, pH:6,73, EC: 0,92 e Lote 54 IAC, pH: 6,39, EC 1,44), composto de casca de pinus foi pesado (900g) em vaso plástico de 1,5L de capacidade e transferido para saco plástico transparente, adicionado uma suspensão aquosa com três mil ovos de *Meloidogyne javanica*, e 0,12 g do produto comercial a base de *P. chlamydosporia* Pc10 ou 0,03 g do produto a base de *P. lilacinum*. A mistura foi homogeneizada através da agitação manual e inserida novamente no vaso. Aos 5, 10, 15 e 20 dias após preparo dos vasos, uma muda de tabaco foi transplantada e mantida em casa de vegetação por mais 50 dias. O substrato da testemunha recebeu apenas a suspensão com ovos de nematoides. O experimento foi conduzido com delineamento em blocos ao acaso, oito tratamentos e três repetições cada, sendo cada vaso com planta uma unidade experimental. As adubações foram realizadas conforme descrito na Tabela 3.

TABELA 3. Adubações recomendadas para mudas de tabaco em vaso. Cachoeirinha, RS, 2012.

Dose (g/vaso)	Adubo (N-P-K)	Época
2,5	10-16-10	Adubação de base
0,8	15-00-14	15-20 dias após o transplântio
0,8	15-00-14	30-35 dias após o transplântio

Ao final do experimento foram determinados o número e o índice de galhas, de acordo com Daulton & Nusbaum (1961), o número de ovos por sistema radicular, conforme Hussey & Barker (1973), o número de folhas, o peso de folhas frescas e secas

através da secagem em estufa a 65°C por 96 h ou até peso constante. A temperatura e umidade ambiente foram medidas diariamente.

A análise estatística foi realizada com o auxílio do pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS). Os dados de peso fresco e seco obtidos foram submetidos à análise de variância e, quando necessário, ao teste de comparação de médias de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

3.4 Avaliação da eficiência agrônômica de produto biológico a base de *Pochonia chlamydosporia*(Pc-10)em campo

Os experimentos foram conduzidos em lavouras de tabaco nos estados de Paraná e Rio Grande do Sul com histórico de *Meloidogyne javanicae* e *Meloidogyne incognita*. O manejo das áreas das lavouras está descrito na Tabela 4.

TABELA 4. Manejo conduzido nas áreas experimentais nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul nos anos de 2012 e 2013.

Lavoura	Preparo do solo	Adubação verde		Semeadura do tabaco	Adubação Base	
		(200 Kg de sementes/ha)			600 Kg/ha	Plantio do tabaco
I	08mai	09 mai (centeio)		11jun	13set	24set
II	09abr	09 abr (aveia preta)		15mai	10ago	20ago

3.4.1Mudas de tabaco

Sementes de tabaco Virgínia cultivar CSC 467 foram semeadas em bandejas de 242 células com substrato Mec Plant e mantidas em canteiro sobre lâminas de água de 1 cm. As adubações (1g/ L de NPK 20-10-20) foram realizadas após a germinação após 15 dias.

3.4.2 Experimento em campo

O produto comercial a base de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) foi aplicado na dosagem de 5g/ 500 mL por parcela aos 10 dias antes do transplante pulverizador costal sobre a linha de plantio e aos 30 dias após o transplante através de jato direcionado na base da planta (Tabela 1). As aplicações foram sempre realizadas no final da tarde e os tratamentos compostos de uma ou duas aplicações do produto comercial (Tabela 5).

TABELA 5. Tratamentos com produto a base de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) em campo. Paraná e Rio Grande do Sul, 2012.

Número de aplicações	Época
1	10 dias antes do transplante (no sulco)
2	10 dias antes do transplante (no sulco) 30 dias após o transplante (jato direcionado na planta)
Zero	Sem aplicação

O delineamento experimental consistiu de blocos casualizados, três tratamentos e cinco parcelas. Cada parcela foi composta de 42 plantas e espaçamento de 1,30 x 0,45 m, sendo as 20 plantas centrais consideradas úteis (quatro linhas). Uma linha de plantio de cada lateral foi reservada para bordadura.

O rendimento, a qualidade e a produtividade das folhas de tabaco foram avaliados logo após a colheita e cura das folhas de cada parcela separadamente. Cinco plantas centrais de cada parcela foram coletadas e o sistema radicular avaliado quanto ao índice de galhas (Daulton & Nusbaum, 1961), e número de ovos (Hussey & Barker, 1973).

O número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *P. chlamydosporia* por grama de solo nas lavouras do experimento de campo foi registrado um ano após a montagem do experimento. Três subamostras de cada parcela foram coletadas e misturadas, e uma amostra composta foi avaliada por tratamento. O solo (1g) foi adicionado em 9 mL de água destilada estéril em tubos de ensaio autoclavados e agitados em

vórtex; diluições sucessivas até 10^{-2} foram realizadas. Uma alíquota de 200 μ l de cada diluição foi inoculada na superfície de meio semi-seletivo (Gaspard *et al.*, 1990) em placas de Petri e espalhada com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram vedadas com Parafilm[®] e incubadas em BOD à 27 ± 2 °C por 10 dias.

A análise estatística foi realizada com o auxílio do pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e, quando necessário, ao teste de comparação de médias de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Crescimento micelial de *Pochonia chlamydosporia*(Pc-10) ou *Purpureocillium lilacinum*(Pae 10) na presença de fungicidas (óxido cuproso, metalaxil M + mancozebe ou iprodiona)

Os fungicidas comumente utilizados na cultura do tabaco: óxido cuproso, metalaxil M+ mancozebe ou iprodiona, nas concentrações testadas, não afetaram o desenvolvimento de *P. chlamydosporia* ou *P. lilacinum* em meio de cultura BDA aos 3, 7, 12 e 20 dias (Figuras 1 e 2), ou seja, os fungicidas não apresentaram problemas de compatibilidade (Apêndices). Produtos químicos utilizados no controle de doenças de plantas podem promover efeitos antagônicos, nulos ou sinérgicos no desenvolvimento de fungos utilizados no controle biológico e influenciar na atividade destes (Benz, 1987), e o presente trabalho demonstrou que a ação dos fungicidas testados é nula, pois sua aplicação não alterou o comportamento do agente biológico *in vitro*. Além da interação, agentes químicos e biológicos podem contribuir para a redução na quantidade de produto químico utilizado, e assim, reduzir os riscos para o homem e o meio ambiente (Nasu, 2013).

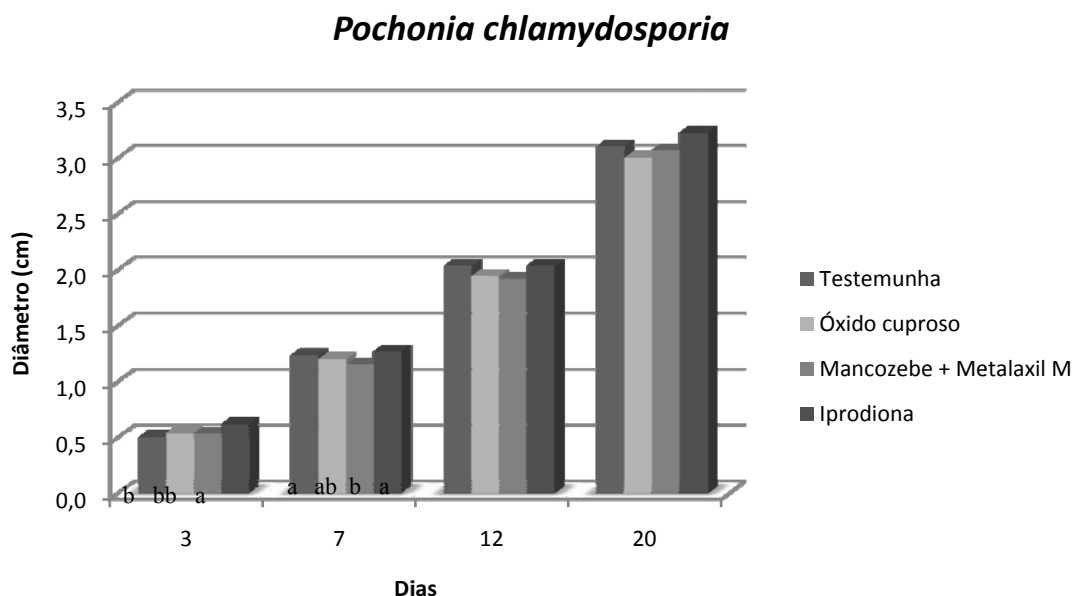


FIGURA1. Diâmetro do micélio do fungo *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) em meio de cultura BDA com Cobre® (óxido cuproso), Ridomil® (mancozebe + metalaxil M) ou Rovral® (iprodiona). Cachoeirinha, RS, 2012.

