

SELEÇÃO DE *TRICHODERMA* SPP. COMO POTENCIAIS AGENTES PARA BIOCONTROLE DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA* EM CANA-DE-AÇUCAR¹

M. A. Freitas², E. M. R. Pedrosa^{3*}, R. L. R. Mariano³, S. R. V. L. Maranhão⁴

¹Parte da dissertação da primeira autora. ²Aluna de pós-graduação, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil. ³Professora, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil. ⁴Doutora, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil. *Autor por correspondência: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Tecnologia Rural, Dois irmãos, Recife, PE, Brasil, CEP: 52171-900, Corresponding author:e-mail: elvira.pedrosa@ufrpe.br

ABSTRACT

Freitas, M. A., E. M. R. Pedrosa, R. L. R. Mariano and S. R. V. L. Maranhão. 2012. Screening *Trichoderma* spp. as potential agents for biocontrol of *Meloidogyne incognita* in sugarcane. *Nematropica* 42:115-122.

The present research had as objective screening, within *Trichoderma* sp. isolates from Universidade Federal Rural de Pernambuco, potential antagonists to *Meloidogyne incognita* and evaluating their potentiality as resistance inducer and growth promoter for sugarcane variety RB863129. *Trichoderma* spp. spore suspensions were added to soil two days before 30-day old sugarcane seedlings were inoculated with 10,000 eggs of *M. incognita*. Plants were arranged in a complete randomized design and kept under greenhouse at 24-36 °C. Ninety days after nematode infestation, the extent and fresh biomass of shoot and roots, number and diameter of stalk node, gall index and nematode reproduction were evaluated. The nematicide and nematostatic effects of *Trichoderma* sp. on *M. incognita* were evaluated through tests *in vitro* for hatching and mortality of juveniles from eggs deposited in *Trichoderma* spp. filtrates, and the fungus parasitism to the egg. *Trichoderma* spp. strains 3M, 8M, 17M and 225T reduced gall index and the strains 1M, 3M, 10M, 17M, 311T and 322 decreased nematode reproduction showing a high potential to control *M. incognita*. *In vitro*, all the filtrates of *Trichoderma* spp. were effective in promoting juvenile mortality. In assessments with nematode eggs, sixteen among twenty-two strains were significant in relation to control for parasitism of eggs with emphasis on strains 8M, 11M, 13M, 15M and 17M as the most promising. The strains 4M, 14M, A18 and 4077T showed potential in enzymatic action and mortality of juveniles after hatching.

Key words: Egg parasitism, root-knot nematode, *Saccharum* sp.

RESUMO

Freitas, M. A., E. M. R. Pedrosa, R. L. R. Mariano e L. M. P. Guimarães. 2012. Seleção de *Trichoderma* spp. como potenciais agentes de biocontrole para *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar. *Nematropica* 42:115-122.

A presente pesquisa teve por objetivo selecionar possíveis antagonistas para o controle de *Meloidogyne incognita* entre isolados de *Trichoderma* spp. pertencentes à coleção de fungos da Universidade Federal Rural de Pernambuco e avaliar o potencial de cada isolado na indução de resistência e promoção de crescimento em cana-de-açúcar variedade RB863129. Dois dias antes da infestação do solo com a suspensão de esporos de *Trichoderma* spp., plântulas de cana-de-açúcar com 30 dias tiveram o solo infestado com 10000 ovos de *M. incognita*. As plantas foram arranjadas em delineamento experimental inteiramente casualizado e mantidas em casa de vegetação em temperaturas que variam entre 24°C e 36 °C. Decorridos 90 dias da infestação do solo com o nematoide, foram determinados comprimento e biomassa fresca da parte aérea e da raiz, número e diâmetro de nós, índice de galhas e reprodução do nematoide. O efeito nematicida de *Trichoderma* spp. sobre *M. incognita* foi avaliado por meio de testes *in vitro* de mortalidade de juvenis de segundo estágio expostos aos filtrados dos isolados em teste. De forma semelhante, pela exposição dos ovos do nematoide aos filtrados, foi avaliado o efeito nematostático desses isolados. O parasitismo dos isolados de *Trichoderma* spp. a ovos de *M. incognita* também foi avaliado. Os efeitos nematicida e nematostático de *Trichoderma* spp. sobre *M. incognita* foram estimados por meio de testes *in vitro* de mortalidade e eclosão de juvenis em ovos depositados em filtrados dos isolados, e parasitismo do fungo a ovos do nematoide. Os isolados 3M, 8M, 17M e 225T e os isolados 1M, 3M, 10M, 17M, 311T e 322 apresentaram alto potencial para controle de *M. incognita*, diminuindo significativamente o índice de galhas e o fator de reprodução do nematoide, respectivamente, em cana-de-açúcar. *In vitro*, todos os filtrados dos isolados de *Trichoderma* spp. se mostraram eficientes em promover a mortalidade dos juvenis. Em

avaliações do parasitismo em ovos do nematoide, dos vinte e dois isolados, dezesseis foram significativos em relação à testemunha; com destaque para os isolados 8M, 11M, 13M, 15M, e 17M. Os isolados 4M, 14M, A18 e 4077T se destacaram quanto à ação enzimática e mortalidade de juvenis após a eclosão.

