

Universidade de Évora

**Evolução da população do fungo nematófago
Pochonia chlamydosporia –isolado PcMR, após
inoculação, no solo e na raiz do tomateiro cultivado
em estufa**

Dissertação de Mestrado em Biologia de Pragas e Doenças de plantas

orientada pelo Prof. Doutor Manuel Melo e Mota

Liliana Rute Ribeiro Gião Vinagre

Évora 2007

Universidade de Évora

**Evolução da população do fungo nematófago
Pochonia chlamydosporia –isolado PcMR, após
inoculação, no solo e na raiz do tomateiro cultivado
em estufa**

Dissertação de Mestrado em Biologia de Pragas e Doenças de plantas

orientada pelo Prof. Doutor Manuel Melo e Mota



168 210

Liliana Rute Ribeiro Glão Vinagre

Évora 2007

Prefácio

Esta dissertação foi realizada no âmbito do Mestrado de Biologia de Pragas e Doenças de Plantas da Universidade de Évora e teve como orientador o Professor Doutor Manuel Melo e Mota. Os estudos que conduziram à elaboração da dissertação foram realizados no Laboratório de Micoiologia Aplicada (ICAM), Universidade de Évora e os ensaios de campo foram executados no Centro de experimentações do Patação (Faro) da Direcção Regional de Agricultura do Algarve. Todo o trabalho foi financiado pelo Programa AGRO, e insere-se no Projecto nº 244: "Acção do fungo nematófago *Verticillium chlamydosporium* sobre o nemátode das gaihas radiculares, *Meloidogyne* spp. em horticultura protegida".

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho, nomeadamente, ao Prof. Doutor Manuel Mota, à Prof. Doutora Maria Ivone Clara, ao Eng. Carlos Franco e aos colegas do projecto da DRAALG, Eng. José Entrudo, Eng^a Nídia Ramos e Eng^a Eugénia Neto. Gostaria de prestar, igualmente, um agradecimento à Professora Doutora Isabel Abrantes e Dr^o Clara Vieira dos Santos do Instituto de ambiente e vida da Universidade de Coimbra pela cedência de dados. Aos meus colegas de laboratório João do Rosário, Susana Magriço e Sérgio Duarte, obrigada pelo apoio.

Por último agradeço aos meus pais e Ricardo Ramos da Silva, por todo o apoio, incentivo com os quais tudo se torna muito mais fácil.

Resumo

O fungo *Pochonia chlamydosporia* é um potencial agente de controlo biológico dos nemátodes-das-galhas-radiculares.

Com este trabalho, pretendeu-se avaliar a eficácia de inoculações de clamidósporos no solo, no estabelecimento de uma população do fungo no solo e na raiz de tomateiro em estufa com níveis de densidade iguais ou superiores aos considerados como necessários para um eficaz controlo dos nemátodes-das-galhas-radiculares. Ao longo de dois anos de ensaio, foram efectuadas inoculações do isolado PcMR e avaliada a densidade de fungo no solo e na raiz.

As inoculações efectuadas permitiram estabelecer uma população de *P. chlamydosporia* no solo e atingir os valores de densidade pretendidos. No entanto, os valores pretendidos para colonização da raiz pelo fungo, foram atingidos apenas no primeiro ano.

Foi igualmente demonstrada a capacidade do fungo em se manter no solo durante longos períodos de tempo mesmo na ausência de cultura e em condições adversas de humidade e temperatura.

Abstract

Evolution of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* – PcMR isolate population, after inoculation, in soil and root of a greenhouse tomato culture

Pochonia chlamydosporia is a potential root-knot nematode biological control agent.

The aim of this work was to evaluate the effectiveness of chlamydospore inoculations at the soil, for the establishment at both soil and greenhouse tomato root, of a fungus population in density levels equal or superior to those considered as needed for an effective control of root-knot nematode. Along two years, several inoculations using the portuguese isolate PcMR were made and the density of fungus at the soil and roots studied.

These inoculations allowed the stablishment of a population of *P. chlamydosporia* at the soil and achieve the desired density values. However, only in the first year of assay, the desired values of root colonization by fungus were achieved.

It was also demonstrated that *P. chlamydosporia* can survive for itself at the soil for a long period of time even in the absence of plant culture and in adverse moist and temperature conditions.

Índice

Prefácio	i
Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice	v
Abreviaturas	1
1. Introdução	3
2. Revisão bibliográfica	5
2.1. Importância do nemátode-das-galhas-radicales	5
2.2. Caracterização do género <i>Meloidogyne</i> spp.	6
2.2.1. Classificação taxonómica	6
2.2.2. Caracterização morfológica e ciclo de vida	6
2.3. Caracterização da doença	9
2.4. Medidas de controlo	10
2.4.1. Controlo Biológico	11
2.5. Caracterização do fungo <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Goddard) Zare & Gams, 2001 Var. <i>chlamydosporia</i>	14
2.5.1. Classificação taxonómica	14
2.5.2. Caracterização morfológica	15
2.6. Isolados de <i>P. chlamydosporia</i> – o PcMR	17
2.7. <i>P. chlamydosporia</i> como agente de controlo biológico	18
2.7.1. Colonização do solo e da raiz	18

2.7.2. Factores que afectam a colonização do solo e da rizosfera	20
2.7.3. Modo de acção de <i>P. chlamydosporia</i> – processo de parasitismo	22
2.7.4. A relação tritrófica fungo-nemátode-planta	23
2.7.5. Utilização de <i>P. chlamydosporia</i> como agente de controlo dos NGR	26
3. Material e métodos	29
3.1. Delineamento experimental	29
3.2. Cronograma do ensaio	34
3.3. Metodologia	35
3.3.1. Produção de inóculo	35
3.3.2. Processo de inoculação no campo	39
3.3.3. Colheita das amostras	40
3.3.4. Avaliação da colonização do solo por <i>P. chlamydosporia</i> e outros fungos	41
3.3.5. Avaliação da colonização da raiz por <i>P. chlamydosporia</i> e outros fungos	42
3.3.6. Contagem das unidades formadoras de colónias de fungos	42
3.3.7. Tratamento estatístico dos dados	43
4. Apresentação dos resultados e discussão	45
4.1. Avaliação da população inicial do fungo <i>P. chlamydosporia</i> no solo em cada ano de ensaio	45
4.2. Densidade de <i>P. chlamydosporia</i> imediatamente após as inoculações	46
4.3. Evolução do fungo <i>P. chlamydosporia</i> no solo	48
4.4. Efeito da aplicação de biocida na população de <i>P. chlamydosporia</i>	54
4.5. População de <i>P. chlamydosporia</i> na raiz	55
4.5.1. Efeito da aplicação de biocida na colonização da raiz pelo fungo <i>P. chlamydosporia</i>	58

4.6. Importância da colonização do solo na colonização da raiz pelo fungo <i>P. chlamydosporia</i>	58
4.7 Outros fungos presentes no solo resistentes ao meio MSS	60
5. Conclusões	65
6. Considerações finais e perspectivas futuras	68
7. Referências bibliográficas	70
Índice de anexos	I

Abreviaturas

ANOVA	Análise de variância
B	Modalidade de tratamento Biocida
c.f.u.	Unidade formadora de colónia (Colony forming unit)
c.v.	cultivar
CMA	Corn Meal Agar – Agar de farinha de milho
Dap	Densidade aparente do solo
DRAALG	Direcção Regional de Agricultura do Algarve
F	Modalidade de tratamento Fungo
FB	Modalidade de tratamento Fungo + Biocida
ICAM	Instituto de ciências agrárias e mediterrânicas
J1	Jovem de primeiro estágio de nemátode
J2	Jovem de segundo estágio de nemátode
J3	Jovem de terceiro estágio de nemátode
J4	Jovem de quarto estágio de nemátode
Labmic	Laboratório de micologia aplicada
MSS	Meio semi-selectivo
NGR	Nemátode-das-galhas-radiculares
PeMR	Isolado do fungo <i>P. chlamydosporia</i> utilizado neste ensaio
Rep.	Repetição
SEM	Microscopia electrónica de varrimento (Scanning electronic microscopy)
Sig.	Nível de significância
SPSS	Statistic Package for Social Sciences
T	Modalidade Testemunha

var. Variedade

VFSA Vácuo-filtrador de suspensões aquosas

WA Water- agar , meio de água + agar

1. Introdução

O nemátode-das-galhas-radiculares constitui actualmente, um dos maiores problemas fitossanitários em horticultura protegida (Agrios, 2005). A utilização de pesticidas químicos para a minimização do problema tem sido generalizada causando elevados impactos ambientais e riscos para a saúde humana e de outros organismos. Por esta razão, as restrições à aplicação destes produtos são crescentes, tornando-se fundamental a disponibilização de meios de controlo alternativos, eficazes e com menos efeitos secundários indesejáveis. Uma das possibilidades que maior interesse tem suscitado neste âmbito é o controlo biológico (Abrantes *et al.*, 2002). O nemátode-das-galhas-radiculares possui vários antagonistas naturais (Stirling & Mankau, 1978; Morgan-jones *et al.*, 1981; Sharon *et al.*, 1998; Kerry & Bourne, 1999; Pyrowolakis A. *et al.*, 2002; Kiewnick & Sikora, 2006). O antagonista *Pochonia chlamydosporia* é um destes organismos, considerando-se que possui um elevado potencial para ser utilizado como agente de controlo do nemátode-das-galhas-radiculares.

Na sequência de vários trabalhos realizados em Inglaterra (Kerry & Crump, 1982; Abrantes *et al.*, 2002) efectuou-se a prospecção do fungo *P. chlamydosporia* em Portugal e constituiu-se uma colecção de isolados (Franco *et al.*, 2001). Através de testes *in vitro* e testes em vasos, foram seleccionados alguns isolados cujas características fisiológicas mais se adequam à utilização como agentes de controlo do nemátode-das-galhas-radiculares, nomeadamente a capacidade de parasitar ovos, a capacidade de produção de clamidósporos e a colonização da rizosfera de plantas (Pombo, 2000; Franco *et al.*, 2001). De entre estes, seleccionou-se para estudos futuros, o isolado PcMR pelos elevados desempenhos nestes testes (Franco *et al.*, 2001).

Para que a eficácia de *P. chlamydosporia* seja elevada no controlo do nemátode-das-galhas-radiculares, é necessário garantir que o fungo colonize o solo e a raiz das plantas, em níveis elevados (de Leij *et al.*, 1993; Bourne *et al.*, 1999). Para tal, é fundamental a compreensão da dinâmica do fungo no solo, após a inoculação, assim como o modo como a colonização do solo pelo fungo afecta a colonização adequada da raiz das plantas. Este é um aspecto fundamental para a eficácia do fungo como agente de controlo biológico uma vez que este depende da capacidade do fungo para parasitar os ovos do nemátode que se encontram ao longo da superfície radicular (Leij *et al.*, 1993).

Este trabalho tem como principal objectivo avaliar a eficácia de inoculações sucessivas do fungo *P. chlamydosporia*, no estabelecimento de uma população do fungo no solo e na raiz de tomateiro cultivado em estufa. Para tal, pretende-se:

- Avaliar a densidade inicial do fungo *P. chlamydosporia* no solo.
- Avaliar a variação da quantidade de propágulos do fungo *P. chlamydosporia* no solo causada por cada nova inoculação do fungo.
- Comparar a colonização do solo e da raiz pelo fungo, entre talhões de solo tratado com um biocida e talhões sem este tratamento.
- Avaliar a colonização da raiz de tomateiro por *P. chlamydosporia*, após as inoculações.
- Verificar a influência do nível de colonização do solo pelo fungo *P. chlamydosporia* na colonização da raiz nos níveis necessários à ocorrência de controlo biológico.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Importância do nemátode-das-galhas-radiculares

As espécies pertencentes ao género *Meloidogyne*, designadas por nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR), constituem um dos maiores problemas fitossanitários causados por nemátodes em todo o mundo (Kerry, 1997). Os seus efeitos reflectem-se ao nível da quantidade e qualidade das produções agrícolas (Eisenback & Triantaphyllou, 1991), sendo responsáveis pela redução em média de 5% da produção mundial. Os estragos em situações isoladas poderão, no entanto, ser muito superiores (Agrios, 2005).

Estão descritas mais de 80 espécies do género *Meloidogyne*, sendo *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. hapla* as espécies consideradas de maior importância económica uma vez que são responsáveis por cerca de 95% das infecções causadas por nemátodes daquele género em sistemas agrícolas (Eisenback & Triantaphyllou, 1991; Baicheva *et al.*, 2002). A distribuição mundial das espécies referidas é muito vasta, verificando-se a sua presença em quase todo o mundo e uma grande capacidade de adaptação a variadas combinações de tipo de solo e de temperatura. A sua presença é especialmente problemática em países de climas temperados a quentes e de Invernos curtos e pouco rigorosos (Whithead, 1997; Agrios, 2005). Os NGR possuem mais de 2000 espécies de plantas hospedeiras, incluindo a maioria das plantas cultivadas pertencentes a famílias distintas como *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Leguminosae*, *Compositae*, *Umbelliferae* ou *Cruciferae* (Kerry, 1997; Agrios, 2005). Algumas espécies destes nemátodes são patogénicas para culturas importantes como cereais, batata, soja, banana, tabaco, café, cana-de-açúcar e algodão (Kerry, 1997). Outro problema associado à infecção por espécies do género *Meloidogyne* é o facto de

induzirem o aumento da susceptibilidade das plantas a outros agentes fitopatogênicos como fungos e bactérias originando doenças complexas e consequentemente aumentando os prejuízos nas culturas (Mitkowski & Abawi, 2003).

2.2. Caracterização do género *Meloidogyne*

2.2.1. Classificação taxonômica

De acordo com Eisenback & Triantaphyllou (1991) a classificação taxonômica do género *Meloidogyne* é a seguinte:

Reino Animal

Filo Nematoda

Classe Secernentea

Ordem Tylenchida

Família Heteroderidae

Género *Meloidogyne*

2.2.2. Caracterização morfológica e ciclo de vida

Os nemátodes pertencentes ao género *Meloidogyne* são endoparasitas obrigatórios, necessitando de uma planta hospedeira para concluir o seu ciclo de vida (Hussey, 1985; Eisenback, 1998). As espécies pertencentes a este género possuem um dimorfismo sexual acentuado, em que os machos são filiformes, medem entre 1,2 a 1,5 mm de comprimento e 30 a 36 μm de

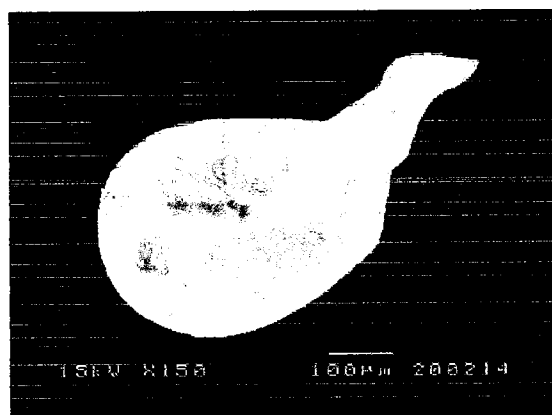


Fig. 1. Fêmea de *Meloidogyne* sp. (SEM) (foto cedida por Labmic)

diâmetro e se encontram livres no solo. As fêmeas são piriformes ou ovóides, com um estreitamento na zona anterior, medindo entre 0,40 a 1,30 mm de comprimento por 0,27 a 0,75 mm de diâmetro (Fig.1) (Agrios, 2005; Eisenback, 1985). Estas têm uma forma de vida sedentária e encontram-se total ou parcialmente inseridas na raiz. Podem reproduzir-se por anfimixia ou por partenogênese dependendo das condições em que se encontram (Poinar Jr., 1983; Triantaphyllou, 1985).

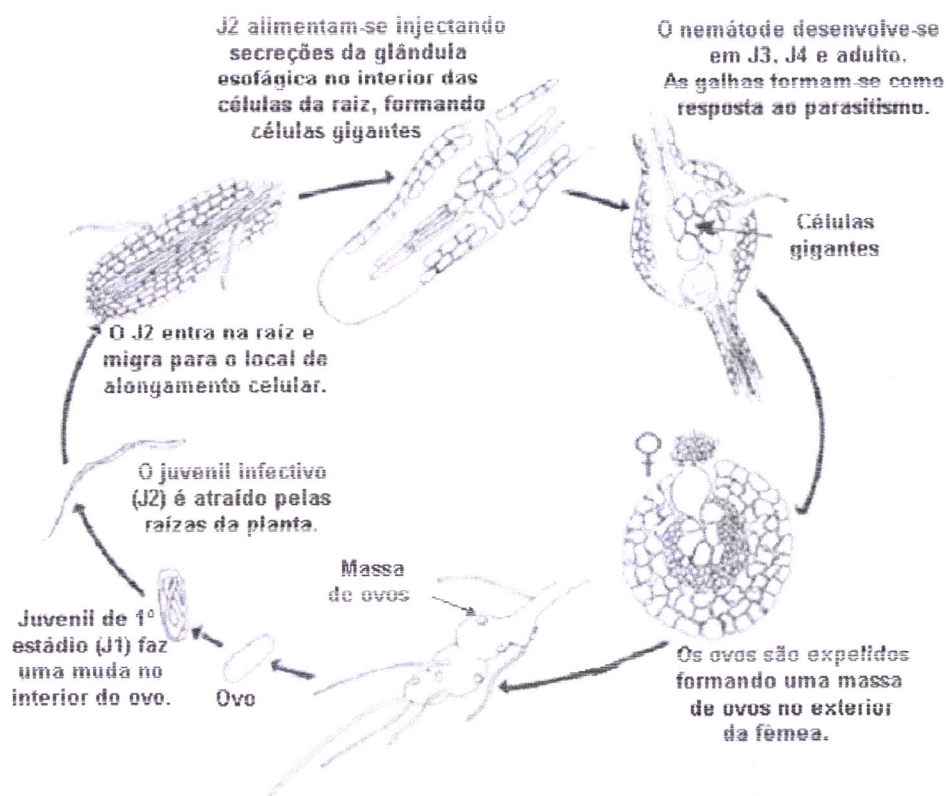


Fig. 2. Ciclo de vida do nemátode-das-galhas-radicales (adaptado de Agrios, 2005)

Em cada postura, uma fêmea liberta entre 500 a mais de 1000 ovos que ficam envolvidos numa matriz gelatinosa segregada pelas glândulas rectais (Mitkowski & Abawi, 2003) que tem como função a protecção dos ovos da dessecação, e de antagonistas e predadores. Este conjunto designa-se por massa de ovos e é geralmente depositado no exterior da raiz, podendo, no entanto, ficar retido no seu interior se a fêmea se encontrar profundamente inserida na raiz (Agrios, 2005). A eclosão do nemátode depende de factores como a maturação do ovo, a temperatura e o tipo de solo.

O primeiro e segundo estádios juvenis (J_1 e J_2) desenvolvem-se no interior do ovo. Os nemátodes eclodem sob a forma de J_2 , único estágio infeccioso (Fig.3), e libertam-se para o solo. Os jovens de segundo estágio, aptos a infectar as plantas, são móveis, vermiformes e medem entre 0,3 a 0,9 mm de comprimento e cerca de 0,15 μm de diâmetro (Eisenback, 1985; Eisenback, J.D. & Triantaphyllou H.H., 1991). Ao encontrarem uma

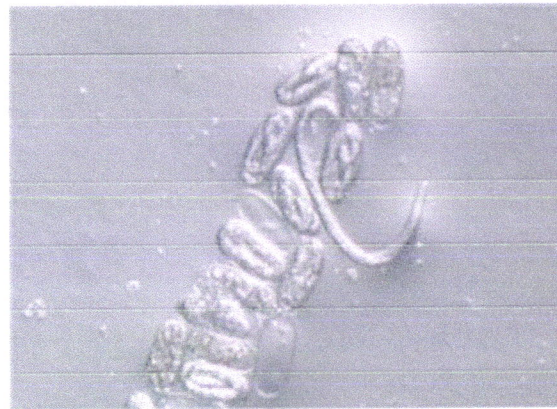


Fig. 3. Ovos de *Meloidogyne* sp. e eclosão de um jovem de segundo estágio (400x)(foto cedida por Labmic)

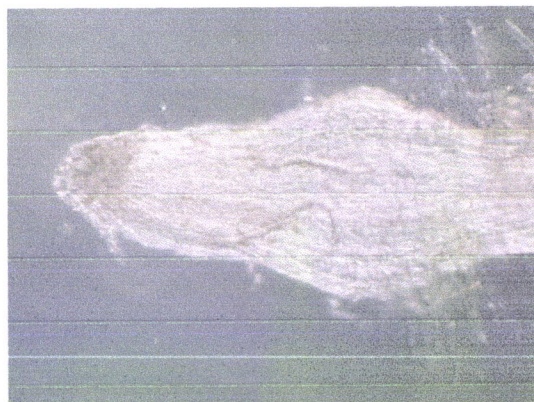


Fig. 4. Galha na raiz com jovem causada por *Meloidogyne* sp. (400x) (foto cedida por

“células gigantes”. Originam-se assim as galhas radiculares típicas da doença (Eisenback & Triantaphyllou, 1991; Bleve-Zacheo *et al.*, 1997). Seguidamente, dá-se uma nova muda que origina um jovem de terceiro estágio (J_3). Esta fase é curta dando-se a terceira muda logo de seguida e originando um jovem de quarto estágio (J_4). Durante o terceiro e quarto estádios o nemátode não se alimenta. Com a quarta e última

planta susceptível, penetram nesta e deslocam-se pelos espaços intercelulares. Na zona do alongamento celular fixam-se e iniciam o processo de alimentação pela introdução de secreções da glândula esofágica nas células da planta, através de um estilete. Como resultado, as células de alimentação permanentes sofrem hipertrofia e tornam-se multinucleadas designando-se por

muda, o nemátode atinge o estado adulto. Este poderá ser um macho vermiforme que se liberta da raiz e vive livremente no solo, ou uma fêmea que continua a aumentar de volume e que adquire forma piriforme. Com ou sem fertilização do macho, esta produz ovos que liberta de seguida para uma matriz gelatinosa (Mitkowski & Abawi, 2003; Agrios, 2005).

O ciclo de vida dos NGR tem a duração aproximada de 25 dias a 27 °C, podendo durar mais tempo, dependendo da temperatura.

A dispersão dos nemátodes é feita principalmente através da água e utilização de material agrícola contaminado. A maioria dos nemátodes encontra-se no sistema radicular entre 5 a 25 cm abaixo da superfície do solo (Agrios, 2005).

2.3. Caracterização da doença

Os sintomas mais característicos e dramáticos resultantes da infecção pelos nemátodes-das-galhas-radiculares situam-se ao nível do sistema radicular. Como resultado da alimentação destes, as raízes dilatam no ponto de infecção e são



Fig. 5. Raiz com galhas causadas por *Meloidogyne* sp. (foto cedida por Labmic)

desenvolvidas galhas típicas da doença que podem atingir várias vezes o diâmetro de uma raiz saudável (Mitkowski & Abawi, 2003; Agrios, 2005). É comum ocorrerem várias infecções ao longo da raiz conferindo-lhe um aspecto rugoso e sinuoso (Fig. 5). A infecção causada por algumas

espécies pode também induzir o crescimento de pequenas mas numerosas raízes na zona acima da galha, resultando numa densidade anormal de raízes secundárias nessa zona.

Em geral, como resultado da infecção por nemátodes do género *Meloidogyne*, o sistema radicular tem crescimento reduzido e podem desenvolver-se necroses (Agrios, 2005). Na parte aérea das plantas infectadas é frequente observar-se o crescimento reduzido e uma menor quantidade de folhas, que em geral são de menores dimensões relativamente a uma planta saudável e de coloração verde pálida ou amarelada. Os rebentos e frutos ocorrem igualmente em menor quantidade e são de qualidade reduzida. Com o aumento da temperatura, as folhas tendem ainda a murchar. Estes sintomas, ao nível da parte aérea da planta, ocorrem devido à absorção e transporte limitado de água e nutrientes para os níveis superiores da planta que, por sua vez, resultam da existência de galhas na zona radicular que impedem o seu fluxo normal. Por esta razão, a planta pode também apresentar sintomas de carência de nutrientes. A gravidade destas alterações depende, em geral, de três factores: da densidade populacional de nemátodes, da espécie do nemátode e da susceptibilidade do hospedeiro (Whitehead, 1997; Mitkowski & Abawi, 2003).

2.4. Medidas de controlo

Existem diversos meios para o controlo de nemátodes fitoparasitas sendo o custo, eficácia e o tipo de cultura, alguns dos factores que influenciam a escolha do mais adequado (Agrios, 2005). Em geral, é aplicada a combinação de vários métodos como a solarização, o uso de plantas resistentes, rotação com plantas não hospedeiras, incorporação de matéria orgânica fresca e aplicação de pesticidas (Whitehead, 1997; Agrios, 2005).

Entre os vários meios existentes, a aplicação de nematicidas químicos é o meio mais fiável e por isso um dos mais utilizados no controlo do nemátode-das-galhas-radiculares em vários tipos de culturas, apesar da sua aplicação ter um impacto considerável ao

nível ambiental, económico e da saúde humana. Os principais efeitos negativos resultantes da sua utilização reflectem-se a nível genético, podendo causar anomalias morfológicas e fisiológicas em animais ao nível dos sistemas nervoso, respiratório, imunitário ou endócrino (EPA, 2006). A bioacumulação, a persistência das substâncias nos ecossistemas, a acumulação nos lençóis freáticos, o arrastamento dos produtos pulverizados pelo vento e a lixiviação são outros dos riscos associados à aplicação de nematicidas químicos. Pode referir-se como exemplo o brometo de metilo, um biocida de largo espectro, muito utilizado em horticultura intensiva. É uma substância muito volátil que facilmente se libertada para a atmosfera sendo um forte destruidor da camada de ozono. Por esta razão, de acordo com o protocolo de Montreal (1995) será retirada do mercado até ao ano 2010 (Kerry, 2001; Portal da União Europeia, 2006).

A crescente preocupação com a saúde humana e ambiental devido ao uso de alguns pesticidas químicos, aumenta o interesse pela pesquisa e desenvolvimento de estratégias que integrem métodos de controlo variados e que reduzem a dependência de substâncias químicas (Kerry, 2001).

2.4.1. Controlo Biológico

O controlo biológico é definido como o uso de organismos vivos com o objectivo de reduzir a densidade populacional ou impacto de determinado organismo patogénico, tornando-o menos abundante ou menos destrutivo relativamente ao que aconteceria na ausência do agente de controlo biológico (Eilenberg, 2006).

Os nemátodes fitoparasitas, em particular o género *Meloidogyne*, desenvolvem uma complexa relação com o hospedeiro e o seu ciclo de vida oferece variadas possibilidades de perturbação. De forma a encontrar um agente de controlo biológico e a desenvolver novas estratégias para a sua utilização, torna-se necessário determinar e

estudar os antagonistas naturais que existem no solo e que podem ser responsáveis pela eventual supressão das populações de nemátodes. É, no entanto, necessário ter em consideração que o controlo biológico não pode ser visto como um substituto dos pesticidas químicos, ou como um modo de eliminação imediata dos organismos fitopatogénicos uma vez que tem que ser mantida a fonte de alimento num certo nível permitindo que o agente de controlo biológico possa sobreviver e multiplicar-se. Deverá antes ser encarado como um complemento a outros métodos, numa perspectiva de protecção integrada na gestão da população de nemátodes e prevenção de futuras infestações graves da doença (Kerry, 1997).

Apesar de possuir algumas limitações, como a lenta actuação dos organismos, a forte dependência das condições ambientais, ou a dificuldade em atingir a totalidade dos organismos patogénicos, o controlo de doenças por meios biológicos apresenta vantagens na sua utilização como a especificidade do hospedeiro, o controlo a longo prazo e o menor impacto a nível ambiental, ecológico e da saúde humana (Kerry, 1997).

Um agente de controlo biológico de nemátodes deverá cumprir os seguintes requisitos: capacidade parasítica elevada, ter o nemátode como principal hospedeiro e não ser patogénico para as plantas cultivadas e outros animais. Deve ainda ter crescimento óptimo em intervalos adequados de pH e temperatura para a sua produção em massa, desenvolver-se em meio artificial, ter um modo de acção conhecido, ser possível formulá-lo numa forma utilizável e ter capacidade de competir com outros microrganismos autóctones do sistema onde é introduzido (Sidiqqi & Mahamood, 1996).