Médias de seis repetições. Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual ou nenhuma letra não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

A hipótese de incompatibilidade com o fungo *P. chlamydosporia* foi baseada nos relatos do efeito dos fungicidas Derosal Plus® (carbendazim e tiram), Maxim® (fludioxonil) e Spectro® (difenoconazol), assim como dos inseticidas Cruiser® (tiametoxam FS), Avicta® (abamectina e 1,2 propanodiol) e Standak® (fipronil SC), que retardaram, em diferentes intensidades o crescimento do fungo, mas não causaram a morte do micélio (Nasu, 2013). No entanto, relatos de compatibilidade já foram observados com os nematicidas fosthiazate (Tobin *et al.*, 2008) e aldicard (De Leij *et al.*, 1993). Todavia, nem estes fungicidas, inseticidas e nematicidas citados são usados para cultura do tabaco. Outro estudo de testes com fungicidas e *P. lilacinum* demonstrou que a adição dos fungicidas fenpiclonil ou tolclofos-methyl em meio de cultura BDA retardou o crescimento micelial do fungo, mas a adição do fungicida pencycuron ou o nematicida oxamyl não inibiu (Jacobs *et al.*, 2003).

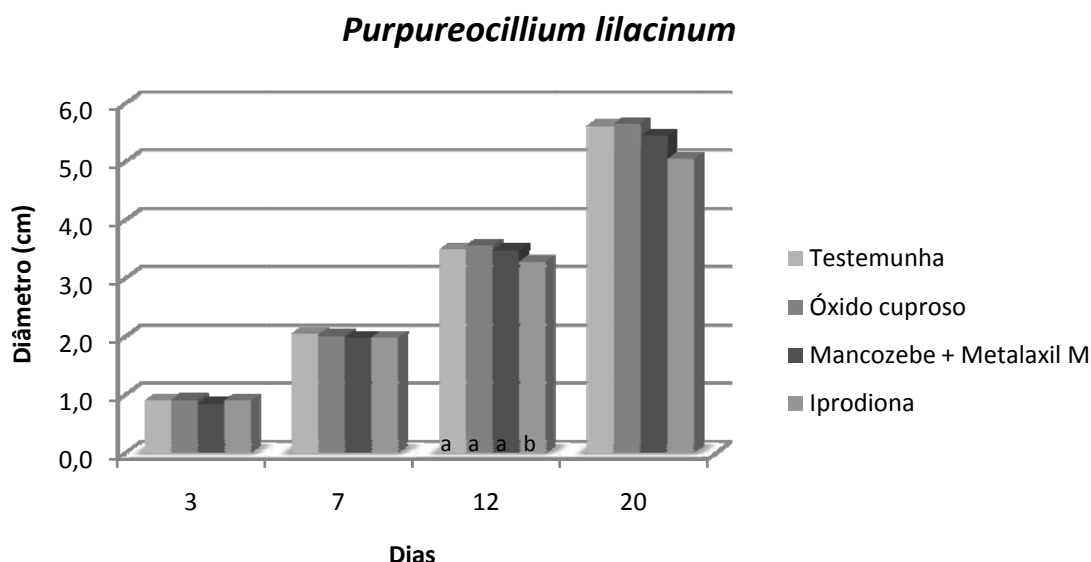


FIGURA2. Diâmetro do micélio do fungo *Purpureocillium lilacinum* (Pae 10) em meio de cultura BDA com Cobre® (óxido cuproso), Ridomil® (mancozebe + metalaxil M) ou Rovral® (Iprodiona). Cachoeirinha, RS, 2012. Médias de seis repetições. Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual ou nenhuma letra não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Não se encontrou registros sobre o efeito do micélio de *P. chlamydosporia* ou *P. lilacinum* na presença de óxido cuproso, mancozebe, metalaxil-M ou iprodiona na bibliografia consultada. Relativamente poucos trabalhos têm sido realizados nos últimos anos para determinar os efeitos de produtos químicos sobre microrganismos do solo (Tobin *et al.*, 2008). O crescimento de *P. chlamydosporia* geralmente é mais afetado na presença de produtos químicos em experimentos *in vitro* do que *in vivo* (Nasu, 2013).

4.2 Interação entre o crescimento micelial de *Pochonia chlamydosporia*(Pc-10) e *Purpureocillium lilacinum*(Pae 10)

Observou-se que, através do teste de cultura pareada em meio de cultura BDA, o micélio de *P. lilacinum* não sobrepôs micélio de *P. chlamydosporia*, e o mesmo ocorreu com *P. chlamydosporia* em relação a *P. lilacinum*. A distância entre os micélios não reduziu, mesmo quando os isolados permaneceram por vários dias na placa (Figura 3). Os isolados de *P. chlamydosporia* pareados em meio de cultura com *P.*

lilacinum, apresentaram redução média de 25 e 32% e *P. lilacinum* de 42 e 61% aos 12 e 20 dias, respectivamente (Tabela 6).

TABELA 6. Diâmetro do crescimento micelial de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) e *Purpureocillium lilacinum* (Pae 10) em meio de cultura BDA em crescimento isolado, comparado com crescimento pareado. Cachoeirinha, RS, 2012.

Fungos	Diâmetro micelial (cm)			
	Dias			
	12		20	
	Isolado	Pareado	Isolado	Pareado
<i>P. lilacinum</i>	3,32	1,95*	4,98	2,17*
<i>P. chlamydosporia</i>	1,87	1,42*	3,15	1,95*

Médias de seis repetições.

* Significância de p-valor teste a um nível de 5% entre a diferença das médias pelo teste de Wilcoxon (valor da diferença entre crescimento pareado menos crescimento isolado).

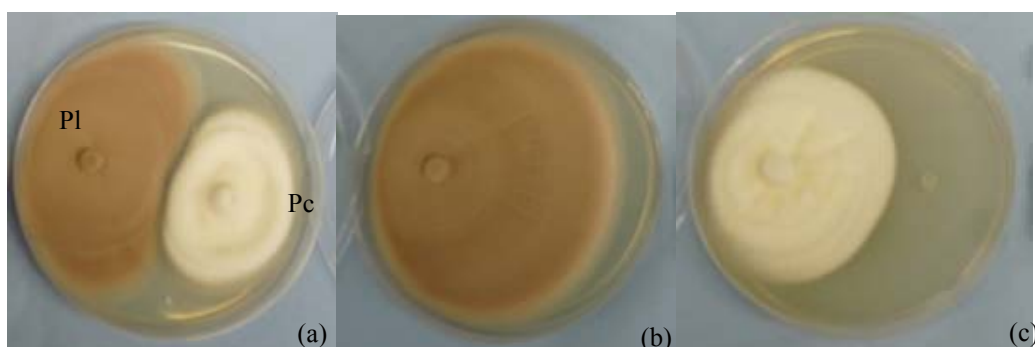


FIGURA 3. Colônia de *Purpureocillium lilacinum* Pae 10 (Pl) em confronto direto com *Pochonia chlamydosporia* Pc-10 (Pc)[a] e controles[b,c]. Cachoeirinha, RS, 2012.

Alguns trabalhos têm destacado que o uso de mais de um organismo de controle biológico pode proporcionar maior eficiência comparativamente a sua utilização isolada, porém é imprescindível saber o tipo de interação que ocorre entre os agentes que se deseja trabalhar (Jacobs *et al.*, 2003). *P. chlamydosporia* (Pc-10) e *P. lilacinum* (Pae 10), nas condições testadas, não são capazes de crescer concomitantemente e interagir na disputa por espaço e alimento. A utilização concomitante de *P. lilacinum* (Pae 10) e *P. chlamydosporia* (Pc-10) não os impede de crescer em um mesmo ambiente e cada fungo colonizar locais distintos das raízes das plantas. Provavelmente o que ocasionou a

separação no crescimento micelial entre os fungos testados foi a produção de compostos tóxicos por parte de cada fungo. Sabe-se que *P. lilacinum* produz um antibiótico, P-186, que possui atividade antimicrobiana (Siddiqui & Mahmood, 1994), e esta, ou outra substância relacionada, pode ter reduzido o crescimento micelial de *P. chlamydosporia*. Da mesma forma, *P. chlamydosporia* libera compostos que inibem o crescimento de outros microrganismos (Jacobs *et al.*, 2003).

Assim como no presente trabalho, o crescimento micelial de *P. lilacinum* foi significativamente inibido pela presença de *P. chlamydosporia* em teste com culturas pareadas em meio de cultura de BDA (Jacob *et al.*, 2003). Além disso, dados de incompatibilidade entre estes fungos foram observados em experimento em casa de vegetação, onde a aplicação concomitante de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* em solo infestado com *Meloidogyne incognita* não reduziu o número de juvenis de nematoides, mesmo quando aumentada a densidade dos propágulos (Gaspard *et al.*, 1990).