Palavras-chave: Parasitismo de ovos, nematóide das galhas, *Saccharum* sp.

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar tem especial significado econômico para o Brasil que lidera a lista dos 80 países produtores. Contudo, frequentemente, o ataque de pragas e doenças causa substancial redução na produtividade da cultura. Dentre as doenças, as causadas por nematoides do gênero *Meloidogyne*, especialmente *M. incognita*, destaca-se pela ampla distribuição e severidade dos sintomas (Bettiol e Morandi, 2009). A busca por medidas alternativas tem levado os pesquisadores a vislumbrar novos caminhos para um manejo integrado mais eficiente e duradouro. O controle biológico destaca-se como um método promissor e o mais estudado (Romeiro, 1995; Nordlund, 1996; Bettiol, 1999). Exemplos de biocontrole de fitonematoides em campo são poucos, apesar dos estudos com vários micro-organismos (Sikora, 1992).

Diversos micro-organismos, principalmente fungos habitantes do solo, têm revelado potencial antagonico a diferentes fitopatógenos do solo, com destaque ao gênero *Trichoderma*. A ação antagonista ocorre devido a mecanismos de antibiose, parasitismo e competição (Melo, 1998). Howell (1997) acrescenta, ainda, a indução de resistência do hospedeiro, a melhor tolerância da planta ao estresse ambiental, a solubilização e sequestro de nutrientes inorgânicos, além da inativação de enzimas dos patógenos. *Trichoderma* tem sido estudado por produzir uma série de enzimas extracelulares (Menezes e Souza, 1995), por sua capacidade de degradar a parede celular e por ser ativo na produção de metabólitos extracelulares com atividade antimicrobiana (Melo, 1991). Segundo Harman *et al.* (2004), o número dessas enzimas e metabólitos extracelulares chegam a mais de 100.

Existem poucas informações sobre os mecanismos utilizados pelas espécies de *Trichoderma* no controle de nematoides. Sahebani e Hadavi (2008) citaram dois: o parasitismo direto de ovos e juvenis pelo aumento da atividade de quitinases e proteases, sendo este um indicativo da capacidade de infectar ovos (Sharon *et al.* 2001; Suarez *et al.*, 2004), e indução dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Enzimas extracelulares, tais como quitinase e protease, com atividade antifúngica, participam da relação de interação de *Meloidogyne* spp. e *Trichoderma* sp. (Sharon, *et al.* 2001).

Trichoderma apresenta algumas características que são essenciais para um agente de biocontrole: a. é

inócuo ao ser humano e ao meio ambiente, b. possui estruturas de reprodução de fácil propagação (Spiegel e Chet, 1998), principalmente em substratos naturais e, c. apresenta meia vida de prateleira quando formulado com boa viabilidade (Melo, 1996). Segundo Bettiol e Morandi (2009), 13 empresas produzem e comercializam produtos formulados à base de isolados de *Trichoderma*, as quais estão localizadas, principalmente, no Centro-Sul do Brasil. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi selecionar, entre os isolados de *Trichoderma* spp., possíveis antagonistas para o controle biológico de *M. incognita* em cana-de-açúcar.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida em laboratório e casa de vegetação da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A variedade de cana-de-açúcar estudada foi RB863129, desenvolvida pelo Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar, RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro). As mudas foram obtidas do cultivo por micropropagação da biofábrica Governador Miguel Arraes do CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste), Recife, PE. As populações que constituíram o inóculo de *M. incognita* foram obtidas de áreas produtoras de cana-de-açúcar, no litoral norte do Estado de Pernambuco, e mantidas em vasos cultivados com tomateiros (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Santa Cruz durante todo o período do experimento. A confirmação específica foi realizada por submeter fêmeas do nematoide à eletroforese de isoenzimas (Carneiro e Gomes, 1993) e a determinação da raça foi feita pelo teste das plantas hospedeiras diferenciadoras (Hartman e Sasser, 1985).

Para obtenção do inóculo, foram feitas extrações de ovos a partir das raízes dos tomateiros infectados pelo nematoide, utilizando-se a metodologia descrita por Hussey e Barker (1973) e ajuste da concentração em câmara de Peters sob microscópio ótico. Para o inóculo de *Trichoderma* spp., foram utilizados sacos plásticos de polipropileno transparentes com capacidade de 2 L, contendo 100 g de arroz parboilizado, umedecidos com 40 ml de água destilada previamente esterilizada em autoclave por 30 minutos a 120°C. O substrato foi inoculado com 10 ml de uma suspensão de 10⁷ esporos/ml de *Trichoderma* spp., e incubado em câmara de crescimento com temperatura de 25°C por sete dias.