Actualmente já são produzidos comercialmente alguns agentes de controlo biológico contra *Meloidogyne* spp., no entanto, estes ainda não demonstraram a eficácia suficiente

para se tornarem uma alternativa aos meios de controlo químico actualmente existentes para a maior parte dos sistemas de produção de plantas (Abrantes *et al.*, 2002).

Os antagonistas de nemátodes fitoparasitas poderão ser vários como parasitas (vírus, bactérias, protozoários, fungos) e predadores (protozoários, ácaros, tardigrados, colêmbolos, fungos e outros nemátodes) (Sayre & Walter, 1991; Pyrowolakis *et al.*, 2002). De entre os antagonistas, os fungos ocupam um lugar de destaque (Sidiqqi & Mahamood, 1996). Estes podem ser divididos em três categorias, segundo o seu modo de actuação; i) Fungos formadores de armadilhas que podem ser redes de hifas, ramificações, botões adesivos, anéis constritores ou não constritores (ex. *Arthrobotrys irregularis*, *Dactylella* spp. e *Monacrosporium* spp.) (Jatala, 1985; Kerry, 2001; Kerry & Jaffee, 1997); ii) Fungos endoparasitas de nemátodes vermiformes que são caracterizados pela produção de esporos adesivos de pequenas dimensões que aderem à cutícula do nemátode e penetram-na, colonizando o hospedeiro e zoósporos móveis ou esporos que necessitam de ser ingeridos para que possa ocorrer a colonização do hospedeiro (ex. *Drechmeria coniospora*, *Catenaria anguillulae* e *Hirsutella rhossiliensis*) (Viaene & Abawi, 2000; Jansson & Lopez-Llorca, 2004); iii) Fungos parasitas de ovos ou formas fixas do nemátode que possuem a capacidade de parasitar ovos e fêmeas sedentárias de nemátodes fitoparasitas. As espécies incluídas neste último grupo são frequentemente encontradas em solos agrícolas e são consideradas potenciais agentes de controlo na medida em que possuem a capacidade de inibir o processo reprodutivo dos nemátodes ou a eclosão dos ovos. Os principais meios de acção envolvidos são a danificação de elementos estruturais dos ovos e da cutícula do nemátode por actividade enzimática e/ou física e distúrbio fisiológico, através da síntese e difusão de metabolitos tóxicos (Morgan-Jones & Rodriguez-Kabana, 1987). Foram já isoladas várias espécies de fungos parasitas de fêmeas sedentárias, de ovos e de quistos

de nemátodes, no entanto apenas algumas como *Paecilomyces lilacinus* e *Pochonia chlamydosporia* têm sido estudadas mais intensivamente (Kerry & Jaffee, 1997; Kerry, 1997; Kerry, 2000). Uma das grandes vantagens que estas espécies apresentam é o facto de serem parasitas facultativos, possuindo a capacidade de se alimentar saprofiticamente. Desta forma, a sua sobrevivência não se encontra completamente dependente da presença de nemátodes no solo (Kerry, 1997; Kerry & Jaffee, 1997).

2.5. Caracterização do fungo *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & Gams, 2001 var. *chlamydosporia*

O fungo *Pochonia chlamydosporia* foi inicialmente identificado em 1913 por Goddard após este o ter recolhido do seu jardim (Oca, 2004). É um fungo endoparasita de formas sedentárias de nemátodes fitoparasitas e já foi isolado de ovos de nemátodes dos quistos (*Heterodera* spp. e *Globodera* spp.), de nemátodes-das-galhas-radiculares em variados locais do mundo e embora raramente, de ovos de caracol (Kerry, 2001; Zare *et al.*, 2001). Trata-se de um parasita facultativo com uma vasta distribuição encontrando-se um pouco por todo o mundo (Kerry, 2001; Abrantes *et al.*, 2002).

O fungo *P. chlamydosporia* tem sido encontrado em solos supressivos de nemátodes-das-galhas-radiculares e nemátodes dos quistos considerando-se que possui um potencial considerável quando introduzido em solos infestados por estas espécies (Kerry & Crump, 1977; Morgan-Jones *et al.*, 1981; Kerry *et al.*, 1982a; Kerry *et al.*, 1982b; Kerry & Crump, 1998).

2.5.1. Classificação taxonómica

Taxonomicamente, o anamorfo *Pochonia chlamydosporia* está incluído no filo Deuteromycota e o seu teleomorfo, *Cordiceps chlamydosporia*, pertence ao filo

Ascomycota. Este, foi observado em ovos de moluscos na América do Sul, no entanto as observações descritas da fase sexuada do fungo são raras (Zare *et al.*, 2001).

Dentro do género *Pochonia* existem pelo menos mais duas espécies associadas a ovos de nemátodes, a espécie *P. suchlasporia* e *P. rubescens* (Zare *et al.*, 2001).

A espécie *P. chlamydosporia* encontra-se dividida nas variedades *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* e *P. chlamydosporia* var. *catemulata* cuja principal diferença reside no modo de formação dos conídios, em aglomerados globosos e mucilaginosos no caso da primeira variedade e em cadeia na segunda (Zare *et al.*, 2001).

Desde que foi identificada pela primeira vez em 1913 foram atribuídas diversas classificações e nomes a esta espécie (Barron & Onions, 1965; Zare *et al.*, 2001). Em 2001 foi realizada, por Zare, Gams e Evans, a revisão da espécie na qual se atribui o nome de *Pochonia chlamydosporia* em substituição de *Verticillium chlamydosporium*, denominação ainda usada frequentemente para esta espécie (Zare *et al.*, 2001)

Teleomorfo (fase sexuada)

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Classe: Ascomycetes

Ordem: Hypocreales

Família: Clavicipitaceae

Género: *Cordyceps*

Espécie: *Cordyceps chlamydosporia*

Anamorfo (fase assexuada)

Reino: Fungi

Filo: Deuteromycota

Classe: Hyphomycetes

Ordem: Moniales

Família: Moniliaceae

Género: *Pochonia*

Espécie: *Pochonia chlamydosporia*

Variedade: *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*

(Zare *et al.*, 2001; Kirk *et al.*, 2001)

2.5.2. Caracterização morfológica

Na forma assexuada desta espécie conhecem-se dois tipos de esporos: os conídios do tipo fialósporos, geralmente designados apenas por conídios e os conídios do tipo aleuriósporos, frequentemente designados por clamidósporos (Gams, 1988; Zare *et al.*, 2001).

Os fialósporos são produzidos em hifas verticiladas (conidióforos) e possuem cerca

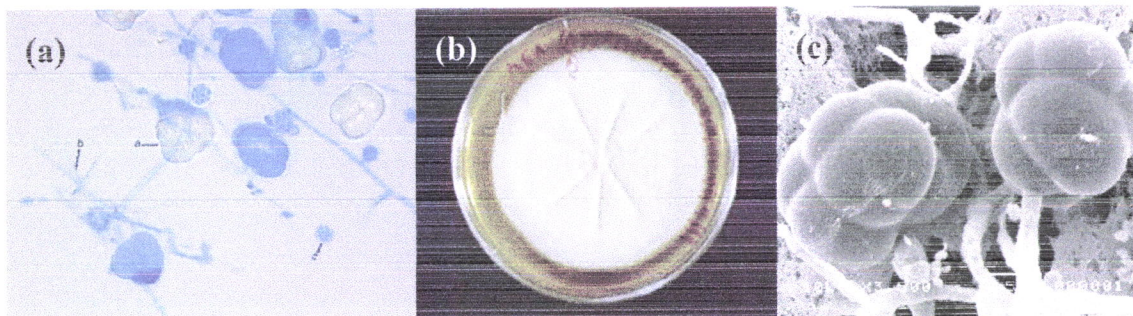


Fig. 6. (a) *P. chlamydosporia*: a – clamidósporo, b – 4 fialides num verticilo, c – fialósporos em agrupamentos mucilaginosos. (400 x) (b) *P. chlamydosporia* em meio de agar de extracto de malte. (c) clamidósporos de *P. chlamydosporia* (SEM) (fotos cedidas por Labmic)

de 2.5-4.5 $\mu\text{m} \times 1.2-2.2 \mu\text{m}$., apresentam forma oval ou subglobosa e superfície lisa (Zare *et al.*, 2001).

Os conidióforos são geralmente prostrados e produzem fialides simples ou verticiladas com 2 ou 3 fialides ao longo do conidióforo, ou conjuntos terminais de 4 ou 5 fialides. São estruturas finas e tubulares com cerca de 12-26 μm de comprimento e 1.0-1.5 μm de diâmetro (Zare *et al.*, 2001) e possuem nas suas extremidades os fialoconídios em agregados globosos mucilaginosos (Gams, 1988; Zare *et al.*, 2001).

Os clamidósporos são esporos de parede espessa e possuem cerca de 15-25 μm de diâmetro. Contêm no seu interior substâncias de reserva que lhes possibilitam uma viabilidade mais prolongada relativamente aos fialósporos e permitem ao fungo sobreviver em condições adversas (Zare *et al.*, 2001). São produzidos em hastes curtas

(pequenos pedúnculos) com cerca de 15-25 μm de comprimento e consistem numa estrutura hialina formada por um grupo de 6 a 9 células com paredes que vão ficando espessas ao longo do tempo. Estes podem ser produzidos em grande quantidade no micélio aéreo ou, em menor quantidade, submersos em agar (Gams, 1988; Zare *et al.*, 2001).

As hifas vegetativas são hialinas e septadas e geralmente o micélio é aéreo e fino (Gams, 1988; Zare *et al.*, 2001). As colónias do fungo em meio de cultura em 10 dias possuem entre 20 a 38 mm de diâmetro. Inicialmente são brancas adquirindo posteriormente uma cor bege e um aspecto pulverulento que resulta da produção de clamidósporos (Zare *et al.*, 2001). A parte inferior da colónia varia entre o bege, amarelo pálido e laranja.

2.6. Isolados de *P. chlamydosporia* – o PcMR

Existe uma grande variação de algumas características entre isolados do fungo *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Abrantes *et al.*, 2002). As características relacionadas com a potencialidade do *P. chlamydosporia* como agente de controlo biológico variam com os diferentes isolados (Irving & Kerry, 1986; Kerry *et al.*, 1986; Kerry, 2001) como a velocidade de crescimento (Kerry *et al.*, 1986; Crump & Irving, 1992; Kerry, 1995), capacidade parasítica (Irving & Kerry, 1986; Crump & Irving, 1992), temperatura óptima a que se relacionam com os outros organismos (Stirling, 1991), temperatura óptima de crescimento (Kerry *et al.*, 1986; Crump & Irving, 1992; Kerry, 1995) capacidade de proliferação na rizosfera (Kerry, 1995; Bourne *et al.*, 1996), produção de esporos (Kerry *et al.*, 1986; Stirling, 1991; Crump & Irving, 1992).

Até à actualidade foram já recolhidos diversos isolados do fungo *Pochonia chlamydosporia*. Alguns destes têm sido alvo de estudo para uma potencial utilização

como agentes de controlo biológico (Irving & Kerry, 1986; Hidalgo-Diaz *et al.*, 2000; Franco *et al.*, 2001). Apenas um isolado que colonize facilmente a rizosfera e parasite rapidamente as massas de ovos será capaz de controlar as populações dos NGR (Kerry, 2001)

Em Portugal recolheram-se vários isolados do fungo *P. chlamydosporia* que foram submetidos a testes de selecção baseados na capacidade de parasitar ovos do nemátode *Meloidogyne* spp., produção de clamidósporos e colonização da rizosfera de plantas em vaso e *in vitro*. Entre os isolados testados, o isolado PcMR foi o que apresentou as características mais adequadas à futura utilização como agente de controlo biológico contra os nemátodes do género *Meloidogyne*, tendo originado diminuições significativas na população de nemátodes relativamente à testemunha (Esteves *et al.*, 2001; Franco *et al.*; 2001; Louro *et al.*, 2001).

2.7. *P. chlamydosporia* como agente de controlo biológico

2.7.1. Colonização do solo e da raiz

O fungo *P. chlamydosporia* é um parasita facultativo e não depende exclusivamente

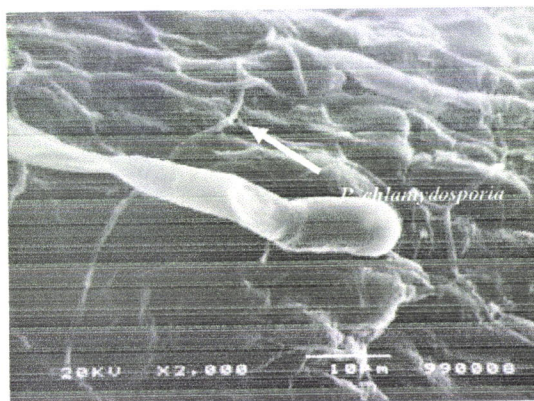


Fig. 7. *P. chlamydosporia* sobre a raiz (SEM)

(foto cedida por Labmic)

dos nemátodes para sua nutrição (Stirling, 1991; Bourne & Kerry, 2000). Para além de conseguir parasitar outros organismos, coloniza o solo devido à sua capacidade saprófita que o permite degradar uma grande variedade de moléculas incluindo a quitina e a celulose. Tem ainda a capacidade de

proliferar na rizosfera de diversas espécies de plantas (Bourne & Kerry, 2000; Kerry, 2001).

Em geral, no solo ocorrem todos os estádios assexuados do fungo *Pochonia chlamydosporia*. Os clamidósporos são estruturas de maior resistência relativamente aos fialósporos e permitem que o fungo sobreviva durante algum tempo quando o material orgânico disponível no solo e os nemátodes hospedeiros são escassos. A relação de parasitismo entre os nemátodes e a planta induz o fungo a produzir maior quantidade de clamidósporos, demonstrando a importância deste tipo de esporos no processo de desenvolvimento do parasitismo do fungo sobre o nemátode (Abrantes *et al.*, 2002).

Quanto à dispersão do fungo, sabe-se que, embora limitada, é devida, ao transporte de conídios pela água, sendo a humidade um factor importante na colonização do solo e da raiz. O movimento de organismos invertebrados do solo permite também a disseminação dos propágulos do fungo a distâncias consideráveis (Leij *et al.*, 1993; Abrantes *et al.*, 2002).

Uma boa colonização do solo é fundamental para assegurar o estabelecimento do fungo *P. chlamydosporia* na raiz num nível que providencie a redução significativa da população de NGR (Lopez-Llorca *et al.*, 2000; Esteves *et al.*, 2001). Com base em trabalhos realizados anteriormente considera-se um solo bem colonizado pelo fungo *P. chlamydosporia* quando este se encontra acima de 10^4 c.f.u. de *P. chlamydosporia* por grama de solo (medido em meio semi-selectivo). No caso da raiz, a colonização na ordem de 10^3 c.f.u. por grama de raiz foi suficiente para provocar a redução da população de NGR acima dos 80%, relativamente a plantas cultivadas em solo não inoculado com o fungo. No entanto, em trabalhos realizados anteriormente foi possível obter colonização da raiz acima de 10^4 c.f.u. por grama de raiz com inoculações de 10000 clamidósporos por grama de solo (de Leij *et al.*, 1992b; de Leij *et al.*, 1993;

Bourne & Kerry, 1999). Para que seja possível a limitação das populações de *Meloidogyne* spp., após a inoculação do fungo no solo, este deverá crescer e colonizar a rizosfera da planta, em particular as galhas radiculares induzidas pelo nemátode (de Leij *et al.*; 1993). Está demonstrado que o controlo dos nemátodes-das-galhas-radiculares é mais eficaz em raízes abundantemente colonizadas por *P. chlamydosporia*, comparativamente a raízes em que este é escasso (Bourne *et al.*, 1996). Ao contrário do que se pensou inicialmente, o fungo além de se desenvolver apenas na superfície da raiz tem comportamento endofítico, ou seja, penetra nas células epidérmicas e corticais da raiz, mas, não causa necroses ou descamação nem parece afectar negativamente a planta (Lopez-Llorca *et al.*, 2000; Bordallo *et al.*, 2002).

2.7.2. Factores que afectam a colonização do solo e da raiz

A colonização do solo e raiz pelo fungo *P. chlamydosporia* está fortemente dependente de factores bióticos e abióticos uma vez que estes afectam a sua sobrevivência e proliferação (Kerry & Jaffee, 1997). O crescimento do fungo no solo está relacionado com o tipo de textura deste e solos ricos em matéria orgânica permitem um maior desenvolvimento deste relativamente a solos arenosos e pobres em matéria orgânica, uma vez que têm disponível uma maior quantidade de alimento para o fungo (de Leij *et al.*, 1993). Os solos mais ricos têm, no entanto, maior abundância de outros microorganismos que podem influenciar o estabelecimento do fungo na medida em que poderão competir com este (Bourne & Kerry, 2000).

Para além da influência de outros organismos sabe-se que o desenvolvimento do fungo no solo é também afectado por factores abióticos. Estes encontram-se pouco estudados, conhecendo-se a sua influência apenas para alguns factores como a humidade e temperatura.

A invasão das raízes por nemátodes jovens do segundo estágio é reduzida no caso de baixos níveis de humidade no solo, mas o fungo tem a capacidade de proliferar no solo em níveis de humidade que reduzem a invasão por parte dos nemátodes (Bourne & Kerry, 2000). Assim, a eficácia do fungo no controlo de NGR poderá ser maior em solos menos húmidos, e consequentemente, com menores densidades de nemátodes (Bourne & Kerry, 2000).

A temperatura é outro factor determinante para o estabelecimento e crescimento do fungo solo e rizosfera. Esta pode influenciar o crescimento do fungo e a produção de conídios. Em testes *in vitro* verificou-se que *P. chlamydosporia* tem crescimento óptimo entre 25 e 32°C, acima dos 35°C não se observa crescimento. Gams (1988) refere aproximadamente 10°C como a temperatura mínima de crescimento do fungo. Quanto à produção de conídios, o pico máximo situa-se nos 22 °C e entre os 22 e 30°C esta é reduzida (de Leij *et al.*, 1992).

Uma boa proliferação do fungo na raiz está dependente não só da capacidade de colonização do isolado mas também em grande parte da espécie e variedade da planta hospedeira que poderá possuir maior ou menor aptidão para suportar o crescimento do fungo (Bourne *et al.*, 1994; Bourne *et al.*, 1996; Bourne & Kerry, 2000). Por exemplo, determinadas variedades de tomateiro têm uma aptidão maior para que a sua rizosfera seja colonizada pelo fungo que plantas de alface (Esteves *et al.*, 2001).

Na rizosfera, o crescimento de *P. chlamydosporia* parece estar grandemente relacionado com a composição e quantidade de exsudados libertados pela raiz. Estes variam com a espécie da planta, com o seu estado geral, que por sua vez depende de factores como humidade, temperatura e luminosidade (Bourne *et al.*, 1996; Bourne & Kerry, 2000). A libertação de exsudados pela raiz é ainda modificada pelo rompimento

da sua superfície causado pela postura das massas de ovos pelas fêmeas de NGR (Bourne & Kerry, 2000).

2.7.3. Modo de acção de *P. chlamydosporia* no processo de parasitismo

Um aspecto crucial para a escolha e utilização de um isolado do fungo no controlo dos NGR é a capacidade de parasitar os ovos de nemátode. O fungo *P. chlamydosporia* não produz toxinas nem armadilhas como acontece em algumas espécies de fungos e aparentemente não possui a capacidade

de parasitar estádios móveis de nemátodes (Kerry & Jaffee, 1997; Kerry, 2001). Em geral, o fungo prolifera na rizosfera, crescendo e dispersando-se na matriz gelatinosa das massas de ovos à medida que estas são produzidas na superfície da raiz. Quando

as hifas vegetativas entram em contacto com os ovos do hospedeiro, aderem à sua superfície (Kerry, 1995; Lopez-Llorca *et al.*, 2000; Morton *et al.*, 2004). Forma-se então uma estrutura, denominada apressório, uma hifa especializada formada terminal ou

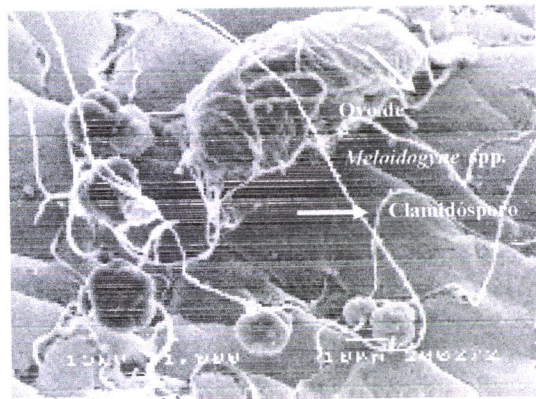


Fig. 8. *P. chlamydosporia* a parasitar ovo de NGR (SEM) (foto cedida por Labmic)

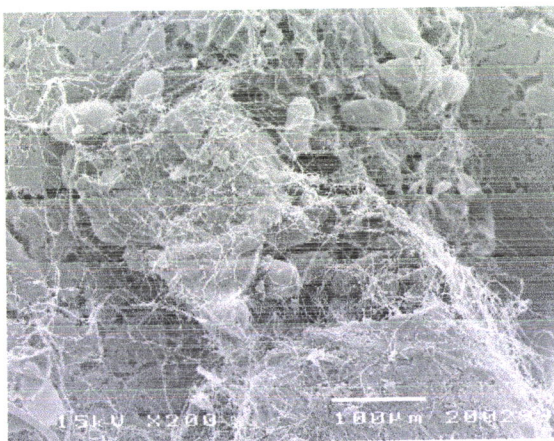


Fig. 9. *P. chlamydosporia* a parasitar massa de ovos de NGR (SEM) (foto cedida por Labmic)

lateralmente a partir de hifas não diferenciadas e que tem como função aderir e penetrar nos hospedeiros através de uma hifa ou cunha de penetração (Lopez-Llorca *et al.*, 2000; Kerry, 2001). Após a penetração,

origina-se um bolbo a partir do qual o micélio cresce radialmente, colonizando o seu interior (Bourne & Kerry, 1996; Kerry, 2001).

A entrada do fungo no hospedeiro resulta de uma pressão física e também de degradação química, como resultado da secreção de enzimas pelo apressório (Lopez-Llorca *et al.*, 2000; Morton *et al.*, 2004). Uma protease, designada por VCP1 foi parcialmente caracterizada e parece ser uma enzima chave no processo de infecção do ovo do nemátode (Segers *et al.*, 1996; Kerry, 2001). Observações ao microscópio electrónico mostraram que durante o processo de infecção, as enzimas produzidas pelo fungo causam a desintegração da camada vitelina do ovo e a dissolução parcial da camada quitinosa e lipídica (Kerry, 2001). A actividade enzimática aumenta ainda a permeabilidade da casca do ovo tornando-a mais susceptível à entrada de toxinas que se encontrem no ambiente (Stirling, 1991). Todos os estádios de desenvolvimento embrionário do nemátode podem ser parasitados pelo fungo, embora em ovos imaturos, cujas camadas da casca ainda não estão completamente formadas, a infecção pelo fungo ocorra mais rapidamente do que em ovos contendo jovens do primeiro e segundo estágio (Bourne *et al.*, 1996; Abrantes *et al.*, 2002).

2.7.4. A relação tritrófica fungo-nemátode-planta

A interacção entre os diferentes organismos envolvidos no processo de controlo biológico é complexa e difícil de quantificar, onde os diferentes componentes dependem de vários factores e se influenciam mutuamente (Kerry, 2001; Abrantes *et al.*, 2002).

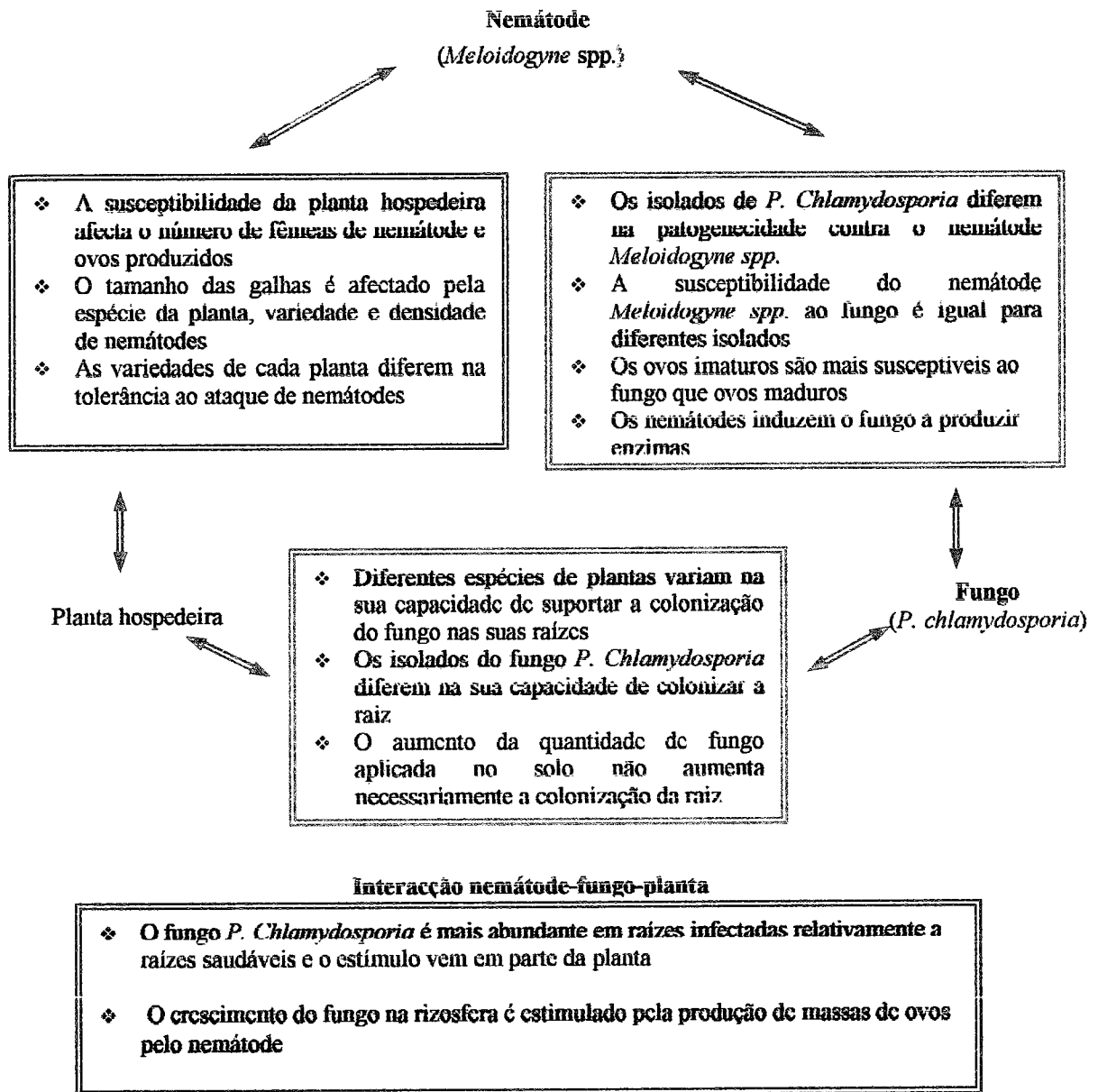


Fig.10: Esquema da interacção fungo-nemátode-planta (adaptado de Kerry, 2001).

Relação fungo/nemátode

Tal como acontece com a colonização da rizosfera, também a aptidão para parasitar ovos de NGR varia com a estirpe ou isolado do fungo. No entanto, diferentes espécies do género *Meloidogyne* parecem possuir uma susceptibilidade semelhante ao

parasitismo pelo *P. chlamydosporia* embora, as infecções do ovo pelo fungo variem com o estágio de desenvolvimento embrionário (Kerry, 2001; Abrantes *et al.*, 2002).