Há ainda outros estudos de interação entre diferentes agentes de controle biológico, incluindo *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum*, como por exemplo, o efeito combinado dos fungos *P. lilacinum* e *Trichoderma harzianum* que reduziu em 71% o número de galhas em plantas inoculadas, enquanto que a inoculação isolada de *P. lilacinum* e *T. harzianum* reduziu, respectivamente, 62 e 55% (Khan *et al.*, 2001). Testes de cultura pareada em meio BDA com *P. lilacinum* e *T. harzianum*, demonstraram crescimento sobreposto dos micélios dos fungos, fato este que indicou compatibilidade entre si, pois seu crescimento combinado apresentou melhor resultado que seu efeito isolado e que, eficientemente podem ser usados em conjunto para controle de nematode de galhas (Santin, 2008). Estes dados demonstram a importância de realizar testes prévios de compatibilidade entre os diferentes microrganismos biocontroladores, como estes que foram realizados, pois fungos nematófagos, quando aplicados em conjunto, são capazes de produzir substâncias tóxicas na rizosfera das plantas ou até competir entre si (Khan *et al.*, 2001; Santin, 2008),

principalmente pelo fato de que alguns fungos, durante o crescimento, produzirem compostos que poderão causar antagonismo (Zou *et al.*, 2007; Dallemole-Giaretta *et al.*, 2008).

4.3 Avaliação da época de aplicação de *Pochonia chlamydosporia*(Pc-10) e *Purpureocillium lilacinum*(Pae 10)

A incorporação do produto a base de *Pochonia chlamydosporia*(Pc-10) no substrato promove redução na massa e no número de ovos de *Meloidogyne javanica*, em todas as épocas testadas, se comparado com a testemunha. Observa-se que a tendência de redução seguiu o modelo linear e a área abaixo da curva do tratamento controle apresentou média de redução de 42 e 32% para massa e número de ovos, respectivamente se comparado com a testemunha. A maior redução ocorreu aos 5 e 15 dias antes do transplante de tabaco para massa de ovos, com reduções de 55 e 47% respectivamente e aos 5 e 10 dias para número de ovos, com reduções de 43 e 29%, respectivamente (Gráficos 4 e 5). Estes resultados vão de encontro ao trabalho de Cabanillas & Barker (1989), que inoculou *P. lilacinum* em mudas de tomate e observou 56% de redução de galhas quando aplicado 10 dias antes do transplante se comparado com a aplicação do fungo no dia do transplante. Isto ocorre pelo fato de que os ovos de fitonematóides são importantes fontes nutricionais para o fungo e o controle é potencializado através da aplicação de *P. chlamydosporia* no solo antes do plantio da cultura, pois propicia maior tempo de contato dos ovos ao fungo, resultando em maior número de ovos parasitados e, por consequência, menor número de juvenis com potencial de penetrar nas raízes (Stirling, 1991; Dallemole-Giaretta, 2008).

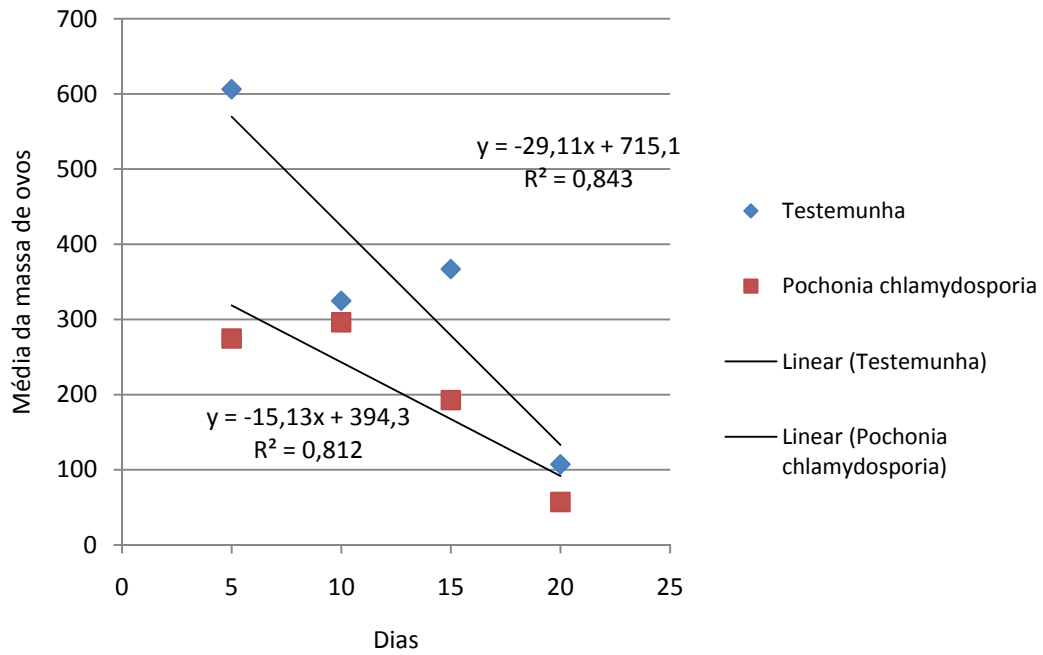


FIGURA4. Massa de ovos de *Meloidogyne javanica* em raízes de tabaco cultivadas em vaso por 50 dias em substrato tratado com produto comercial a base de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) aos 5, 10, 15 e 20 dias antes do transplântio. Cachoeirinha, RS, 2012.

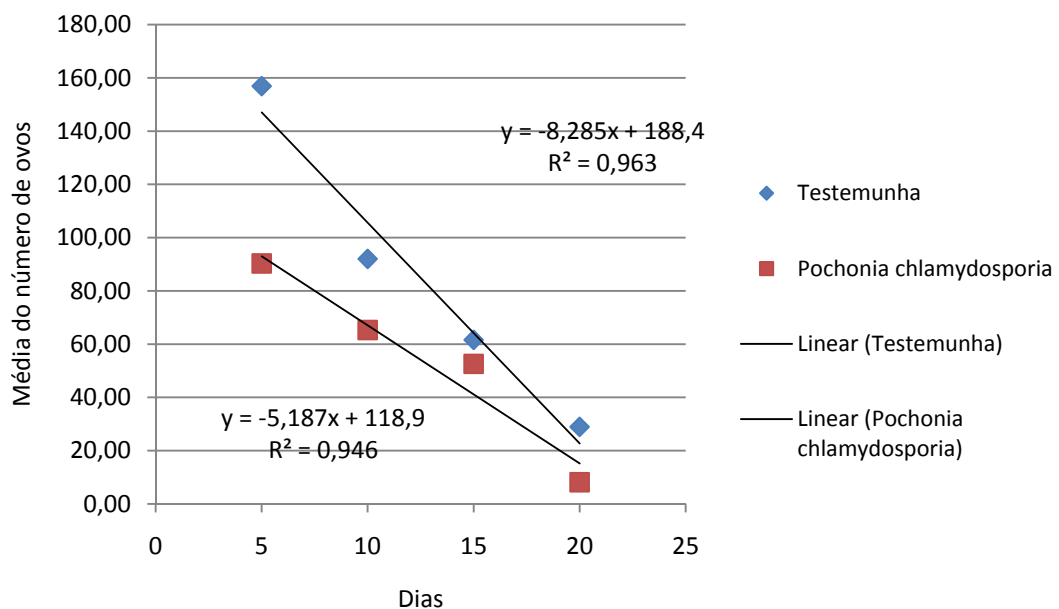


FIGURA5. Número de ovos de *Meloidogyne javanica* em raízes de tabaco cultivadas em vaso por 50 dias em substrato tratado com produto comercial a base de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) aos 5, 10, 15 e 20 dias antes do transplântio. Cachoeirinha, RS, 2012.

Ovos de nematoides das galhas são fontes nutricionais para o fungo, portanto é possível potencializar o controle de nematoides pela aplicação de *P. chlamydosporia* ao solo antes do transplântio da cultura principal visando reduzir o inóculo inicial do fitopatógeno (Stirling, 1991). Significativa redução de nematoides foi observada quando o antagonista inoculado a 5.000 clamidósporos/g de solo foi aplicado 7 dias antes do transplântio da cultura (Bourne *et al.*, 1996; Dallemole-Giaretta *et al.*, 2008), pois manter o solo com o bionemático e o nematoide antes do transplântio da muda é uma prática que promove o desenvolvimento e a colonização do fungo no ambiente antes da incorporação da muda, possibilitando maior eficiência no controle do nematoide (Carneiro, 1992; Sidiqi *et al.*, 2000).