Para o estudo da capacidade de cada isolado como provável antagonista, plantas de cana-de-açúcar com idade de 30 dias, cultivadas em vasos com capacidade para 5 L, contendo solo esterilizado, foram inoculadas com 10000 ovos de *M. incognita*, depositados em quatro perfurações de 2 cm de profundidade ao redor do colo da planta. A aplicação do fungo ocorreu dois dias antes da inoculação do nematoide, depositando-se, em cada um dos vasos, 5 g do substrato colonizado pelo fungo, triturado e homogeneizado. Para o tratamento controle, foi utilizado 0,5 g de arroz não inoculado com o fungo e 10000 ovos do nematoide foram aplicados em cada uma das plantas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação a uma temperatura média mínima de 25°C e média máxima de 36°C. O delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado, com 23 tratamentos que consistiram de 22 isolados de *Trichoderma* spp. e testemunha, com cinco repetições. Após 90 dias da inoculação do nematoide, foram determinados os comprimentos e as massas das partes aéreas e das raízes frescas de cada uma das plantas, o número e o diâmetro de nós, o índice de galhas e o fator de reprodução do fitonematoide (FR). Para a estimativa do índice de galhas foi utilizada a escala de notas do “International *Meloidogyne* Project” (Taylor e Sasser, 1978). Paralelamente, as galhas com 0,5 a 1,0 e 1,0 a 2,0 cm de comprimento foram enumeradas.

Para a avaliação *in vitro* do efeito nematicida e nematostático de *Trichoderma* spp. sobre *M. incognita*, foi preparado um filtrado de cada isolado, cultivando o fungo em placa de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Agar. Após sete dias de incubação a 28°C, três discos de 5 mm de diâmetro, retirados das bordas, das culturas, foram colocados em Erlenmeyer de 250 ml, contendo 100 ml de meio líquido CzapekDox, mantidos em incubadora a 25°C sob agitação, por 15 dias. Após esse período, todo o conteúdo dos Erlenmeyers foi filtrado em membrana de acetato celulose com 0,22 µm de abertura. Os filtrados fúngicos obtidos foram mantidos sob refrigeração por 48 horas, até o estabelecimento do ensaio.

Para o teste de mortalidade de juvenis de segundo estágio (J₂) seguiu-se a metodologia descrita por Silva *et al.* (2002) modificada e adaptada. A suspensão de J₂ foi obtida a partir da câmara de eclosão com lenço de papel. Dessa suspensão, 35 nematoides foram retirados, por captura individual para 20 µl de água, e adicionados a 80 µl dos filtrados contidos em *eppendorf* de 1,5 ml. Cada tratamento foi constituído por quatro repetições, mantidas a 25 oC, no escuro e, a avaliação da mortalidade, realizada após 24 horas. Para o teste de eclosão, a suspensão de ovos foi obtida conforme metodologia de Hussey e Baker (1973), colocando-se 40 ovos por *eppendorf*. A avaliação foi realizada no 14º dia, tomando-se os primeiros 35 ovos e/ou juvenis visualizados.

Para o teste de parasitismo de *Trichoderma* spp. em ovos de *M. incognita*, os ovos foram extraídos manualmente a partir de massas de ovos e colocados

em tubo de ensaio com solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, agitados manualmente por um minuto. Em seguida os ovos foram desinfestados com estreptomicina a 1% e mercaptaetanol a 0,1%, durante quatro minutos; lavados em água esterilizada e coletados com micropipeta. Em lâmina de vidro, foram dispostos dois discos de Agar-água 1%, com diâmetro de 10 mm, contendo 20 ovos no disco da direita e 20 no da esquerda, conforme metodologia descrita por Carneiro e Gomes (1993). As avaliações foram realizadas após 15 dias, determinando-se os números de ovos parasitados, de ovos escurecidos devido à ação enzimática e os números de juvenis vivos e mortos.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando-se o programa estatístico SAS (Statistical Analysis System) versão 9.1. Os dados referentes ao fator de reprodução foram transformados para $\log(x+1)$ e os demais para $\sqrt{(X+0,5)}$, comparados pelo teste de Fisher (Proteated) LSD (Least standard deviation) a 5% de probabilidade.

Os experimentos foram repetidos para confirmação dos resultados obtidos com os organismos promissores. Para caracterização das espécies dos isolados, foi realizada análise da região intergênica 16S/23S (ITS) por restrição do DNA ribossomal amplificado, que constitui uma excelente ferramenta para a identificação de espécies (Rodriguez-Valera e Garcia-Martinez, 2000). Para efeito de comparação, as seqüências obtidas foram alinhadas e depositadas no GenBank-EMBL (Dados não mencionados).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 22 isolados de *Trichoderma* avaliados, dois (12T e A18) se destacaram com aumentos significativos da massa da parte aérea fresca das plantas, proporcionando ganhos na ordem de 51.49 e 70.79% em relação à testemunha (Tabela 1). Para comprimento da parte aérea quatro isolados se destacaram com aumentos significativos em relação à testemunha: 1M, 11M, 225T e A18. Esse aumento em massa/comprimento da planta deve estar associado ao fato de espécies de *Trichoderma* favorecerem a tolerância da planta ao estresse ambiental, proporcionar a solubilização e sequestro de nutrientes inorgânicos, e inativação de enzimas dos patógenos que alteram o desenvolvimento normal das plantas (Harman, 2000).