O parasitismo do fungo nos ovos é também afectado pelo tamanho das galhas formadas. Em culturas susceptíveis aos NGR ocorrem com frequência galhas radiculares de grandes dimensões que possuem uma grande proporção de massas de ovos no seu interior que não estão em contacto com o exterior. Uma vez que o fungo prolifera essencialmente na superfície da raiz, não entra em contacto com grande parte dos ovos. Assim, em geral, com elevadas densidades de nemátodes em plantas susceptíveis, o fungo é menos eficiente que em culturas com baixas densidades de NGR (Abrantes *et al.*, 2002; Kerry, 2001). A redução da população tende a ser maior em plantas menos susceptíveis ao nemátode e com uma forte aptidão para serem colonizadas pelo fungo (Kerry, 2001; Abrantes *et al.*, 2002). O impacto do *P. chlamydosporia* na população de NGR é ainda maximizado com temperaturas inferiores a 30°C uma vez que acima deste valor o desenvolvimento embrionário do nemátode é acelerado enquanto que o fungo tem um crescimento mais lento, ocorrendo a eclosão antes do fungo colonizar a massas de ovos (de Leij *et al.*, 1992a; Kerry, 2001).

Relação fungo/planta

Alguns aspectos desta relação foram já abordados anteriormente neste trabalho. No entanto é pertinente referir que a planta hospedeira tem um papel fundamental no estabelecimento do fungo resultando numa maior ou menor eficácia na supressão dos NGR. Esta relação tem como pontos principais o facto da aptidão que as plantas têm para ser colonizadas pelo fungo variar com a espécie da planta e por outro lado isolados diferentes do *P. chlamydosporia* diferirem na sua capacidade de colonização da rizosfera. O fungo é em geral mais abundante em plantas infectadas pelo nemátode que



em plantas saudáveis e o aumento da taxa de crescimento deste ocorre ao fim de certo tempo após a instalação da cultura. Este estímulo pode resultar do início da colonização directa das massas de ovos ou dos nutrientes libertados pela planta infectada (Kerry, 2001).

A densidade do fungo em plantas hospedeiras “fracas” pode não ser aumentada significativamente mesmo com o aumento da taxa de aplicação de inóculo. Assim, dada a importância da planta nesta relação, as espécies e variedades cultivadas devem ser escolhidas tendo em conta estes aspectos de forma a maximizar o impacto do fungo sobre a população de nemátodes (Kerry, 2001; Abrantes *et al.*, 2002).

Relação nemátode /planta

A susceptibilidade da planta afecta o número de nemátodes que invadem a raiz assim como número de fêmeas que se formam e a quantidade de ovos em cada massa de ovos. Consequentemente, a dimensão das galhas também varia e por sua vez influencia a taxa de parasitismo pelo fungo e o sucesso na supressão dos NGR.

2.7.5. Utilização de *P. chlamydosporia* como agente de controlo do NGR

O fungo *P. chlamydosporia* possui potencialidades no combate aos NGR mas o modo de maximizar a sua eficácia não está ainda completamente esclarecido. Nos últimos anos têm-se procurado estratégias de controlo de NGR em que se combina a aplicação de *P. chlamydosporia* com outros métodos nomeadamente a rotação de culturas com hospedeiros com maior resistência aos nemátodes (Atkins *et al.*, 2003). As plantas utilizadas deverão apresentar uma boa capacidade para suportar o fungo na rizosfera mas serem fracas hospedeiros de NGR formando galhas pequenas como resposta à infecção, maximizando assim a taxa de parasitismo do fungo (Atkins *et al.*,

2003). Quando os solos possuem elevadas densidades de nemátodes pode ser necessária a aplicação de outros métodos como a aplicação de biocidas químicos antes da aplicação do fungo no solo ou a solarização para evitar uma invasão inicial dos jovens na planta (Abrantes *et al.*, 2002).

O isolado de *P. chlamydosporia* utilizado deverá possuir um bom desempenho nos testes prévios de selecção (capítulo 2.6.) como boa capacidade de colonização da raiz da planta hospedeira, produção de grandes quantidades de clamidósporos e elevada taxa de parasitismo sobre os nemátodes (Abrantes *et al.*, 2002). Os clamidósporos são as estruturas preferenciais para a constituição de inóculo pelas suas dimensões relativamente grandes, que os tornam mais fáceis de manipular e que não permitem que sejam facilmente dispersos pela água, e por possuírem uma maior resistência a condições adversas que facilita o estabelecimento no solo e na rizosfera relativamente a outras estruturas. Outra vantagem da utilização dos clamidósporos está relacionada com o facto de estas estruturas possuírem uma maior quantidade de substâncias de reserva o que permite a inoculação sem necessidade de adição de nutrientes ao solo ou ao inóculo para que ocorra a germinação e crescimento do fungo (Kerry, 1995; Kerry, 2001; Kerry & Bourne, 2002).

Os fragmentos de hifas e os conídios também podem ser usados como inóculo, no entanto é necessário adicionar elementos nutritivos ao solo ou inóculo em grandes quantidades para que haja germinação e proliferação adequada do fungo (Kerry, 1995; Kerry, 2001). Esta situação pode estimular a proliferação de microrganismos competidores e causar alterações no desenvolvimento da cultura (Kerry *et al.*, 2000).

O inóculo deverá ser aplicado no solo que circunda a planta, assegurando assim uma grande proximidade com a raiz, favorecendo o seu crescimento na superfície desta. Esta condição é fundamental para que o ocorra o processo de parasitismo, já que o inóculo

possui fraca capacidade de dispersão e proliferação no solo (Bourne *et al.*, 1996; Kerry, 2001).

Em trabalhos realizados por de Leij *et al.* (1992b) verificou-se que a redução da população de NGR foi máxima quando se inocularam 5000 clamidósporos de *P. chlamydosporia* por grama de solo, sendo esta redução menos acentuada com taxas menores de aplicação de clamidósporos no solo.

Para que a aplicação no solo das quantidades de clamidósporos atrás referidas seja possível em larga escala, é necessária a existência de uma metodologia rápida e eficiente de produção de clamidósporos e formulação em produto final. Esta deverá ser de baixo custo de modo a permitir a utilização do fungo num produto comercial competitivo com os restantes produtos existentes no mercado (Abrantes *et al.*, 2002). Este desenvolvimento passa por um método melhor de obtenção do produto que permita a produção de clamidósporos em grandes quantidades, em relativamente pouco tempo e que possam ser facilmente isolados do meio em que são produzidos e formulados no produto final. O produto final deverá ser de fácil aplicação no campo e ter uma conservação simples e prolongada.

Para que a utilização comercial do fungo *P. chlamydosporia* venha a ser possível é ainda necessário compreender se em condições de campo, a limitação efectiva das populações de NGR poderá ser assegurada com aplicações únicas ou repetidas de inóculo, assim como estudar qual a melhor forma de aplicação deste no solo. A forma como a população de fungo evolui no solo e rizosfera ao longo do tempo e os factores que afectam esta evolução têm que ser bem compreendidos com o objectivo de garantir a eficácia do método e do processo de limitação dos NGR.

O controlo biológico, de um modo geral, tem sido frequentemente descrito como inconsistente, demasiado lento e inadequado às necessidades dos agricultores, no

entanto, após estar estabelecido poderá providenciar um controlo sustentado, duradouro, eficaz e menos agressivo para o ambiente (Bourne *et al.*, 1996; Oca, 2004).

3. Material e métodos

3.1. Delineamento experimental

Para atingir os objectivos propostos, realizou-se um ensaio em duas componentes: o trabalho de campo, realizado numa estufa nas instalações da Direcção Regional de Agricultura do Algarve (DRAALG) em Faro e o trabalho laboratorial realizado no laboratório de Micologia Aplicada, da Universidade de Évora. O ensaio decorreu durante duas épocas culturais, denominadas neste trabalho como primeiro e segundo ano, respectivamente.

Utilizou-se uma estufa com 40 m de comprimento por 7,2 m de largura e cobertura de plástico com arejamento. O solo tinha textura arenosa, teor em matéria orgânica



Fig. 11. Interior da estufa onde decorreu o ensaio

entre 1 e 2 % e pH entre 6 e 7 (informações fornecidas pela DRAALG).

Seleccionou-se para este ensaio a cultura de tomateiro, *Lycopersicon esculentum* cv. Sinatra. A escolha desta espécie resulta de trabalhos realizados anteriormente nos quais se verificou que esta permite um bom desenvolvimento do

fungo *P. chlamydosporia* na rizosfera (Bourne & Kerry, 1999; Esteves *et al.*, 2001). A escolha da cultivar Sinatra para este ensaio resulta do facto de ser uma cultivar utilizada com frequência pelos agricultores da região do Algarve.

As plantas foram instaladas em seis linhas de 94 plantas cada no sentido do comprimento da estufa. O espaçamento entre linhas foi de 1,1 m e entre plantas em cada linha de 0,40 m. Cada talhão possuía 33 plantas¹.

A estufa foi dividida em 16 talhões (unidade estatística) com uma área de 14,52 m² cada que foram dispostos em duas colunas por oito linhas². A cada talhão foi atribuída uma das quatro modalidades de tratamento ao solo, descritas mais adiante. Uma vez que a distribuição quer do nemátode *Meloidogyne* spp. quer de outros factores que possam influenciar o decorrer ensaio não são homogéneos (ou totalmente conhecidos) optou-se pela distribuição das modalidades de tratamento pelos talhões utilizando a distribuição completamente casualizada, pois considera-se que será a que oferece a maior aleatoriedade para esta situação.

Tendo em consideração as limitações da capacidade de trabalho disponível para o processo de produção de inóculo, para as inoculações, e para a realização das análises, e também pela dimensão das estufas foi necessário estabelecer um compromisso entre a área de cada talhão e o número de repetições de cada modalidade de tratamento (quatro talhões), como forma de aumentar a fiabilidade dos resultados obtidos.

Tendo em conta as características da cultura (espaço entre linhas, espaço entre plantas na linha, dimensão das estufas, etc.), os recursos humanos, os equipamentos disponíveis, e os objectivos do trabalho, optou-se por efectuar quatro modalidades de tratamento ao solo: Fungo; Fungo + Biocida; Biocida e Testemunha (solo não tratado).

Descrição das modalidades:

¹ Ver Anexo I

- **Biocida (B)** – Foi aplicado no solo um biocida de largo espectro que contém 98% de brometo de metilo + 2% de cloropicrina. O biocida foi aplicado nos talhões correspondentes de forma uniforme através de injeção de líquido no solo, recorrendo a uma empresa especializada que utilizou um processo idêntico ao utilizado comercialmente. O Biocida foi aplicado aproximadamente dois meses antes da instalação da cultura em cada ano de ensaio.
- **Fungo + Biocida (FB)** – Nesta modalidade aplicou-se o mesmo biocida e da mesma forma que na modalidade anterior. Foram efectuadas três aplicações do isolado PcMR no solo em cada ano, após a plantação, de acordo com o procedimento para a inoculação descrito mais adiante, nas mesmas datas da modalidade F (capítulo 3.2.).
- **Fungo (F)** – Nesta modalidade apenas foi aplicado o isolado PcMR utilizando o mesmo procedimento da modalidade FB e nas mesmas datas.
- **Testemunha (T)** – Nos talhões testemunha não foi aplicado o isolado PcMR nem biocida.

Em cada modalidade efectuaram-se quatro repetições (quatro talhões) por se ter considerado ser o número mais adequado tendo em conta o espaço, recursos humanos e materiais disponíveis.

O isolado utilizado no ensaio foi o isolado PcMR. Estudos realizados anteriormente revelaram que o isolado PcMR apresenta características favoráveis à sua utilização em ensaios de controlo biológico de NGR em condições de campo, sendo essa a razão para a sua utilização neste ensaio (Franco *et al.*, 2001; Esteves *et al.*, 2001)

Realizaram-se três inoculações no solo de 5000 clamidósporos por grama de solo do isolado PcMR (em cada um dos anos de ensaio apresentados nos resultados) cujas datas foram estabelecidas de acordo com as datas de plantação dos tomateiros, capacidade de produção de inóculo e análises ao solo. Para o cálculo da quantidade de clamidósporos necessários para cada inoculação considerou-se a massa de solo correspondente ao volume em 20 cm de profundidade (zona na qual se encontram a maioria das raízes e também os nemátodes-das-galhas-radiculares) multiplicados pela área correspondente a cada planta, que se considerou ser 0,44 m². A massa de solo a inocular obteve-se multiplicando este volume pela densidade aparente do solo, sendo esta definida como a razão entre a massa da parte sólida de um dado volume aparente do solo (volume ocupado pelas partículas + volume ocupado pelos poros) e a massa de igual volume de água.

Os cálculos relativos à quantidade de inóculo produzida e inoculada encontram-se expressos no Anexo II.

Das trinta e três plantas de cada um dos talhões, foram seleccionadas oito no centro de cada destes². Nas oito plantas centrais dos talhões das modalidades F e FB foi inoculado o isolado PcMR de acordo com o procedimento descrito mais adiante. Esta selecção foi determinada tendo em conta a necessidade da existência de pelo menos uma planta não tratada de margem entre talhões, de forma a reduzir contaminações de talhões adjacentes. A aplicação do inóculo do fungo foi efectuada localmente em volta das plantas seleccionadas (capítulo 3.3.2).

² Ver Anexo I

De modo a pesquisar a eventual presença de isolados autóctones de *P. chlamydosporia* no solo recolheram-se amostras de solo junto às oito plantas seleccionadas em cada talhão para efectuar os tratamentos e analisaram-se antes de serem efectuadas inoculações³. Para a avaliação da densidade do isolado PcMR no solo ao longo do ensaio foram colhidas amostras de solo junto às plantas, entre 1 a 15 dias antes de cada inoculação, e entre 1 a 15 dias depois de cada inoculação. De modo a determinar a população final de PcMR no solo colheram-se também amostras de solo no momento de arranque das plantas. Foram ainda colhidas, em cada talhão, amostras de raiz das oito plantas seleccionadas para tratamento durante o processo de levantamento da cultura e analisadas com o objectivo de avaliar a população do PcMR na raiz.

O método utilizado para avaliar a densidade da população de *P. chlamydosporia* baseou-se no descrito em Abrantes *et al* (2002). A análise da população de PcMR no solo e raiz realizou-se em meio semi-selectivo⁴ em placas de Petri. Ao ser efectuada a medição da população de PcMR nestas placas através da contagem das unidades formadoras de colónias (c.f.u.), realizou-se também a contagem de c.f.u. de outras espécies de fungos existentes no solo e raiz que germinaram no meio semi-selectivo. Esta contagem realizou-se para a totalidade das colónias e não para cada espécie individualmente. A metodologia aplicada para as recolhas das amostras e realização das análises efectuadas encontra-se descrita adiante.

Todos os fungos contabilizados, para além do *P. chlamydosporia* serão designados daqui em diante apenas como “outros fungos”.

³ Ver Anexo I

⁴ Ver Anexo III

3.2. Cronograma do ensaio

Nos quadros I e II encontra-se o cronograma do ensaio mostrando as datas das principais tarefas realizadas no trabalho de campo no primeiro e segundo ano, respectivamente. A produção de inóculo e análises foram efectuadas no período entre cada tarefa e após o levantamento do ensaio.

Quadro 1 – datas das principais tarefas efectuadas no ensaio (1º ano).

Tarefa	Data
Plantação	07-09-2002
Amostragem de solo (antes da primeira inoculação)	16-09-2002
1º Inoculação	30-09-2002
Amostragem de solo (depois da 1ª inoculação)	08-10-2002
Amostragem de solo (antes da 2ª inoculação)	29-10-2002
2º Inoculação	30-10-2002
Amostragem de solo (depois da 2ª inoculação)	11-11-2002
Amostragem de solo (antes da 3ª inoculação)	24-03-2003
3º Inoculação	24-03-2003
Amostragem de solo (depois da 3ª inoculação)	31-03-2003
Remoção das plantas/ amostragem final de solo/ amostragem de raiz	19-05-2003

Quadro 11 – datas das principais tarefas efectuadas no ensaio (2º ano).

Tarefa	Data
Plantação	16-09-2003
Amostragem de solo (antes da primeira inoculação)	13-11-2003
1º Inoculação	13-11-2003
Amostragem de solo (depois da 1ª inoculação)	19-11-2003
Amostragem de solo (antes da 2ª inoculação)	20-02-2004
2º Inoculação	23-02-2004
Amostragem de solo (depois da 2ª inoculação)	08-03-2004
Amostragem de solo (antes da 3ª inoculação)	10-05-2004
3º Inoculação	10-05-2004
Amostragem de solo (depois da 3ª inoculação)	17-05-2004
Remoção das plantas/ amostragem final de solo/ amostragem de raiz	22-06-2004

3.3. Metodologia

3.3.1. Produção de inóculo

A produção do inóculo foi realizada nas seguintes fases:

Reanimação e multiplicação do PcMR

O isolado PcMR encontra-se liofilizado em ampolas e para que possa ser utilizado tem que ser reanimado e multiplicado até que se atinja a quantidade desejada.

A ampola que contém o fungo liofilizado foi quebrada sob condições estéreis adicionando-se 1,5 ml de água destilada ao seu conteúdo. Passados 15 minutos e após a agitação da suspensão, transferiram-se 200 µl para uma placa de Petri com meio

agar de farinha de milho (CMA⁵) e espalharam-se uniformemente por toda a placa. Selou-se com Parafilm[®] e incubou-se a 25 °C. Todo este processo foi realizado sob condições estéreis.

Após cerca de 3 semanas, o fungo ocupava quase a totalidade da placa de Petri, estando pronto a ser utilizado como base para a produção de clamidósporos.

Para manter o fungo nestas condições é necessário efectuar repicagens periodicamente, sempre que o meio já não se encontre em condições de suportar o crescimento do fungo ou seja necessário aumentar a sua quantidade.

Preparação do meio de cultura para produção de clamidósporos

O isolado PcMR foi produzido em fermentadores de 250 ml (balões Erlenmeyer) contendo 50 ml de meio sólido de crescimento constituído por farelo de cevada e areia na proporção de 1:1 (v/v).

A areia foi previamente crivada num crivo de 2mm de malha e posteriormente lavada com água num crivo de 44 µm de malha. Utilizaram-se as partículas com dimensões entre 44 µm e 2mm. Deixou-se secar.

O farelo de cevada foi crivado num crivo de 2 mm e posteriormente lavado com água num crivo de 44 µm e escorrido. Aproveitaram-se, tal como na areia, as partículas entre 44 µm e 2 mm. A quantidade de cevada e areia utilizada no meio de cultura foi calculada de acordo com a quantidade de clamidósporos que se pretendeu produzir. De seguida, misturou-se homogeneamente a areia e a cevada. Para o crescimento do fungo e para uma produção de clamidósporos adequados é necessário que a mistura se encontre solta e húmida. Quando foi necessário, ajustou-se o teor de humidade.

⁵ Ver Anexo III

Transferiram-se cerca de 50 ml do meio para cada fermentador que foi rolhado com algodão, tapado com folha de alumínio e levado a esterilizar na autoclave durante 20 minutos a 120°C e 1,5 atm. Depois de terminada a esterilização, estes foram agitados de forma a desagregar a mistura e deixaram-se arrefecer.

Inoculação de fermentadores com o isolado PcMR

Sob condições estéreis, retirou-se a rolha de cada fermentador e, recorrendo a um furador de rolhas ou um tubo, inoculou-se o meio de cultura com 4 discos de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro de CMA colonizado pelo fungo. Voltou-se a rolar cada fermentador e incubou-se a 25°C no escuro. Após 2-3 dias estes foram



Fig. 12. Inoculação de meio de cultura com PcMR

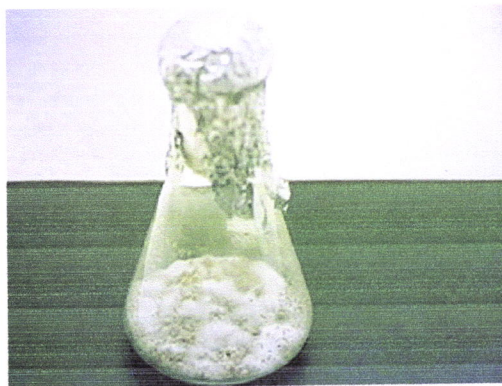


Fig.13. Cultura de PcMR em meio sólido (3 semanas após inoculação)

agitados para que o fungo se dispersasse e colonizasse todo o meio. Após um mínimo de três semanas o crescimento do micélio e a produção de clamidósporos são suficientes para que se proceda à extracção dos clamidósporos.

Extracção dos clamidósporos

Uma vez que os métodos existentes de extracção dos clamidósporos do meio de

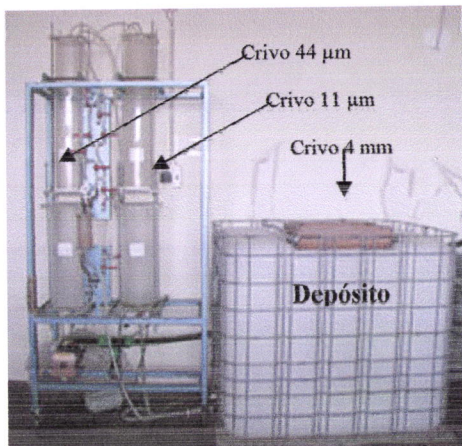


Fig. 14. Vácuo-filtrador de suspensões aquosas

cultura não são satisfatórios para as quantidades necessárias a este ensaio, foi necessário recorrer a um processo mais eficiente para extracção de clamidósporos. Foi utilizado um processo inovador de extracção de clamidósporos, através de um aparelho de filtração por vácuo semi-automático denominado Vácuo-filtrador de suspensões aquosas (VFSA.) que permite

aumentar a eficiência da extracção dez a vinte vezes relativamente ao processo de extracção manual anteriormente utilizado.

Após o período de crescimento, homogeneizou-se o conteúdo de 10 a 100 fermentadores, juntou-se água e transferiu-se a suspensão para um depósito inicial do aparelho VFSA provido de um crivo de malha de 4 mm na sua abertura. De seguida, esta mistura foi crivada através do VFSA de forma a reter o meio de crescimento (areia + cevada) e partículas maiores de micélio num crivo de 44 µm e a deixar passar apenas os clamidósporos que ficaram retidos num crivo seguinte, de 11 µm. Os clamidósporos foram retirados do crivo de 11 µm e armazenados em placas de Petri a 4°C até ao momento da preparação do inóculo.

Preparação do inóculo para aplicação no campo

No início deste projecto foram testados três métodos de constituição do inóculo: suspensão aquosa de clamidósporos, clamidósporos liofilizados e mistura de areia fina e clamidósporos. Optou-se por este último porque é aquele que melhor se adequa às necessidades de transporte a grandes distâncias, facilidade de aplicação no solo e conservação (Vinagre, 2003).

Utilizou-se areia crivada e lavada com partículas de dimensão compreendida entre 75 µm e 400µm, esterilizou-se em autoclave durante 20 minutos a 120°C e 1,5 atm e deixou-se secar. De seguida, misturaram-se homogeneamente os clamidósporos previamente extraídos com a areia na proporção de 1:10 (clamidósporos:areia (p/p)). A mistura foi colocada em balões Erlenmeyer de 250 ml esterilizados e rolhados com algodão e folha de alumínio que foram guardados a 4°C até ao momento da inoculação. Em cada balão Erlenmeyer foi colocada a quantidade de inóculo necessário para inocular o solo correspondente a uma planta.

3.3.2. Processo de inoculação no campo



Fig. 15. Aplicação do inóculo numa planta de tomateiro

O solo que circunda a zona radicular foi removido, a uma distância de cerca de 10 cm do caule da planta, de forma a obter uma pequena caldeira. Adicionaram-se 500 a 750 ml de água ao conteúdo dos Erlenmeyers e agitou-se. Verteu-se a suspensão uniformemente na

respectiva caldeira, esperou-se que a suspensão do inóculo se infiltrasse e recolocou-se o solo que se tinha removido anteriormente.

Todo o equipamento utilizado na realização da caldeira foi descontaminado com uma solução de lixívia comercial a 20% sempre que se mudou de talhão.

3.3.3. Colheita das amostras

Colheita das amostras de solo

Com recurso a uma sonda descontaminada, recolheram-se três sub-amostras de solo de aproximadamente 100 ml na zona que circunda o caule, a 10 a 30 cm de distância deste e a 10 a 15 cm de profundidade, amostrando as 8 plantas seleccionadas inicialmente em cada talhão (plantas centrais).

De seguida, misturaram-se homogeneamente as 24 sub-amostras, retiraram-se 100 ml que se colocaram em sacos e etiquetaram-se convenientemente.

As amostras foram conservadas a 4 °C até ao momento da análise ao solo para determinação do número de c.f.u. de *P. chlamydosporia* e de outros fungos.

Colheita de amostras da raiz

As plantas foram cuidadosamente retiradas do solo de forma a não danificar as raízes. De seguida, destacou-se o máximo de terra possível das raízes que foram depois cortadas em secções de aproximadamente 10 cm. Colocaram-se em sacos, etiquetaram-se convenientemente e conservaram-se a 4° C até ao momento das análises para determinação do número de c.f.u. de *P. chlamydosporia* e de outros fungos por grama de raiz.

Para a recolha de amostras de raiz utilizou-se material descontaminado com lixívia comercial a 20% no início e sempre que se mudou de talhão.

3.3.4. Avaliação da colonização do solo por *P. chlamydosporia* e outros fungos

O método utilizado para avaliar a população de *P. chlamydosporia* é o método de contagem de “Colony forming units” (c.f.u.) e que se baseou em Abrantes *et. al*



Fig. 16. Diluição 1% da suspensão inicial de solo na solução de agar.

Fig. 17. Introdução de 200µl da suspensão em MSS.

Fig. 18. Placa de MSS com colónias de PcMR e outros fungos.

(2002).

Em ambiente estéril, numa câmara de fluxo laminar, pesou-se uma sub-amostra de um grama de solo de uma amostra homogeneamente misturada. Suspendeu-se esta sub-amostra em 9 ml de uma solução de agar 0,05% num frasco McCartney e agitou-se. De seguida, fizeram-se diluições de 1% da suspensão inicial novamente em solução de agar 0,05%. Transferiram-se 200 µl da diluição 1% para uma placa de Petri com MSS⁶ espalhando-se uniformemente com um rodo esterilizado. Efectuaram-se três repetições para cada sub-amostra.

⁶ Meio semi-selectivo. Ver anexo III

As placas de Petri foram seladas com Parafilm[®], etiquetaram-se e colocaram-se no escuro a 25°C. Após três semanas contaram-se as colónias formadas, determinando número de cfu do isolado PcMR por grama de solo.

3.3.5. Avaliação da colonização da raiz por *P. chlamydosporia* e outros fungos

Para a determinação de c.f.u. por grama de raiz, cortou-se uma porção representativa da raiz da planta que se pretende analisar em secções de 1 cm. Misturou-se homogeneamente e pesou-se uma sub-amostra de um grama. Esta foi esmagada num almofariz esterilizado com um pequeno volume de solução de agar 0,05% proveniente de um frasco McCartney de 9ml dessa solução. Esta massa foi novamente adicionada à solução de agar restante e agitou-se. Fizeram-se diluições de 1% da suspensão inicial.

Transferiram-se 200 µl da diluição 1% para uma placa de Petri com meio semi-selectivo e espalharam-se uniformemente com um rodo esterilizado. Efectuaram-se três repetições para cada sub-amostra. De seguida, selaram-se as placas de Petri com Parafilm[®], etiquetaram-se e colocaram-se a 25°C no escuro. Após cerca de três semanas contaram-se as colónias formadas, de modo a determinar o número de c.f.u. de fungo por grama de raiz (c.f.u. /g raiz).

3.3.6. Contagem das unidades formadoras de colónias de fungos

A contagem de c.f.u. foi efectuada visualmente e em separado para as colónias de *P. chlamydosporia* e outros fungos. Para as colónias onde existiam dúvidas realizaram-se, observações à lupa e ao microscópio ou fizeram-se repicagens da colónia em meio CMA.

Este procedimento permite, caso se trate de *P. chlamydosporia*, que se observem clamidósporos, um dos caracteres diagnosticantes desta espécie.

3.3.7. Tratamento estatístico dos dados

O software

Para efectuar o tratamento estatístico dos dados obtidos neste trabalho recorreu-se ao programa de análise estatística SPSS® versão 13.0 para Microsoft® Windows®. Utilizaram-se diferentes testes estatísticos de acordo com o delineamento experimental do trabalho e os objectivos propostos:

Análise de variância e análise multivariada

A análise multivariada foi utilizada para verificar se existiam diferenças entre as variâncias das modalidades do tratamento ao solo nas várias avaliações efectuadas (variável dependente). A análise de variância foi utilizada sempre que foi necessário comparar valores de modalidades entre si, de uma única avaliação de determinado parâmetro (variável dependente).