A incorporação do produto a base de *Purpureocillium lilacinum* (Pae 10) no substrato também promoveu uma redução na massa de ovos de *Meloidogyne javanica*, porém não em todas as épocas testadas. A média da massa de ovos seguiu o modelo linear e a área abaixo da curva do tratamento controle apresentou redução 23% para massa de ovos se comparado com a área da testemunha. A maior redução na média da massa de ovos ocorreu aos 5 dias, chegando a 56% e no número de ovos aos 15 dias, com redução de 59% (Figuras 6 e 7). Corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho, Kiewnick & Sikora (2006) relataram redução no número de galhas em 66% e no número de massas de ovos em 74% em relação à testemunha, quando realizaram tratamento de solo com *P. lilacinum* aos seis dias antes do plantio de mudas de tomate. Diversos autores como Santiago *et al.* (2006), Nunes (2008) e Rao (2008), apontaram *P. lilacinum* como agente de grande potencial de controle de ovos de nematoides e promotores do crescimento de mudas de soja, tomate e feijão cultivados em solo autoclavado. Com relação ao número de ovos, quando incorporado ao substrato, o produto a base de *P. lilacinum* não seguiu o modelo linear, apresentando médias muito próximas com o tratamento controle, com exceção do tratamento aos 5 dias que foi observada redução de 59%.

A menor infectividade dos ovos aos 20 dias antes do transplântio, muito provavelmente, pode estar relacionada com o processo acelerado de desenvolvimento embrionário, seguida da eclosão de J2, que perdem sua infectividade ao longo dos dias devido ao gasto de reservas de nutrientes causado pela movimentação em busca das raízes sem, no entanto, encontrá-las (Van Gundy *et al.*, 1976; Podestá, 2010). O período de transplântio aos 20 dias, que naturalmente reduz o número de ovos e juvenis quando mantido em vaso, pode ter mascarado o resultado de controle do nematoide pelo fungo.

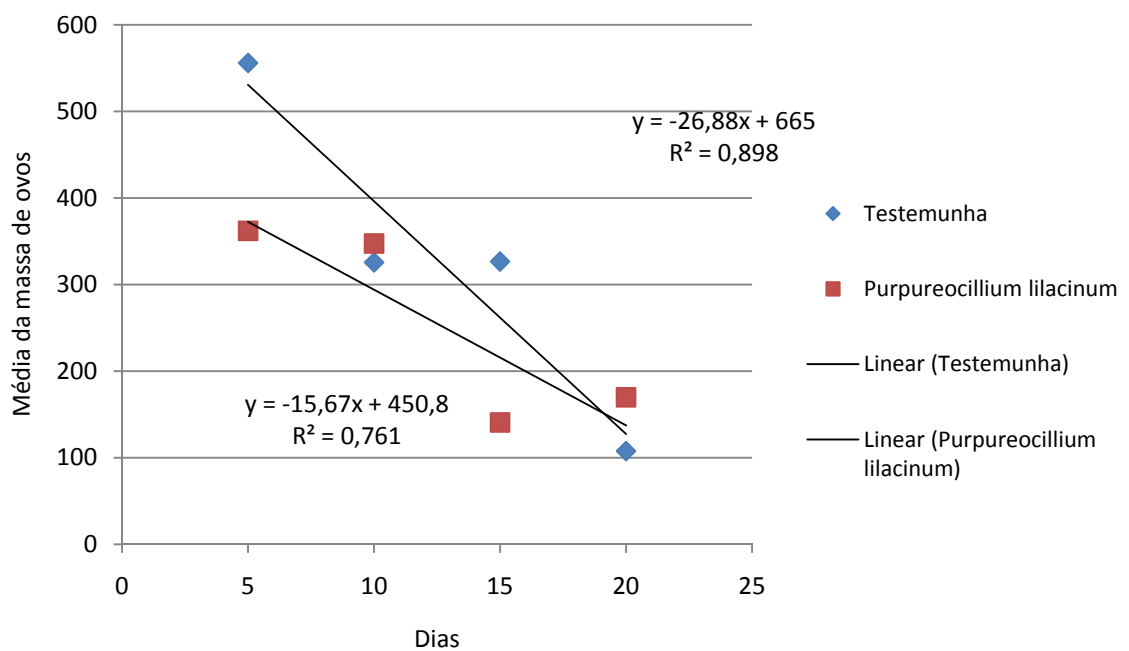


FIGURA6. Massa de ovos de *Meloidogyne javanica* em raízes de tabaco cultivadas em vaso por 50 dias em substrato tratado com produto comercial a base de *Purpureocillium lilacinum* (Pae 10) aos 5, 10, 15 e 20 dias antes do transplântio. Cachoeirinha, RS, 2012.

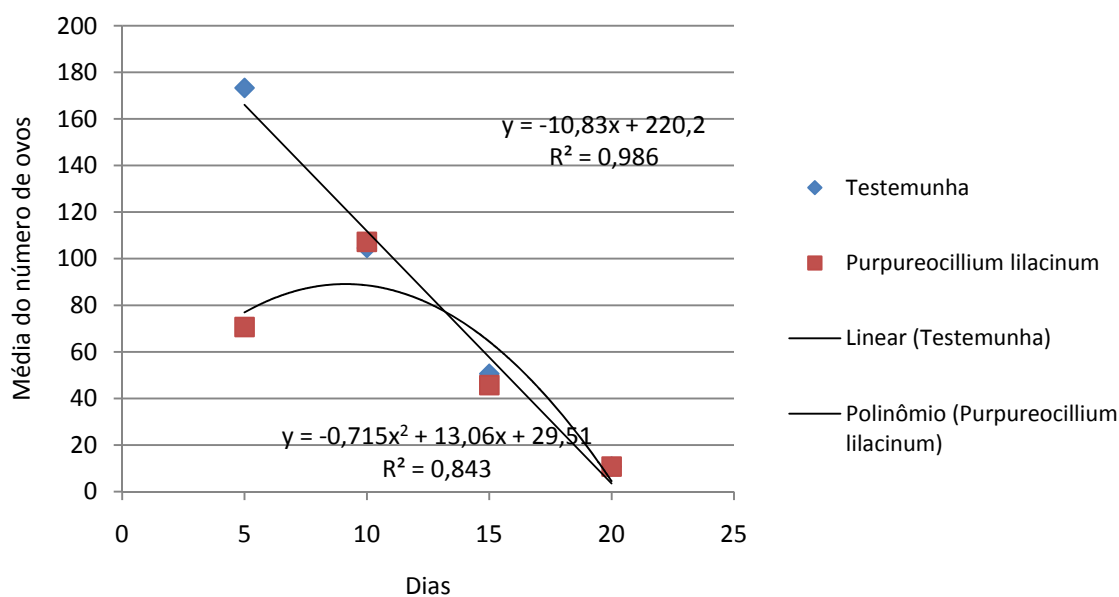


FIGURA7. Número de ovos de *Meloidogyne javanica* em raízes de tabaco cultivadas em vaso por 50 dias em substrato tratado com produto comercial a base de *Purpureocillium lilacinum* (Pae 10) aos 5, 10, 15 e 20 dias antes do transplântio. Cachoeirinha, RS, 2012.

A diferença entre os experimentos com *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* pode ser explicada pelo lixiviamento dos ovos e juvenis durante as regas, já que o substrato de casca de pinus, usado no experimento, é mais poroso que solo, mesmo de textura arenosa, não sendo capaz de reter o inóculo de nematoides nos vasos e permitir a infecção das raízes. A maior eficiência do produto a base de *P. chlamydosporia*, em comparação com *P. lilacinum* pode ser devida a capacidade de *P. chlamydosporia* colonizar e utilizar o substrato de casca de pinus, substrato que apresenta alta relação C/N. A capacidade de produzir diferentes enzimas extracelulares, incluindo quitinases e celulases (Domseh *et al.*, 1980), permite que *P. chlamydosporia* seja capaz de competir por muitos substratos (Stirling, 1991). O substrato Mec Plant utilizado no experimento, composto de casca de pinus, foi utilizado nos ensaios em casa de vegetação pelo fato de que no transplântio do tabaco, a muda é incorporada junto com o substrato no solo e é necessário que o agente de

controle biológico colonize o sistema radicular primeiramente sendo que isso compreende a rizosfera que estará circundada pelo substrato em questão.