Em adição, *Trichoderma* spp. podem atuar diretamente sobre o fitonematoide por mecanismos de antibiose, hiperparasitismo, competição e, em alguns casos, pela promoção de crescimento (Melo, 1996). A promoção de crescimento de plantas por *Trichoderma* spp. foi inicialmente relacionada ao controle de micro-organismos prejudiciais presentes na rizosfera e, ou no solo. Mais recentemente, tem sido relacionada à produção de hormônios ou fatores de crescimento; maior eficiência no uso de alguns nutrientes; e aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pela planta (Ferreira e Ferraz, 2008).

Tabela 1. Efeito de isolados de *Trichoderma* spp. no biocontrole de *Meloidogyne incognita* e sobre o desenvolvimento da variedade de cana-de-açúcar RB863129, 90 dias após inoculação do nematoide.

Tratamento	Parte aérea		Raiz		Colmos		N° Galhas		Reprodução	
	Peso (g)	Comprimento (cm)	Peso(g)	Comprimento (cm)	Numero	Diâmetro (cm)	IG ^x	0,5-1,0 (cm)	1,0-2,0 (cm)	FR ^y
Testemunha	46.26 cd ^z	179.40 de	30.95 bcd	33.20 de	7.40 abc	3.56 cdef	5.00 a	25.60 a	4.20 bcd	75.27 abc
1M	62.93 abc	210.00 ab	29.13 cd	33.40 cde	5.80 cd	3.72 bcde	4.00 ab	2.00 efg	1.80 bcdef	24.86 defg
2M	46.73 cd	176.00 e	34.45 bcd	48.01 ab	7.20 abcd	3.62 cde	4.60 ab	4.00 cdef	0.60 ef	47.94 bcdef
3M	49.33 bcd	194.40 abcde	27.43 cd	43.22 abcd	8.40 ab	2.98 f	2.40 de	7.00 bcd	4.00 bcd	13.40 efg
4M	63.03 abc	197.20 abcde	27.55 cd	33.20 de	6.60 abcd	3.58 cdef	4.80 ab	5.40 cde	2.80 bcdef	51.67 bcdef
5M	56.29 bcd	200.00 abcd	29.70 bcd	39.20 bcde	5.40 cd	3.78 abcd	5.00 a	8.60 bcd	14.8 a	31.20 bcdefg
6M	46.44 cd	179.00 de	36.21 bcd	38.60 bcde	5.60 cd	3.66 cde	5.00 a	12.60 bcd	6.60 bc	19.96 cdefg
8M	42.63 d	180.60 de	41.35 abc	56.60 a	5.80 cd	3.78 abcd	2.80 cd	0.40 fg	0.20 f	189.82 a
9M	58.07 bcd	198.20 abcde	26.87 cd	38.20 bcde	6.00 cd	3.72 bcde	5.00 a	10.20 bc	5.20 bcde	47.94 bcdef
10M	57.90 abcd	198.12 abcde	39.52 abc	39.20 bcde	5.60 cd	3.92 abcd	4.80 ab	1.20 efg	2.60 bcdef	25.09 defg
11M	49.48 bcd	203.40 abc	24.63 cd	47.00 abcd	7.00 abcd	3.14 ef	4.60 ab	9.60 bc	5.60 bc	38.46 bcdefg
12T	70.08 ab	200.40 abcd	30.56 bcd	49.20 abc	5.80 cd	3.86 abc	4.40 ab	3.00 defg	0.60 f	44.39 bcdefg
13M	56.05 bcd	198.40 abcde	29.54 cd	34.80 bcde	6.00 cd	3.48 cdef	5.00 a	5.80 cdef	6.00 b	28.89 cdefg
14M	54.69 bcd	189.00 bcde	13.73 bcd	39.40 bcde	5.20 d	3.66 cde	5.00 a	5.40 cde	3.00 bcdef	76.41 ab
15M	62.18 abc	200.20 abcd	22.14 d	29.60 e	5.20 d	4.38 a	5.00 a	4.20 cdef	1.60 bcdef	43.97 bcde
17M	49.54 cd	185.00 cde	40.23 abc	36.60 bcde	6.60 abcd	3.74 bcde	1.60 e	0.00 g	0.60 f	8.71 g
223	49.33 bcd	194.40 abcde	27.43 cd	43.22 abcd	8.40 ab	2.98 f	4.00 ab	15.00 ab	4.00 bcd	41.40 bcdefg
225T	59.98 abcd	211.80 a	41.97 abc	41.60 abcd	6.40 abcd	3.20 def	3.80 bc	3.80 defg	2.00 bcdef	53.12 bcd
311T	51.93 bcd	201.40 abcd	59.91 a	38.28 bcde	6.00 cd	3.50 cdef	4.20 ab	1.00 efg	1.60 bcdef	12.99 fg
322	58.14 abcd	193.40 abcde	28.53 cd	45.00 abcd	8.60 a	3.76 abcde	5.00 a	8.60 bcd	1.80 cdef	36.38 defg
4077T	53.86 bcd	193.60 abcde	27.53 cd	33.80 cde	6.20 bcd	3.70 cde	4.88 ab	4.20 cdef	3.20 bcdef	36.95 bcdefg
A18	79.01 a	204.60 abc	48.59 ab	36.00 bcde	6.20 bcd	4.34 ab	5.00 a	4.40 cdef	1.00 def	39.01 bcdefg
CR	57.16 abcd	190.40 abcde	23.08 d	32.20 de	7.20 abcd	3.60 cdef	4.80 ab	6.40 cde	6.20 bcd	50.80 bcd
C.V.(%)	14.10215	13.83743	21.45964	13.83743	12.20738	13.57895	19.5978	45.83078	50.13990	22.2106