Realizaram-se os testes de Duncan e Tamhane T2, a partir e após a análise multivariada (testes post-hoc), sempre que foi necessário identificar as diferenças existentes entre os valores das modalidades que possuíam variâncias significativamente diferentes. Utilizou-se o teste Duncan sempre que se verificou homogeneidade das variâncias e o Teste Tamhane T2 quando esta situação não se verificou. Utilizou-se o teste Levene para verificar a homogeneidade das variâncias entre grupos (Snedecor *et al*, 1980).

Teste t-Student para comparação de médias de amostras emparelhadas

O teste t-Student para comparação de médias de amostras emparelhadas utilizou-se sempre que foi necessário comparar grupos de valores de duas variáveis dependentes agrupadas de acordo com as modalidades da variável independente, por exemplo os valores da avaliação efectuada à densidade de PcMR no solo antes da primeira inoculação e depois da primeira inoculação para a modalidade fungo.

Correlação de Pearson

A correlação mede o grau de relacionamento entre dois grupos de dados numa escala que os torna independentes da unidade de medida e foi utilizada quando se suspeitou da existência de uma relação entre dois grupos de variáveis dependentes (Snedecor *et al.*, 1980), nomeadamente entre os valores de densidade de fungo no solo e na raiz por *P. chlamydosporia* em cada talhão de determinada modalidade (avaliação final).

4. Apresentação e discussão dos resultados

4.1. Avaliação da população inicial do fungo *P. chlamydosporia* no solo em cada ano de ensaio

Efectuou-se uma análise prévia ao solo, antes de ser realizada a primeira inoculação de *P. chlamydosporia* em cada ano de ensaio, de modo a detectar a possível existência de uma população autóctone desta espécie no caso do primeiro ano, e, no caso do segundo ano, de forma a verificar a população de fungo que permanecia no solo resultante de inoculações efectuadas durante o primeiro ano. Os resultados são apresentados no quadro II.

Quadro II. Número de c.f.u. (média) de *P. chlamydosporia* por grama de solo antes de ser efectuada a primeira inoculação e depois da aplicação de biocida, em cada ano. F = modalidade fungo; FB = modalidade fungo + biocida; B = modalidade biocida; T = testemunha.

	Modalidade			
	F	FB	B	T
1º ano	0,00	0,00	0,00	0,00
2º ano	$1,04 \times 10^4$	$1,25 \times 10^3$	0,00	0,00

No primeiro ano não foi detectada a presença de *P. chlamydosporia* no solo em qualquer das modalidades sugerindo a inexistência de uma população autóctone desta espécie na estufa (quadro II). A avaliação efectuada antes da primeira inoculação no segundo ano demonstrou a existência de PcMR nas modalidades F e FB que resultou das inoculações realizadas no decurso do primeiro ano de ensaio.

4.2. Densidade de *P. chlamydosporia* imediatamente após as inoculações

A densidade de *P. chlamydosporia* no solo antes e depois cada inoculação encontram-se representadas nos gráficos da figura 19 e no quadro III.

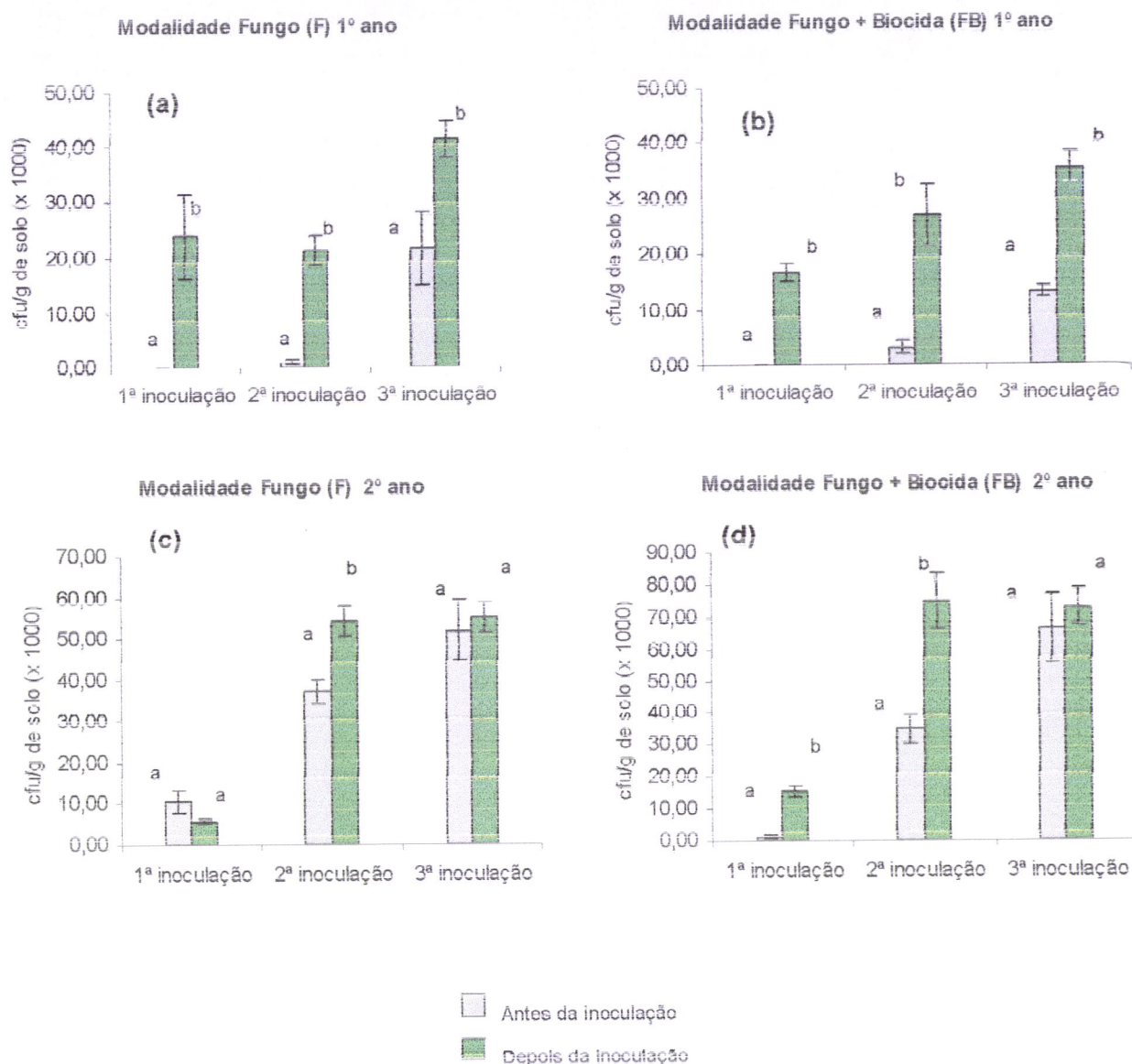


Fig. 19. Número de c.f.u. / grama de solo nas modalidades inoculadas em cada ano. Letras diferentes sobre as barras de cada inoculação indicam médias de c.f.u./ g de solo significativamente diferentes pelo Teste t de comparação de médias ($P < 0,05$); barras de cada inoculação com letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes ($P < 0,05$). Intervalos sobre as barras = Erro padrão

Quadro III. Número de c.f.u. (média) de *P. chlamydosporia* por grama de solo antes e depois de cada inoculação nos dois anos de ensaio nas modalidades F e FB. F= modalidade fungo; FB= modalidade fungo + biocida.(1º e 2º ano)

Análise	1ª inoculação		2ª inoculação		3ª inoculação	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
Data de amostragem	16-09-2002	08-10-2002	29-10-2002	11-11-2002	24-03-2003	31-03-2003
F	0,00	$2,39 \times 10^4$	$1,04 \times 10^3$	$2,12 \times 10^4$	$2,16 \times 10^4$	$4,15 \times 10^4$
FB	0,00	$1,69 \times 10^4$	$3,13 \times 10^3$	$2,70 \times 10^4$	$1,33 \times 10^4$	$3,57 \times 10^4$

2º ano						
Análise	1ª inoculação		2ª inoculação		3ª inoculação	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
Data de amostragem	13-11-2003	19-11-2003	20-02-2004	08-03-2004	10-05-2004	17-05-2004
F	$1,04 \times 10^4$	$5,71 \times 10^3$	$3,73 \times 10^4$	$5,42 \times 10^4$	$5,21 \times 10^4$	$5,51 \times 10^4$
FB	$1,25 \times 10^3$	$1,52 \times 10^4$	$3,47 \times 10^4$	$7,48 \times 10^4$	$6,62 \times 10^4$	$7,29 \times 10^4$

Apenas em três situações não se verificou o aumento significativo da densidade de *P. chlamydosporia* no solo após a inoculação ($P < 0,05$): na primeira inoculação na modalidade F e na terceira inoculação nas modalidades F e FB, todas no segundo ano (Fig. 19, c e d).

A razão para não se registrar um aumento significativo da população de *P. chlamydosporia* na primeira inoculação do segundo ano na modalidade F não é clara, podendo dever-se a uma falha de procedimento quer na distribuição do inóculo ao redor das plantas quer na recolha das amostras de solo e não à baixa qualidade dos clamidósporos inoculados uma vez que na mesma inoculação na modalidade FB, realizada em simultâneo com a modalidade F, verificou-se um aumento significativo da densidade de *P. chlamydosporia* ($P < 0,05$). Também as análises ao solo, para contagem de c.f.u., foram realizadas em simultâneo para todas as modalidades, pelo que se considera que este resultado não se deve a um erro de análise.

Na terceira inoculação do segundo ano de ensaio, ao contrário do esperado, o aumento da densidade de fungo no solo verificado, não foi significativo ($P < 0,05$) (Fig. 19, b). Esta situação foi semelhante em ambas as modalidades inoculadas e, curiosamente, foi precisamente nestas análises que se obteve o valor máximo de densidade para a modalidade F, $5,51 \times 10^4$ c.f.u./ grama de solo, e o segundo valor mais

elevado para a modalidade FB, $7,29 \times 10^4$ c.f.u./ grama de solo. Estes dados, sugerem que poderá ter sido atingido o limite de saturação de fungo no solo.

Exceptuando as situações atrás referidas, todas as outras inoculações, em ambas as modalidades, provocaram um aumento significativo da densidade de *P. chlamydosporia* no solo relativamente aos valores existentes antes das mesmas ($P < 0,05$), pelo que se considera que as inoculações foram bem sucedidas. Não foi detectada a presença de *P. chlamydosporia* no solo em todas as análises efectuadas nas modalidades não inoculadas (Biocida e Testemunha).

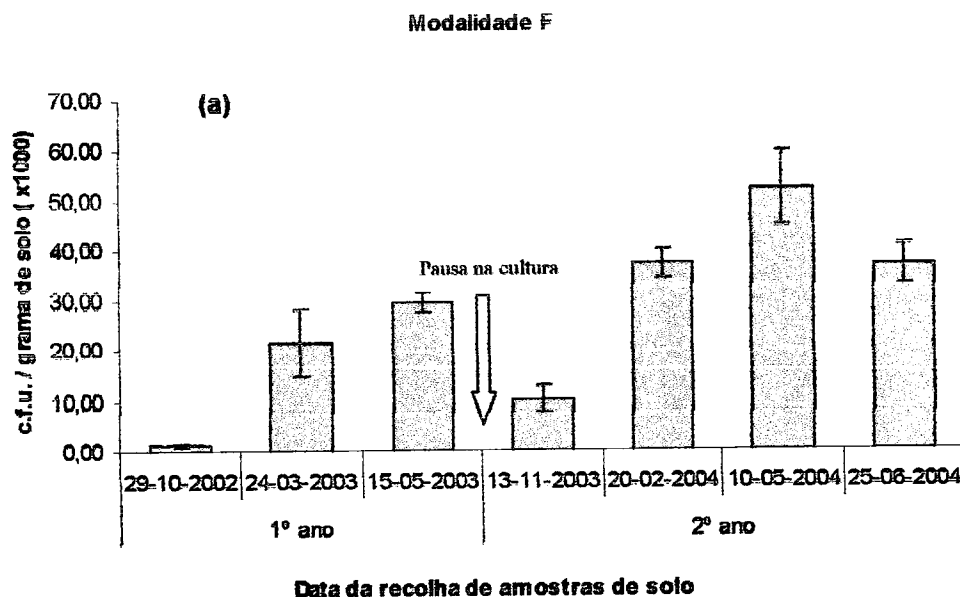
4.3. Evolução do fungo *P. chlamydosporia* no solo

O quadro IV e os gráficos da figura 20 apresentam os valores da densidade da população de *P. chlamydosporia* estabelecida no solo ao longo dos dois anos de ensaio, nas modalidades F e FB. Foram considerados apenas os resultados das análises efectuadas antes da realização de cada inoculação e a análise final de cada ano, de forma a ocorrer um período de tempo relativamente longo entre a inoculação anterior e cada análise representada (capítulo 3.2.). Não se consideraram os resultados obtidos nas análises realizadas logo após cada inoculação uma vez que não remetem apenas para a população estabelecida mas também para os clamidósporos viáveis não germinados que resultam da inoculação imediatamente anterior em todas as análises efectuadas nos dois anos de ensaio para ambas as modalidades inoculadas. Nas modalidades B e T não foi detectada a presença de *P. chlamydosporia* em todas as análises realizadas nos dois anos de ensaio.

4. Apresentação e discussão dos resultados

Quadro IV. Número de c.f.u. (média) de *P. chlamydosporia* por grama de solo antes de cada inoculação e no final para as modalidades inoculadas, F e FB. F= modalidade fungo; FB= modalidade fungo + biocida.

	Análise	Antes da 1ª inoculação	Antes da 2ª inoculação	Antes da 3ª inoculação	Final
1º ano	Data de amostragem	16-09-2002	29-10-2002	24-03-2003	15-05-2003
	F	0,00	$1,04 \times 10^3$	$2,16 \times 10^4$	$2,97 \times 10^4$
	FB	0,00	$3,13 \times 10^3$	$1,33 \times 10^4$	$2,31 \times 10^4$
	Análise	Antes da 1ª inoculação	Antes da 2ª inoculação	Antes da 3ª inoculação	Final
2º ano	Data de amostragem	13-11-2003	20-02-2004	10-05-2004	22-06-2004
	F	$1,04 \times 10^4$	$3,73 \times 10^4$	$5,21 \times 10^4$	$3,68 \times 10^4$
	FB	$1,25 \times 10^3$	$3,47 \times 10^4$	$6,62 \times 10^4$	$2,54 \times 10^4$



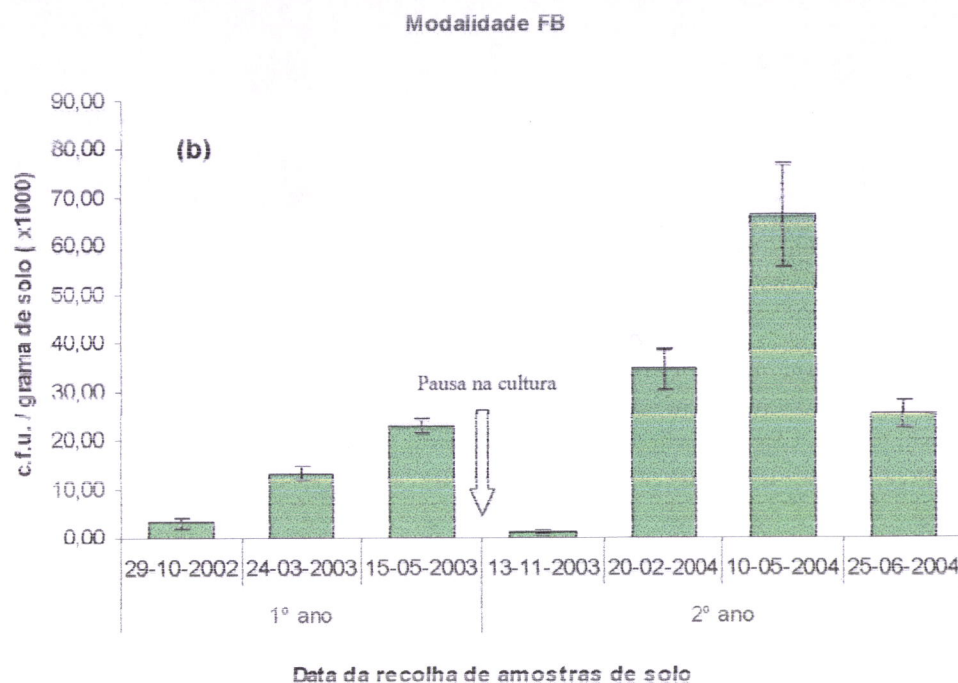


Fig. 20. Número de c.f.u. / grama de PcMR no solo antes de cada inoculação e no final de cada ano de ensaio nas modalidades F (a) e FB (b). Intervalos sobre as barras = Erro padrão.

De acordo com os gráficos apresentados, verifica-se que a população de *P. chlamydosporia* aumentou progressivamente ao longo do primeiro ano em ambas as modalidades inoculadas, F e FB (Fig. 20, a e b). Este aumento não foi, no entanto, significativo entre as análises de 24-3-2003 e 15-05-2003 da modalidade F, que correspondem às análises efectuadas antes da terceira inoculação e no final do primeiro ano, respectivamente ($P < 0,05$)¹.

Quanto ao segundo ano, verificou-se um aumento da densidade de fungo existente no solo desde a primeira análise, de 13-11-2003 (antes da primeira inoculação), até à análise de 10-5-2004 (antes da terceira inoculação), para ambas as modalidades. Este aumento não foi estatisticamente significativo entre a análise de 20-02-2004 e 10-05-2004 na modalidade F ($P < 0,05$)².

¹ Ver tabela 2.5 e 2.6, Anexo V

² Ver tabela 2.7, Anexo V

No último intervalo de tempo do ensaio, entre a análise de 10-05-2004 e a análise final, de 25-06-2004, a média da densidade de *P. chlamydosporia* decresceu em ambas as modalidades, embora este decréscimo não tenha sido estatisticamente significativo na modalidade F ($P < 0,05$)².

Nos dois anos de ensaio podem estabelecer-se duas situações distintas: o primeiro ano em que o fungo *P. chlamydosporia* foi aplicado pela primeira vez no solo onde esta espécie não existia, e o segundo ano, cujas inoculações foram realizadas em solo que já possuía uma população de *P. chlamydosporia* que permanecia das inoculações do ano anterior. Quer na situação em que foram efectuadas inoculações em solo isento de *P. chlamydosporia* (primeiro ano) quer na situação em que estas foram efectuadas após já ter já decorrido um ano de inoculações, foi possível instalar uma população de *P. chlamydosporia* com densidade acima de 10^4 c.f.u./ grama de solo, considerada como necessária para que ocorra a colonização da raiz pelo fungo num nível adequado à existência de uma redução significativa da população de *Meloidogyne* spp. (Bourne & Kerry, 1999; Leij *et al*, 1993). Este valor foi atingido com a segunda inoculação no primeiro ano (quadro IV, análise de 24-03-2003) para ambas as modalidades. No segundo ano, a modalidade F já apresentava valores desta ordem na primeira amostragem efectuada ao solo (a 13-11-2003) e na modalidade FB foi atingido após a primeira inoculação (quadro IV). A razão para que 10^4 c.f.u. de *P. chlamydosporia* por grama de solo tenham sido atingidos mais cedo no segundo ano que no primeiro ano, está, provavelmente relacionada com o facto da primeira inoculação do segundo ano ter sido efectuada em solo onde já existia uma população desta espécie. Os resultados sugerem, que em situações futuras de utilização de *P. chlamydosporia* como agente de controlo biológico, deverão ser efectuadas pelo menos duas inoculações de 5000 clamidósporos por grama de solo de modo a garantir uma densidade de fungo presente

no solo suficiente para que ocorra redução da população dos nemátodes-das-galhas-radiculares.

Através da comparação das densidades de *P. chlamydosporia* no solo entre análises correspondentes de cada ano³, verifica-se ainda que estas foram superiores no segundo ano para a maioria das análises apresentadas. Esta situação apenas não se verificou nas análises finais em cada ano, cujas médias das densidades não são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$). Tal como foi referido anteriormente, a diferença observada entre os dois anos deve-se possivelmente a um efeito cumulativo por já existir uma população de *P. chlamydosporia* instalada resultante do ano anterior.

Durante o segundo ano, foram atingidos, $6,62 \times 10^4$ c.f.u. por grama de solo (quadro IV) na análise de 10-05-2004, sendo este o valor de densidade de *P. chlamydosporia* estabelecida mais elevado dos dois anos de ensaio de ambas as modalidades (considerando apenas as análises efectuadas antes de cada inoculação e a análise final de cada ano). Os resultados sugerem que estes valores poderiam estar perto do limite de densidade de *P. chlamydosporia* suportado pelo solo. Esta afirmação é suportada pelo facto de, apesar de terem sido efectuadas duas inoculações de *P. chlamydosporia* no período de tempo que decorreu entre 20-02-2004 e a análise final, de 25-06-2004, não foram observadas variações significativas da densidade de fungo na modalidade F ($P < 0,05$)⁴. Também na modalidade FB apesar de ter sido efectuada a terceira inoculação no período de tempo entre 10-05-2004 e 25-06-2004 a densidade de *P. chlamydosporia* não aumentou como se poderia esperar, tendo em conta a evolução da população do fungo até à data de 10-05-2004.

No período de tempo que decorreu entre os dois anos de ensaio, desde a análise final do primeiro ano, de 15-05-2003, e a primeira análise do segundo ano, de 13-11-2003, a

³ Ver tabelas 2.11 e 2.12, Anexo V

⁴ Ver tabelas 2.7 e 2.8, Anexo V

população de *P. chlamydosporia* sofreu um decréscimo significativo nas duas modalidades inoculadas, F e FB ($P < 0,05$)⁵. (Fig. 23). Na modalidade FB, a densidade de fungo decresceu de $2,31 \times 10^4$ c.f.u./ g de solo (análise final, 1º ano) para $1,25 \times 10^3$ c.f.u./ g de solo (primeira análise, 2º ano), que poderá ser explicado pela aplicação de biocida efectuada neste intervalo de tempo (quadro IV). Porém, na modalidade F, onde não foi aplicado biocida, também se verificou um decréscimo da densidade de fungo no solo, de $2,97 \times 10^4$ (análise final, 1º ano) para $1,04 \times 10^4$ c.f.u./ g de solo (primeira análise, 2º ano), sendo este menos acentuado que o decréscimo verificado na modalidade FB. Assim, a explicação para a redução da densidade de *P. chlamydosporia* durante este período não poderá ser atribuída apenas à aplicação de biocida. Durante este período, aproximadamente seis meses, que incluiu todos os meses de verão, a estufa onde foi realizado o ensaio permaneceu sem cultura e irrigação do solo. As temperaturas elevadas características dos meses de verão no interior da estufa, os baixos níveis de humidade no solo e a reduzida quantidade de matéria orgânica, que se deve ao tipo de solo e à ausência de uma cultura durante um período de tempo prolongado, são também algumas das razões a que se pode atribuir o decréscimo da densidade de fungo verificado após este período. Os resultados obtidos sugerem que, numa situação de cultura comercial, poderá ser necessária a renovação da aplicação do fungo *P. chlamydosporia* sempre que se iniciar uma nova cultura, uma vez que é comum a aplicação de biocidas no solo antes de cada plantação e que o período de tempo entre culturas ocorrer em condições semelhante às verificadas neste trabalho. É ainda importante determinar, em estudos futuros, o modo como factores como temperatura e humidade afectam a viabilidade do fungo no solo.

⁵ Ver tabelas 2.9 e 2.10. Anexo V

4.4. Efeito da aplicação de biocida na população de *P. chlamydosporia*

O gráfico seguinte representa as densidades de *P. chlamydosporia* nas avaliações efectuadas antes de cada inoculação e na avaliação final nos dois anos de ensaio na modalidade F e FB.

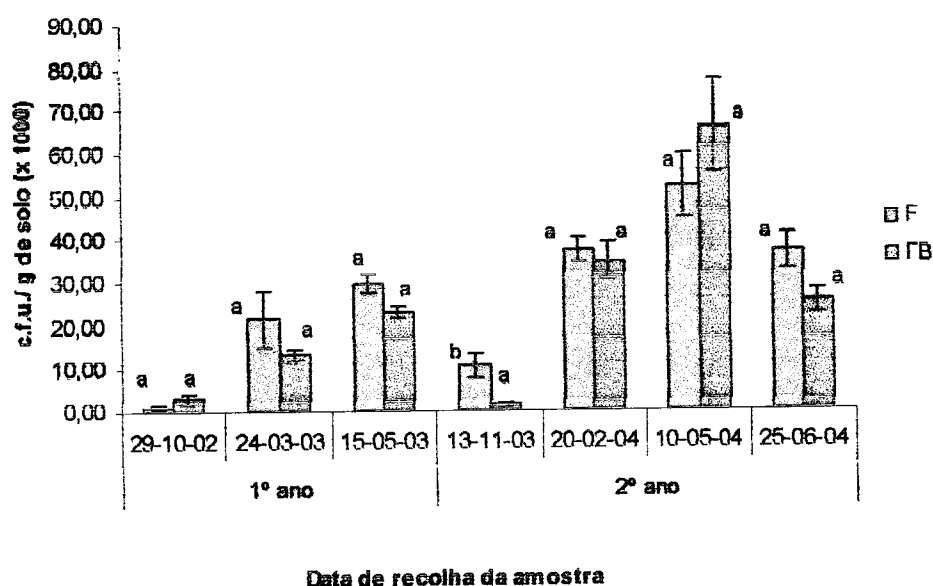


Fig. 21. Número de c.f.u. (média) de *P. chlamydosporia* por grama de solo antes de cada inoculação e no final nos dois anos de ensaio nas modalidades F e FB. Letras diferentes sobre as barras de cada análise indicam médias significativamente diferentes. Letras iguais sobre as barras de cada análise indicam que as médias não são significativamente diferentes pelo teste *Tamhane's T2* após ANOVA⁶ ($P < 0,05$). F= modalidade fungo; FB= modalidade fungo + biocida. Intervalos sobre as barras = Erro padrão.

Verifica-se que na maioria das avaliações efectuadas antes de cada inoculação e no final de cada ano de ensaio não existiram diferenças significativas na densidade de *P. chlamydosporia* entre a modalidade FB e a modalidade F ($P < 0,05$). Apenas na avaliação de 13-11-2003, efectuada antes da primeira inoculação do segundo ano, a densidade de fungo da modalidade F foi significativamente mais elevada que na

⁶ Ver tabelas 2.2. e 2.4., Anexo V

modalidade FB ($P < 0,05$)⁶. Como seria de esperar, a aplicação de um biocida de largo espectro efectuada no período de tempo entre os dois anos de ensaio provocou a redução da população de *P. chlamydosporia* que já se encontrava instalada e que resultava das inoculações realizadas durante o primeiro ano. Assim, compreende-se que a população de *P. chlamydosporia* medida na modalidade FB tenha sido inferior a F antes da primeira inoculação do segundo ano.

Apesar da aplicação de biocida afectar a população de fungo que já se encontrava instalada nos solo antes do início do segundo ano, a sua aplicação antes das inoculações em cada ano de ensaio não impediu que o fungo se estabelecesse no solo a longo prazo e que ocorresse nas densidades consideradas necessárias para a existência de controlo biológico. Estes resultados são importantes para o desenvolvimento de estratégias que maximizem o controlo de NGR nas quais se poderá combinar a utilização de biocidas, antes da implantação da cultura para prevenir a invasão inicial de NGR nas raízes, com a aplicação de *P. chlamydosporia*, que providenciará o controlo da população de nemátodes a longo prazo.

4.5. População de *P. chlamydosporia* na raiz

O gráfico seguinte e o quadro V representam a população de *P. chlamydosporia* na raiz (medida em c.f.u./ grama de raiz), para as modalidades F e FB, quando foi efectuado o arranque das plantas, a 15-05-2003 no primeiro ano e a 25-06-2004 no segundo ano.

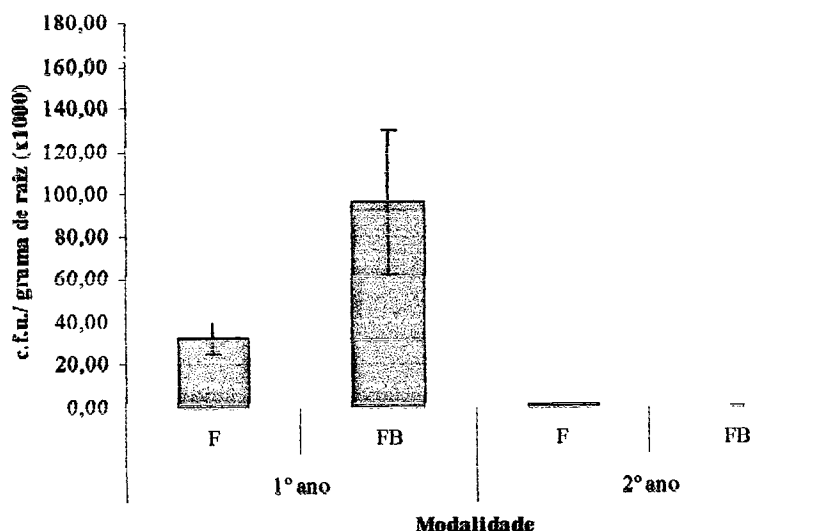


Fig. 22. Número de c.f.u. / g de raiz nos dois anos de ensaio nas modalidades F e FB. F = modalidade Fungo, FB = modalidade Fungo + Biocida

Quadro V. Número de c.f.u. (média) de *P. chlamydosporia* por grama de raiz no final de cada ano de ensaio para as modalidades inoculadas, F e FB. F= modalidade fungo; FB= modalidade fungo + biocida.

	1º ano	2º ano
Data de amostragem	15-05-2003	22-06-2004
F	$3,26 \times 10^4$	$9,60 \times 10^2$
FB	$9,62 \times 10^4$	$1,70 \times 10^2$

Apesar de se verificar a existência de fungo na raiz nos dois anos de ensaio em ambas as modalidades inoculadas, a densidade deste no segundo ano foi muito reduzida e bastante inferior à colonização da raiz obtida durante o primeiro ano ($P < 0,05$)⁷ (Fig. 22).

Durante o primeiro ano, a colonização da raiz foi de $3,26 \times 10^4$ c.f.u. /grama de raiz para a modalidade F e $9,62 \times 10^4$ c.f.u./grama de raiz para a modalidade FB (quadro V). Estes valores encontram-se acima dos valores de colonização da raiz que se verificou

⁷ Ver tabelas 2.17. e 2.18., Anexo V

serem suficientes para originar um nível de parasitismo dos ovos de NGR que permitiu o controlo significativo da população de nemátodes (de Leij *et al.*, 1992b; Bourne & Kerry, 1999).

No segundo ano, o valor médio para a colonização da raiz foi de $9,6 \times 10^2$ c.f.u. por grama de raiz para a modalidade F e de $1,7 \times 10^2$ c.f.u. por grama de raiz para a modalidade FB (quadro V), sendo que num dos talhões desta modalidade não se observou a presença de *P. chlamydosporia*⁸. Estes valores são significativamente mais baixos que os obtidos no primeiro ano e também a níveis de colonização da raiz verificados em ensaios anteriormente realizados em condições semelhantes a este ensaio, onde os valores variaram entre 10^3 e 10^4 c.f.u./ grama de raiz (Vinagre, 2003). No segundo ano de ensaio o nível de colonização da raiz não atingiu os níveis considerados como necessários para que possa ocorrer uma situação de controlo biológico (quadro V). A colonização da raiz pelo fungo depende do nível de colonização do solo adjacente. Uma vez que na análise final ao solo, cuja recolha foi efectuada em simultâneo com a recolha das amostras de raiz, se verificaram valores de densidade de fungo ($3,68 \times 10^4$ para F e $2,54 \times 10^4$ para FB), a reduzida colonização da raiz no segundo ano é difícil de explicar. Está demonstrado que a colonização desta tende a ser mais elevada quando se encontra infectada por NGR (Bourne *et al.*, 1996). Neste ensaio, não se registou a presença de *Meloidogyne* spp. na maioria dos talhões⁹ nos dois anos de ensaio, pelo que a reduzida densidade de nemátodes na raiz não pode ser uma explicação para os baixos níveis de colonização desta pelo fungo. Outra explicação possível poderá estar relacionada com plantas utilizadas uma vez que estas têm uma grande influência na colonização da raiz. Porém, nos dois anos de ensaio foi

⁸ Ver tabela 6. Anexo IV

⁹ Ver tabelas 9 e 10. Anexo IV

utilizada a mesma variedade de tomateiro não sendo por isso a melhor explicação para o sucedido.

Os resultados obtidos no segundo ano de ensaio devem-se provavelmente à influência de outros factores, não conhecidos, que foram desfavoráveis à passagem do fungo da sua fase de colonizador de matéria orgânica do solo para colonizador da raiz, tornando-se interessante averiguar, em estudos futuros, quais os factores envolvidos neste processo e o modo como o influenciam.

4.5.1. Efeito da aplicação de biocida na colonização da raiz pelo fungo *P. chlamydosporia*

No ensaio do segundo ano, apesar do teste estatístico não revelar diferenças significativas entre modalidades F e FB ($P < 0,05$)¹⁰ não é possível retirar conclusões deste resultado uma vez que os valores de colonização da raiz obtidos são muito reduzidos. Porém, realizando o mesmo teste para os valores obtidos no primeiro ano, verifica-se que a tendência é semelhante e não se obtiveram diferenças significativas nos valores de colonização da raiz entre as modalidades F e FB ($P < 0,05$). Assim, à semelhança do que ocorreu no solo, a aplicação de um biocida geral no solo antes da instalação da cultura e da inoculação de *P. chlamydosporia* não parece influenciar o estabelecimento deste na raiz das plantas.

4.6. Importância da colonização do solo na colonização da raiz pelo fungo *P. chlamydosporia*

O gráfico seguinte representa a densidade de fungo no solo e na raiz no final do primeiro ano de ensaio. Para que se pudesse utilizar um maior número de valores para

¹⁰ Ver tabela 2.16.. Anexo V

estudar a relação entre o nível de colonização do solo e da raiz recorreu-se aos valores obtidos em cada talhão das modalidades F e FB. Não foram considerados os valores correspondentes ao segundo ano por a densidade de fungo na raiz ser muito reduzida.

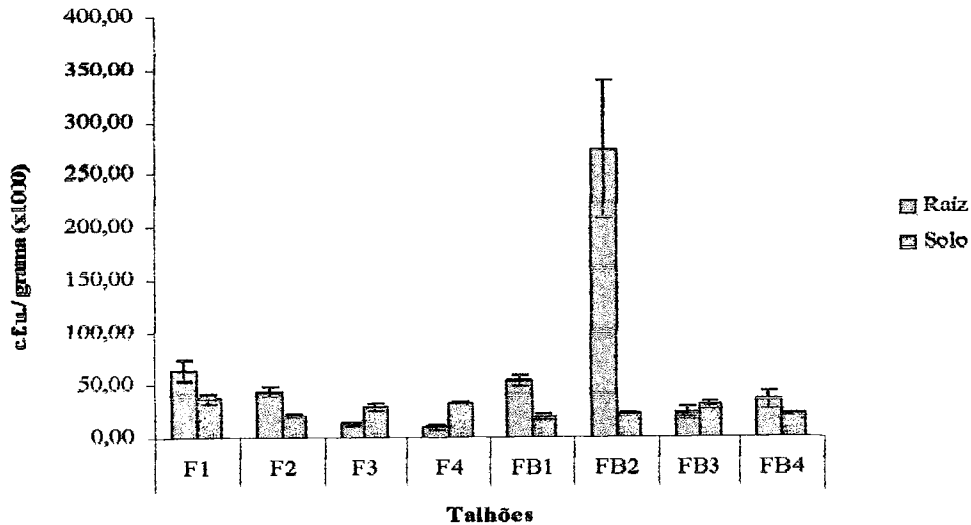


Fig. 23. Número (média) de c.f.u./g de raiz e número de c.f.u. / g de solo na análise final, no primeiro ano de ensaio. Intervalos sobre as barras = Erro padrão.

Quadro VI. Correlação de Pearson entre as médias dos valores de c.f.u./ grama de solo e de c.f.u./ grama de raiz nos talhões das modalidades F e FB no primeiro ano de ensaio ($P < 0,05$)

		Raiz	Solo
Raiz	Coefficiente de correlação	1	-0,251
	Sig.	-	0,237
	N	24	24
Solo	Coefficiente de correlação	-0,251	1
	Sig.	0,237	-
	N	24	24

Correlação significativa = nível de significância $< 0,05$

verifica-se que não existe uma correlação significativa entre as densidades de *P. chlamydosporia* presentes no solo e na raiz na mesma data ($P < 0,05$) (quadro VI). Significa que, neste caso, não existe uma tendência para que os talhões que possuam

maior colonização do solo pelo fungo sejam também aqueles que exibem uma maior colonização da raiz. No entanto, possivelmente a colonização da raiz está dependente da colonização do solo na medida em que é necessário um valor mínimo de densidade de *P. chlamydosporia* no solo para que a colonização da raiz pelo fungo ocorra nos níveis necessários à existência de controlo biológico. No entanto, de acordo com estes resultados, atingido este nível (estabelecido em trabalhos anteriores como 10^4 c.f.u./grama de solo), a existência de uma maior ou menor densidade de fungo no solo não está relacionada com uma maior ou menor colonização da raiz.

Em todos os talhões das modalidades F e FB nos dois anos de ensaio, a densidade de *P. chlamydosporia* observada na análise final ao solo foi superior a 10^4 c.f.u. por grama de solo¹¹. Apesar existirem condições favoráveis para a proliferação do *P. chlamydosporia* no solo em ambos os anos de ensaio, durante o segundo ano do ensaio não ocorreu migração do fungo para a superfície da raiz ou o seu estabelecimento nesta. As razões para o sucedido são difíceis de determinar. Assim, os resultados obtidos sugerem que uma elevada colonização do solo pelo fungo não é a única condição necessária para que ocorra a colonização da raiz nos níveis necessários à existência de parasitismo dos ovos de NGR pelo fungo numa proporção que permita uma situação efectiva de controlo biológico.

4.7. Outros fungos presentes no solo resistentes ao meio MSS¹²

Durante a avaliação da densidade de *P. chlamydosporia* surgiram outros fungos que se mostraram resistentes ao meio semi-selectivo, tendo alguns sido identificados até ao género com base em características morfológicas. Os géneros identificados nas análises

¹¹ Ver tabelas 1 e 5. Anexo IV

¹² Ver capítulo 3.1.

foram: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cylindrocarpon*, *Doratomyces*, *Geotrichum*, *Gliocladium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Torula*.

Neste capítulo, apresentam-se dados relativos a estes fungos, a título meramente acessório, que poderão eventualmente revelar-se úteis na compreensão das interações de *P. chlamydosporia* no solo com outros organismos em trabalhos futuros. O gráfico que se segue representa os valores de c.f.u./ grama de solo de outros fungos obtidos em todas as análises efectuadas, nas modalidades inoculadas com *P. chlamydosporia* (F + FB) e não inoculadas (B + T). O quadro VII apresenta as médias de c.f.u. de outros fungos por grama de solo em todas as análises efectuadas nos dois anos para todas as modalidades isoladamente.

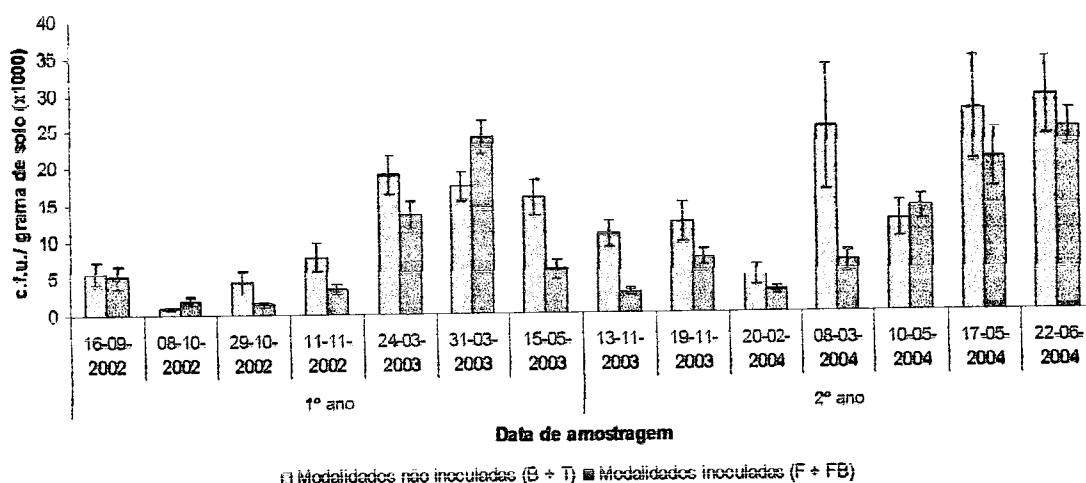


Fig. 24. Número de c.f.u. de outros fungos por grama de solo (média) em todas as análises efectuadas nos dois anos de ensaio nas modalidades inoculadas (Fungo + (Fungo+Biocida) e nas modalidades não inoculadas (Biocida + Testemunha). Intervalos sobre as barras = Erro padrão da média

4. Apresentação e discussão dos resultados

Quadro VII. Número de c.f.u. (média) de “outros fungos” por grama de solo em todas as análises efectuadas para todas as modalidades. F= modalidade fungo; FB= modalidade fungo + biocida, B = Biocida, T = testemilha.

		Data de amostragem	16-09-2002	08-10-2002	29-10-2002	11-11-2002	24-03-2003	31-03-2003	15-05-2003
1º ano	F		8,92x10 ³	3,29 x10 ³	1,79 x10 ³	4,92 x10 ³	1,12x10 ⁴	2,37 x10 ⁴	2,83 x10 ³
	FB		1,42 x10 ³	6,67x10 ²	1,21 x10 ³	1,96 x10 ³	1,58 x10 ⁴	2,44 x10 ⁴	9,08 x10 ³
	B		4,71 x10 ³	5,00 x10 ²	2,00 x10 ³	5,46 x10 ³	2,20 x10 ⁴	2,33 x10 ⁴	1,39 x10 ⁴
	T		6,67 x10 ³	1,54 x10 ³	7,00 x10 ³	9,96 x10 ³	1,60 x10 ⁴	1,12 x10 ⁴	1,75 x10 ⁴
		Data de amostragem	13-11-2003	19-11-2003	20-02-2004	08-03-2004	10-05-2004	17-05-2004	22-06-2004
2º ano	F		3,42 x10 ³	1,07 x10 ⁴	3,58 x10 ³	4,75 x10 ³	1,42 x 10 ⁴	2,19 x10 ⁴	2,25 x10 ⁴
	FB		2,58 x10 ³	4,17 x10 ³	2,46 x10 ³	9,08 x10 ³	1,40 x10 ⁴	1,96 x10 ⁴	2,73 x10 ⁴
	B		5,25 x10 ³	7,58 x10 ³	5,54 x10 ³	4,22 x10 ⁴	1,18 x10 ⁴	3,20 x10 ⁴	2,58 x10 ⁴
	T		1,60 x10 ⁴	1,70 x10 ⁴	4,54 x10 ³	7,92 x10 ³	1,33 x10 ⁴	2,28 x10 ⁴	3,24 x10 ⁴

De acordo com a figura 24, a quantidade de propágulos de outros fungos do solo em MSS variou ao longo dos dois anos do ensaio¹³. Através da análise estatística, verificou-se também que na maioria das análises efectuadas não existiram diferenças significativas nos valores de c.f.u. de outros fungos por grama de solo entre as modalidades inoculadas e as modalidades não inoculadas com *P. chlamydosporia* ($P < 0,05$). Nas catorze avaliações efectuadas nos dois anos de ensaio apenas se observaram diferenças significativas nas avaliações de 29-10-2002, 15-05-2003, 08-03-2004 e 13-11-2003 onde as modalidades inoculadas com *P. chlamydosporia* apresentaram densidades de outros fungos significativamente inferiores às modalidades não inoculadas e a 31-03-2003 onde a densidade dos outros fungos foi superior nas modalidades inoculadas com *P. chlamydosporia* ($P < 0,05$)¹⁴.

¹³ Ver tabelas 2.26 a 2.29. Anexo V

¹⁴ Ver tabela 2.30, Anexo V

Verifica-se ainda que a densidade de *P. chlamydosporia* em cada talhão inoculado apresentou uma correlação significativa (de índice negativo) com os valores correspondentes da densidade de outros fungos ($P < 0,05$) nas análises de 29-10-2002 e 20-02-2004¹⁵. Estes resultados significam que a média das densidades de *P. chlamydosporia* e dos outros fungos do solo em MSS em cada talhão foi inversamente proporcional nas datas apresentadas. A análise da correlação não foi realizada para os dados correspondentes às amostragens efectuadas depois de cada inoculação uma vez que se considerou que esta não seria válida pelo facto do intervalo de tempo entre a inoculação e amostragem de solo ser muito curto para se poderem verificar alterações causadas por *P. chlamydosporia*.

Quanto aos outros fungos contabilizados nas análises à raiz, verifica-se que apenas no primeiro ano ocorreram diferenças significativas na quantidade de c.f.u. de outros fungos por grama de raiz entre modalidades, que se verificou entre a modalidade B e as restantes ($P < 0,05$)¹⁶.

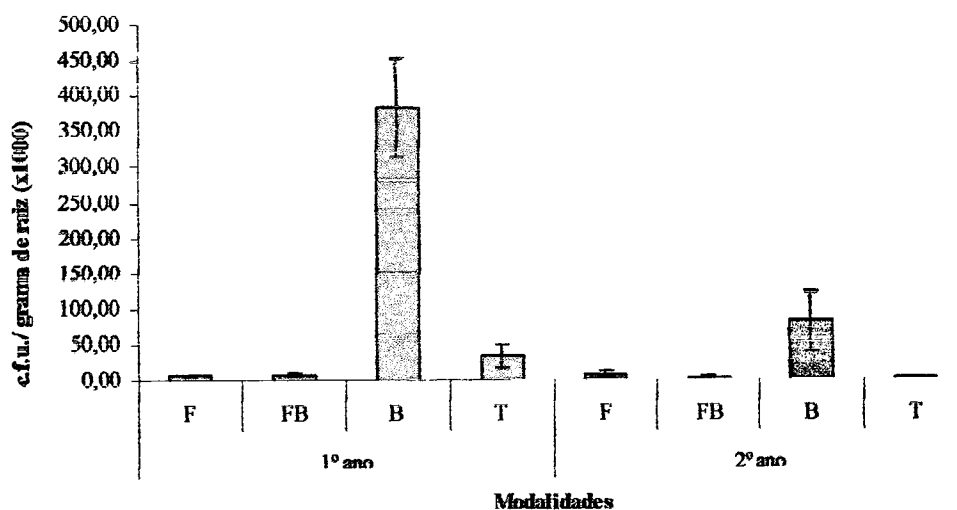


Fig. 25. Número de c.f.u de outros fungos por grama de raiz em todas as modalidades nos dois anos de ensaio. = Fungo, FB = Fungo+Biocida, B = Biocida, T= testemunha. Intervalo sobre as barras = Erro padrão.

¹⁵ Ver tabela 2.31, Anexo V

¹⁶ Ver tabela 2.33 e 2.35, Anexo V

Quadro VIII. Número de c.f.u. (média) de outros fungos por grama de raiz no final de cada ano de ensaio para todas as modalidades. F= modalidade fungo; FB= modalidade fungo + biocida, B = Biocida, T= Testemunha.

	1º ano	2º ano
Data de amostragem	15-05-2003	22-06-2004
F	7,38x10 ³	7,96 x10 ³
FB	7,83x10 ³	3,88 x10 ³
B	3,83 x10 ⁵	8,18 x10 ⁴
T	3,46 x10 ⁴	1,75 x10 ³

A correlação entre as médias de c.f.u. por grama de raiz de *P. chlamydosporia* e de outros fungos em cada talhão das modalidades inoculadas (F e FB) no primeiro ano, é significativa e tem um índice positivo indicando existir uma tendência para que os talhões onde se verificou uma densidade de *P. chlamydosporia* mais elevada fossem também aqueles onde foi contabilizado um número mais elevado de c.f.u. de outros fungos por grama de raiz em MSS.

Verifica-se também que os valores da densidade de outros fungos na raiz nas modalidades F e FB do segundo ano de ensaio se encontraram dentro da mesma ordem de valores obtidos no primeiro ano nas mesmas modalidades (10³ c.f.u./ grama de raiz). Estes resultados poderão significar que os factores que dificultaram a instalação do fungo *P. chlamydosporia* na raiz durante o segundo ano de ensaio (capítulo 4.5.) não terão afectado da mesma forma os outros fungos presentes nas análises em MSS. No entanto, visto que não foi efectuada uma análise aprofundada destes fungos, nada se pode inferir, deixando estes dados apenas questões interessantes para investigações futuras.

5. Conclusões

Pretendeu-se com este trabalho avaliar a eficácia de inoculações sucessivas do fungo *P. chlamydosporia*, no estabelecimento de uma população do fungo no solo e na raiz de tomateiro cultivado em estufa. Os resultados obtidos contribuem de forma positiva para a compreensão da dinâmica da população de *P. chlamydosporia* inoculado e para o desenvolvimento de uma estratégia viável para a gestão do nemátode-das-galhas-radiculares.

Com a realização deste trabalho, evidenciou-se que os métodos laboratoriais utilizados para a produção de clamidósporos, formulação do inóculo e inoculação do fungo *P. chlamydosporia*, permitem a realização de inoculações eficazes em que a densidade de propágulos viáveis no solo que rodeia o sistema radicular das plantas após as inoculações é significativamente superior à densidade existente antes das mesmas.

Verificou-se que na estufa utilizada, existia uma população de *P. chlamydosporia* antes de se iniciar o segundo ano de ensaio. Esta resultou das inoculações efectuadas durante primeiro ano do ensaio e não de uma população autóctone uma vez que antes de ser realizada qualquer inoculação na estufa, as análises não revelaram a presença desta espécie.

Com os resultados obtidos conclui-se que é possível estabelecer uma população de *P. chlamydosporia* no solo, e que a densidade desta tende a aumentar com cada nova inoculação, pelo menos até que seja atingido o limite de saturação do solo. Foi possível obter neste ensaio, uma colonização do solo acima de 10^4 c.f.u. de *P. chlamydosporia* por grama de solo, sendo este valor considerado como necessário à ocorrência de um nível de colonização da raiz e parasitismo dos ovos de nemátode-das-galhas-radiculares que origine um controlo efectivo da população destes nemátodes (Bourne & Kerry, 1999; Leij *et al*, 1993). Em solo isento de *P. chlamydosporia*, foram necessárias duas

inoculações de 5000 clamidósporos de *P. chlamydosporia* por grama de solo para que este nível de colonização fosse alcançado e mantido até à remoção da cultura. Num período de tempo longo entre culturas, que incluiu os meses de Verão nos quais a estufa permaneceu sem cultura e irrigação, a população de *P. chlamydosporia* manteve-se no solo mas sofreu um decréscimo na sua densidade, indicando que poderá ser necessária a renovação da aplicação de *P. chlamydosporia* em cada nova época de cultura para manter a sua população em densidades adequadas à ocorrência do controlo eficaz do nemátode-das-galhas-radiculares. Três inoculações de 5000 clamidósporos de *P. chlamydosporia* por grama de solo permitiram obter um nível de colonização da raiz pelo fungo adequado à ocorrência de controlo biológico (acima de 10^3 c.f.u./ grama de raiz) (de Leij *et al*, 1992b; Bourne & Kerry, 1999). No entanto, é possível demonstrar também que uma elevada colonização do solo adjacente à raiz (superior a 10^4 c.f.u./ grama de solo) não parece ser a única condição necessária para que ocorra colonização desta pelo fungo em níveis adequados à existência de parasitismo dos ovos de NGR numa proporção que permita uma situação de controlo biológico. Não existiu uma correlação significativa entre as densidades de *P. chlamydosporia* no solo no final do ensaio e as densidades de fungo na raiz, quando estas foram elevadas. Estes resultados reforçam a ideia de que o sucesso deste processo parece estar dependente de outros factores para além da eficácia das inoculações de *P. chlamydosporia* efectuadas, e que poderão ser factores edáficos, climáticos ou relacionados com a biologia do solo.

Foi possível demonstrar que a aplicação de um biocida geral no solo antes da implantação da cultura e das inoculações de *P. chlamydosporia* no solo, e respeitando os intervalos de segurança, não impediu o estabelecimento do fungo no solo a longo prazo, nem na raiz das plantas, nas densidades consideradas necessárias para a existência de controlo biológico. Estes resultados são importantes para o

desenvolvimento de estratégias que maximizem o controlo de NGR nas quais se poderá combinar a utilização de alguns biocidas, com o objectivo de prevenir a invasão inicial de NGR nas raízes, com a aplicação de *P. chlamydosporia*, que providenciará o controlo da população de nemátodes a longo prazo.

6. Considerações finais e perspectivas futuras

Desde os anos 70, quando se suspeitou da potencialidade do fungo *Pochonia chlamydosporia* (Kerry & Crump, 1977), no combate a nemátodes dos quistos, as investigações desenvolvidas em volta desta espécie em variados locais do mundo, têm sido inúmeras.

O desenvolvimento de um agente de controlo biológico é um processo complexo no qual se encontram envolvidas diversas variáveis ligadas não só à biologia e ecologia do fungo mas também à existência de uma tecnologia adequada de produção em massa, formulação e estratégias de aplicação no campo.

O presente trabalho, e o projecto no qual se inseriu, em que se realizou um ensaio no campo numa situação semelhante à horticultura comercial utilizando uma metodologia inovadora de produção de inóculo em massa, constitui uma contribuição importante para a compreensão da dinâmica da população do fungo *P. chlamydosporia* no solo e na raiz, após inoculação. Os resultados obtidos vêm reforçar a ideia da complexidade do mecanismo envolvido no processo de colonização do solo e da raiz pelo *P. chlamydosporia* necessário a um processo eficaz de controlo biológico de NGR, e da existência de variados factores que o influenciam, nomeadamente climáticos, edáficos e/ou bióticos (Kerry, 2001). Para que possa existir uma utilização comercial do fungo *P. chlamydosporia* é ainda necessário melhorar a compreensão da influência que estes factores exercem sobre o fungo, das relações ecológicas que se estabelecem e aprofundar conhecimentos ligados à genética e bioquímica da espécie, como genes e enzimas envolvidos no processo de parasitismo. É igualmente necessário o melhoramento da tecnologia de produção e formulação do inóculo em produto final, assim como definir estratégias de aplicação do fungo (quando e como aplicá-lo no solo),

e a possível combinação com outros métodos de controlo, de modo a maximizar o seu impacto sobre as populações do nemátode-das-galhas-radiculares

Apesar de existirem ainda alguns obstáculos a ultrapassar, os estudos efectuados continuam a dar garantias da potencialidade desta espécie cujas características a tornam promissora para uma futura utilização comercial generalizada. Contribuir-se-á assim, com uma alternativa para a resolução de um dos grandes problemas de fitopatologia em horticultura no mundo, o nemátode-das-galhas-radiculares, assim como para a preservação do ambiente através do incentivo a uma menor utilização de substâncias químicas com elevado impacto negativo sobre este.

7. Referências bibliográficas

Abrantes, I.M. De O.; Bourne, J.M.; Brito, I.; Ciancio, A.; Hirsch, P.R.; Kerry, B.R.; Lopez-Llorca, L. V.; Mota, M.M.; Santos, M.S.N. De A.; Tzortzakakis, E.A. & Verdejo-Lucas, S. (2002) A Manual for Research on *Verticillium chlamydosporium*, a potential biocontrol agent for root-knot nematodes. Kerry, B.R & Bourne, J.M. (eds.). IOBC/WPRS, Gent. 84 pp.

Agrios N.G. (2005) Plant Pathology. 5. th. ed. Elsevier Academic Press, Burlington. 922 pp.

Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W. & Blackwell M. (1996) Introductory Mycology. 4th ed. New York: John Willar & Sons. 869 pp.

Amaro, P. (2003) A Protecção Integrada, ISA/Press, Cadaval. 446 pp.

Atkins, S.D.; Hildago-Diaz, L.; Kalisz, H.; Mauchline, T.H.; Hirsch, P.R. & Kerry, B.R. (2003) Development of a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. *Pest Management Science* 59: 183-189.

Baicheva, O.; Salkova, D. & Palazova, G. (2002) Root-knot nematodes (*Meloidogyne*, Goeldi, 1887). Species composition, pathogenicity, some problems for investigation. Experimental pathology and parasitology, *Bulgarian Academy of sciences* 5/10 : 21-24.