O número de folhas, peso fresco e seco das folhas não apresentaram diferenças significativas com a aplicação de *P. chlamydosporia* nem com a aplicação de *P. lilacinum*, indicando que estes fungos não afetaram o desenvolvimento das mudas ou a produtividade das plantas de tabaco, independente da data de aplicação (Tabelas 7 e 8). Contrário a estes resultados, a massa de raízes frescas de soja inoculadas com *M. incognita* aumentou em média 78% em solo de terra de barranco e areia tratada na proporção 1:1 (v:v) com o fungo *P. chlamydosporia* (Nasu, 2013). Em trabalho desenvolvido por Podestá (2010), em que avaliou as mesmas datas de transplântio de mudas de tomate com o fungo *P. chlamydosporia*, observou redução no número de ovos de *M. javanica* em todas as épocas de infestação, porém a maior redução da multiplicação do nematoide foi em substrato inoculado 20 dias antes do transplântio das mudas.

TABELA 7. Número de folhas e peso de folhas frescas e secas de tabaco cultivadas em vaso por 50 dias em substrato tratado com produto comercial a base de *Pochonia chlamydosporia* aos 5, 10, 15 e 20 dias antes do transplântio. Cachoeirinha, RS, 2012.

Transplântio ¹ (dias)	<i>Pochonia chlamydosporia</i> ²	Número de folhas	C.V. (%)	Peso de folhas frescas (g)	C.V. (%)	Peso de folhas secas (g)	C.V. (%)
5	-	16	2,5	166,83	5,6	22,66	6,1
	+	17		168,62		22,10	
10	-	16	5,1	158,42	6,0	21,25	8,1
	+	16		159,59		22,85	
15	-	16	4,6	145,66	2,6	22,16	4,1
	+	15		127,43		18,93	
20	-	15	7,1	138,02	9,7	19,26	12,3
	+	15		133,70		18,90	

¹Após a mistura do substrato, nematoide e *P. chlamydosporia*.

²(+) com ou (-) sem *P. chlamydosporia*(Pc-10)

Médias de três repetições sem diferenças significativas ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

TABELA 8. Número de folhas e peso de folhas frescas e secas de tabaco cultivadas em vaso por 50 dias em substrato tratado com produto comercial a base de *Purpureocillium lilacinum* aos 5, 10, 15 e 20 dias antes do transplântio. Cachoeirinha, RS, 2012.

Transplântio ¹ (dias)	<i>Purpureocillium lilacinum</i> ²	Número de folhas	C.V. (%)	Peso de folhas frescas (g)	C.V. (%)	Peso de folhas secas (g)	C.V. (%)
5	-	17	2,4	174,89	5,9	24,45	3,2
	+	17		179,87		24,41	
10	-	16	6,6	166,00	4,2	22,41	5,1
	+	17		165,78		22,38	
15	-	16	2,6	145,27	2,3	22,08	1,7
	+	15		139,40		22,20	
20	-	14	4,9	135,14	4,7	18,34	6,7
	+	14		139,56		19,64	

¹Após a mistura do substrato, nematoide e e produto a base de *P. lilacinum*.

²(+) com ou (-) sem *P. lilacinum* (Pae 10).

Médias de três repetições sem diferenças significativas ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Como ambos os testes com *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* foram conduzidos na mesma época e local, com dados de temperatura e umidade iguais, fatores ambientais possivelmente não tiveram interferência no parasitismo do fungo e desenvolvimento do nematoide, o que permite uma comparação da eficiência entre os fungos no controle do nematoide. A temperatura média foi de 26°C com mínimas de 11,8°C e máximas de 35°C. A umidade relativa do ar variou entre 40 e 95%, com média de 76%, sendo estas boas condições tanto para o desenvolvimento do fungo quanto para a multiplicação de *Meloidogyne javanica*. O maior desenvolvimento do embrião, multiplicação celular e eclosão de juvenis de *Meloidogyne* sp. ocorre a 28°C e estes processos ficam mais lentos com alterações na temperatura (Campos *et al.*, 2008). A temperatura ótima de parasitismo

e desenvolvimento de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* é de 25°C e altas temperaturas podem reduzir a eficiência do agente de controle biológico no solo (Cadioli *et al.*, 2007; Manzanilla-López *et al.*, 2013).

4.4 Avaliação do produto a base de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) em lavouras de tabaco

Uma e duas aplicações de produto comercial a base de *P. chlamydosporia* (Pc-10) em solo cultivado com tabaco (lavoura I), não diferiram entre si e ambas reduziram o número de ovos de nematoidese o índice de galhas em mais de 45 e 50%, respectivamente. Uma aplicação do produto a base de *P. chlamydosporia* reduziu significativamente o índice de galhas e número de ovos na lavoura I (Tabela 9). Resultado semelhante foi obtido com tomate, onde a variação na concentração de clamidósporos acima do nível recomendável de 5.000 clamidósporos por grama de solo (10, 15, 20 e 25 mil clamidósporos/g de solo) de *P. chlamydosporia* não apresentou maior efetividade na redução do número de ovos de *Meloidogyne javanica* (Dallemole-Giaretta, 2008). Distintas concentrações de clamidósporos do fungo *P. chlamydosporia* têm resultado em boa eficiência no controle de nematoides das galhas em várias culturas como cana, soja e tomate e estes dados podem ser observados em trabalhos em casa de vegetação e campo (Deleij *et al.*, 1993; Bourne *et al.*, 1996; Sidiqii *et al.*, 2000; Podestá *et al.*, 2009; Dallemole-Giaretta *et al.*, 2010).

TABELA 9. Média do índice de galhas e o número de ovos de *Meloidogyne* spp. em lavoura de tabaco I tratada com produto comercial a base de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10). Paraná, 2013.

Número de aplicações do produto a base de <i>P. chlamydosporia</i>	Índice de Galhas (Daulton & Nusbaum, 1961)		Número de ovos ($\times 10^3$)	
Zero	34,9	A	296	a
1	12,0	B	116	b
2	15,6	B	154	b
C.V. (%)	26,4		55,2	

Média de 25 repetições. Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual ou nenhuma letra não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Uma suposição para o fato da segunda aplicação do produto não ter potencializado o controle de nematoides das galhas baseia na época de aplicação em relação ao ciclo de vida do nematoide alvo, pois aos 30 dias após o plantio, os ovos de *Meloidogynespp.*, já haviam eclodido e não estariam mais suscetíveis no solo como na primeira aplicação, aos sete dias. O fungo *P. chlamydosporia* não reduz juvenis de segundo estágio, pois esta fase do nematoide não é o alvo principal (Manzanilla-López *et al.*, 2013).

Ao contrário da lavoura I, a lavoura de tabaco II não apresentou diferença significativa no índice de galhas e número de ovos, independente do número de aplicações do produto (Tabela 10).

TABELA 10. Média do índice de galhas e o número de ovos de *Meloidogyne* spp. em lavoura de tabaco II tratadas com produto comercial a base de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10). Rio Grande do Sul, 2013.

Número de aplicações do produto a base de <i>P. chlamydosporia</i>	Índice de Galhas (Daulton & Nusbaum, 1961)	Número de ovos (x10³)
Zero	49,4	213
1	38,8	177
2	38,0	161
C.V. (%)	18,2	63,8

Média de 25 repetições. Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual ou nenhuma letra não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Esta diferença entre os dois experimentos provavelmente aconteceu pelo volume de precipitação entre as áreas. Na lavoura I, o produto a base de *P. chlamydosporia* (Pc-10) foi introduzido nos meses de agosto e setembro, época onde houve poucas chuvas (Figura 8), possibilitando uma boa colonização deste fungo no solo e raízes. Na lavoura II, o produto a base de *P. chlamydosporia* (Pc-10) foi aplicado em setembro e outubro, onde a precipitação

foi intensa (Figura 9), podendo ser um dos fatores que interferiu no desenvolvimento do agente de controle biológico, pela lixiviação do fungo no solo.