^xÍndice calculado de acordo com Taylor e Sasser (1978). IG = Índice de Galhas.

^yFator de reprodução de acordo com Hussey e Barker (1973). Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste LSD a de 5% de probabilidade. Dados transformados para $\log(x+1)$.

^zMédias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste LSD a nível de 5% de probabilidade. Dados transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$.

Com relação ao sistema radicular, apenas o isolado 311T apresentou diferença significativa na massa de material fresco quando comparado à testemunha. Os isolados 2M, 8M e 12T promoveram aumento significativo no comprimento das raízes, proporcionando acréscimos de 44.60, 70.48 e 48.19%, respectivamente, em relação à testemunha. Sabe-se que na presença de altas densidades do nematoide há formação de raízes laterais na tentativa de melhorar a absorção de água e nutrientes (Carneiro e Gomes 1993).

Tabela 2. Mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* causada por filtrados de *Trichoderma* spp. e pH dos filtrados fúngico.

Tratamento	Juvenis de segundo estágio		pH
	Vivos	Mortos	
Testemunha	33.00 a ^z	2.00 e	8
1M	0.00 e	35.00 a	7
2M	0.00 e	35.00 a	8
3M	0.00 e	35.00 a	6
4M	0.00 e	35.00 a	9
5M	0.00 e	35.00 a	7
6M	4.20 d	30.80 b	8
8M	0.00 e	35.00 a	8
9M	0.00 e	35.00 a	7
10M	0.00 e	35.00 a	8
11M	0.00 e	35.00 a	7
12T	0.00 e	35.00 a	8
13M	0.00 e	35.00 a	8
14M	12.20 c	22.80 c	8
15M	0.00 e	35.00 a	9
17M	0.00 e	35.00 a	8
223	0.00 e	35.00 a	7
225T	0.00 e	35.00 a	7
311T	0.00 e	35.00 a	9
322	0.00 e	35.00 a	8
4077T	0.00 e	35.00 a	8
A18	0.00 e	35.00 a	8
CR	24.20 b	10.80 d	5
CV (%)	23.07161	6.331180	

^zMédias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste LSD a 5% de probabilidade. Dados transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$.

Em relação ao número de nós, os isolados não diferiram da testemunha, exceto os tratamentos com os isolados 14M e 15M que apresentaram valores significativamente menores (Tabela 1). Ao contrário, nos tratamentos com os isolados 15M e A18 observaram-se diâmetros dos nós significativamente maiores do que na testemunha.

O índice de galhas das plantas inoculadas com a maioria dos isolados dos fungos foi alto (Tabela 1), embora 18.18% dos isolados tenham diferido significativamente da testemunha. Três isolados (3M, 8M, 17M) se destacaram promovendo redução significativa no número de galhas, caracterizando reação de resistência por apresentarem índices de galhas inferiores a 3 (Taylor e Sasser, 1978). Em tratamentos, baixo número de galhas medindo entre 0,5 e 1,0 cm foi observado em 21 isolados em relação à testemunha. Nesse aspecto, se destacaram os isolados 17M, 311T e 8M; embora no tratamento com o isolado 311T o índice de galhas tenha sido de 4,2. Isso foi devido ao elevado número de galhas de menor tamanho, medindo de 0,1 a 0,5 cm de comprimento. Para o número de galhas medindo entre 1,0 e 2,0 cm, os tratamentos com os isolados 2M, 8M, 12T e 17M apresentaram diferença significativa em relação à testemunha. A redução do número de galhas ocasionado pelos tratamentos não apresentou relação com o acréscimo no comprimento e peso da biomassa da parte aérea ou raiz.