Barron, G.L. & Onions, H.S. (1966) *Verticillium chlamydosporium* and its relationships to *Diheterospora*, *Stemphyliopsis*, and *Paecilomyces*. *Canadian Journal of Botany* 44: 861-869.

Bleve-Zacheo, T. & Melillo, M.T. (1997) The biology of giant cells. In: Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions. 1st edition, Fenoll, C.; Grundler, F.M.W.; Ohl, S.A. (Eds.), 65-69

Bordallo, J.J.; Lopez-Llorca, L.V.; Jansson, H.B.; Salinas, J.; Persmark, L. & Asenio, L. (2002) Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. *New Phytologist* 154:491-499.

Bourne, J. M. & Kerry B. R (2000) Observations on the survival and competitive ability of the nematophagous fungus *Verticillium* in soil. *Int. J. Nematology*, 10:9-18.

Bourne, J. M.; Kerry, B. R. & de Leij, F. A. A. M. (1994) Methods for the study of *Verticillium chlamydosporium* in the rhizosphere. *J. Nematology*, 26: 587-591.

Bourne J.M. & Kerry B.R. (1999) Effect of the host plant on the efficacy of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent of root-knot nematodes at different nematode densities and fungal application rates. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 75-84.

Bourne, J. M., Kerry, B. R. & de Leij, F. A. A. M. (1996) The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 539-548.

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

de Leij, F. A. A. M., Kerry, B. R. & Dennehy, J. A. (1993) *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and microplot tests. *Nematologica*, 39: 115-126.

de Leij, F.A.A.M., Dennehy, J.A. & Kerry, B.R. (1992a) The effect of temperature and nematode species on interactions between the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) *Nematologica*, 38: 65-79.

de Leij, F.A.A.M., Dennehy, J.A. & Kerry, B.R. (1992b) The use of *Verticillium chlamydosporium* Goddard and *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayres & Starr alone and in combination to controlo *Meloidogyne incognita* on tomato plants. *Fundam. Appl. Nematol.*, 15 (3), 235-242

Eilenberg, J. & Hokkanem, H. M. T. (2006) An Ecological and Societal Approach to Biological Control. Eilenberg & Hokkanen (Eds.), Springer. Dordrecht. 322 pp.

Eisenback, J.D. (1998) Morphology and Sistematics. In: Plant Nematode interactions, Eds Bakers, K.R., Pederson, G.A.; Windham, G.F., Agronomy monograph, 36, Soil science society of America, USA, 37-60.

Eisenback, J.D. (1985) Detailed morphology and anatomy of second-stage juveniles, males, and females of the genus *Meloidogyne* (Root-knot nematodes) In: An advanced treatise on *Meloidogyne*: biology and control. Raleigh. Sasser, J.N. & Carter, C.C. (Eds.), North Carolina State University Graphics. 95-112.

Eisenback, J.D. & Triantaphyllou H.H. (1991) Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In: Manual of agricultural nematology. Nickle WR (Ed.) New York/Hong Kong: Marcel Dekke, 191-273.

Esteves, L; Franco, C.; Pombo, C.; Louro, T; Clara, M.I.; Mota, M. (2001) Evaluation of three of the fungus *Verticillium chlamydosporium* in diferent plant root colonization. Proc. Of 11th Congress of Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of Sociedade Portuguesa de fitopatologia, Andaluz Academic publishing, Redondo, 430-432.

Franco, C.; Esteves, L; Cravo, J.; Clara, I.; & Mota, M. (2001) The use of *Verticillium chlamydosporium* isolates, as a biological control agents against *Meloidogyne incognita*, in a green pepper pot test evaluation. Proc. Of 11th Congress of Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of Sociedade Portuguesa de fitopatologia, Andaluz Academic publishing, Redondo, 154-156.

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

Goddard, H.N. (1913). Can Fungi living in agricultural soil assimilate free nitrogen? *Botanical Gazette*. 56: Crawfordsville, IN, 249-304

Hidalgo-Diaz, L.; Bourne, J.M.; Kerry, B.R. & Rodriguez, M.G. (2000) Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. *International Journal of Pest Management*. 46: 277-284.

Hussey, R.S. (1985) Host-parasite relationships and associated physiological changes. In: *An advanced treatise on Meloidogyne, Vol I biology and control*. Sasser, J.N.; Carter, C.C. (Eds.). Raleigh: North Carolina State University, 143-153.

Irving, F. & Kerry, B.R. (1986) Variation between strains of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. II. Factors affecting parasitism of cyst nematode eggs. *Nematologica*. 32: 474-485.

Jansson, H.B. & Lopez-Llorca, L. V. (2004) Control of nematodes by fungi. In: *Handbook of Fungal Biotechnology. Vol. VI Fungi in Agricultural Biotechnology*. D.K. Arora, P.; Bridge & Bhatnagar, D. (eds.). Marcel Dekker, Inc. New York. 205-215.

Jatala, P. (1985) Biology control of nematodes. In: *An Advanced Treatise on Meloidogyne, Vol. I. Biology and control*. Sasser, J.N. & Carter, C.C. (Eds.). Raleigh. North Carolina State University Graphics. 303- 308.

Kerry, B. R. & Crump, D. H. (1998) The dynamics of the decline of the cereal cyst nematode *Heterodera avenae* in four soils under intensive cereal production. *Fundamental Applied Nematology*, 21, 617-625.

Kerry, B.R. (1995). Ecological considerations for the use of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium*, to control plant parasitic nematodes. *Can. J. Bot.* 73: 565-570.

Kerry, B.R. (2000) Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of nematodes. *Annu. Rev. Phytopathology*, 38, 423-441.

Kerry, B.R. (2001). Exploitation of the Nematophagous Fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the Biological Control of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.) In: *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. Butt, T. M.; Jackson, C & Magan, N, (Eds), CABI International, Wallingford, 155-168.

Kerry, B.R. & Crump, D.H. (1977) Observation on fungal parasites of females and eggs of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae*, and other cyst nematodes. *Nematologica*, 23:193-201.

Kerry, B.R. & Jaffee, B.A. (1997) Fungi as biological control agents for plant parasitic nematodes. In: *The Mycota. IV Environmental and Microbial Relationships*. Wicklow/Soderstrom (Eds), Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, 203-218.

Kerry, B.R., Crump, D.H. & Mullen, L.A. (1982a) Studies of the cereal-cyst nematode, *Heterodera avenae* under continuous cereals, 1975-1978. II. Fungal parasitism of nematode eggs and females. *Ann. Appl. Biol.*, 100:489-499.

Kerry, B.R., Crump, D.H. & Mullen, L.A. (1982b) Natural control of the cereal cyst-nematode, *Heterodera avenae* Woll., by soil fungi at three sites. *Crop Protection*, 1, 99-109.

Kerry, B.R.; Irving, F. & Hornsey, J.C. (1986) Variation between strains of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. I. Factors affecting growth in vitro. *Nematologica*, 32: 461-473.

Kirk, P.M.; Cannon, P.F.; David, J.C. & Stalpers, J.A (2001) *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 9th Ed., Wallingford, CAB International, UK, 655 pp.

Kok, C.J.; Papert, A. & Hok-A-Hin, C.H. (2001) Microflora of *Meloidogyne* egg masses: species composition, population density and effect on the biocontrol agent *Verticillium chlamyosporium* (Goddard). *Nematology*, 3:8, 729-864

Lopez-Llorca, L.V.; Bordallo, J. J.; Salinas, J.; Monfort, E. & Lopez-Serna, M. L. (2000) Use of Light and Scanning Electron microscopy to examine colonisation of barley rhizosphere by the nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium*. *Micron*. 33, 61-67

Louro, T. ; Franco, C. ; Pombo, C. ; Esteves, L; Clara, M.I. & Mota, M. (2001) Chlamyospore production evaluation of portuguese isolate of the nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium*, Proc. of 11th Congress of Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of Sociedade Portuguesa de fitopatologia, Andaluz Academic publishing, Redondo, 433-436.

Morgan-Jones G; Godoy, G. & Rodriguez-Kabana, R. (1981) *Verticillium chlamyosporium*, fungal parasite of *Meloidogyne arenaria* females. *Nematropica*, 11: 2, 115-120.

Morgan-Jones, G. & Rodriguez-Kabana, R. (1987) Fungal biocontrol for the management of nematodes. In: *Vistas on Nematology*, JA Vecch (ed.), DW Dickson, 14:94-99.

Morton, O.M., Hirsch, P.R. & Kerry, B.R. (2004) 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*, 6: 161-170.

Poinar G. (1983) The natural history of nematode control, Prentice-Hall (Ed.), Inc., 119-145.

Pombo, C. (2000) Pesquisa e selecção de isolados do fungo *Verticillium chlamyosporium* para utilização em luta biológica, nas principais zonas de cultura protegida em Portugal, Trabalho de fim de curso, Universidade de Évora, 93 pp.

Pyrowolakis, A.; Westphal, A.; Sikora, R.A. & Becker, J.O. (2002) Identification of root-knot nematode suppressive soils. *Applied soil Ecology*. 19: 51-56.

Sharon, E.; Bar-Eyal, M.; Mor, M.; Kleofeld, O.; Chet, I. & Spiegel, Y. (1998) Biological control of *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma* preparations: mode of action. *Nematologica*, 44: 581.

Sayre, R.M & Walter, D.E. (1991) Factors affecting the efficacy of natural enemies of nematodes. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 29: 149-166.

Segers, R.; Butt, T.M.; Kerry, B.; Beckett, A. & Peberdy, J. F. (1996) The role of the protease VCP1 produced by the nematophagous *Verticillium chlamydosporium* in the infection process of nematode eggs. *Mycol. Res.* 100(4): 421-428.

Siddiqui, Z. A. & Mahmood, I. (1996) Biological control of plant-parasitic nematodes by fungi: A review. *Bioresource Technology* 58: 229-239.

Snedecor, G. W. & Cochran, W. S. (1980), *Statistical Methods*, Univ. Press. Iowa, 507 pp.

Stirling, G.R. (1991) *Biological control of plant-parasitic nematodes*. CAB International, Wallingford, UK. 282 pp.

Stirling, G.R. & Mankau, R. (1979) Mode of parasitism of *Meloidogyne* and other nematode eggs by *Dactylella oviparasitica*. *Nematology*. 11:282-288.

Triantaphyllou A. C. (1985) Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. In: *An advanced treatise on Meloidogyne: biology and control*. Sasser, J.N.; Carter, C.C. (Eds.). Raleigh: North Carolina State University, 113-126.

Tzortzakakis E. A. (2000) The effect of *Verticillium chlamydosporium* and oxamyl on the control of *Meloidogyne javanica* on tomatoes grown in a plastic house in Crete, Greece. *Nematologia Mediterranea* 28, 249-54

Ulloa, M. & Hanlin R.T. (2000) Illustrated Dictionary of Mycology. APS Press, St. Paul, MN, APS Press, 448 pp.

Verdejo-Lucas, S.; Sorribas, F. J.; Ornat, C. & Galeano, M.. (2003) Evaluating *Pochonia chlamydosporia* in a double cropping system of lettuce and tomato in plastic houses infested with *Meloidogyne javanica*. *Plant Pathology* , 52 (4) : 521-528.

Viaene, N.M. & Abawi G.S. (2000) *Hirsutella rhosiliensis* and *Verticillium chlamydosporium* as biocontrol agents of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on lettuce. *J. Nematology*, 32: 85-100.

Vinagre, L. (2003) Estudo da colonização do solo e da rizosfera do tomateiro cultivado em estufa, pelo fungo *Pochonia chlamydosporia* – isolado PcMR, no controlo biológico do nemátode *Meloidogyne* spp., Tese de licenciatura, Universidade de Évora, 97 pp.

Whitehead, A.G. (1997) Plant Nematode Control. CAB International, Wallingford U.K. 448 pp.

Zare, R.; Gams, W. & Evans, H.C. (2001) A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia*, 73: 51-86

Referências de internet

Kerry B.R. (1997) Biological control of nematodes: prospects and opportunities In: M.A. Maqbool & B. Kerry, Plant Nematode Problems and their Control in the Near East Region (FAO Plant Production and Protection Paper - 144) www.fao.org/docrep/v9978e/v9978e00.htm#Contents

Mitkowski, N.A. & G.S. Abawi (2003) Root-knot nematodes, Plant disease lessons, American Phytopathological Society
<http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/RootKnotNema/default.htm>

U.S. Environmental Protection Agency (2006)

<http://www.epa.gov/cbtpages/pollchemicmethylbromide.html>

Portal da União Europeia (2006)

<http://europa.eu.int/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP/04/878&format=HTML&aged=0&language=PT&guiLanguage=en>

Oca, N. (2004) Perspectiva para la fabricación de un Bionematicida a partir del hongo *Pochonia chalmidosporea* La Habana, Cuba

<http://www.monografias.com/trabajos26/bionematicida/bionematicida.shtml>

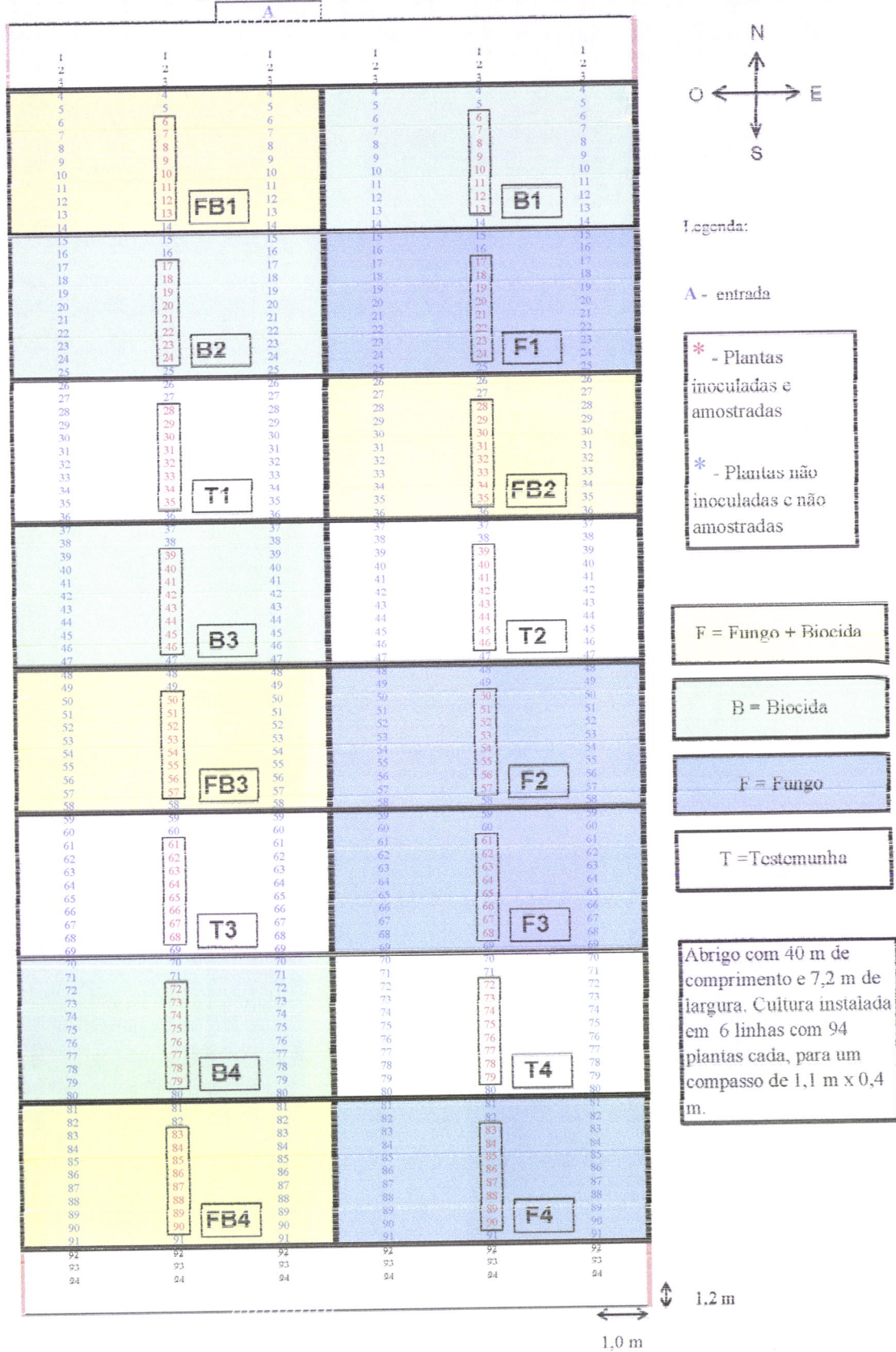
Kiewnick, S. & Sikora R.A. (2006) Biological control of Root knot nematodes with *Paecilomyces lilacinus* strain 251, Biological control, *In press*

www.sciencedirect.com

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I – Esquema da estufa	ii
Anexo II – Cálculos	iii
Anexo III – Composição dos meios de cultura e suporte	v
Anexo IV – Tabelas de dados	vi
Anexo V – Tratamento estatístico	xvii

ANEXO I – Esquema da estufa e distribuição das modalidades de tratamento



ANEXO II – Cálculos**1. Dados utilizados para os cálculos da produção de clamidósporos**

Parâmetro	Valor	Fonte
Nível de inoculação	5000 clamidósporos/ g de solo	Abrantes <i>et al</i> , 2002; Leij <i>et al</i> , 1993
Produção média de PcMR	$1,12 \times 10^7$ clamidósporos / g de meio	Esteves, 2001; Louro, 2001; Pombo, 2000
Densidade granular dos clamidósporos	$8,8 \times 10^6$ clamidósporos/g**	Vinagre, 2003
Quantidade de meio cultura sólido por Erlenmeyer	30 g/ Erlenmeyer	Abrantes <i>et al</i> , 2002
Massa de clamidósporos produzida por Erlenmeyer de 250 ml (fermentador)	3,82 g/ Erlenmeyer	Vinagre, 2003
Viabilidade média dos clamidósporos após extracção	69 %	Franco, comunicação pessoal
Densidade aparente do solo (Dap)	1,3	Fornecido pela DRAALG
Área do talhão	14,52 m ²	Fornecido pela DRAALG
Nº de plantas por talhão	33	*
Nº de plantas a inocular por talhão	8	*
Profundidade de solo considerada para cálculos de quantidade de clamidósporos necessários por planta	0,20 m	*
Distância entre linhas	1,1 m	Fornecido pela DRAALG
Distância entre plantas na linha	0,4 m	Fornecido pela DRAALG
Área por planta	0,44 m ²	Fornecido pela DRAALG
Coefficiente de segurança	0,4	*

* Valores decididos durante o delineamento experimental do ensaio.

** Denominação atribuída neste trabalho ao número de clamidósporos presentes em cada grama de massa de clamidósporos obtida após extracção.

2. Cálculos:

a) Massa de solo a inocular por planta: Área por planta x profundidade x Dap:

11440g

b) N^o total de talhões inoculados: 2 modalidades (F e FB) x 4 repetições (talhões) x 1 estufa = 8

c) Quantidade de clamidósporos necessária (corrigida pela viabilidade)

(clamidósporos/inoculação): (N^o total de talhões inoculados (b)) x N^o de plantas a inocular por talhão x Massa de solo a inocular por planta (a) x nível de inoculação / (Viabilidade/100) = $5,31 \times 10^{10}$ clamidósporos

d) Massa de clamidósporos necessária corrigida pela viabilidade (gramas de clamidósporos/inoculação): Quantidade necessária de clamidósporos (c) / densidade granular dos clamidósporos = 605 g

e) Massa de clamidósporos produzida por Erlenmeyer de 250 ml (fermentador): Produção de PcMR x Quantidade de meio cultura sólido por Erlenmeyer / densidade granular dos clamidósporos = 3,82 g/Erlenmeyer

f) Quantidade de Erlenmeyers (fermentadores) necessária (n^o de Erlenmeyers/inoculação): Quantidade necessária de massa de clamidósporos (d) / Massa de clamidósporos produzida por Erlenmeyer (e) x (1 + coeficiente de segurança) = 164,71 Erlenmeyers

ANEXO III – Meios de cultura e suporte

1. “Corn Meal Agar” (CMA)

Por cada litro de água destilada adicionar:

17 g de “Corn Meal Agar”

Levar à autoclave e distribuir por placas de Petri

2. Meio Semi-selectivo (MSS)

Por cada litro de água destilada adicionar:

17 g de “ corn meal agar “ (CMA)

17,5 g de cloreto de sódio

75 mg de “ Rose bengal “

Perfazer até 0,75 L, autoclavar e adicionar com os restantes 0,25 L contendo:

3 ml de Triton X-100

50 mg de sulfato de estreptomicina

50 mg de cloranfenicol

50 mg de clorotetraciclina

37,5 mg de tiabendazol

37,5 mg de carbendazime

3. Meio água-agar 0,05% (WA)

Por cada litro de água destilada adicionar:

0,5 g de agar

Levar à autoclave e distribuir por frascos McCartney

ANEXO IV – Tabelas de dados

Tabela 1 – Densidade de PcMR no solo em todas as análises efectuadas, 1º ano. (c.f.u./ g de solo reais = valores apresentados x 1000 c.f.u. / g de solo). Rep. = Repetição da análise. Datas correspondem a datas de amostragem.

Modalidade	Talhão	Rep.	16-09-2002	06-10-2002	29-10-2002	11-11-2002	24-03-2003	31-03-2003	15-05-2003
B	B1	P1	0	0	0	0	0	0	0
B	B1	P2	0	0	0	0	0	0	0
B	B1	P3	0	0	0	0	0	0	0
B	B2	P1	0	0	0	0	0	0	0
B	B2	P2	0	0	0	0	0	0	0
B	B2	P3	0	0	0	0	0	0	0
B	B3	P1	0	0	0	0	0	0	0
B	B3	P2	0	0	0	0	0	0	0
B	B3	P3	0	0	0	0	0	0	0
B	B4	P1	0	0	0	0	0	0	0
B	B4	P2	0	0	0	0	0	0	0
B	B4	P3	0	0	0	0	0	0	0
FB	FB1	P1	0	22	0	2	16	46	24
FB	FB1	P2	0	25	0	1	16	49	18
FB	FB1	P3	0	21	0	0	11	48	15
FB	FB2	P1	0	23	9	33	8	48	22
FB	FB2	P2	0	10	4	25	6	38	19
FB	FB2	P3	0	9	6	47	10	26	24
FB	FB3	P1	0	24	4	25	21	25	29
FB	FB3	P2	0	16	5	19	15	32	27
FB	FB3	P3	0	12	10	27	14	23	37
FB	FB4	P1	0	16	0	40	17	26	22
FB	FB4	P2	0	13	0	56	16	37	22
FB	FB4	P3	0	15	0	50	14	33	21
F	F1	P1	0	8	3	8	9	33	46
F	F1	P2	0	8	1	19	16	39	29
F	F1	P3	0	11	0	13	13	30	35
F	F2	P1	0	22	1	34	3	33	20
F	F2	P2	0	24	1	37	4	28	23
F	F2	P3	0	22	1	34	7	34	21
F	F3	P1	0	106	1	25	66	47	35
F	F3	P2	0	17	5	13	65	46	26
F	F3	P3	0	10	1	18	45	47	26
F	F4	P1	0	24	0	13	12	42	33
F	F4	P2	0	22	0	25	11	63	31
F	F4	P3	0	16	2	18	11	59	35
T	T1	P1	0	0	0	0	0	0	0
T	T1	P2	0	0	0	0	0	0	0
T	T1	P3	0	0	0	0	0	0	0
T	T2	P1	0	0	0	0	0	0	0
T	T2	P2	0	0	0	0	0	0	0
T	T2	P3	0	0	4	0	0	0	0
T	T3	P1	0	0	0	0	0	0	0
T	T3	P2	0	0	0	0	0	0	0
T	T3	P3	0	0	0	0	0	0	0
T	T4	P1	0	0	0	0	0	0	0
T	T4	P2	0	0	0	0	0	0	0
T	T4	P3	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 2 – Densidade de PcMR na raiz, 1º ano. (c.f.u./ g de raiz reais = valores apresentados x 1000 c.f.u./ g de raiz). Rep. = Repetição da contagem. Datas correspondem a datas de amostragem.

Modalidade	Talhão	Rep.	15 05 2003
B	B1	P1	0
B	B1	P2	0
B	B1	P3	0
B	B2	P1	0
B	B2	P2	0
B	B2	P3	0
B	B3	P1	0
B	B3	P2	0
B	B3	P3	0
B	B4	P1	0
B	B4	P2	0
B	B4	P3	0
FB	FB1	P1	57
FB	FB1	P2	45
FB	FB1	P3	60
FB	FB2	P1	282
FB	FB2	P2	156
FB	FB2	P3	380
FB	FB3	P1	12
FB	FB3	P2	28
FB	FB3	P3	31
FB	FB4	P1	22
FB	FB4	P2	50
FB	FB4	P3	33
F	F1	P1	43
F	F1	P2	77
F	F1	P3	70
F	F2	P1	46
F	F2	P2	35
F	F2	P3	52
F	F3	P1	12
F	F3	P2	14
F	F3	P3	15
F	F4	P1	7
F	F4	P2	14
F	F4	P3	8
T	T1	P1	0
T	T1	P2	0
T	T1	P3	0
T	T2	P1	0
T	T2	P2	0
T	T2	P3	0
T	T3	P1	0
T	T3	P2	0
T	T3	P3	0
T	T4	P1	0
T	T4	P2	0
T	T4	P3	0

Tabela 3 – Densidade de outros fungos no solo em todas as análises efectuadas, 1º ano. (c.f.u./ g de solo reais = valores apresentados x 1000 c.f.u. / g de solo). Rep. = Repetição da análise. Datas correspondem a datas de amostragem.

Modalidade	Talhão	Rep.	16-09-2002	08-10-2002	29-10-2002	11-11-2002	24-03-2003	31-03-2003	15-05-2003
B	B1	P1	0	0	2	4	10	21	12
B	B1	P2	0	0	3	5	12	29	15
B	B1	P3	0	1	2	5	11	20	11
B	B2	P1	0	2	4	11	17	12	23
B	B2	P2	0	2	4	10	16	23	19
B	B2	P3	0	2	6	12	13	20	15
B	B3	P1	15	0	1	6	32	46	17
B	B3	P2	26	1	2	5	42	27	12
B	B3	P3	4	0	1	2	50	33	12
B	B4	P1	4	0	1	2	47	18	9
B	B4	P2	4	0	1	4	8	17	11
B	B4	P3	5	0	0	2	9	17	14
FB	FB1	P1	0	1	2	2	25	19	1
FB	FB1	P2	0	0	1	5	20	21	3
FB	FB1	P3	1	2	2	2	27	21	4
FB	FB2	P1	0	1	0	0	31	55	19
FB	FB2	P2	0	2	0	0	28	41	16
FB	FB2	P3	0	1	0	3	32	39	24
FB	FB3	P1	2	0	0	4	9	13	13
FB	FB3	P2	1	1	0	3	7	10	8
FB	FB3	P3	1	0	1	0	5	15	9
FB	FB4	P1	8	0	2	6	3	24	5
FB	FB4	P2	2	2	4	0	3	18	5
FB	FB4	P3	3	1	4	0	4	18	4
F	F1	P1	3	1	2	5	16	14	3
F	F1	P2	4	1	1	4	15	22	3
F	F1	P3	2	2	1	5	13	18	1
F	F2	P1	2	1	2	7	14	22	2
F	F2	P2	3	2	1	4	15	22	3
F	F2	P3	8	2	2	6	8	17	3
F	F3	P1	9	9	1	8	21	18	3
F	F3	P2	9	6	0	8	10	19	4
F	F3	P3	13	8	2	10	4	27	3
F	F4	P1	11	4	4	2	6	41	4
F	F4	P2	14	3	4	3	8	32	5
F	F4	P3	33	2	3	1	9	34	3
T	T1	P1	4	1	1	2	11	9	48
T	T1	P2	3	2	1	2	10	11	49
T	T1	P3	5	2	3	4	16	9	35
T	T2	P1	4	2	7	25	20	25	13
T	T2	P2	1	2	3	33	23	18	12
T	T2	P3	3	4	1	35	23	17	14
T	T3	P1	13	1	18	4	27	5	7
T	T3	P2	24	1	25	4	29	6	5
T	T3	P3	16	2	25	8	19	4	8
T	T4	P1	2	2	0	2	5	15	5
T	T4	P2	4	1	0	2	8	9	10
T	T4	P3	1	2	1	1	4	11	6

Tabela 4 – Densidade de outros fungos na raiz, 2º ano. (c.f.u./ g de raiz reais = valores apresentados x 1000 c.f.u./ g de raiz). Rep. = Repetição da contagem. Datas correspondem a datas de amostragem.

Modalidade	Talhão	Rep.	15-05-2003
B	B1	P1	553
B	B1	P2	726
B	B1	P3	627
B	B2	P1	300
B	B2	P2	435
B	B2	P3	390
B	B3	P1	515
B	B3	P2	560
B	B3	P3	393
B	B4	P1	33
B	B4	P2	25
B	B4	P3	36
FB	FB1	P1	4
FB	FB1	P2	6
FB	FB1	P3	4
FB	FB2	P1	19
FB	FB2	P2	10
FB	FB2	P3	19
FB	FB3	P1	6
FB	FB3	P2	8
FB	FB3	P3	3
FB	FB4	P1	4
FB	FB4	P2	7
FB	FB4	P3	7
F	F1	P1	13
F	F1	P2	16
F	F1	P3	10
F	F2	P1	5
F	F2	P2	6
F	F2	P3	14
F	F3	P1	5
F	F3	P2	5
F	F3	P3	7
F	F4	P1	4
F	F4	P2	2
F	F4	P3	5
T	T1	P1	5
T	T1	P2	9
T	T1	P3	7
T	T2	P1	68
T	T2	P2	180
T	T2	P3	94
T	T3	P1	14
T	T3	P2	15
T	T3	P3	15
T	T4	P1	2
T	T4	P2	3
T	T4	P3	6



Tabela 5 – Densidade de PcMR no solo em todas as análises efectuadas, 2º ano. (c.f.u./ g de solo reais = valores apresentados x 1000 c.f.u. / g de solo). Rep. = Repetição da análise. Datas correspondem a datas de amostragem.

Modalidade	Talhão	Rep.	13-11-2003	19-11-2003	20-02-2004	08-03-2004	10-05-2004	17-05-2004	22-06-2004
B	B1	P1	0	0	0	0	0	0	0
B	B1	P2	0	0	0	0	0	0	0
B	B1	P3	0	0	0	0	0	0	0
B	B2	P1	0	0	0	0	0	0	0
B	B2	P2	0	0	0	0	0	0	0
B	B2	P3	0	0	0	0	0	0	0
B	B3	P1	0	0	0	0	0	0	0
B	B3	P2	0	0	0	0	0	0	0
B	B3	P3	0	0	0	0	0	0	0
B	B4	P1	0	0	0	0	0	0	0
B	B4	P2	0	0	0	0	0	0	0
B	B4	P3	0	0	0	0	0	0	0
FB	FB1	P1	0	10	26	50	48	52	17
FB	FB1	P2	1	10	11	56	50	50	10
FB	FB1	P3	5	21	21	35	49	49	13
FB	FB2	P1	0	16	32	49	47	77	38
FB	FB2	P2	0	20	29	59	59	61	32
FB	FB2	P3	0	23	29	60	65	54	40
FB	FB3	P1	5	14	36	93	21	87	27
FB	FB3	P2	4	22	28	62	41	99	31
FB	FB3	P3	2	23	37	103	50	94	23
FB	FB4	P1	0	12	65	119	142	76	32
FB	FB4	P2	0	6	53	123	91	100	28
FB	FB4	P3	0	9	53	93	134	78	17
F	F1	P1	18	10	28	28	105	64	23
F	F1	P2	22	10	22	41	45	66	27
F	F1	P3	34	7	23	57	43	66	35
F	F2	P1	4	2	56	59	57	59	24
F	F2	P2	4	7	34	63	59	58	27
F	F2	P3	7	7	50	39	103	74	27
F	F3	P1	6	5	44	60	44	48	40
F	F3	P2	2	4	37	66	31	55	30
F	F3	P3	4	4	40	62	37	36	34
F	F4	P1	11	7	38	47	28	39	64
F	F4	P2	13	4	38	68	38	64	52
F	F4	P3	4	4	40	64	39	35	61
T	T1	P1	0	0	0	0	0	0	0
T	T1	P2	0	0	0	0	0	0	0
T	T1	P3	0	0	0	0	0	0	0
T	T2	P1	0	0	0	0	0	0	0
T	T2	P2	0	0	0	0	0	0	0
T	T2	P3	0	0	0	0	0	0	0
T	T3	P1	0	0	0	0	0	0	0
T	T3	P2	0	0	0	0	0	0	0
T	T3	P3	0	0	0	0	0	0	0
T	T4	P1	0	0	0	0	0	0	0
T	T4	P2	0	0	0	0	0	0	0
T	T4	P3	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 6 – Densidade de PcMR na raiz, 2º ano. (c.f.u./ g de raiz reais = valores apresentados x 1000 c.f.u./ g de raiz). Rep. = Repetição da contagem. Datas correspondem a datas de amostragem.

Modalidade	Talhão	Rep.	22-06-2004
B	B1	P1	0
B	B1	P2	0
B	B1	P3	0
B	B2	P1	1
B	B2	P2	0
B	B2	P3	0
B	B3	P1	0
B	B3	P2	0
B	B3	P3	0
B	B4	P1	0
B	B4	P2	0
B	B4	P3	0
FB	FB1	P1	1
FB	FB1	P2	0
FB	FB1	P3	0
FB	FB2	P1	0
FB	FB2	P2	0
FB	FB2	P3	0
FB	FB3	P1	0
FB	FB3	P2	0
FB	FB3	P3	1
FB	FB4	P1	1
FB	FB4	P2	0
FB	FB4	P3	1
F	F1	P1	2
F	F1	P2	3
F	F1	P3	3
F	F2	P1	0
F	F2	P2	1
F	F2	P3	1
F	F3	P1	1
F	F3	P2	2
F	F3	P3	0
F	F4	P1	0
F	F4	P2	1
F	F4	P3	0
T	T1	P1	0
T	T1	P2	0
T	T1	P3	0
T	T2	P1	0
T	T2	P2	0
T	T2	P3	0
T	T3	P1	0
T	T3	P2	0
T	T3	P3	0
T	T4	P1	0
T	T4	P2	0
T	T4	P3	0

Tabela 7 – Densidade de outros fungos no solo em todas as análises efectuadas, 2º ano. (c.f.u./ g de solo reais = valores apresentados x 1000 c.f.u. / g de solo). Rep. = Repetição da análise. Datas correspondem a datas de amostragem.

Modalidade	Talhão	Rep.	13-11-2003	19-11-2003	20-02-2004	08-03-2004	10-05-2004	17-05-2004	22-06-2004
B	B1	P1	10	12	11	135	24	17	57
B	B1	P2	9	12	7	131	23	20	53
B	B1	P3	10	14	14	129	48	14	77
B	B2	P1	9	13	1	33	7	17	9
B	B2	P2	9	17	1	31	9	181	9
B	B2	P3	7	12	29	19	11	25	11
B	B3	P1	4	1	0	7	5	5	23
B	B3	P2	0	1	1	9	1	5	17
B	B3	P3	1	1	1	3	1	11	28
B	B4	P1	2	3	1	6	7	24	6
B	B4	P2	2	7	2	5	2	28	12
B	B4	P3	3	1	1	1	6	43	12
FB	FB1	P1	8	3	5	1	15	37	37
FB	FB1	P2	3	6	6	2	15	63	43
FB	FB1	P3	3	8	6	0	13	63	39
FB	FB2	P1	2	6	3	6	14	3	14
FB	FB2	P2	2	8	4	5	15	6	14
FB	FB2	P3	2	6	3	4	12	12	17
FB	FB3	P1	1	1	0	30	18	7	44
FB	FB3	P2	4	3	2	26	32	9	43
FB	FB3	P3	1	2	1	19	29	11	43
FB	FB4	P1	3	3	1	4	3	3	11
FB	FB4	P2	2	4	0	7	4	13	14
FB	FB4	P3	3	4	2	7	2	11	13
F	F1	P1	7	8	6	6	19	22	18
F	F1	P2	6	5	6	5	26	26	19
F	F1	P3	4	5	10	9	20	19	18
F	F2	P1	2	11	2	3	17	33	34
F	F2	P2	2	16	3	2	14	42	38
F	F2	P3	2	18	3	3	21	62	37
F	F3	P1	3	12	2	5	23	12	23
F	F3	P2	5	11	3	6	4	14	20
F	F3	P3	4	21	4	6	3	7	25
F	F4	P1	2	5	2	6	8	12	24
F	F4	P2	2	11	3	6	9	10	10
F	F4	P3	6	9	2	4	11	7	7
T	T1	P1	8	8	7	10	22	13	91
T	T1	P2	10	10	4	12	18	17	78
T	T1	P3	9	12	4	14	27	20	62
T	T2	P1	16	11	1	8	2	33	10
T	T2	P2	15	10	1	5	4	28	15
T	T2	P3	16	63	1	3	2	46	15
T	T3	P1	34	14	4	4	31	23	41
T	T3	P2	29	9	6	12	20	41	23
T	T3	P3	27	9	7	6	24	35	17
T	T4	P1	10	38	1	6	3	10	20
T	T4	P2	10	11	2	10	4	5	13
T	T4	P3	11	11	20	8	6	6	6

Tabela 8 - Densidade de outros fungos na raiz, 2º ano. (c.f.u./ g de raiz reais = valores apresentados x 1000 c.f.u./ g de raiz). Rep. = Repetição da contagem. Datas correspondem a datas de amostragem.

Modalidade	Talhão	Rep.	22 06 2004
B	B1	P1	3
B	B1	P2	2
B	B1	P3	1
B	B2	P1	0
B	B2	P2	0
B	B2	P3	0
B	B3	P1	0
B	B3	P2	0
B	B3	P3	1
B	B4	P1	350
B	B4	P2	300
B	B4	P3	325
FB	FB1	P1	1
FB	FB1	P2	1
FB	FB1	P3	2
FB	FB2	P1	7
FB	FB2	P2	8
FB	FB2	P3	11
FB	FB3	P1	1
FB	FB3	P2	1
FB	FB3	P3	0
FB	FB4	P1	5
FB	FB4	P2	5
FB	FB4	P3	7
F	F1	P1	22
F	F1	P2	27
F	F1	P3	41
F	F2	P1	1
F	F2	P2	0
F	F2	P3	1
F	F3	P1	1
F	F3	P2	0
F	F3	P3	0
F	F4	P1	3
F	F4	P2	1
F	F4	P3	1
T	T1	P1	1
T	T1	P2	1
T	T1	P3	0
T	T2	P1	5
T	T2	P2	7
T	T2	P3	5
T	T3	P1	1
T	T3	P2	1
T	T3	P3	1
T	T4	P1	2
T	T4	P2	1
T	T4	P3	0

Tabela 9 – Nº de (ovos+j2)/g raiz de *Meloidogyne* sp. e nº de ovos/massa de ovos de *Meloidogyne* sp. (0- significa que não havia massas de ovos) , 1º ano. Rep. = repetição de contagem (dados cedidos pelo Instituto de ambiente e vida).

Modalidade	Talhão	Rep.	Ovos + j2/ g de raiz	Ovos / massa de ovos
B	B1	C1	0	0
B	B1	C2	0	0
B	B1	C3	0	0
B	B2	C1	0	0
B	B2	C2	0	0
B	B2	C3	0	0
B	B3	C1	0	0
B	B3	C2	0	0
B	B3	C3	0	0
B	B4	C1	0	0
B	B4	C2	0	0
B	B4	C3	0	0
FB	FB1	C1	0	0
FB	FB1	C2	0	0
FB	FB1	C3	0	0
FB	FB2	C1	0	0
FB	FB2	C2	0	0
FB	FB2	C3	0	0
FB	FB3	C1	273	137
FB	FB3	C2	360	180
FB	FB3	C3	313	313
FB	FB4	C1	0	0
FB	FB4	C2	0	0
FB	FB4	C3	0	0
F	F1	C1	0	0
F	F1	C2	0	0
F	F1	C3	0	0
F	F2	C1	0	0
F	F2	C2	0	0
F	F2	C3	0	0
F	F3	C1	867	289
F	F3	C2	640	213
F	F3	C3	2180	545
F	F4	C1	1420	284
F	F4	C2	1346	673
F	F4	C3	1773	235
T	T1	C1	0	0
T	T1	C2	0	0
T	T1	C3	578	116
T	T2	C1	0	0
T	T2	C2	0	0
T	T2	C3	0	0
T	T3	C1	0	0
T	T3	C2	0	0
T	T3	C3	0	0
T	T4	C1	0	0
T	T4	C2	0	0
T	T4	C3	0	0

Tabela 10 – Nº de (ovos+j2)/g raiz de *Meloidogyne* sp. e nº de ovos/massa de ovos de *Meloidogyne* sp. (0-significa que não havia massas de ovos), 2º ano. Rep. = repetição de contagem (dados cedidos pelo Instituto de ambiente e vida).

Modalidade	Talhão	Rep.	Ovos + j2/ g de raiz	Ovos / massa de ovos
B	B1	C1	0	0
B	B1	C2	0	0
B	B1	C3	0	0
B	B2	C1	0	0
B	B2	C2	0	0
B	B2	C3	0	0
B	B3	C1	0	0
B	B3	C2	0	0
B	B3	C3	0	0
B	B4	C1	0	0
B	B4	C2	0	0
B	B4	C3	0	0
FB	FB1	C1	0	0
FB	FB1	C2	0	0
FB	FB1	C3	0	0
FB	FB2	C1	0	0
FB	FB2	C2	0	0
FB	FB2	C3	0	0
FB	FB3	C1	0	0
FB	FB3	C2	0	0
FB	FB3	C3	0	0
FB	FB4	C1	0	0
FB	FB4	C2	0	0
FB	FB4	C3	0	0
F	F1	C1	0	0
F	F1	C2	0	0
F	F1	C3	0	0
F	F2	C1	0	0
F	F2	C2	0	0
F	F2	C3	0	0
F	F3	C1	0	0
F	F3	C2	0	0
F	F3	C3	0	0
F	F4	C1	364	145
F	F4	C2	608	135
F	F4	C3	312	285
T	T1	C1	22960	260
T	T1	C2	32400	171
T	T1	C3	36000	185
T	T2	C1	0	0
T	T2	C2	0	0
T	T2	C3	0	0
T	T3	C1	0	0
T	T3	C2	0	0
T	T3	C3	0	0
T	T4	C1	596	264
T	T4	C2	0	369
T	T4	C3	588	329

Temperaturas do solo (cedidas pela DRAALG)

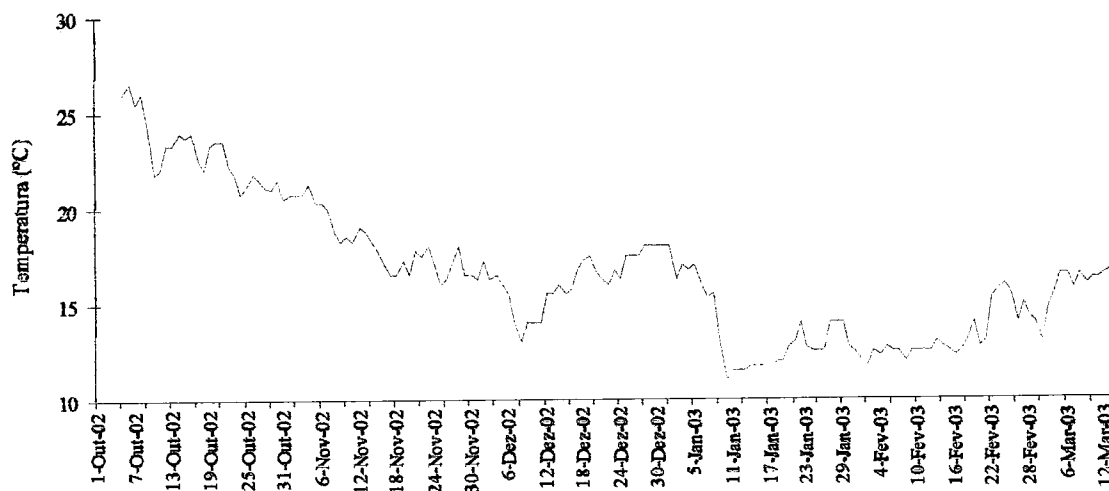


Fig. 1. Temperatura do solo medida a 10cm de profundidade. 1º ano.

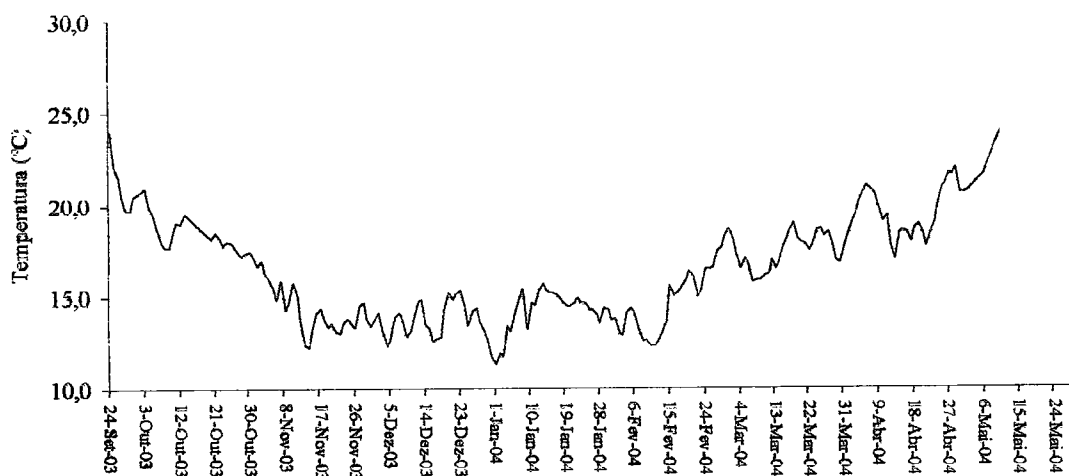


Fig. 2. Temperatura do solo medida a 10cm de profundidade. 2º ano.

ANEXO V – Tratamento estatístico

Nota: As datas apresentadas nas tabelas correspondem a datas de amostragem de solo ou raiz

1. Estatística descritiva

1.1. Médias e erro padrão da média de densidades de PcMR no solo (c.f.u./ g de solo reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de solo). (1º ano).

Modalidade		16-09-2002	08-10-2002	29-10-2002	11-11-2002	24-03-2003	31-03-2003	15-05-2003
F	Média	0,00	23,92	1,04	21,21	21,63	41,46	29,67
	Erro Padrão da média	0,00	7,63	0,40	2,78	6,66	3,22	2,16
FB	Média	0,00	16,92	3,13	27,00	13,29	35,67	23,08
	Erro Padrão da média	0,00	1,62	1,06	5,55	1,23	2,78	1,61
B	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Erro Padrão da média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T	Média	0,00	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00
	Erro Padrão da média	0,00	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00

1.2. Médias e erro padrão da média de densidades de PcMR no solo (c.f.u./ g de solo reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de solo). (2º ano)

Modalidade		13-11-2003	19-11-2003	20-02-2004	08-03-2004	10-05-2004	17-05-2004	22-06-2004
F	Média	10,42	5,71	37,25	54,21	52,08	55,13	36,83
	Erro Padrão da média	2,80	0,72	2,86	3,66	7,45	3,75	4,15
FB	Média	1,25	15,21	34,67	74,83	66,21	72,92	25,42
	Erro Padrão da média	0,54	1,81	4,40	8,54	10,74	5,59	2,83
B	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Erro Padrão da média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Erro Padrão da média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

1.3. Médias e erro padrão da média de densidades de PcMR na raiz (c.f.u./ g de raiz reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de raiz). (1º ano).

Modalidade	Média	Erro Padrão da média
F	32,58	7,16
FB	96,17	33,93
B	0,00	0,000
T	0,00	0,000

1.4. Médias e erro padrão da média de densidades de PcMR na raiz (c.f.u./ g de raiz reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de raiz). (2º ano).

Modalidade	Média	Erro Padrão da média
F	0,96	0,292
FB	0,17	0,071
B	0,04	0,042
T	0,00	0,000

1.5. Médias e erro padrão da média de densidades de outros fungos no solo (c.f.u./ g de solo reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de outros fungos). (1º ano)

Modalidade		16-09-2002	08-10-2002	29-10-2002	11-11-2002	24-03-2003	31-03-2003	15-05-2003
F	Média	2,52	0,82	0,34	0,79	1,43	2,30	0,30
	Erro Padrão da média	1,42	0,67	1,21	1,96	15,79	24,38	9,08
FB	Média	0,66	0,18	0,43	0,59	3,46	3,85	2,09
	Erro Padrão da média	4,71	0,50	2,00	5,46	22,00	23,33	13,88
B	Média	2,26	0,21	0,50	1,01	4,60	2,60	1,18
	Erro Padrão da média	6,67	1,54	7,00	9,96	16,04	11,21	17,54
T	Média	2,07	0,26	2,83	3,72	2,43	1,78	4,76
	Erro Padrão da média	2,52	0,82	0,34	0,79	1,43	2,30	0,30

1.6. Médias e erro padrão da média de densidades de outros fungos no solo (c.f.u./ g de solo reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de outros fungos). (2º ano)

Modalidade		13-11-2003	19-11-2003	20-02-2004	08-03-2004	10-05-2004	17-05-2004	22-06-2004
F	Média	3,42	10,71	3,58	4,75	14,21	21,88	22,46
	Erro Padrão da média	0,58	1,49	0,69	0,56	2,20	4,77	2,85
FB	Média	2,58	4,17	2,46	9,08	14,04	19,63	27,33
	Erro Padrão da média	0,53	0,66	0,61	2,92	2,66	6,34	4,22
B	Média	5,25	7,58	5,54	42,21	11,75	32,04	25,75
	Erro Padrão da média	1,09	1,79	2,52	15,86	3,89	13,83	6,73
T	Média	15,96	16,96	4,54	7,92	13,29	22,79	32,42
	Erro Padrão da média	2,55	4,80	1,50	0,99	3,20	3,96	8,34

1.7. Médias e erro padrão da média de densidades de outros fungos na raiz (c.f.u./ g de raiz reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de raiz). (1º ano).

Modalidade	Média	Erro Padrão da média
F	7,96	3,95
FB	3,88	1,04
B	81,75	42,46
T	1,75	0,65

1.8. Médias e erro padrão da média de densidades de outros fungos na raiz (c.f.u./ g de raiz reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de raiz). (2º ano).

Modalidade	Média	Erro Padrão da média
F	7,38	1,28
FB	7,83	1,54
B	382,50	69,38
T	34,63	15,64

2. Análise de variância, análise multivariada, Teste de Levene e testes “post hoc”

2.1. Teste de Levene de homogeneidade das variâncias, PcMR no solo, 1º ano

Data de amostragem	F	df	Sig.
16-09-2002	.	44	.
08-10-2002	3,94	44	0,014
29-10-2002	20,69	44	0,000
11-11-2002	17,64	44	0,000
24-03-2003	22,25	44	0,000
31-03-2003	21,39	44	0,000
15-05-2003	13,23	44	0,000

2.2. Teste Tamhane's T2 – Teste de comparação de médias, PcMR no solo, 1º ano. (c.f.u./ g de solo reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de solo)

Manova-teste de Tamhane ^{a,b,c} - População de PcMR no solo	Modalidade	N	Subgrupo média (c.f.u./g de solo)		
			1	2	3
16-09-2002	B	12	0,00		
	T	12	0,00		
	FB	12	0,00		
	F	12	0,00		
08-10-2002	B	12	0,00		
	T	12	0,00		
	FB	12		16,92	
	F	12	23,92	23,92	
29-10-2002	B	12	0,00		
	T	12	0,29		
	F	12	1,04		
	FB	12	3,13		
11-11-2002	B	12	0,00		
	T	12	0,00		
	F	12		21,21	
	FB	12		27,00	
24-03-2003	B	12	0,00		
	T	12	0,00		
	FB	12		13,29	
	F	12		21,62	
31-03-2003	B	12	0,00		
	T	12	0,00		
	FB	12		35,67	
	F	12		41,46	
15-05-2003	B	12	0		
	T	12	0		
	FB	12		23,08	
	F	12		29,67	

a – baseado nas medias observadas

b - A diferença da media é significativa a 0,05

c- não homogeneidade das varianças de acordo com o teste de Levene

2.3. Teste de Levene de homogeneidade das variâncias, PcMR no solo, 2º ano

Data de amostragem	F	df	Sig.
13-11-2003	17,037	44	0,000
19-11-2003	37,693	44	0,000
20-02-2004	12,411	44	0,000
08-03-2004	39,407	44	0,000
10-05-2004	11,985	44	0,000
17-05-2004	25,917	44	0,000
22-06-2004	18,956	44	0,000

Homogeneidade de variâncias quando o nível de significância é superior a 0.05.

2.4. Teste Tamhane's T2 – Teste de comparação de médias, PcMR no solo, 2º ano. (c.f.u./ g de solo reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de solo)

Manova-teste de Tamhane ^{a,b,c} – População de PcMR no solo	Modalidade	N	Subgrupo média (c.f.u./g de solo)		
			1	2	3
13-11-2003	B	12	0,00		
	T	12	0,00		
	FB	12	1,25		
	F	12		10,42	
19-11-2003	B	12	0,00		
	T	12	0,00		
	FB	12		5,71	
	F	12			15,21
20-02-2004	B	12	0,00		
	T	12	0,00		
	FB	12		34,67	
	F	12		37,25	
08-03-2004	B	12	0,00		
	T	12	0,00		
	FB	12		54,21	
	F	12		74,83	
10-05-2004	B	12	0,00		
	T	12	0,00		
	FB	12		52,08	
	F	12		66,21	
17-05-2004	B	12	0,00		
	T	12	0,00		
	FB	12		55,13	
	F	12		72,92	
22-06-2004	B	12	0,00		
	T	12	0,00		
	FB	12		25,42	
	F	12		36,83	

a – baseado nas médias observadas

b - A diferença da média é significativa a 0,05

c- não homogeneidade das variâncias de acordo com o teste de Levene

2.5. Teste t-Student para comparação de médias de PcMR - método das amostras emparelhadas. 1º ano .
Modalidade F. (c.f.u./ g de solo reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de solo)

Amostras emparelhadas								
	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	Intervalo de confiança 95%		t	df	Sig.
				inferior	superior			
16-09-2002 - 08-10-2002	-23,917	26,443	7,633	-40,718	-7,116	-3,133	11	0,010
08-10-2002 - 29-10-2002	22,875	26,746	7,721	5,881	39,869	2,963	11	0,013
29-10-2002 - 11-11-2002	-20,167	10,356	2,989	-26,746	-13,587	-6,746	11	0,000
11-11-2002 - 24-03-2003	-,417	27,285	7,876	-17,752	16,919	-,053	11	0,959
24-03-2003 - 31-03-2003	-19,833	22,179	6,403	-33,925	-5,741	-3,098	11	0,010
31-03-2003 - 15-05-2003	11,792	12,274	3,543	3,993	19,590	3,328	11	0,007
16-09-2002 - 29-10-2002	-1,042	1,373	,396	-1,914	-,169	-2,629	11	0,023
29-10-2002 - 24-03-2003	-20,583	22,545	6,508	-34,908	-6,259	-3,163	11	0,009
24-03-2003 - 15-05-2003	-8,042	23,863	6,889	-23,203	7,120	-1,167	11	0,268
08-10-2002 - 11-11-2002	2,708	25,575	7,383	-13,541	18,958	,367	11	0,721
11-11-2002 - 31-03-2003	-20,250	16,149	4,662	-30,511	-9,989	-4,344	11	0,001

2.6. Teste t-Student para comparação de médias de PcMR – método das amostras emparelhadas. 1º ano .
Modalidade FB. (c.f.u./ g de solo reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de solo)

Amostras emparelhadas								
	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	Intervalo de confiança 95%		t	df	Sig.
				inferior	superior			
16-09-2002 - 08-10-2002	-16,917	5,628	1,625	-20,493	-13,341	-10,412	11	0,000
08-10-2002 - 29-10-2002	13,792	7,460	2,154	9,052	18,532	6,404	11	0,000
29-10-2002 - 11-11-2002	-23,875	19,088	5,510	-36,003	-11,747	-4,333	11	0,001
11-11-2002 - 24-03-2003	13,708	19,757	5,703	1,155	26,261	2,404	11	0,035
24-03-2003 - 31-03-2003	-22,375	11,788	3,403	-29,865	-14,885	-6,575	11	0,000
31-03-2003 - 15-05-2003	12,583	14,145	4,083	3,596	21,571	3,082	11	0,010
16-09-2002 - 29-10-2002	-3,125	3,669	1,059	-5,456	-,794	-2,951	11	0,013
29-10-2002 - 24-03-2003	-10,167	6,617	1,910	-14,371	-5,962	-5,322	11	0,000
24-03-2003 - 15-05-2003	-9,792	5,798	1,674	-13,475	-6,108	-5,851	11	0,000
08-10-2002 - 11-11-2002	-10,083	23,044	6,652	-24,725	4,558	-1,516	11	0,158
11-11-2002 - 31-03-2003	-8,667	25,771	7,439	-25,041	7,708	-1,165	11	0,269

2.7. Teste t-Student para comparação de médias de PcMR - método das amostras emparelhadas. 2º ano .
 Modalidade F. (c.f.u./ g de solo reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de solo)

Amostras emparelhadas								
	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	Intervalo de confiança 95%		t	df	Sig.
				inferior	superior			
13-11-2003 - 19-11-2003	4,708	8,540	2,465	-,718	10,134	1,910	11	0,083
19-11-2003 - 20-02-2004	-31,542	11,887	3,431	-39,094	-23,989	-9,192	11	0,000
20-02-2004 - 08-03-2004	-16,958	13,890	4,010	-25,784	-8,133	-4,229	11	0,001
08-03-2004 - 10-05-2004	2,125	35,924	10,370	-20,700	24,950	,205	11	0,841
10-05-2004 - 17-05-2004	-3,042	21,023	6,069	-16,399	10,316	-,501	11	0,626
17-05-2004 - 22-06-2004	18,292	24,664	7,120	2,621	33,962	2,569	11	0,026
13-11-2003 - 20-02-2004	-26,833	18,259	5,271	-38,434	-15,232	-5,091	11	0,000
20-02-2004 - 10-05-2004	-14,833	26,767	7,727	-31,840	2,174	-1,920	11	0,081
10-05-2004 - 22-06-2004	15,250	36,076	10,414	-7,672	38,172	1,464	11	0,171
19-11-2003 - 08-03-2004	-48,500	14,658	4,231	-57,813	-39,187	-11,462	11	0,000
08-03-2004 - 17-05-2004	-,917	21,510	6,209	-14,583	12,750	-,148	11	0,885

2.8. Teste t-Student para comparação de médias de PcMR - método das amostras emparelhadas. 2º ano .
 Modalidade FB. (c.f.u./ g de solo reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de solo)

Amostras emparelhadas								
	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	Intervalo de confiança 95%		t	df	Sig.
				inferior	inferior			
13-11-2003-19-11-2003	-13,958	5,754	1,661	-17,614	-10,302	-8,403	11	0,000
19-11-2003-20-02-2004	-19,458	18,529	5,349	-31,231	-7,685	-3,638	11	0,004
20-02-2004-08-03-2004	-40,167	18,423	5,318	-51,872	-28,461	-7,552	11	0,000
08-03-2004-10-05-2004	8,625	31,763	9,169	-11,556	28,806	,941	11	0,367
10-05-2004-17-05-2004	-6,708	40,144	11,589	-32,215	18,798	-,579	11	0,574
17-05-2004 - 22-06-2004	47,500	18,559	5,358	35,708	59,292	8,866	11	0,000
13-11-2003-20-02-2004	-33,417	15,870	4,581	-43,500	-23,333	-7,294	11	0,000
20-02-2004-10-05-2004	-31,542	26,820	7,742	-48,583	-14,501	-4,074	11	0,002
10-05-2004 - 22-06-2004	40,792	38,152	11,014	16,551	65,032	3,704	11	0,003
19-11-2003-08-03-2004	-59,625	32,593	9,409	-80,333	-38,917	-6,337	11	0,000
08-03-2004-17-05-2004	1,917	21,523	6,213	-11,758	15,591	,308	11	0,763

2.9. Teste t-Student para comparação de médias de PcMR - método das amostras emparelhadas entre valores da análise final do primeiro ano e os valores da primeira a análise do 2º ano . Modalidade F (c.f.u./ g de solo reais – valores representados x 1000 c.f.u. / g de solo)

Amostras emparelhadas								
	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	Intervalo de confiança 95%		t	df	Sig.
				inferior	inferior			
15-05-2003 – 13-11-2003	36,83	14,38	4,15	27,70	45,97	8,87	11	0,000

2.10. Teste t-Student para comparação de médias de PcMR - método das amostras emparelhadas entre valores da análise final do primeiro ano e os valores da primeira a análise do 2º ano . Modalidade FB (c.f.u./ g de solo reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de solo)

Amostras emparelhadas								
	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	Intervalo de confiança 95%		t	df	Sig.
				inferior	inferior			
15-05-2003 – 13-11-2003	25,42	9,80	2,83	19,19	31,64	8,98	11	0,000

2.11. Teste t-Student para comparação de médias de PcMR - método das amostras emparelhadas entre 1º ano e 2º ano . Modalidade F (c.f.u./ g de solo reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de solo)

Amostras emparelhadas								
	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	Intervalo de confiança 95%		t	df	Sig.
				inferior	inferior			
16-09-2002 - 13-11-2003	10,42	9,69	2,80	4,26	16,57	3,72	11	0,003
29-10-2002 - 20-02-2004	36,21	10,23	2,95	29,71	42,71	12,26	11	0,000
24-03-2003 - 10-05-2004	30,46	40,93	11,82	4,45	56,46	2,58	11	0,026
15-05-2003 - 22-06-2004	7,17	14,13	4,08	-1,81	16,14	1,76	11	0,107

2.12. Teste t-Student para comparação de médias de PcMR - método das amostras emparelhadas entre 1º ano e 2º ano . Modalidade FB (c.f.u./ g de solo reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de solo)

Amostras emparelhadas								
	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	Intervalo de confiança 95%		t	df	Sig.
				inferior	inferior			
16-09-2002 - 13-11-2003	1,25	1,86	0,54	0,07	2,43	2,32	11	0,040
29-10-2002 - 20-02-2004	31,54	16,20	4,68	21,25	41,84	6,74	11	0,000
24-03-2003 - 10-05-2004	52,92	37,01	10,68	29,40	76,43	4,95	11	0,000
15-05-2003 - 22-06-2004	2,33	10,01	2,89	-4,02	8,69	0,81	11	0,436

2.13. Teste de Levene de homogeneidade das variâncias de PcMR na raiz, todas as modalidades, 1º ano

Análise	F	df	Sig.
PcMR	15,4	44	0,000

2.14. Teste Tamhane 's T2 – Teste “post-hoc” de comparação de médias de PcMR na raiz, 1º ano

Manova-teste de Tamhane ^{a,b,c} - PcMR na raiz	Modalidade	N	Subgrupo – média (c.f.u./g de raiz)	
			1	2
PcMR	B	12	0	
	T	12	0	
	FB	12	96,17	96,17
	F	12		32,58

a – baseado nas medias observadas

b - A diferença da media é significativa a 0,05

c- não igualdade das varianças de acordo com o teste de Levene

2.15. Teste de Levene de homogeneidade das variâncias de PcMR na raiz, todas as modalidades, 2º ano

Análise	F	df2	Sig.
PcMR	19,50	44	0,000

2.16. Teste Tamhane 's T2 – Teste “post-hoc” de comparação de médias de PcMR na raiz, 2º ano

Manova-teste de Tamhane ^{a,b,c} - PcMR na raiz	Modalidade	N	Subgrupo – média (c.f.u./g de raiz)		
			1	2	3
PcMR	B	12	0,00		
	T	12	0,00		
	FB	12	0,17	0,17	
	F	12		0,96	

a – baseado nas medias observadas

b - A diferença da media é significativa a 0,05

c- não igualdade das varianças de acordo com o teste de Levene

2.17. Teste-t Student para comparação de médias de PcMR - método médias emparelhadas (entre 1º ano e 2º ano). Modalidade F (c.f.u./ g de raiz reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de raiz)

Amostras emparelhadas						t	df	Sig.
	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	Intervalo de confiança 95%				
				inferior	inferior			
15-05-2003 – 22-06-2004	31,63	24,04	6,94	16,35	46,90	4,56	11	0,001

2.18. Teste-t Student para comparação de médias de PcMR - método médias emparelhadas (entre 1º ano e 2º ano). Modalidade FB (c.f.u./ g de raiz reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de raiz)

Amostras emparelhadas						t	df	Sig.
	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	Intervalo de confiança 95%				
				inferior	inferior			
15-05-2003 – 22-06-2004	96,00	117,63	33,96	21,26	170,74	2,83	11	0,016

2.19. Teste de Levene de homogeneidade das variâncias outros fungos no solo, todas as modalidades, 1º ano

Análise	F	df	Sig.
16-09-2002	2,10	44	0,114
08-10-2002	9,99	44	0,000
29-10-2002	17,37	44	0,000
11-11-2002	15,04	44	0,000
10-05-2004	10,26	44	0,000
31-03-2003	1,97	44	0,133
15-05-2003	13,06	44	0,000

Homogeneidade de variâncias quando o nível de significância é superior a 0.05.

2.20. Análise multivariada, outros fungos no solo, todas as modalidades, 1º ano

Teste "Between-Subjects Effects"						
Fonte	Variável dependente	Tipo III soma dos quadrados	df	média ao quadrado	F	Sig.
Modelo corrigido	16-09-2002*	363,77	3	121,26	2,50	0,072*
	08-10-2002	58,88	3	19,63	8,06	0,000
	29-10-2002	260,04	3	86,68	3,39	0,026
	11-11-2002*	392,89	3	130,96	2,75	0,054*
	24-03-2003*	709,88	3	236,63	1,92	0,141*
	31-03-2003	1431,85	3	477,28	5,29	0,003
	15-05-2003	1455,79	3	485,26	5,68	0,002
Modalidade	16-09-2002	363,77	3	121,26	2,50	0,072
	08-10-2002	58,88	3	19,63	8,06	0,000
	29-10-2002	260,04	3	86,68	3,39	0,026
	11-11-2002	392,89	3	130,96	2,75	0,054
	24-03-2003	709,88	3	236,63	1,92	0,141
	31-03-2003	1431,85	3	477,28	5,29	0,003
	15-05-2003	1455,79	3	485,26	5,68	0,002
Erro	16-09-2002	2135,73	44	48,54		
	08-10-2002	107,13	44	2,43		
	29-10-2002	1125,46	44	25,58		
	11-11-2002	2092,60	44	47,56		
	24-03-2003	5427,63	44	123,36		
	31-03-2003	3971,63	44	90,26		
	15-05-2003	3761,88	44	85,50		
Total	16-09-2002	3913,25	48			
	08-10-2002	274,00	48			
	29-10-2002	1817,50	48			
	11-11-2002	3976,25	48			
	24-03-2003	18812,50	48			
	31-03-2003	25863,50	48			
	15-05-2003	10851,00	48			

* Nível de significância superior a 0,05. Não existem diferenças significativas.

2.21. Teste Duncan – Teste "post-hoc" de comparação de médias dos outros fungos no solo, todas as modalidades, 1º ano

	Modalidade	N	Subgrupo	
			1	2
31-03-2003	B	12	11,21	
	T	12		23,33
	FB	12		23,67
	F	12		24,38

Nível de significância de 0,05

2.22. Teste Tamhane's T2 – Teste “post-hoc” de comparação de médias de outros fungos no solo, todas as modalidades, 1º ano

Manova-teste de Tamhane ^{a,b,c} - outros fungos no solo	Modalidade	N	Subgrupo – média (c.f.u./g de solo)		
			1	2	3
08-10-2002	B	12	0,50		
	T	12		1,54	1,54
	FB	12	0,67	0,67	
	F	12			3,29
29-10-2002	B	12	1,21		
	T	12	1,79		
	FB	12	2,00		
	F	12	7,00		
15-05-2003	B	12		13,88	
	T	12	17,54	17,54	
	FB	12	9,08	9,08	
	F	12	2,83		

a – baseado nas médias observadas

b - A diferença da média é significativa a 0,05

c- não igualdade das variâncias de acordo com o teste Levene

2.23. Teste de Levene de homogeneidade das variâncias outros fungos no solo, todas as modalidades, 2º ano

Análise	F	df	Sig.
13-11-2003	10,20565	44	0,000
19-11-2003	4,872029	44	0,005
20-02-2004	4,62394	44	0,007
08-03-2004	23,12069	44	0,000
10-05-2004	1,378521	44	0,262
17-05-2004	1,263163	44	0,299
22-06-2004	5,10476	44	0,004

Homogeneidade de variâncias quando o nível de significância é superior a 0.05.

2.24. Análise multivariada, outros fungos no solo, todas as modalidades, 2º ano

Teste "Between-Subjects Effects"						
Fonte	Variável dependente	Tipo III soma dos quadrados	df	média ao quadrado	F	Sig.
Modelo corrigido	13-11-2003	1386,06	3	462,02	18,53	0,00
	19-11-2003	1064,44	3	354,81	4,09	0,01
	20-02-2004*	62,60	3	20,87	0,74	0,54*
	08-03-2004	11119,43	3	3706,48	4,73	0,01
	10-05-2004*	45,31	3	15,10	0,13	0,94*
	17-05-2004*	1077,08	3	359,03	0,44	0,72*
	22-06-2004*	619,68	3	206,56	0,49	0,69*
Modalidade	13-11-2003	1386,06	3	462,02	18,53	0,00
	19-11-2003	1064,44	3	354,81	4,09	0,01
	20-02-2004	62,60	3	20,87	0,74	0,54
	08-03-2004	11119,43	3	3706,48	4,73	0,01
	10-05-2004	45,31	3	15,10	0,13	0,94
	17-05-2004	1077,08	3	359,03	0,44	0,72
	22-06-2004	619,68	3	206,56	0,49	0,69
Erro	13-11-2003	1096,81	44	24,93		
	19-11-2003	3813,04	44	86,66		
	20-02-2004	1247,60	44	28,35		
	08-03-2004	34494,31	44	783,96		
	10-05-2004	4924,94	44	111,93		
	17-05-2004	35615,08	44	809,43		
	22-06-2004	18591,56	44	422,54		
Total	13-11-2003	4703,75	48			
	19-11-2003	9538,50	48			
	20-02-2004	2090,25	48			
	08-03-2004	3976,25	48			
	10-05-2004	18812,50	48			
	17-05-2004	25863,50	48			
	22-06-2004	10851,00	48			

* Nível de significância superior a 0,05. Não existem diferenças significativas.

2.25. Teste Tamhane's T2 – Teste "post-hoc" de comparação de médias de outros fungos no solo, 2º ano

Manova-teste de Tamhane ^{a,b,c} outros fungos no solo	Modalidade	N	Subgrupo – média (c.f.n./g de solo)		
			1	2	3
13-11-2003	B	12	5,25		
	T	12		15,96	
	FB	12	2,58		
	F	12	3,42		
19-11-2003	B	12	7,58	7,58	
	T	12	16,96	16,96	
	FB	12	4,17		
	F	12		10,71	
08-03-2004	B	12	42,21		
	T	12	7,92		
	FB	12	9,08		
	F	12	4,75		

a - baseado nas médias observadas

b - A diferença da média é significativa a 0,05

c- não igualdade das variâncias de acordo com o teste Levene

2.26. Teste t-Student para comparação de médias de outros fungos - método médias emparelhadas (1º ano e 2º ano). Modalidade B (c.f.u./ g de solo reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de solo)

Amostras emparelhadas						t	df	Sig.
	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	Intervalo de confiança 95%				
				inferior	superior			
16-9-2002 - 08-10-2002	4,21	8,04	2,32	-0,90	9,32	1,81	11	0,097
08-10-2002 - 29-10-2002	-1,50	1,21	0,35	-2,27	-0,73	-4,31	11	0,001
29-10-2002- 11-11-2002	-3,46	2,18	0,63	-4,84	-2,07	-5,50	11	0,000
11-11-2002 - 24-03-2003	-16,54	17,38	5,02	-27,59	-5,50	-3,30	11	0,007
24-03-2003 - 31-03-2003	-1,33	14,50	4,19	-10,55	7,88	-0,32	11	0,756
31-03-2003 - 15-05-2003	9,46	9,87	2,85	3,19	15,73	3,32	11	0,007
15-05-2003 - 13-11-2003	8,63	4,15	1,20	5,99	11,26	7,20	11	0,000
13-11-2003 - 19-11-2003	-2,33	3,31	0,96	-4,44	-0,23	-2,44	11	0,033
19-11-2003 - 20-02-2004	2,04	7,98	2,30	-3,03	7,11	0,89	11	0,395
20-02-2004 - 08-03-2004	-36,67	52,33	15,11	-69,92	-3,42	-2,43	11	0,034
08-03-2004 - 10-05-2004	30,46	43,73	12,62	2,68	58,24	2,41	11	0,034
10-05-2004 - 17-05-2004	-20,29	50,93	14,70	-52,65	12,07	-1,38	11	0,195
17-05-2004 - 22-06-2004	6,29	59,00	17,03	-31,19	43,78	0,37	11	0,719

2.27. Teste-t Student para comparação de médias de outros fungos - método médias emparelhadas (1º ano e 2º ano). Modalidade FB (c.f.u./ g de solo reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de solo)

Amostras emparelhadas						t	df	Sig.
	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	Intervalo de confiança 95%				
				inferior	inferior			
16-9-2002 - 08-10-2002	0,75	2,55	0,73	-0,87	2,37	1,02	11	0,329
08-10-2002 - 29-10-2002	-0,54	1,51	0,44	-1,50	0,42	-1,24	11	0,241
29-10-2002- 11-11-2002	-0,75	2,86	0,83	-2,57	1,07	-0,91	11	0,384
11-11-2002 - 24-03-2003	-13,83	12,36	3,57	-21,69	-5,98	-3,88	11	0,003
24-03-2003 - 31-03-2003	-8,58	9,59	2,77	-14,68	-2,49	-3,10	11	0,010
31-03-2003 - 15-05-2003	15,29	9,68	2,79	9,14	21,44	5,47	11	0,000
15-05-2003 - 13-11-2003	6,50	8,28	2,39	1,24	11,76	2,72	11	0,020
13-11-2003 - 19-11-2003	-1,58	2,98	0,86	-3,48	0,31	-1,84	11	0,093
19-11-2003 - 20-02-2004	1,71	1,90	0,55	0,50	2,92	3,11	11	0,010
20-02-2004 - 08-03-2004	-6,63	11,53	3,33	-13,95	0,70	-1,99	11	0,072
08-03-2004 - 10-05-2004	-4,96	8,24	2,38	-10,20	0,28	-2,08	11	0,061
10-05-2004 - 17-05-2004	-5,58	23,82	6,88	-20,72	9,55	-0,81	11	0,434
17-05-2004 - 22-06-2004	-7,71	19,23	5,55	-19,92	4,51	-1,39	11	0,192

2.28. Teste-t Student para comparação de médias de outros fungos - método médias emparelhadas (entre 1º ano e 2º ano). Modalidade F (c.f.u./ g de solo reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de solo)

Amostras emparelhadas						t	df	Sig.
	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	Intervalo de confiança 95%				
				inferior	inferior			
16-9-2002 – 08-10-2002	5,63	8,64	2,50	0,13	11,12	2,25	11	0,046
08-10-2002 – 29-10-2002	1,50	3,29	0,95	-0,59	3,59	1,58	11	0,142
29-10-2002- 11-11-2002	-3,13	3,57	1,03	-5,40	-0,85	-3,03	11	0,011
11-11-2002 – 24-03-2003	-6,25	5,41	1,56	-9,69	-2,81	-4,00	11	0,002
24-03-2003 – 31-03-2003	-12,50	11,70	3,38	-19,93	-5,07	-3,70	11	0,003
31-03-2003 – 15-05-2003	20,83	7,50	2,16	16,07	25,60	9,62	11	0,000
15-05-2003 – 13-11-2003	-0,58	2,52	0,73	-2,19	1,02	-0,80	11	0,440
13-11-2003-19-11-2003	-7,29	6,24	1,80	-11,26	-3,33	-4,05	11	0,002
19-11-2003-20-02-2004	7,13	6,47	1,87	3,01	11,24	3,81	11	0,003
20-02-2004-08-03-2004	-1,17	1,99	0,58	-2,43	0,10	-2,03	11	0,067
08-03-2004-10-05-2004	-9,46	8,03	2,32	-14,56	-4,36	-4,08	11	0,002
10-05-2004-17-05-2004	-7,67	14,59	4,21	-16,94	1,61	-1,82	11	0,096
17-05-2004 - 22-06-2004	-0,58	10,82	3,12	-7,46	6,29	-0,19	11	0,855

2.29. Teste-t Student para comparação de médias de outros fungos - método médias emparelhadas (entre 1º ano e 2º ano). Modalidade T (c.f.u./ g de solo reais = valores representados x 1000 c.f.u. / g de solo)

Amostras emparelhadas						t	df	Sig.
	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	Intervalo de confiança 95%				
				inferior	inferior			
16-9-2002 – 08-10-2002	5,13	7,58	2,19	0,31	9,94	2,34	11	0,039
08-10-2002 – 29-10-2002	-5,46	10,12	2,92	-11,89	0,97	-1,87	11	0,089
29-10-2002- 11-11-2002	-2,96	17,13	4,94	-13,84	7,92	-0,60	11	0,562
11-11-2002 – 24-03-2003	-6,08	11,41	3,29	-13,33	1,17	-1,85	11	0,092
24-03-2003 – 31-03-2003	4,83	10,64	3,07	-1,93	11,59	1,57	11	0,144
31-03-2003 – 15-05-2003	-6,33	17,92	5,17	-17,72	5,05	-1,22	11	0,246
15-05-2003 – 13-11-2003	1,58	22,40	6,47	-12,65	15,81	0,24	11	0,811
13-11-2003-19-11-2003	-1,00	19,40	5,60	-13,33	11,33	-0,18	11	0,862
19-11-2003-20-02-2004	12,42	18,92	5,46	0,40	24,44	2,27	11	0,044
20-02-2004-08-03-2004	-3,38	5,87	1,69	-7,10	0,35	-1,99	11	0,072
08-03-2004-10-05-2004	-5,38	10,60	3,06	-12,11	1,36	-1,76	11	0,107
10-05-2004-17-05-2004	-9,50	16,98	4,90	-20,29	1,29	-1,94	11	0,079
17-05-2004 - 22-06-2004	-9,63	34,82	10,05	-31,75	12,50	-0,96	11	0,359

2.30. Análise multivariada, outros fungos no solo, modalidades inoculadas (F + FB) / modalidades não inoculadas (T + B), 1º ano e 2º ano.

Teste "Between-Subjects Effects"						
Fonte	Variável dependente	Tipo III soma dos quadrados	df	média ao quadrado	F	Sig.
Modelo corrigido	16-09-2002	3,255	1	3,255	0,060	0,808
	08-10-2002	11,021	1	11,021	3,271	0,077
	29-10-2002	108,000	1	108,000	3,889	0,055
	11-11-2002	218,880	1	218,880	4,442	0,041
	24-03-2003	368,521	1	368,521	2,938	0,093
	31-03-2003	546,750	1	546,750	5,178	0,028
	15-05-2003	1140,750	1	1140,750	12,871	0,001
	13-11-2003	693,880	1	693,880	17,842	0,000
	19-11-2003	280,333	1	280,333	2,805	0,101
	20-02-2004	49,005	1	49,005	1,787	0,188
	08-03-2004	3951,255	1	3951,255	4,363	0,042
	10-05-2004	30,880	1	30,880	0,288	0,594
	17-05-2004	533,333	1	533,333	0,678	0,414
	22-06-2004	210,422	1	210,422	0,509	0,479
Modalidade	16-09-2002	3,255	1	3,255	0,060	0,808
	08-10-2002	11,021	1	11,021	3,271	0,077
	29-10-2002	108,000	1	108,000	3,889	0,055
	11-11-2002	218,880	1	218,880	4,442	0,041
	24-03-2003	368,521	1	368,521	2,938	0,093
	31-03-2003	546,750	1	546,750	5,178	0,028
	15-05-2003	1140,750	1	1140,750	12,871	0,001
	13-11-2003	693,880	1	693,880	17,842	0,000
	19-11-2003	280,333	1	280,333	2,805	0,101
	20-02-2004	49,005	1	49,005	1,787	0,188
	08-03-2004	3951,255	1	3951,255	4,363	0,042
	10-05-2004	30,880	1	30,880	0,288	0,594
	17-05-2004	533,333	1	533,333	0,678	0,414
	22-06-2004	210,422	1	210,422	0,509	0,479
Erro	16-09-2002	2496,240	46	54,266		
	08-10-2002	154,979	46	3,369		
	29-10-2002	1277,500	46	27,772		
	11-11-2002	2266,615	46	49,274		
	24-03-2003	5768,979	46	125,413		
	31-03-2003	4856,729	46	105,581		
	15-05-2003	4076,917	46	88,629		
	13-11-2003	1788,990	46	38,891		
	19-11-2003	4597,146	46	99,938		
	20-02-2004	1261,198	46	27,417		
	08-03-2004	41662,490	46	905,706		
	10-05-2004	4939,365	46	107,377		
	17-05-2004	36158,833	46	786,062		
	22-06-2004	19000,823	46	413,061		
Total	16-09-2002	3913,250	48			
	08-10-2002	274,000	48			
	29-10-2002	1817,500	48			

11-11-2002	3976,250	48
24-03-2003	18812,500	48
31-03-2003	25863,500	48
15-05-2003	10851,000	48
13-11-2003	4703,750	48
19-11-2003	9538,500	48
20-02-2004	2090,250	48
08-03-2004	57885,750	48
10-05-2004	13490,250	48
17-05-2004	64532,500	48
22-06-2004	54176,250	48

* Nível de significância superior a 0,05. Não existem diferenças significativas.

2.31. Correlação de Pearson entre médias de outros fungos e médias de PcMR no solo nos talhões das modalidades inoculadas (F + FB), 1º ano e 2º ano.

Amostragem		PcMR/Outros fungos
29-10-2002	Coeficiente de correlação	-0,741
	Sig.	0,035
	N	8
24-03-2003	Coeficiente de correlação	-0,196
	Sig.	0,641
	N	8
19-05-2003	Coeficiente de correlação	-0,210
	Sig.	0,617
	N	8
13-11-2003	Coeficiente de correlação	0,688
	Sig.	0,059
	N	8
20-02-2004	Coeficiente de correlação	-0,749
	Sig.	0,032
	N	8
10-05-2004	Coeficiente de correlação	-0,449
	Sig.	0,265
	N	8
22-06-2004	Coeficiente de correlação	-0,593
	Sig.	0,121
	N	8

2.32. Teste de Levene de homogeneidade das variâncias de outros fungos na raiz, todas as modalidades, 1º ano

Análise	F	df2	Sig.
Outros fungos	18,97	44	0,000

2.33. Teste *Tamhane's T2* – Teste “post-hoc” de comparação de médias de outros fungos na raiz, 1º ano

Manova-teste de Tamhane ^{a,b,c} - outros fungos na raiz	Modalidade	N	Subgrupo – média (c.f.u./g de raiz)		
			1	2	3
Outros fungos	B	12	7,375		
	T	12	7,833		
	FB	12	34,625		
	F	12		382,500	

a – baseado nas médias observadas

b - A diferença da média é significativa a 0,05

c- não igualdade das variâncias de acordo com o teste de Levene

2.34. Teste de Levene de homogeneidade das variâncias de outros fungos na raiz, todas as modalidades, 2º ano

Análise	F	df2	Sig.
Outros fungos	29,40	44	0,000

2.35. Teste *Tamhane's T2* – Teste “post-hoc” de comparação de médias de outros fungos na raiz, 2º ano

Manova-teste de Tamhane ^{a,b,c} - outros fungos na raiz	Modalidade	N	Subgrupo – média (c.f.u./g de raiz)		
			1	2	3
Outros fungos	B	12	1,75		
	T	12	3,88		
	FB	12	7,96		
	F	12		81,75	

a – baseado nas médias observadas

b - A diferença da média é significativa a 0,05

c- não igualdade das variâncias de acordo com o teste de Levene