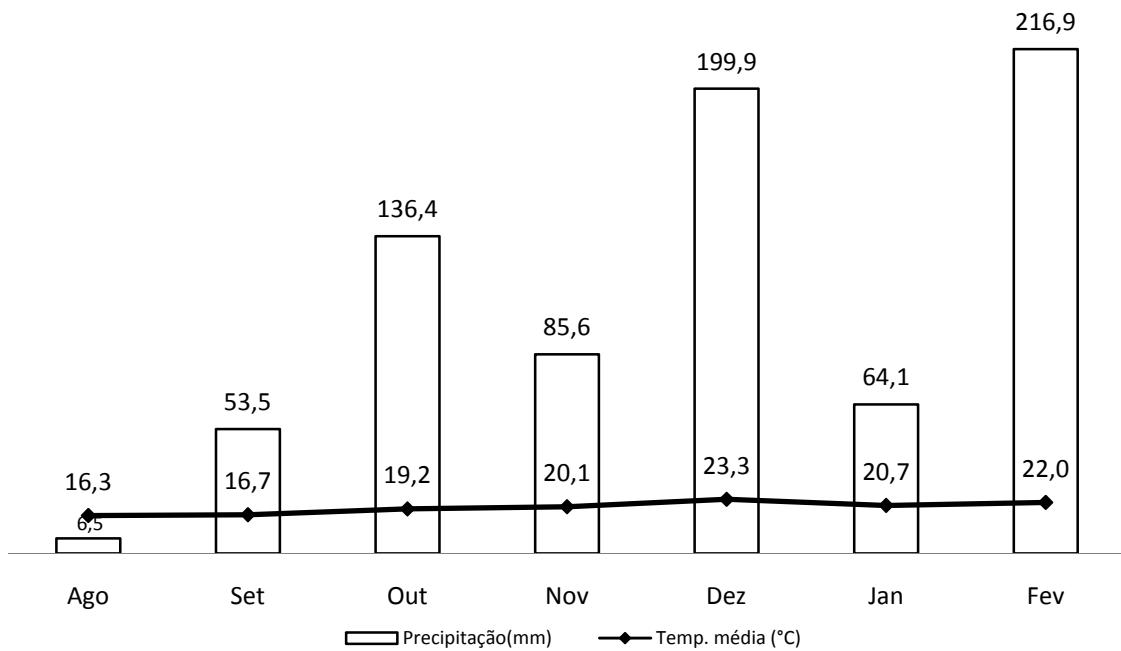


FIGURA 8. Temperatura e precipitação média na lavoura I, de agosto de 2012 (plântio do tabaco) até fevereiro de 2013 (colheita). Paraná.

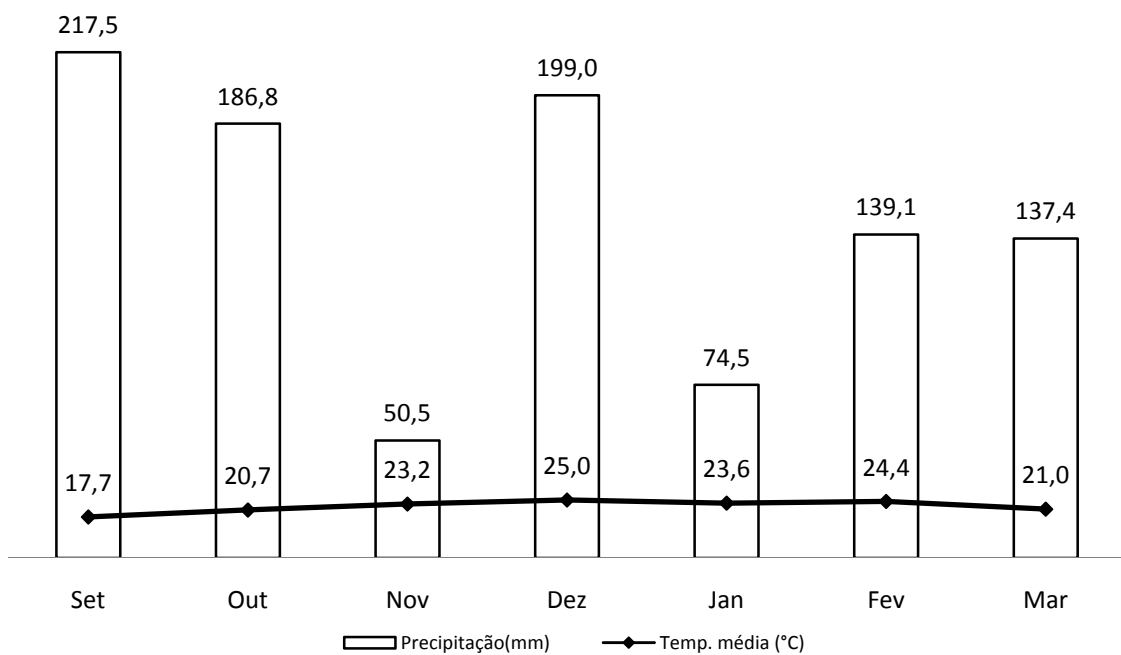


FIGURA 9. Temperatura e precipitação média na lavoura II, de setembro de 2012

(plantio do tabaco) até março de 2013 (colheita).Rio Grande do Sul.

O tipo de solo também pode ser um dos fatores que promoveu maior eficiência do agente de controle biológico na lavoura I, pois apresenta característica de solo arenoso, diferente da lavoura II, que é argiloso (Tabela 11). O fungo *P. chlamydosporia* é um organismo aeróbio, com isso, níveis menores de oxigênio podem fazer com que seu estabelecimento no solo e na superfície radicular seja menor, fato este que pode estar relacionado ao menor desenvolvimento do fungo em solos argilosos. Além disso, o clamidósporo de *P. chlamydosporia* é mais efetivo em solos com maior porosidade, pois sua percolação e distribuição no solo pode ser facilitada (De Leij *et al.*, 1993; Nasu, 2013). Cabe salientar que *Meloidogynespp.* causa maiores danos quando presente em solos arenosos, contudo, a aplicação e o bom desenvolvimento de *P. chlamydosporia* (Pc-10) neste tipo de solo pode ter reduzido o efeito causado pelo nematoide (Nasu, 2013). Este trabalho corrobora ode Nasu (2013), no qual o controle de *M. incognita* em soja que foi maior quando se fez a aplicação do produto a base de *P. chlamydosporia* em solo arenoso, reduzindo em 48,2 e 65,9% no número de ovos por sistema radicular, comparado com o solo argiloso que apresentou reduções de 43,4 e 26,8% para o primeiro e segundo experimentos, respectivamente.

TABELA 11. Características do solo nas áreas de lavouras de tabaco I e II. Paraná e Rio Grande do Sul, 2013.

Lavoura	pH H ₂ O	Índice SMP	M.O. %	meq %				P (ppm)	Granulometria			Classe Textural
				Ca	Mg	Al	K		Areia	Silte	Argila	
I	5,5	6,1	2,8	3,9	1,3	0	0,32	24,6	65	15	20	Média
II	6,0	6,4	2,3	6,4	2,0	0	0,69	>50	73	9	18	Arenosa

Embora a aplicação do produto a base de *P. chlamydosporia*(Pc-10)tenha resultado na redução do número de nematoides das galhas na lavoura I, não foi observado um aumento significativo de produtividade (Tabela 12). Este aumento também não foi observado na lavoura II, onde o rendimento quantitativo, qualitativo e econômico das folhas de tabaco demonstrou que não houve diferença entre os tratamentos em ambas as áreas (Tabelas 12 e 13). Uma hipótese para não haver diferença entre os tratamentos é que *P. chlamydosporia* deve ser introduzido no solo antes do transplântio das mudas para que ocorra uma boa colonização, e esse processo, na cultura do tabaco, coincide com épocas de baixas temperaturas, chegando a mínima a 9,3 e 14,7°C no mês de setembro para lavoura I e agosto para lavoura II, respectivamente. As baixas temperaturas podem ter estabilizado o desenvolvimento do fungo no solo e interferido no controle dos ovos antes da introdução da muda de tabaco. A faixa ótima de temperatura para eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *M.javanica*é de 25 a 28°C (Kerry & Deleij, 1992; Manzanilla-López *et al.*, 2013). *Pochonia chlamydosporia* possui uma temperatura ótima de crescimento também a 25°C, e a temperatura média registrada nos experimentos variou de 17,7 a 25,0°C e de 16,3 a 23,3°C na lavoura I e II, respectivamente (Figuras 8 e 9).

TABELA 12. Média dos rendimentos quantitativo, qualitativo e econômico do tabaco em lavoura de tabaco I tratadas com produto comercial a base de *Pochonia chlamydosporia*(Pc-10). Paraná, 2013.

Número de aplicações do produto a base de <i>P. chlamydosporia</i>	Kg/ha	US\$/kg	US\$/ha
Zero	3531	2,84	10073,90
1	3891	2,57	9970,45
2	3618	2,77	10023,08
C.V. (%)	7,5	6,4	10,9

Média de 25 repetições. Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual ou nenhuma letra não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

TABELA 13. Média dos rendimentos quantitativo, qualitativo e econômico do tabaco em lavoura de tabaco II tratadas com produto comercial a base de *Pochonia chlamydosporia*(Pc-10). Rio Grande do Sul, 2013.