Os isolados 1M, 3M, 10M, 17M, 311T e 322 se destacaram em diminuir significativamente a reprodução de *M. incognita*. Embora se tenha observado reduzido número de galhas no tratamento com o isolado 8M, este não inibiu a reprodução do nematoide, não se mostrando promissor para o manejo do patógeno. A produção de metabólitos tóxicos está entre as possíveis causas para a redução do número de galhas. Essa produção de metabólitos tóxicos se constitui numa característica muito explorada no controle biológico de fitopatógenos pelo gênero *Trichoderma* (Howell, 2003). O comportamento desse fungo como antagonista é essencial para uso efetivo em biocontrole, pois pode atuar por diversos mecanismos (Küçük e Kivanç, 2003). *Trichoderma* spp. têm a capacidade de competir por sítios de infecção e usar nutrientes disponíveis, podendo impedir a germinação de propágulos do patógeno ou a infecção (Punja e Utkhede, 2003). Geralmente, são consideradas competidoras agressivas, apresentando rápido crescimento e colonização, excluindo muitos patógenos. Em adição a eficiência da inibição do fitopatógeno por espécies de *Trichoderma* parece estar também relacionada a altas taxas e ao acúmulo de CO₂ realizadas pelo antagonista (Marchetti *et al.*, 1992).

A forma de atuação de *Trichoderma* no ciclo de vida dos nematoides e os mecanismos de ação envolvidos ainda são pouco esclarecidos. Presume-se, no entanto, que envolva a produção de toxinas, modificações dos exsudados radiculares reduzindo a eclosão de ovos, atração e reconhecimento do hospedeiro pelo J₂, e a indução de resistência sistêmica (Oostendorp e Sikora, 1990). Segundo Harman *et al.* (2004), *Trichoderma*

Tabela 3. Parasitismos de ovos e mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incógnita* por isolados de *Trichoderma* spp.

Tratamento	Ovos			Juvenis	
	Parasitados	Não parasitados	Escurecidos*	Vivos	Mortos
Testemunha	0.000 i ^z	0.000 f	0.000 k	18.66 a	1.333 def
1M	13.66 ab	1.666 bcde	4.667 defgh	0.000 g	0.000 f
2M	5.333 def	1.000 cdef	6.000 cdef	0.000 g	7.333 ab
3M	7.333 cde	0.333 ef	6.333 cdef	1.667 ef	4.333 bc
4M	1.667 hi	0.666 def	3.333 efghi	5.000 bcd	9.333 a
5M	3.000 fgh	0.000 f	6.666 bcde	5.667 bcd	4.667 bc
6M	14.33 ab	0.000 f	4.667 defgh	0.000 g	1.000 ef
8M	19.00 a	0.000 f	1.000 jk	0.000 g	0.000 f
9M	8.667 cd	2.333 bc	7.667 bcd	1.333 efg	0.000 f
10M	0.333 i	6.000 a	3.333 fghij	6.667 bc	3.667 bcd
11M	17.00 a	0.000 f	2.333 ghij	0.000 g	0.667 ef
12T	7.000 cde	2.333 bcd	8.333 bcd	0.000 g	2.000 cde
13M	17.66 a	0.000 f	2.000 ijk	0.000 g	0.333 ef
14M	0.000 i	0.000 f	20.00 a	0.000 g	0.000 f
15M	17.66 a	0.000 f	1.000 jk	0.000 g	1.333 def
17M	17.00 a	0.000 f	1.000 ijk	0.000 g	0.000 f
223	0.333 i	5.666 a	7.000 bcd	7.000 b	0.000 f
225T	0.000 i	3.000 b	7.667 bcd	3.667 cd	5.000 bc
311T	5.000 efg	0.000 f	10.66 bc	3.667 de	0.667 ef
322	9.333 bc	0.666 def	10.00 bc	0.000 g	0.000 f
4077T	2.667 gh	1.333 bcdef	6.333 cdef	0.000 g	9.667 a
A18	0.000 i	0.000 f	20.00 a	0.000 g	0.000 f
CR	6.667 cde	0.000 f	10.66 b	0.000 g	2.000 cde
C.V.(%)	17.38038	34.55092	19.80283	29.91780	33.23801

^zMédias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste LSD a 5% de probabilidade. Dados transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$.

sp. compete por exsudatos liberados pelas sementes no processo de germinação e desenvolvimento radicular, fator que inibe a eclosão de ovos pela falta de estímulo ocasionado pela redução ou falta do exsudatos. De acordo com Howell (2003), a competição é uma das principais características de isolados de *Trichoderma* usados como agentes de biocontrole, pois somente assim terão capacidade de se desenvolver na rizosfera.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com Sharon *et al.* (2001) que relataram que o uso de

Trichoderma foi efetivo contra patógenos radiculares, a exemplo de *Meloidogyne* sp. Campos (1994) relatou redução de 61% no número de ovos desse fitonematoide após a aplicação do fungo, em casa de vegetação. Resultados similares foram observados quando outras espécies de *Meloidogyne* foram estudadas (De Leij e Kerry, 1991; Lopes *et al.*, 2007).