Número de aplicações do produto a base de <i>P. chlamydosporia</i>	Kg/ha	US\$/kg	US\$/ha
Zero	4122	3,26	13442,87
1	3859	3,19	12309,64
2	4033	3,21	12954,47
C.V. (%) =	9,2	5,0	9,5

Média de 25 repetições. Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual ou nenhuma letra não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

P. chlamydosporia usado como biocontrole possui limitações para seu desenvolvimento que podem influenciar na sua colonização no solo e no seu estabelecimento como um agente efetivo de controle de nematoides. Limitações como clima e época de aplicação são alguns dos fatores que podem interferir no seu desenvolvimento (Carneiro *et al.*, 2001; Santin, 2008). Quando liberado no solo, *P. chlamydosporia* é exposto a fatores abióticos como água disponível e microclima que podem ter um grande impacto no estabelecimento deste e na sua eficácia em controlar nematoides. A temperatura ambiente e umidade afetam diretamente o crescimento do fungo e o nematoide no solo (Bourne & Kerry, 2000; Dallemole-Giaretta, 2008; Manzanilla-López *et al.*, 2013).

Outra hipótese para não haver diferença na produtividade entre os tratamentos é o tipo de solo, pois áreas com alto teor de matéria orgânica por si só já promovem a supressão do nematoide. As duas lavouras de tabaco com histórico de nematoides das galhas apresentaram alta porcentagem de matéria orgânica tanto na lavoura I quanto na

lavoura II, representando 2,8 e 2,3%, respectivamente (Tabela 11). Solos com alto teor de matéria orgânica são supressores naturais de nematoide de galhas, pois promovem a produção de compostos tóxicos ao nematoide e aumentam o conteúdo nutricional para auxiliar ao desenvolvimento da planta (Aktar & Malik, 2000; Podestá *et al.*, 2013).

No ano seguinte a condução do experimento de campo, uma amostra representativa das áreas, composta de nove repetições de cada tratamentodemonstrou que a quantificação do fungo *P. chlamydosporia* no solo foi similar entre as duas áreas sendo 522 e 588 unidades formadoras de colônia (UFC)por grama de solo para lavoura I e II respectivamente. Estes dados demonstram que *P. chlamydosporia*Pc10 se desenvolveu e permaneceu no solo, comprovando que o fungo é capaz de sobreviver na rizosfera e de utilizar a matéria orgânica como fonte adicional de nutrientes. Paraum microrganismo ser considerado um agente de biocontrole, além da capacidade de produzir compostos bioativos é necessário que este antagonista se estabeleça no solo para promover o parasitismo (Santin, 2008). Em aplicações seguidas deste fungo em áreas comerciais é esperado que sua população no solo aumente e se estabilize, chegando a tornar esses solos supressivos a nematoides (Atkins *et al.*, 2003).

5 CONCLUSÕES

Os resultados desta pesquisa permitiram as seguintes conclusões:

1. Os fungicidas a base de óxido cuproso, metalaxil M + mancozebe ou iprodiona não afetam o desenvolvimento *in vitro* dos fungos *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) ou *Purpreocillium lilacinum* (Pae 10).
2. Não há crescimento *in vitro* sobreposto do micélio dos fungos *P. chlamydosporia* (Pc-10) e *P. lilacinum* (Pae 10).
3. Os produtos comerciais a base de *P. chlamydosporia* (Pc-10) e *P. lilacinum* (Pae 10) reduzem a massa e o número de ovos de *Meloidogyne javanica* quando aplicado após o transplante de mudas de tabaco em vaso.
4. *P. chlamydosporia* (Pc-10) reduz o número de ovos e índice de galhas de *M. incognitae* e *M. javanica* em lavouras de tabaco em solo arenoso.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, P. et al. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology**, New York, v.26, p.909-915, 2008.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. Amsterdam : Elsevier, 2005.
- AKTAR, M.; MALIK, A. Roles of organic soil amendments and soil organism in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.74, p. 35-47, 2000.
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Editora da UFV, 2007. 382 p.
- ALVES, F. R.; CAMPOS, V. P. Efeitos da temperatura sobre a atividade de fungos no controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* raça 3. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.1, p.91-97, 2003.
- ATKINS, S. D. et al. Development of a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. **Pest Management Science**, Sussex, v.59, p.183–189, 2003.
- BARKER, K.R.; MELTON, T.A. Comparative Host Sensitivity and Efficiency of Selected Tobacco Cultivars to *Meloidogyne* species and Populations. **Tobacco Science**, Raleigh, v.34, p. 44-49, 1990.
- BENZ, G. Environment. **Epizootiology of insect**, Baracoa, v.22, p.31-39, 1987.
- BOURNE, J.M.; KERRY, B.R. Observations on the survival and competitive ability of the nematophagous *Verticillium chlamyosporium* in soil. **International Journal of Nematology**, Luton, v.10, p.9-18, 2000.
- BOURNE, J.M.; KERRY, B.R.; DE LEIJ, F.A.A.M. The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus, *Verticillium chlamyosporium*. **Biocontrol Science and Technology**, London, v.6, p.539-548, 1996.
- BONETI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, p.553-561, 1981.

BORDALLO, J.J. et al. Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. **New Phytologist**, Cambridge, v.154, p.491–499, 2002.

CAMPOS, H.D.; CAMPOS, V.P.; POZZA, E.A. Efeito da temperatura na multiplicação celular, no desenvolvimento embrionário e na eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, p. 29-33, 2008.

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

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas de nematoides das galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.25, p.35-44, 2001.

CAMPOS, H.D.; CAMPOS, V.P. Efeito da época e forma de aplicação dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis*, *Paecilomyces lilacinus*, e *Verticillium chlamydosporium* no controle de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.122, p.361-365, 1997.

CIANCIO, A.; MUKERJI, K.G. **Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes**. Netherlands: Springer, 2010.

COSTA, M.J.N. et al. Patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne incognita* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com aplicação de filtrados fúngicos ou extratos de plantas e de esterco de animais. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v.24, p.219-226, 2000.

DALLEMOLE-GIARETTA. **Isolamento, identificação e avaliação de *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica* e na promoção de crescimento de tomateiro**. 2008. 83f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, 2008.

DALLEMOLE-GIARETTA, R. et al. Efeito da concentração de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.32, n.4, p.327-332, 2008.

DALLEMOLE-GIARETTA, R. et al. Associação de *Pochonia chlamydosporia*, *Bacillus cereus* e fibra de coco no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.34, n.1, p.18-22, 2010.

DALLEMOLE-GIARETTA, R. et al. Produção de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* em diferentes substratos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.2, p.314-321, 2011.

DAULTON, R.A.C.; NUSBAUM, C.J. The effect of soil temperature on the survival of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* and *M. hapla*. **Nematologica**, Leiden, v.6, p.280-294, 1961.

DELEIJ, F.A.A.M.; DENHEHY, J.A.; KERRY, B.R.
Effect of watering on the distribution of *Verticillium chlamydosporium* in

soilandthecolonizationofeggsmassesof*Meloidogyneincognita*bythefungus.
Nematropica, Leithen, v.39, p.250-265, 1993.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press, 1980. v.1, 859 p.

EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of enzimidazoles compounds, **Phytopathology**, Saint Paul, v.61, p 42-44, 1971.

FERNADES, C.F. **Importância da fitopatologia**. 2005. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/importancia-fitopatologia>>. Acesso em: 06 out. 2012.

FERRAZ S.; FREITAS L.G. Use of antagonistic plants and natural products. In: CHEN, Z.X; CHEN, S.Y. ; DICKSON, D.W. (Ed.) **Nematology – Advances and perspectives**. Wallingford UK: CABI. 2004. p.931-960.

FERRAZ, S. et al. **Manejo sustentável de Fitonematoides**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2010. 306 p.

GASPARD, J.T; JAFFEE, B. A; FERRIS, H. *Meloidogyneincognita* survival in soilinfestedwith*Paecilomyceslilacinus*and*Verticilliumchlamydosporium*. **JournalofNematology**, Loudonville, v.22, n.2, p.176-181, 1990.

GOMES, C.B.; COUTO, M.E.O.; CARNEIRO, R.M.D.G. Registro de ocorrência de *Meloidogynemayaguensis* em goiabeira e fumo no Sul do Brasil.**Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.32, n.3, p.244-247, 2008.

HEWLETT, T.E. et al.Evaluation of *Paecilomyceslilacinus* as a Biocontrol Agent of *Meloidogynejavanica* on Tobacco. **Journal of Nematology**, Loudonville,v.20, n.4, p.578-584, 1988.

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

JACOBS, H.; SIMON, N. G; CRUMP, D. H.Interaction between nematophagous fungi and consequences for their potencial as biological agent for the control of potato cyst nematodes. **Mycological Research**, United Kingdom,v.107, n.1, p. 47-56, 2003.

KERRY, B.R.; DELEIJ, F.A.A.M. Key factors in the development of fungal agent for the control of cyst and root-knot nematodes. In: TIJAMOS, E. C. ; PAPAVIDAS, G. C.; COOK, J. (Ed). **Biological Control of Plant Diseases**. New York: Plenus Press, 1992. p. 139-144.

KERRY, B.R.; BOURNE, J.M. The importance of rhizosphere interaction in the biological control of plant parasitic nematodes – a case study using *Verticillium chlamydosporium*. **Journal ofPesticide Science**, Toquio, v.47, p.69-75, 1996.

- KERRY, B.R. Exploration of the nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.W.; MAGAN, N. (Ed.). **Fungi as biological control agent: progress, problems and potencial**. Wallingford: CABI Publishing, 2001. p.155-167
- KHAN, H.U. et al. Evaluation of the combined effects of *Paecilomyces lilacinus* and *Trichoderma harzianum* against root-knot disease of tomato. **Journal of Biological Sciences**, Adelaide, v.1, p.139-142, 2001.
- KHAN, M.R. et al. A new bioprocess to produce low cost powder formulations of biocontrol bacteria and fungi to control fusarial wilt and root-knot nematodes of pulse. **Biological Control**, Orlando, v.59, p.130-140, 2010.
- KIEWNICK, S.; SIKORA, R. A. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. **Biological Control**, Orlando, v. 38, p. 179-187, 2006.
- LARA, J. et al. Biological control of *Meloidogyne incognita* in tomato in Puerto Rico. **Nematropica**, Leithen, v.26, p.143-152, 1996.
- LI, J. et al. Multiple gene genealogical analyses of nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* from China. **Journal of Microbiology**, Korea, v.51, n.4, p.423-429, 2013.
- LOPES, E.A. **Formulação de condicionadores de solo com propriedades nematocidas**. 2007. 92f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- LOPES, E.A. et al. Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.31, n.2, p.20-26, 2007.
- LUCAS, G.B. **Diseases of Tobacco**. 3.ed. Raleigh: Biological Consulting Associated, 1975. 621p.
- MACHADO, V.O.F.; CAMPOS, V.P. Cultivo de fungos antagonistas em diferentes substratos e avaliação da eficiência no controle de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.33, n.3, p.387-391, 1997.
- MACHADO, J.C. et al. Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pochonia chlamyosporiae* esterco bovino. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.29, n.3, p.590-596, 2013.
- MANZANILLA-LÓPEZ, R.H et al. *Pochonia chlamyosporiae*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endoparasitic nematodes. **Journal of Nematology**, Loudonville, v.45, n.1, p.1-7, 2013.
- MUTHULAKSHMI, M. et al. Compatibility of *Pochonia chlamyosporiae* with other biocontrol agents and carbofuran. **Journal of Biopesticides**, Tamil Nadu, v.5, p.243-245, 2012.
- NASU, ERICA. **Tratamento de sementes de soja e algodão com *Pochonia chlamyosporiae* no controle de *Meloidogyne incognita* e histopatologia da interação**

tritrófica. 2013. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.

NORDMEYER, D.; DICKSON, D.W. Management of *Meloidogyne javanica*, *M. arenaria* on Flue-Cured Tobacco with Organophosphate, Carbamate, and Avermectin Nematicides. **Plant Disease**, Saint Paul, v.18, p.67-69, 1985.

NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY. **Flue-Cured Tobacco Guide**. North Carolina: College of Agriculture & Life Sciences, 2008.

NUNES, H. T. **Agentes microbianos no controle de nematoides e fungos fitopatogênicos de soja e sua compatibilidade com agroquímicos**. 2008. Tese (Doutorado) - , Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2008.

PODESTÁ, G.S. et al. Atividade nematófaga de *Pochonia chlamydosporia* em solo natural ou autoclavado sobre *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.33, n.2, p.191-193, 2009.

PODESTÁ, G.S. **Aplicação de *Pochonia chlamydosporia* em pré-plantio para potencializar o controle de *Meloidogyne javanica* em tomate e alface**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2010.

QURESHI, S.A. et al. Nematicidal potencial of culture filtrates of soil fungi associated with rhizosphere and rhizoplane of cultivated and wild plants. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v.44, n.3, p.1041-1046, 2012.

RAO, M.S. Management of *Meloidogyne javanica* on Acid Lime Using *Paecilomyces lilacinus* and *Pseudomonas Fluorescens*. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.36, p.45-50, 2008.

ROCHA, S.F. **Aspectos da coloração, ciclo de vida, parasitismo por *Pasteuria penetrans* e suas relações com a reserva energética de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne* spp.** 2007. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2007.

SANTIAGO, D.C. et al. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* para controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1055-1064, 2006.

SANTIN, R.C.M. **Potencial do Uso dos Fungos *Trichoderma* spp. E *Paecilomyces lilacinus* no Biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris***. 2008. 82 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2008.

SASSER, J. N.; CARTER, C.C. **An Advanced Treatise on *Meloidogyne***. North Carolina : Department of Plant Pathology, North Carolina State University Graphics, U.S.A., 1985.

SASSER, J.N.; FRECKMAN D.W. A word perspective on Nematology: the role of the Society. In: VEECH, J.A. ; D.W. DICKSON (Ed). **Vistas on Nematology**: a commemoration of the twenty-fifth anniversary of the Society of Nematologists. Hyattsville (MD) EUA: Society of Nematologists, 1987. p.7-14

SHARMA, RAVI DATT, *Bacillus thuringiensis*: A Biocontrol Agent of *Meloidogyne incognita* on Barley. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.18, p.79-84, 1994.

SIDDIQUI, Z.A. et al. Biological Control of rot-root knot disease complex of tomato. **Plant Soil**, Hauge, v. 227, p.163-169, 2000.

SIDIQUI, Z. A.; MAHMOOD. Culture of *Paecilomyces lilacinus* on leaf extract and leaf residues for nematode control. **Bioresource Technology**, Barking, v.49, p. 187-189, 1994.

SOUZA CRUZ, **Manejo Integrado de Pragas e Doenças**. Rio de Janeiro: Souza Cruz, 1998.

SOUZA CRUZ. Disponível em: <<http://www.souzacruz.com.br>>. Acesso em: 06 mar. 2012.

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

SUN, M. et al. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and female in china and their biocontrol potencial. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.93, p. 22-28, 2006.

TOBIN, J.D. et al. The compatibility of the fungicide azoxystrobin with *Pochonia chlamydosporia*, a biological control agent for potato cyst nematodes (*Globodera* spp.). **Annals of Applied Biology**, London, v.33, p. 301-305, 2008.

VAN GUNDY, S.D.; BIRD, A.F.; H.R. WALLACE. Aggind and starvation in juveniles of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. **Phytopathology**, St. Paul, v.57, n.6, p.559-571, 1967.

ZOU, C.S. et al. Possible contributions of volatile producing bacteria to soil fungistasis. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.39, n.9, p. 2371-2379, 2007.

WALLA, R.K.; BANSAL, R.K.; BHATTI, D.S.; Effect of *Paecilomyces lilacinus* Application time and Method in Controlling *Meloidogyne javanica* on Okra. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.19, p.247-249, 1991.

7 APÊNDICES

TABELA 14. Média do diâmetro da colônia de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) em meio de cultura BDA com óxido cuproso, mancozebe + metalaxil M ou iprodiona aos 3, 7, 12 e 20 dias. Cachoeirinha, RS, 2012.

		Média do diâmetro (cm)			
	Dias	3	7	12	20
Tratamento					
Testemunha		0,52 b	1,23 a	2,03	3,10
Óxidocuproso		0,54 b	1,20 ab	1,94	3,00
Mancozebe + Metalaxil M		0,53 b	1,15 b	1,92	3,07
Iprodiona		0,62 a	1,27 a	2,03	3,22
C.V. (%) =		8,5	4,7	4,4	6,1

Médias de seis repetições. Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual ou nenhuma letra não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

TABELA 15. Média do diâmetro da colônia de *Purpureocillium lilacinum* (Pae 10) em meio de cultura BDA com óxido cuproso, mancozebe + metalaxil M ou iprodiona aos 3, 7, 12 e 20 dias. Cachoeirinha, RS, 2012.

		Média do diâmetro (cm)			
	Dias	3	7	12	20
Tratamento					
Testemunha		0,85	2,05	3,5 a	5,61
Óxido cuproso		0,92	2,02	3,57 a	5,65
Mancozebe + Metalaxil M		0,85	1,98	3,48 a	5,45
Iprodiona		0,92	1,98	3,28 b	5,05
C.V. (%) =		10,3	5,7	2,8	7,6

Médias de seis repetições. Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual ou nenhuma letra não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Dunca