Pelo teste de mortalidade de J, *in vitro*, observou-se que os filtrados dos isolados de *Trichoderma* avaliados foram eficientes em promover a mortalidade dos

juvenis, após 24 horas, diferindo significativamente do tratamento testemunha (Tabela 2). Verificou-se alterações entre os tratamentos quanto aos valores do pH do filtrado, assim como o seu efeito sobre a mortalidade dos juvenis, entretanto as alterações eram sem efeito direto na mortalidade, uma vez que 11 tratamentos (2M, 6M, 8M, 10M, 12T, 13M, 14M, 17M, 322, 4077 e A18) apresentavam pH = 8, não diferindo significativamente da testemunha. Resultados semelhantes foram obtidos por Santin (2008) com J₂ de *M. incognita*, em que 100% dos juvenis foram mortos, mesmo constatando alterações no pH final do filtrado. Devrajan e Seenivasan (2002) mencionaram que filtrados deste fungo possuem efeito tóxico sobre juvenis e adultos de *Meloidogyne* sp. Costa (2001), trabalhando com diferentes isolados fúngicos, também observou que todos os filtrados apresentaram atividade tóxica contra *M. incognita*, obtendo 98% de J₂ imóveis, 98% de J₂ mortos e apenas 3% de eclosão de J₂.

Dezesseis isolados mostraram eficiência significativa em parasitar ovos de *M. incognita*, com destaque para 8M, 11M, 13M, 15M e 17M (Tabela 3). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos por Ferreira e Ferraz (2008), que relatam que nove isolados de *Trichoderma* spp. foram capazes de parasitar ovos do nematoide. Eapen *et al.* (2005) também relataram índices que variam de 10 a 25% de ovos de *M. incognita* parasitados por espécies de *Trichoderma*. Segundo Stirling (1991), os fungos são os agentes mais estudados para o biocontrole de nematoides. Isso se deve ao fato de apresentarem estratégias sofisticadas para infectar ou capturar os nematoides, atuando como predadores, endoparasitas, parasitas de ovos e fêmeas se comportando como oportunistas e produzindo metabólitos tóxicos.

Os resultados aqui obtidos demonstram que outro mecanismo de ação do fungo seria pela mortalidade do embrião, com escurecimento dos ovos por causa da ação enzimática (Tabela 3). Dentre os 23 tratamentos, 18 apresentaram diferença significativa em relação a testemunha, com destaque para 14M e A18. Para os juvenis mortos, sete isolados (2M, 3M, 4M, 5M, 10M, 225T e 4077) se mostraram eficientes em promover mortalidade quando comparados à testemunha, com destaque para 4077T e 4M. Fungos do gênero *Trichoderma* são produtores de enzimas e metabólitos tóxicos (Papaviza, 1985). Muitas espécies de *Trichoderma* são conhecidas como produtoras de diversos metabólitos secundários, voláteis e não voláteis, com amplo espectro de atividade antimicrobiana (Punja e Utkhede, 2003). Essas espécies podem secretar diversos antibióticos como as pironas, isocianatos, tricotecenos, dentre outros (Schirmbock *et al.*, 1994).

Os isolados 1M, 3M, 10M, 17M, 311T e 322 apresentaram alto potencial para controle de *M. incognita*, diminuindo significativamente a reprodução do nematoide em cana-de-açúcar. *In vitro*, todos os

filtrados dos isolados de *Trichoderma* spp. se mostraram eficientes em promover a mortalidade dos juvenis. De forma semelhante, nessa condição, todos os isolados foram eficientes em parasitar ovos do nematoide, mas aqueles identificados como 8M, 11M, 13M, 15M e 17M se destacaram como os mais promissores.

LITERATURA CITADA

- Bettiol, W. 1999. Controle biológico de doenças. *Ação Ambiental*. 2:30-33.
- Bettiol, W., R. Ghini, R. R. L. Mariano, S. J. Michereff, L. P. V. Mattos, I. C. M. Alvarado, and Z. V. Pinto. 2009. Supressividade a fitopatógenos habitantes do solo. Pp. 187-208. *in*: W. Bettiol, and M. A. B. Morandi, eds. *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente.
- Bettiol, W. and Morandi, M. A. B. (Ed.). 2009. *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 187-208.
- Campos, H. D. 1994. Controle de *Meloidogyne incognita* raça 2 em feijoeiro e *Meloidogyne exigua* em cafeeiro com fungos predadores e parasitas de ovos de fitonematóides. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, Brasil. 67 pp.
- Carneiro, R. M. D. G. and C. B. Gomes. 1993. Metodologia e teste de patogenicidade de *Paecilomyces lilacinus* e *P. fumosoroseus* em ovos de *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira* 7:66-75.
- Costa, M. J. N. 2001. Toxicidade de filtrados fúngicos a *Meloidogyne incognita*. *Fitopatologia Brasileira* 26:749-755.
- De Leij, F. A. A. M. and Kerry, B. R. 1991. The fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. *Revue de Nematologie* 14:157-164.
- Devrajan, K. and N. Seenivasan, 2002. Biochemical changes in banana roots due to *Meloidogyne incognita* infected with *Paecilomyces lilacinus*. 1. *Current Nematology*, Bigleswade 13:1-5.
- Eapen, S. J., B. Beena and K. V. Ramana. 2005. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology* 88:218-225.
- Ferreira, P. A. and S. Ferraz. 2008. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. 3. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas* 2:17.
- Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol – Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84:377-392.

- Harman, G. E., C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet, and M. Lorito. 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. 1. Nature Reviews Microbiology 2: 43-56.
- Hartman, K. M. and J. N. Sasser. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. Pp. 69-77. in: K. R., Barker, C. C., Carter and J. N. Sasser, eds. An advanced treatise on *Meloidogyne*: methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics.
- Howell, C. R. 1997. Field control of cotton seedling diseases with *Trichoderma virens* in combination with fungicide seed treatments. 1. Journal of Cotton Science 1:15-20.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* Species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. 1. Plant Disease, 87:4-10.
- Hussey, R. S. and K. Baker. 1973. A Comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter 57:1025-1028.
- Küçük, Ç. and M. Kivanç. 2003. Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. Turk. J. Biol., 27:247-253.
- Lopes, E. A., S. Ferraz, P. A. Ferreira, L. G. Freitas, O. D. Dhingra, C. G. Gardiano and S. L. Carvalho. 2007. Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira 31:78-84.
- Marchetti, R., P. Nipoti, N. D'ercole and M. E. Guerzoni. 1992. Competition at atmosphere level as biocontrol mechanism in *Trichoderma* spp. Petria 2:137-47.
- Melo, I. S. 1991. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. Pp. 130-177. in: W. Bettiol. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna, SP: EMBRAPA-CNPDA.
- Melo, I. S. 1996. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. Revisão Anual de Patologia de Plantas 4:261-295.
- Melo, I. S. 1998. Agentes Microbianos de Controle de Fungos Fitopatogênicos. Pp.17-67. in: Melo, I. S. and J. L. Azevedo, eds. Controle Biológico. 1. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente.
- Menezes, M. and E. E. B. Souza. 1995. Avaliação de isolados de *Trichoderma* através da análise eletroforética em gel de poli(acrilamida). Suplemento da Fitopatologia Brasileira 20.
- Nordlund, D. A. 1996. Biological control, integrated pest management and conceptual models. Biocontrol News and Information 17:35-44.
- Oostendorp, M. and R. A. Sikora. 1990. *In vitro* interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. Review of Nematology 14:269-274.
- Papaviza, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. Annu. Rev. Phytopathol. 23:23-54.
- Punja, Z. K. and R. S., Utkhede, 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. Trends in Biotechnology 21:400-407.
- Rodriguez-Valera, F. B. and J. Garcia-Martinez, 2000. Sparcer online. ASM News. 66:712-713.
- Romeiro, R. S. 1995. Bactérias Fitopatogênicas. Editora UFV. 283, Viçosa, MG
- Sahebani, N. and N. Hadavi, 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Soil Biol. Biochem 40:2016–2020.
- Santin, R. C. M. 2008. Pontencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris*. Tese de Doutorado em Fitotecnia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. 92 pp.
- Schirrnbock, M., M. Lorito, Y. L. Wang, C. K. Hayes, I. Arisan-Atac, F. Scala, G. E. Harman, and C. Kubicek. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. Applied Environmental Microbiology, 60:4363-4370.
- Sharon, E., M. Bar-Ar-Eyal, I. Chet, A. Herrera-Estrella, O. Okleifeld and Y. Spiegel, Y. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 91:687-693.
- Sikora, R. A. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plant parasitic nematodes. Annual Review of Phytopathology 30:245-270.
- Silva, G. S., I. M. R., Souza and F. A. Cutrim. 2002. Efeito da incorporação de sementes trituradas de feijão de porco ao solo sobre o parasitismo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 27:412-413.
- Spiegel, Y. and I. Chet. 1998. Evaluation of *Trichoderma* spp. as biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. Integrated Pest Management Reviews, Israel, 3:169-175.
- Stirling, G. R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospect. Wallingford: CAB International. 282 pp.
- Suarez, B., M. Rey, M.; P. Castillo, E. Monte and A. Llobello. 2004. Isolation and characterization of PRA1, a trypsinlike protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. Applied Microbiology and Biotechnology 65:46-55.
- Taylor, A. L. and J. N. Sasser. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Raleigh, North Carolina State University Graphics, 111p.

Received:

17/XI/2011

Accepted for publication:

23/II/2012

Recibido:

Aceptado para publicación: