

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

BIOCONTROLE DE NEMATOIDES COM FUNGOS

Marilene Aparecida da Costa
Engenheira Agrônoma

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

BIOCONTROLE DE NEMATOIDES COM FUNGOS

Marilene Aparecida da Costa
Orientador: Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Entomologia Agrícola).

2015

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARILENE APARECIDA DA COSTA – nascida em Viçosa, MG no dia 24 de Julho de 1987, graduou-se em agronomia em 2012, pela Universidade Federal de Viçosa. Estagiou na área de Fitopatologia e Controle Biológico de Fitonematoides do mencionado Câmpus, tendo conduzido seu Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “CONTROLE BIOLÓGICO DE FITONEMATOIDES” sob a orientação do Prof. Dr. Leandro Grassi de Freitas. Foi estagiária da empresa Rizoflora Biotecnologia S/A de 2009 a 2011, onde posteriormente ocupou o cargo de coordenadora de laboratório. Em março de 2013 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia – Área de Concentração Entomologia Agrícola, na Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Câmpus de Jaboticabal- SP, com bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), sob orientação do Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos. Iniciou suas atividades como Coordenadora de Pesquisa e Desenvolvimento no Grupo Bio Soja, unidade Químicas e Biológicas de São Joaquim da Barra - SP em Maio de 2015, onde lidera os novos projetos de Controle Biológico de Fitonematoides.

À Deus por estar sempre iluminando o meu caminho

DEDICO

Aos meus pais, José Lúcio e Maria do Carmo, por se dedicarem tanto à minha formação, pelo apoio e incentivo diário. Pelo amor incondicional e por não deixar me sentir só em nenhum momento, dessa difícil etapa. Vocês são pessoas incomparáveis...

Aos meus irmãos Márcio e Marcilene, Pelo carinho, apoio e incentivo.

Aos meus amigos e familiares pelo carinho e preciosos conselhos.

Ao meu diferenciado namorado Thiago “CORAÇÃO”, Pela confiança, amor e carinho e, principalmente, pela paciência. Que seja infinitamente linda a nossa história, que está apenas começando.

AMO MUITO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos pela orientação, generosidade em compartilhar todos os conhecimentos profissional e pessoal, carinho, dedicação, respeito e pela eterna amizade.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP), Campus de Jaboticabal pela infraestrutura e apoio fornecido durante o curso de mestrado.

Ao Departamento de Fitossanidade e Professores do Programa de Pós-graduação em Entomologia Agrícola, pelos conhecimentos compartilhados e pela oportunidade de realizar um prestigiado curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da banca examinadora da Defesa, Dr. Bruno Flávio Figueiredo Barbosa e Dra. Nilza Maria Martinelli pela dedicação e empenho nas correções e por todas as sugestões.

Aos membros da banca examinadora da qualificação, Dra. Nilza Maria Martinelli e Dr. Daniel Junior de Andrade, por todas as contribuições.

A amiga Kerly Cristina Pereira, por todo apoio, companhia, pelos momentos de descontração, e por me mostrar através de pequenos detalhes, o caminho menos árduo para minha formação pessoal e profissional.

Ao pós-doutorando Elder Simões de Paula Batista por toda ajuda e dedicação ao repassar seus conhecimentos, por me auxiliar em muitas tarefas desenvolvidas mesmo com tantos afazeres.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Nematologia UNESP/FCAV, André, Walmir, Mariana, Vanessa, Junior, Suelen, Heric, Ilana, Ângela e Vanderlei pela excelente convivência.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS _____	viii
LISTA DE FIGURAS _____	ix
CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS	
1. INTRODUÇÃO _____	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____	2
3. REFERÊNCIAS _____	7
CAPITULO 2: Isolamento, identificação e avaliação do potencial de fungos nematófagos como agentes de controle biológico.	
1. RESUMO _____	10
2. ABSTRACT _____	11
3. INTRODUÇÃO _____	12
4. MATERIAL E MÉTODOS _____	14
4.1. Seleção de isolados _____	16
4.2. Identificação de isolados _____	16
4.3. Experimento 1: Teste de patogenicidade de isolados fúngicos em ovos de <i>Meloidogyne javanica</i> e <i>Heterodera glycines</i> _____	17
4.4. Experimento 2: Teste de patogenicidade de isolados fúngicos em ovos de <i>H. glycines</i> dentro do cisto _____	18
4.5. Experimento 3: Parasitismo de ovos e larvas de <i>Pratylenchus brachyurus</i> pelo fungo endoparasita <i>Catenaria</i> sp. _____	18
5. RESULTADO E DISCUSSÃO _____	19
6. CONCLUSÃO _____	22
REFERÊNCIAS _____	23

CAPITULO 3: CONTROLE DE NEMATOIDES COM SEMENTES TRATADAS COM FUNGOS

1. RESUMO	26
2. ABSTRACT	27
3. INTRODUÇÃO	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. Obtenção dos isolados fúngicos	30
4.2. Obtenção dos inóculos	30
4.3. Tratamento de sementes	30
4.4. Plantio e infestação	32
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Identificação da localidade e informações sobre as amostras de solo ___ 15

Tabela 2. Efeito do parasitismo de quatro isolados de fungos em ovos de *Meloidogyne javanica*, e em ovos e cistos de *Heterodera glycines*, *in vitro* _____ 21

Tabela 3. Efeito do parasitismo do fungo *Catenaria* sp. em ovos e formas ativas de *Pratylenchus brachyurus*, *in vitro* _____ 22

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Fator de Reprodução das espécies de *Meloidogyne incognita*, *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus* em algodão, soja e milho após tratamento com agentes biológicos. _____ 33

Tabela 2. Médias da massa fresca de raízes de plantas de algodão, soja e milho, cujas sementes foram tratadas com fungos nematófagos e inoculadas com *Meloidogyne incognita*, *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus*. _____ 34

Tabela 3. Médias de matéria seca da parte aérea de plantas de algodão, soja e milho, cujas sementes foram tratadas com fungos nematófagos e inoculadas com *Meloidogyne incognita*, *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus*, _____ 34

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 2

Figura 1. (A) Fotomicrografia de ovos de *Heterodera glycines* colonizados dentro do cisto pelo isolado de *Fusarium solani* (40X). (B) Fotomicrografia de hifas do isolado de *F. solani* em ovos de *Meloidogyne javanica* (100x)
_____20

Figura 2. (A) Fotomicrografia do corpo da fêmea de *Pratylenchus brachyurus* completamente parasitada por *Catenaria* sp. (60X); (B) Fotomicrografia da vesícula formada pelo fungo *Catenaria* sp. em ovos de *Pratylenchus brachyurus* (100X)_____20

CAPÍTULO 3

Figura 1. Tratamento de sementes com suspensão de fungos dentro da câmara de fluxo laminar _____31

CAPÍTULO 1: Considerações gerais

INTRODUÇÃO

Os fitonematoides são responsáveis por grandes perdas na agricultura em todo o mundo, podendo até mesmo inviabilizar o cultivo em determinadas áreas. Os nematoides causadores de galhas radiculares, *Meloidogyne* spp. são um dos principais patógenos agrícolas, em função de sua ampla distribuição, vasta gama de hospedeiros e elevados prejuízos provocados. No Brasil, como em outras partes do mundo, os nematoides-das-galhas têm sido encontrados associados a culturas de grande importância econômica, tornando-se fator limitante à produção de algumas delas, como algodão, batata, café, cana-de-açúcar, cenoura, fumo, soja, tomate, dentre outras (LORDELLO, 1982).

A importância do patógeno é justificada pela dificuldade e pelos altos custos envolvidos no seu controle. O princípio da exclusão é o mais importante quando se pensa no manejo de qualquer nematoide, ou seja, o agricultor deve evitar o estabelecimento deste organismo em local onde ele não ocorra. A partir do momento que a área foi infestada, a sua erradicação torna-se praticamente impossível e as medidas de controle que serão adotadas visarão apenas a redução da população dos nematoides no solo (FERRAZ et al., 2001).

Na redução da densidade populacional desses fitopatógenos, algumas medidas são adotadas, como o controle químico, a rotação de culturas, o uso de variedades resistentes e o controle biológico. O uso de variedades resistentes, embora seja o método ideal de controle de doenças, nem sempre é possível, pois depende da disponibilidade de genótipos que combinem características de resistência com qualidades agronômicas. (FERRAZ et al., 2001). A rotação de culturas, embora seja desejável, normalmente é de difícil aplicação quando se trata de uma cultura perene (HALBRENDT & LAMONDIA, 2005). O controle químico, baseado no uso de nematicidas, tem tido espaço limitado na agricultura mundial, principalmente a partir da década de 80, com a retirada de vários produtos do mercado, devido sua persistência no solo, contaminação dos lençóis freáticos e dos

efeitos prejudiciais aos seres humanos e à fauna do planeta. Somam-se a estes fatores os altos custos e a eficiência temporária de alguns produtos (JATALA, 1986; STIRLING, 1991; KERRY, 2001).

Devido a crescente pressão pública por uma agricultura que cause menos impactos ambientais, métodos alternativos de controle têm sido estudados, como o controle biológico e a incorporação de matéria orgânica ao solo.

REVISÃO DE LITERATURA

O termo controle biológico é definido como sendo a redução da população de um organismo alvo por outro organismo vivo, que não plantas resistentes (STIRLING, 1991). Este controle pode ocorrer naturalmente, através do equilíbrio biológico natural da microbiota do solo, ou de forma induzida, implementado por programas que visam aumentar a população e a atividade dos antagonistas dos nematoides (JATALA, 1986; STIRLING, 1991; FERRAZ & SANTOS, 1995).

Os primeiros experimentos para avaliar o potencial de fungos nematófagos para controle de nematoides foram realizados no Havaí, por Linford & Yap (1939). Os pesquisadores testaram a eficiência de *Arthrobotrys oligospora* Fresenius, *M. ellipsosporium* (Preuss) Cooke & Dickinson, *A. musiformis* Drechsler, *Dactylaria cândida* (Nees ex Peers.) Saccardo e *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler) Schenck, Kendrick & Pramer, no controle de *Meloidogyne* spp.. Desde então, vários estudos têm demonstrado o potencial destes organismos como agentes biocontroladores de nematoides (MANKAU, 1980; JATALA, 1986; STIRLING, 1991; FERRAZ & SANTOS, 1995; SIDDIQUI & MAHMOOD, 1996).

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

Os fungos endoparasitas, como por exemplo, *Catenaria*, *Haptoglossa*, *Hirsutella*, *Nematoctonus*, apresentam esporos que são ingeridos pelos nematóides ou ficam aderidos à sua cutícula. Os conídios, ao germinarem, dão origem a hifas que parasitam o corpo do nematoide. Apresentam pouco potencial de uso como agentes de controle biológico por serem pouco competitivos, dependerem muito da umidade do solo, não crescem muito no solo e são sensíveis às variações de pH, metais, sais, etc (Ferraz & Santos, 1995).

Um grupo de fungos nematófagos que apresenta grande potencial no controle biológico de nematoides é o dos fungos oportunistas ou parasitas de ovos e de fêmeas, com destaque para as espécies *Purpureocillium lilacinum* e *Pochonia chlamydosporia*, conhecida anteriormente como *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium*, respectivamente. Normalmente, esses fungos são saprofiticos, logo, independem da presença de ovos de nematoides no solo para a sua sobrevivência, crescendo satisfatoriamente em matéria orgânica. Devido a essa característica, se estabelecem mais facilmente no solo, quando comparados com os fungos predadores. Parasitam rapidamente ovos e fêmeas de nematoides, destruindo de uma só vez grande quantidade de indivíduos, especialmente no caso dos nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.) e dos cistos (*Heterodera* spp., *Globodera* spp) (Stirling, 1991), necessitando apenas de mais estudos sobre sua ação no manejo de nematoides (Sharon *et al.*, 2001).

Os fungos produtores de metabólitos tóxicos, representados pelos gêneros *Aspergillus*, *Pleurotus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Myrothecium*, demandam mais estudos sobre o efeito das possíveis substâncias tóxicas aos nematoides que produzidas por tais fungos. *Trichoderma* spp. são conhecidos como agentes de controle biológico de fungos fitopatogênicos (ELAD *et al.*, 1993), mas poucas pesquisas foram realizadas sobre a sua ação no manejo de nematoides (SPIEGEL & CHET, 1998; SHARON *et al.*, 2001). Embora o principal modo de controle de nematóides por *Trichoderma* spp. seja a produção de compostos tóxicos, há vários relatos de parasitismo de ovos de fitonematoides por esse gênero de fungo (SPIEGEL & CHET, 1998; SHARON *et al.*, 2001; EAPEN *et al.*, 2005).

Embora existam inúmeros trabalhos explorando o controle biológico de nematoides (STIRLING, 1991; FERRAZ & SANTOS, 1995; SIDDIQUI & MAHMOOD,

1996; FREITAS & CARNEIRO, 2000; KERRY, 2001), a grande maioria das abordagens aplicadas ao controle biológico de doenças de plantas tem sido baseada no uso de um único antagonista contra o(s) patógeno(s) alvo(s) (SIDDIQUI & SHAUKAT, 2002). Entretanto, é provável que na maioria dos casos onde o controle biológico ocorra naturalmente, tal evento seja resultado da mistura de antagonistas, muito mais do que a alta população de apenas um deles (SIDDIQUI & SHAUKAT, 2003). Em solos supressivos a doenças de plantas, a presença de mais de um agente de biocontrole é considerada como um dos principais fatores que contribuem para este fenômeno (LEMANCEAU & ALABOUVETTE, 1991; STIRLING, 1991). No entanto, deve-se conhecer previamente se estes organismos podem ser aplicados conjuntamente, pois um fungo poderia inibir o crescimento do outro.

As espécies de *Fusarium* apresentam distribuição cosmopolita e têm sido isoladas com frequência de ovos e cistos de *H. glycines* (SILVA et al., 1994; CHEN et al., 1994; COSTA et al., 2000). Segundo Chen et al. (1996), fungos do gênero *Fusarium* são bons colonizadores de solo, parasitas de ovos e cistos e, apesar de exibir moderada patogenicidade ao nematoide de cisto da soja, seu potencial de biocontrole deve ser avaliado.

A incorporação de matéria orgânica vegetal ao solo é outra prática bem-sucedida no controle de nematoides, adotada por agricultores desde o início do século passado (RITZINGER & MCSORLEY, 1998). Os mecanismos de ação associados com esta técnica são atribuídos, em parte, a fatores como a melhoria das características físicas e químicas do solo (STIRLING, 1991), resultando em melhor desenvolvimento das plantas, além do aumento da população de microrganismos antagonistas aos nematoides (LINFORD et al., 1938; SITARAMAIIH & SINGH, 1978). Em certos casos, a decomposição destes resíduos resulta na liberação de produtos tóxicos aos nematoides (STIRLING, 1991; GONZAGA & FERRAZ, 1994). A eficiência de determinado material orgânico no controle de nematoides depende de sua composição química e das espécies de microrganismos relacionados com a sua decomposição. A liberação de compostos tóxicos seria a ação direta da degradação do material orgânico e, provavelmente, promoveria rápida redução na população dos nematoides (RODRÍGUEZ-KÁBANA et al., 1984; DIAS-ARIEIRA, 2002). Outros atributos, como a melhoria da estrutura e agregação

do solo e da nutrição das plantas também podem favorecer o controle de nematoides (STIRLING, 1991).

É provável que na maioria dos casos onde o controle biológico ocorra naturalmente, tal evento seja resultado da mistura de antagonistas, muito mais do que uma alta população de apenas um deles (SIDDIQUI & SHAUKAT, 2003). Portanto, a introdução de uma mistura de antagonistas provavelmente resultaria em maior sucesso no controle biológico, pois aumentaria a eficácia e confiabilidade do controle, em função da ampliação do espectro de atividade, podendo reunir vários mecanismos de ação contra o patógeno alvo (SIDDIQUI & SHAUKAT, 2002, 2003). Atualmente, os métodos mais utilizados para o manejo de fitonematoides, são: o uso de nematicidas, de cultivares resistente e de rotação de culturas. Alguns nematicidas têm sido retirados do mercado devido aos efeitos nocivos ao ecossistema, à persistência no solo e à contaminação do lençol freático (RODRIGUES et al., 2003). O controle biológico torna-se mais uma alternativa para o manejo, por minimizar o dano ambiental e ser mais vantajoso economicamente, comparado aos métodos químicos convencionais.

A grande parte de estudos voltados ao controle biológico de doenças de plantas foi baseada no uso de um único antagonista contra o patógeno alvo (JATALA, 1986; SIDDIQUI; SHAUKAT, 2003; FERRAZ et al., 2010). Entretanto, o local onde ocorre o controle biológico naturalmente, seja resultado da mistura de antagonistas, muito mais do que uma alta população de apenas um (SIDDIQUI; SHAUKAT, 2003; ROBERTS et al., 2005). Porém, a mistura de antagonistas pode ou não ser vantajosa para o controle de fitopatógenos devendo-se ter o cuidado de evitar a mistura de isolados incompatíveis (AKRAMI et al., 2009; LUCON et al., 2009). Esta situação foi reportada por Lucon et al. (2009). Na ocasião, os autores verificaram que na aplicação conjunta de cinco isolados de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* apenas duas combinações entre os isolados do antagonista resultaram em maior controle da doença.

O controle biológico apresenta varias vantagens em relação ao químico, pois não contamina, não desequilibra o meio ambiente e nem deixa resíduos, além de ser barato e de fácil aplicação (SOARES, 2006). Uma grande quantidade de organismos é capaz de repelir, inibir ou mesmo levar a morte dos fitonematoides. Já foram

relatados mais de 200 organismos considerados inimigos naturais dos fitonematoides, como fungos, bactérias, nematóides predadores, tardígrados, colêmbolas e ácaros (KERRY, 1990), cujo potencial pode ser explorado no intuito de alcançar resultados mais consistentes e promissores. Dentre estes, os fungos têm se destacado. Cerca de 75% dos antagonistas identificados, são fungos que habitam normalmente o solo que podem ser parasitas de ovos, predadores de juvenis, adultos ou cistos, ou ainda produzem metabólitos tóxicos aos nematoides (JATALA, 1986). Alguns fungos nematófagos também podem ser capazes de colonizar endofiticamente raízes de plantas e, além disso, controlarem doenças causadas por outros fungos de solo (MONFORT et al., 2005).

Algumas empresas vêm focando suas pesquisas no desenvolvimento de formulações com organismos que sejam antagonistas dos fitonematoides. Produzem produtos à base de microrganismos com potencial de controle biológico comprovado em pesquisas, e essa tecnologia é empregada visando à sustentabilidade do sistema agrícola, com a redução de agrotóxicos, evitando perdas e produzindo alimentos de qualidade.

REFERÊNCIAS

- AKRAMI, M.; IBRAHIMOV, A. S.; ZAFARI, D. M.; VALIZADEH, E. Control *Fusarium* root of bean by combination of by *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma asperellum* in greenhouse condition. **Agricultural Journal**, Faisalabad, v. 4, p. 121-123, 2009.
- CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P. Efeito da época e forma de aplicação dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* no controle de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 261-265, 1997.
- CHEN, S.Y.; D.W. DICKSON & D.J. MITCHELL. 1996. Pathogenicity of fungi to eggs of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, 28(2): 148-158.
- CHEN, S.Y.; D.W. DICKSON; J.W. KIMBROUGH; R. McSOLEY & D.J. MITCHELL. 1994. Fungi associated with females and cysts of *Heterodera glycines* in a Florida soybean field. **Journal of Nematology** 26(3): 296-303.
- COSTA, M. J. N.; CAMPOS, V. P.; PFENNING, L. H.; OLIVEIRA, D. F. Filtrados de culturas fúngicas com ação antagonista a *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, supl., p. 235-336, 2000.
- DIAS-ARIEIRA, C. R.; FERRAZ, S.; FREITAS, L. G.; MIZOBUSTI, E. H. Avaliação de gramíneas forrageiras para o controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* (Nematoda). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 25, n. 2, p. 473-477, 2003.
- EAPEN, S.J.; BEENA, B & RAMANA, K.V. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.88, p.218-225, 2005.
- ELAD, Y.; ZIMMAND, G.; ZAQS, Y.; ZURIEL, S. & CHET, I. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. **Plant Pathology**, v.42, 324-332, 1993.
- FERRAZ, S. & SANTOS, M.A. Controle biológico de fitonematóides pelo uso de fungos. **Revisão Anual de Proteção de Plantas**, v.3, p.283-314, 1995.
- FERRAZ, S.; DIAS, C.R. & FREITAS, L.G. 2001. Controle de nematóides com práticas culturais. In: ZAMBOLIM, L. (ed). **Manejo Integrado-Fitossanidade: Cultivo protegido, pivô central e plantio direto**. Editora UFV, Viçosa, pp. 1-52.
- FREITAS, L. G.; FERRAZ, S.; ALMEIDA, A. M. S. Controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro pela produção de mudas de tomateiro em substrato infestado com *Paecilomyces lilacinus*. **Nematologia Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 65-73, 1999.
- FREITAS, L.G. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2000. Controle biológico de fitonematóides por *Pasteuria* spp. IN: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. (Eds). **Controle Biológico**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, 388 p.

GONZAGA, V. & FERRAZ, S. 1994. Efeito da incorporação da parte aérea de algumas espécies vegetais no controle de *Meloidogyne incognita* raça 3. **Nematologia Brasileira**, 18: 42-49.

HALBRENDT, J.M. & LaMONDIA. 2004. Crop rotations and other cultural practices. IN: CHEN, Z.; S. CHEN & D.W. DICKINSON (Eds). **Nematology – Advances and Perspectives. Volume II: Nematode Management and Utilization**. Beijing & Wallingford, Tsinghua University Press & CAB International, p. 909-930.

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

KERRY, B.R. Exploitation of nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: BUTT, T.M.; JACKSON, C. & MAGAN, N. (Ed). Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential. Wallingford: **CAB International**, 2001. 380p.

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

LINFORD, M.B.; Y. FRANCIS & J.M. OLIVEIRA. 1938. Reduction of soil populations of the root-knot nematode during decomposition of organic matter. **Soil Science**, 45: 127-141.

LINFORD, M.B. & F. YAP. 1939. Root-Knot nematode injury restricted by a fungus. **Phytopathology**, 29: 596-608.

LORDELLO, L. G. E. **Nematóides das plantas cultivadas**. São Paulo: Nobel, 1982. 314p.

LUCON, C. M. M.; KOIKE, C. M.; ISHIKAWA, A. I.; PATRÍCIO, F. R. A.; HARAKAVA, R. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, p. 225-232, 2009.

MANKAU, R. 1980. Biocontrol: fungi as nematode controlagents. **Journal of Nematology**, 12: 244-252.

MONFORT, E.; LOPEZ-LORCA, L. V.; JANSSON. H. B.; SALINAS, J.; PARK, J. O.; SIVASITHAMPARAM, K. Colonization of seminal roots of wheat and barley by egg parasitic nematophogous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root-rot. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 1229-1235, 2005.

RITZINGER, C.H.S. & McSORLEY, R. 1998. Effect os fresh and dry organic amendments on *Meloidogyne arenaria* in greenhouse experiments. **Nematropica**, 28(2): 173-185.

ROBERTS, D. P.; LOHRKE, S. M.; MEYER, SL. F.; BUYER, J.S.; BOWERS, J. H.; BAKER, C. J.; LI, W.; SOUZA, J. T.; LEWIS, J. A.; CHUNG, S. Biocontrol agents

applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 24, p. 141-155. 2005.

RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; MORGAN-JONES, G.; GODOY, G.; GINTIS, B. O. Effectiveness of species of *Giocladium*, *Paecilomyces* and *Verticillium* for control of *Meloidogyne arenaria* in field soil. **Nematropica**, v. 14, n. 1, p. 155-170, 1984.

SOARES, P. L. M.; SANTOS, J. M. dos. Utilização de fungos nematófagos no controle biológico de fitonematóides. In: BORTOLI, S.A. de; BOIÇA JÚNIOR, A.L.; OLIVEIRA, J.E. de M. **Agentes de controle biológico: metodologia de criação, multiplicação e uso**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. p. 1-59.

SHARON, E.; BAR-EYAL, M.; CHET, I. HERRERA-ESTRELLA, AA.; KLEIFELD, O. & SPIEGEL, Y. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v.91, p.687-693, 2001.

SIDDIQUI, Z.A. & MAHMOOD, I. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: A review. **Bioresource Technology**, v.58, p.229-239, 1996.

SIDDIQUI, I.A. & SHAUKAT, S.S. Mixtures of plant disease suppressive bacteria enhance biological control of multiple tomato pathogens. **Biology and Fertility of Soils**, v.36, p.260-268, 2002.

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

SILVA, J.F.V.; S.M.T. PIZA & R.G. CARNEIRO, 1994. Fungos associados a ovos de *Heterodera glycines*. **Nematologia Brasileira** 18: 73-78.

SPIEGEL, Y. & CHET, I. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. **Integrated Pest Management Reviews**, v.3, p.169- 175, 1998.

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

CAPÍTULO 2: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FUNGOS NEMATÓFAGOS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO.

RESUMO- Em razão das elevadas perdas que os nematoides causam a agricultura e das limitações e impactos causados pelos defensivos químicos, assim como do cultivo sucessivo de plantas hospedeiras que propiciam o aumento das populações dessas pragas, esse trabalho teve como objetivo, isolar, identificar fungos nematófagos e avaliar o potencial como agentes de controle biológico das principais espécies de fitonematoides no Brasil. Os fungos foram isolados de amostras de solo coletadas em regiões dos estados do MS, MG e SP, de cisto e de nematoides naturalmente parasitados. Para testar a patogenicidade dos isolados fúngicos parasitas de ovos e cisto de *Heterodera glycines* pelos fungos *Pochonia chlamydosporia*, *Fusarium solani* e *Trichoderma* sp., dois experimentos *in vitro* foram conduzidos, compostos pela combinação das espécies de nematoides com cada isolado parasita e a testemunha: 1) capacidade de parasitismo de ovos de *Meloidogyne javanica* e *H. glycines*, e 2) capacidade de parasitismo de ovos de *H. glycines* dentro do cisto, totalizando 10 e 4 tratamentos, respectivamente e 3 repetições cada. Para o fungo endoparasita *Catenaria* sp. foram usados ovos e formas ativas de *Pratylenchus brachyurus*, 3 tratamentos e 3 repetições. Os ovos e cistos parasitados foram avaliados e fotomicrografados. O isolado de *P. chlamydosporia* se destacou, tendo parasitado mais de 80% dos ovos de *H. glycines*. O fungo endoparasita *Catenaria* sp. parasitou 89% das formas ativas de *P. brachyurus*, além de parasitar ovos dessa mesma espécie.

Palavras-chave: controle biológico, *Catenaria* sp., diversidade microbiana do solo, *Heterodera glycines*, nematoides de galha, *Pochonia chlamydosporia*, *Pratylenchus brachyurus*

ISOLATION, IDENTIFICATION AND EVALUATION OF POTENTIAL NEMATOPHAGOUS FUNGI AS BIOLOGICAL CONTROL AGENTS

ABSTRACT - Given the high losses that nematodes cause agriculture and the limitations and impacts of agrochemicals, as well as the continuous cultivation of host plants that provide increased populations of these pests, this study aimed to isolate, identify and fungi nematophagous evaluate the potential as biological control agents of the main species of plant-parasitic nematodes in Brazil. The fungi were isolated from soil samples collected in regions of the states of MS, MG and SP, cyst and naturally infected nematodes. To test the pathogenicity of the isolated fungal parasite eggs and cysts of *Heterodera glycines* by fungi *Pochonia chlamydosporia*, *Fusarium solani* and *Trichoderma* sp, two in vitro experiments were conducted, composed by the combination of species of nematodes with every single parasite and the witness: 1) parasitism capacity of *Meloidogyne javanica* eggs and *H. glycines*, and 2) parasitism capacity of *H. glycines* eggs within the cyst, totaling 10 and 4 treatments, respectively, and 3 repetitions each. For fungus endoparasite *Catenaria* sp. they were used eggs and active forms *Pratylenchus brachyurus*, three treatments and three replications. Eggs and infected cysts were evaluated and photomicrographed. The isolate of *P. chlamydosporia* stood, infested with more than 80% of the eggs of *H. glycines*. The fungus endoparasite *Catenaria* sp. parasitized 89% of active forms of *P. brachyurus*, and parasite eggs of the same species.

Keywords: biological control, *Catenaria* sp., microbial diversity of soil, *Heterodera glycines*, root-knot nematodes, *Pochonia chlamydosporia*, *Pratylenchus brachyurus*

INTRODUÇÃO

O grupo dos fungos parasitas de ovos e de fêmeas são os agentes de controle biológico de nematoides mais estudados, e são os que apresentam maior relevância no controle de fitonematoides, com destaque para as espécies *Purpureocillium lilacinum* e *Pochonia chlamydosporia*, conhecidos anteriormente como *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium*, respectivamente. Estes, juntamente com as bactérias, são os que apresentam maior potencial de uso na agricultura. Eles apresentam estratégias sofisticadas para infectar ou capturar os nematoides, podendo ser divididos em: predadores, endoparasitas, oportunistas (parasitas de ovos e de fêmeas sedentárias) e produtores de metabólitos tóxicos aos nematoides (STIRLING, 1991).

Normalmente, esses fungos são saprófitos e independem da presença de ovos de nematoides no solo para a sua sobrevivência, crescendo satisfatoriamente em matéria orgânica. Portanto são parasitas facultativos, principalmente de ovos e fêmeas de nematoides dos cistos (KERRY e HIRSCH, 2011). Em função dessa característica, são mais fáceis de estabelecerem no solo, quando comparados com os fungos predadores. Colonizam rapidamente ovos e fêmeas de nematoides, destruindo de uma só vez grande quantidade de indivíduos, especialmente no caso dos nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) e de cisto (*Heterodera* spp., *Globodera* spp), conforme menção de Stirling, 1991. Portanto, esses fungos podem ser encontrados em todos os continentes como um importante agente de controle biológico de populações de nematoides, incluindo várias espécies de *Heretodera* (KERRY, 1975), *Meloidogyne* (LOFFREDO et al., 2007) e *Nacubbus aberrans* (FLORES-CAMACHO et al., 2007). Podem ser facilmente isolados de solos infestados por nematoides e contendo matéria orgânica.

A necessidade de um sistema alternativo para o controle de nematoides parasitas de plantas tem aumentado nas últimas décadas, em função principalmente da proibição de muitos nematicidas importantes (KERRY e HIRSCH, 2011).

O potencial de *Trichoderma* spp. para controle de nematoides é promissor, e vem demonstrando *in vitro* eficiência em diferentes espécies de nematoides (SHARON et al, 2007). Há trabalhos que apontam para o potencial do *Trichoderma*

spp. no controle biológico de fitonematoides. Dentre as possíveis interações está na capacidade de colonização da massa de ovos gelatinosa formada por espécies de *Meloidogyne* spp. (SHARON et al., 2007).

Gintis (1982) relatou *Fusarium solani* parasitando ovos e cistos de *H. glycines*. Apesar de alguns isolados de espécies do gênero *Fusarium* terem desenvolvido mecanismos especializados para o parasitismo, esses fungos são normalmente saprófitos, sendo oportunista sua associação com nematoides (STIRLING, 1991). Entretanto o rápido crescimento micelial, colonização das raízes e esporulação intensa coloca *Fusarium* spp. em posição importante no controle de nematoides no solo, influenciado pelas condições das regiões tropicais, a temperatura e umidade favorecem a ação sobre os nematoides (SILVA et al., 1994).

Catenaria sp. é um fungo endoparasita obrigatório de nematoides vermiformes. Entretanto, *C. anguillulae* é um parasita facultativo de fêmeas e ovos de nematoides de galha (WYSS et al., 1990). Zoósporos uniflagelados que são atraídos por secreções corporais do nematoide, penetrando pelos orifícios naturais do corpo do hospedeiro (abertura oral, ânus, vulva, etc) e produzem vesículas esféricas (CURTIS et al., 2011).

Em virtude da diversidade de fungos que atuam naturalmente no solo promovendo o controle biológico de nematoides, o objetivo do trabalho foi isolar, identificar fungos nematófagos e avaliar *in vitro* seu potencial como agente de controle biológico das principais espécies de fitonematoides no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Nematologia do Departamento de Fitossanidade da FCAV/UNESP - Campus de Jaboticabal, São Paulo.

A multiplicação de *P. brachyurus* foi realizada em cilindro de cenoura pelo método desenvolvido por MOODY et al. (1973) e modificado por Gonzaga et al. (2006), e extraídos pela flotação centrífuga em solução de sacarose com caulim (COOLEN & D'HERDE, 1972).

Amostras de solo de diferentes regiões do estado de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato grosso e Mato Grosso do Sul (Tabela 1) foram utilizadas para a detecção e isolamento de fungos nematófagos presentes na microflora do solo, em áreas onde existe a ocorrência de nematoides em baixas densidades. Foi utilizado o método do espalhamento de solo descrito por Barron (1977) e modificado por Santos (1991) para a detecção dos fungos nematófagos endoparasitos. No centro das placas de Petri, contendo ágar-água 2% foi colocada uma colher de chá da amostra de solo previamente homogeneizada. Em seguida foi adicionado 1 mL de suspensão concentrada do nematoide *P. brachyurus*, tendo como objetivo estimular a esporulação dos fungos nematófagos.

Após a aplicação da suspensão de *P. brachyurus*, as placas foram recobertas com um plástico preto e mantidas em condições de ambiente do laboratório, onde as médias das temperaturas mínimas e máximas no período foram anotadas. Aproximadamente 2 dias após o plaqueamento das amostras de solo foi iniciada a observação em estereoscópio.

Constatada a presença de nematoides predados ou até mesmo paralisados indicando alguma limitação gerada por microrganismos, estes foram transferidos para outra placa com ágar-água 2% e, em seguida, foi adicionado 1 mL de suspensão concentrada do nematoides para induzir a multiplicação do fungo. Ovos e formas ativas dos nematoides colonizados foram fotomicrografados em um sistema de aquisição de imagens constituído por uma câmera digital Olympus DP72®, sobre um microscópio trinocular Olympus BX 50®, ligada a um computador, utilizando-se o

Tabela 1: Identificação da localidade e informações sobre as amostras de solo

Amostra	Localidade	Informações
1	Uberlândia- MG	Pousio
2	Diamantina- MG	Fazenda Riacho das Varas; Café
3	Cuiabá- MT	Fazenda Guadalupe; Talhão Baubem 06; Fora da Reboleira
4	Cuiabá- MT	Fazenda Guadalupe; Talhão Baubem 06; Soja
5	Cuiabá- MT	Fazenda Vista Alegre; Talhão 21; Soja
6	Cuiabá- MT	Fazenda Vista Alegre; Talhão 20; fora da reboleira; Soja
7	Presidente Prudente-SP	Pousio
8	Fazenda Camararé- GO	Talhão 240/254; fora da reboleira; Soja
9	Fazenda Arimera- GO	Talhão 256; Fora da reboleira; Soja
10	Fazenda Arimera- GO	Talhão 2; Fora da reboleira; Soja
11	Inhotim- MG	<i>Trialis</i> sp.
12	Inhotim- MG	<i>Cuphea gracialis</i> (Branca)
13	Inhotim- MG	<i>Cuphea gracialis</i> (Roxa)
14	Valinhos- SP	Citrus
15	Unesp- Jaboticabal- SP	Mata; próximo á lagoa
16	Unesp- Jaboticabal- SP	Jardim da Cantina central; Ornamental 1
17	Unesp- Jaboticabal- SP	Mata; Creche
18	Unesp- Jaboticabal- SP	Jardim da Cantina central; Ornamental 2
19	Unesp- Jaboticabal- SP	Mata; Laboratório O
20	Vista Alegre do Alto- SP	A1; Goiaba
21	Vista Alegre do Alto- SP	A2; Goiaba
22	Vista Alegre do Alto- SP	A3; Goiaba
23	Vista Alegre do Alto- SP	A4; Goiaba
24	Viçosa- MG	Universidade Federal de Viçosa; Mata 1
25	Viçosa- MG	Universidade Federal de Viçosa; Mata 2
26	Taquaritinga- SP	Pomar de Goiaba comercial
27	Taquaritinga- SP	Pomar de Goiaba; Sr. Kuka; solo fungado
28	Chapadão do Sul- MS	Soja
29	Chapadão do Sul- MS	Soja
30	Chapadão do Sul- MS	Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; Soja
31	Costa Rica- MS	Parque Natural Municipal Salto do Sucuriú; A1
32	Costa Rica- MS	Parque Natural Municipal Salto do Sucuriú ; A2
33	Costa Rica- MS	Parque Natural Municipal Salto do Sucuriú; A3
34	Costa Rica- MS	Parque Natural Municipal Salto do Sucuriú; A4
35	Costa Rica- MS	Parque Natural Municipal Salto do Sucuriú; A5
36	Costa Rica- MS	Parque Natural Municipal Salto do Sucuriú; A6
37	Costa Rica- MS	Parque Natural Municipal Salto do Sucuriú; A7
38	Costa Rica- MS	Parque Natural Municipal Salto do Sucuriú; A8
39	Costa Rica- MS	Parque Natural Municipal Salto do Sucuriú; A9

Software Image-Pro® Plus 4.1 (Media Cybernetics, 8484 Georgia Avenue, Silver Spring, MD 20910, EUA) para auxiliar na identificação da espécie de microrganismo potencialmente útil como agente do controle biológico do nematoide.

De amostra de solo infestada com *H. glycines* foram extraídos cistos conforme a metodologia de Jenkins (1964), em seguida foi realizada uma assepsia superficial em álcool 70% (1 min), solução de hipoclorito a 0,05% (2 min) e, em seguida, foram lavados 3 vezes em água destilada e autoclavada. Os cistos foram rompidos para liberação dos ovos, e estes foram colocados em meio ágar-água 2% e incubados em BOD a 25 °C ± 1. Os fungos que se desenvolveram foram repicados em cultura pura para serem identificados posteriormente.

De raiz de milho cultivado em vaso em casa de vegetação foram extraídas *P. brachyurus* e detectado o parasitismo pelo fungo *Catenaria* sp. Para estimular a esporulação do fungo foram adicionados 30 mL de suspensão contendo 1000 ovos e formas ativas de *P. brachyurus*.

Seleção dos isolados

A seleção dos isolados de fungos filamentosos obtidos do plaqueamento do solo foi realizada conforme descrito por Eapen et al., (2005). Discos de micélio de 5 mm de diâmetro removidos das bordas de culturas dos isolados, crescidos em meio batata-dextrose-água (BDA) foram repicados para placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo ágar-água a 2%. Em seguida, adicionou-se 1 mL de uma suspensão de ovos de *M. javanica* contendo 100 ovos/mL. As placas foram mantidas incubadas em BOD a 25 °C ± 1. Após 10 dias, foram avaliados os ovos com o auxílio de microscópio fotônico, calculando-se o percentual de ovos colonizados pelo respectivo fungo.

Identificação dos isolados

Os isolados cultivados em BDA foram repicados para placas de Petri contendo ágar-ágar 2% e incubados em BOD 25 °C ± 1 por sete dias. Para

documentação dos isolados foram feitas lâminas semipermanente usando corante lactofenol azul de algodão para evidenciar as estruturas fungicas. Para a identificação das espécies dos fungos isoladas foram utilizadas as chaves de identificação propostas por Cooke & Godfrey (1964) e Barron (1972), que levam em consideração os tipos de órgãos de captura, formato e tamanho dos conídios, além dos tipos de conidióforos formados.

Experimento 1: Teste de patogenicidade de isolados fúngicos em ovos de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines*

As espécies de nematoides *M. javanica* e *H. glycines* (raça 3), foram multiplicadas em plantas de berinjela e soja suscetível, respectivamente, em vasos de 5 litros contendo mistura de solo de barranco e areia na proporção 2:1, previamente autoclavados. As massas de ovos de *M. javanica* foram retiradas manualmente da superfície da raiz infectada, previamente lavada em água corrente, com auxílio de uma pinça e lupa, e os cistos *H.glycines* foram extraídos conforme a metodologia de Jenkins (1964). Em seguida foi realizada uma assepsia dos ovos e cistos em álcool 70% (1 min), solução de hipoclorito a 0,05% (2 min) e a lavam em água destilada e autoclavada. Os cistos foram rompidos com a ponta de uma pinça para liberar os ovos em suspensão e, em seguida, as suspensões foram calibradas para 100 ovos/mL.

Os isolados fúngicos foram repicados para placa de petri contendo meio de cultura BDA Comercial e incubados em BOD a 25 °C ± 1. Para o preparo da suspensão dos fungos foi adicionada água destilada e autoclavada contendo twin 80 à cultura dos fungos. Em seguida, as suspensões foram calibradas para $2,0 \times 10^7$ conídios /mL, com auxílio da câmara de Neubauer.

Em uma placa de Petri de 5 cm de diâmetro foram acrescentados 1 mL de suspensão de ovos de nematoides, 1 mL da suspensão de esporos e 5 mL de água destilada e autoclavada para cobrir o fundo da placa. A seguir, promoveu-se a distribuição da suspensão nas placas por meio de movimentos elípticos em cada uma delas. Os tratamentos foram compostos por cada um dos isolados de fungos combinados individualmente com ovos de *M. javanica* e *H. glycines* mais a

testemunha, onde continha somente água e ovos das respectivas espécies de nematoides, totalizando 10 tratamentos com 3 repetições cada. Todas as placas contendo as culturas foram incubadas em BOD a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. Depois de 72h teve início a primeira avaliação, repetindo-se a cada 2 dias, até que algum dos isolados colonizasse o maior número de ovos antes que o juvenis eclodissem. Com auxílio de um estereoscópio foram retirados das placas os ovos visivelmente colonizados com uma micropipeta, corados com Lactofenol azul de algodão e quantificados para análise estatística.

Experimento 2: Teste de patogenicidade de isolados fúngicos em ovos de *Heterodera glycines* dentro do cisto

Os isolados fúngicos foram repicados para placas de petri contendo meio de cultura Ágar-ágar 2% e incubados em BOD a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. Os cistos de *H. glycines* foram extraídos conforme a metodologia de Jenkins (1964), em seguida foi realizada uma assepsia desses em álcool 70% (1 min), solução de hipoclorito a 0,05% (2 min) e lavados em água destilada e autoclavada antes de serem expostos aos fungos. Os tratamentos foram compostos por cada um dos isolados e cistos de *H. glycines* mais a testemunha, onde continha somente os cistos no meio Ágar-água, totalizando cinco tratamentos com três repetições cada. Os cistos foram transferidos cuidadosamente um a um para as extremidades das colônias fúngicas, para cada colônia foram depositados 15 cistos, de onde se retiravam 3 cistos a cada 7 dias para avaliar a percentagem de colonização. Os cistos retirados das colônias eram estourados e corados com Lactofenol azul de algodão, para evidenciar o parasitismo pelas hifas fúngicas. Foi realizada a contagem total de ovos em cada cisto e a de ovos coloridos de azul para estimar a percentagem de colonização por cisto.

Experimento 3: Parasitismo de ovos e larvas de *Pratylenchus brachyurus* pelo fungo endoparasita *Catenaria* sp.

A população de *P. brachyurus* foi multiplicada em cilindros de cenoura e os espécimes extraídos como descrito anteriormente.

Nematoides parasitados com o fungo foram transferidos um a um para BPI, passaram por assepsia em álcool 70% (1 min), solução de hipoclorito a 0,05% (2 min) e lavados em água destilada e autoclavada. Em seguida foram macerados para liberar os zoósporos em suspensão. O experimento foi composto pela combinação do fungo *Catenaria* sp. com ovos e formas ativas, separadamente, mais a testemunha com 3 repetições cada tratamento. Para isso foram transferidos 1mL da suspensão de zoósporo, previamente homogeneizada para uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo uma suspensão de 5mL de 200 ovos ou formas ativas de *P. brachyurus*. Após cinco dias avaliou-se o número de ovos e formas ativas parasitadas.

Todos os dados obtidos foram analisados estatisticamente com o auxílio do pacote estatístico Assistat 7.7 beta (SILVA et al., 2009).

Os isolados foram incluídos na coleção de fungos nematófagos do Laboratório de Nematologia Departamento de Fitossanidade da FCAV/UNESP - Campus de Jaboticabal, São Paulo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise de 39 amostras de solo, foram obtidos 10 isolados de fungos nematófagos, sendo detectados isolados de *P. chlamydosporia* e *Trichoderma* spp. que se destacaram pelo potencial de parasitismo de ovos. De amostras de solo infestado por *H. glycines* com cistos colonizados foram obtidos dois isolados de *Fusarium solani* ambos parasitando ovos dentro do cisto (Figura 1). De suspensão contendo *P. brachyurus* retirados de inoculo cultivado em milho suscetível obteve-se o fungo endoparasita *Catenaria* sp. parasitando formas ativas e ovos, (Figura 2).

O isolado Pc1 de *P. chlamydosporia* colonizou 82% e 88% dos ovos de *M. javanica* e *H. glycines*, respectivamente, diferindo significativamente do grupo testemunha e dos demais isolados (Tabela 1). Lopes et al., (2007) relatou a redução do número de ovos de *M. javanica* em até 85,6% após a aplicação do fungo *P. chlamydosporia* em tomateiro. em casa de vegetação. Resultados similares foram

observados quando outras espécies de *Meloidogyne* foram estudadas (CAMPOS, 1994; FERREIRA et al., 2008).

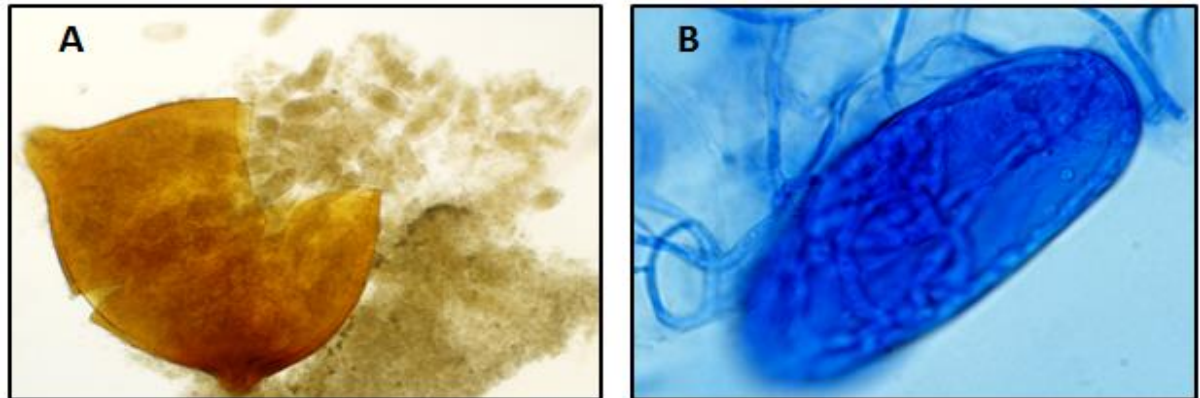


Figura 1. (A) Fotomicrografia de ovos de *Heterodera glycines* colonizados dentro do cisto pelo isolado de *Fusarium solani* (40X). (B) Fotomicrografia de hifas do isolado de *F. solani* em ovo de *Meloidogyne javanica* (100x).

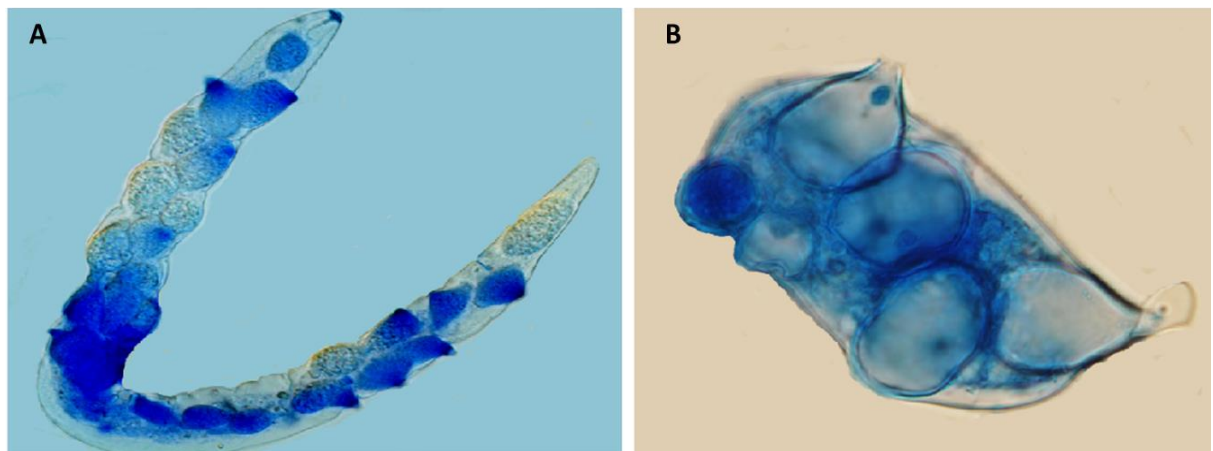


Figura 2. (A) Fotomicrografia do corpo da fêmea de *Pratylenchus brachyurus* completamente parasitada por *Catenaria* sp. (60X); (B) Fotomicrografia da vesícula formada pelo fungo *Catenaria* sp. em ovos de *Pratylenchus brachyurus* (100X).

Nematoides do gênero *Heterodera* passam por uma dormência endógena, também denominada diapausa, necessária para seu desenvolvimento (EVANS, 1987). Portanto, seus ovos ficam mais tempo expostos ao parasitismo de fungos, sendo observada uma percentagem de parasitismo dos isolados em ovos de *H. glycines* superior ao de *M. javanica*. Em contrapartida, a taxa de eclosão de juvenis

de *M. javanica* no final da avaliação sempre foi maior que a de ovos de *H. glycines* (Tabela 2).

O isolado *F. solani* Hg apresentou uma alta porcentagem de colonização de ovos de *H. glycines* e baixa em *M. javanica*, devido à facilidade de eclosão dos juvenis de segundo estágio (J2) das espécies de *Meloidogyne* que ficam menos tempo expostos aos fungos parasitas de ovos facultativos, reduzindo a taxa de parasitismo. Segundo La Mondia e Brondie (1984), ovos nos estágio inicial de desenvolvimento embriogênico são mais facilmente parasitados do que quando já possuem o juvenil de segundo estágio já formado dentro do ovo. A baixa eficiência de parasitismo de alguns fungos isolados de cistos de *H. glycines* pode ser devido ao fato que tais fungos no campo se comportam mais como saprófitas do que como parasitas, Mizobutsi et al., 2000.

Com base nas condições de realização desse experimento e nos dados obtidos, foi possível observar que o fungo *Catenaria* sp. apresentou um controle efetivo de 89% de juvenis de *P. brachyurus* (Tabela 3). Castillo & Lawrence, (2011) observaram 39,5% da população de *Rotylenchus reniformes* parasitados pelo fungo *C. auxiliaris* em casa de vegetação. Foi possível observar durante as avaliações que antes da formação de vesículas característica do fungo, o nematoide já estava visivelmente paralisado, indicando que ao penetrar no corpo do nematoide o fungo limita a sua movimentação.

Tabela 2. Efeito do parasitismo de quatro isolados de fungos em ovos de *Meloidogyne javanica* e em ovos e cistos de *Heterodera glycines*, *in vitro*.

Isolados	<i>Meloidogyne javanica</i>		<i>Heterodera glycines</i>		
	% de ovos Parasitados	% de J2 eclodidos	% de ovos Parasitados	% de J2 eclodidos	% de ovos Parasitados dentro do cisto**
<i>P. chlamydosporia</i>	80,00 a**	20,00 c	88,00 a**	2,00 b	83,00 a
<i>F. solani</i> Hg	29,33 bc	61,33 b	75,67 b	5,67 ab	75,33 a
<i>Trichoderma</i> sp.	42,00 b	50,33 b	44,33 c	11,33 a	71,33 a
<i>F. solani</i> F5	23,33 c	65,67 ab	27,33 d	8,00 ab	41,67 b
Testemunha	0,00 d	84,00 a	0,00 e	7,67 ab	0,00 c
CV%	14,24	14,32	4,03	49,96	12,28

**Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Tabela 3. Efeito do parasitismo do fungo *Catenaria* sp. em ovos e formas ativas de *Pratylenchus brachyurus*, *in vitro*.

Tratamentos	% de parasitismo
Larvas + fungo	89,00 a
Ovos + fungo	13,33 b
Testemunha	0,00 c
CV%	15,47

**Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

As informações geradas sobre a diversidade de fungos com elevado potencial de controle biológico de nematoides podem servir de subsídio para elaboração de estratégias de manejo de conservação da microbiota a partir de adição ou preservação da matéria orgânica no solo, a fim de favorecer a sobrevivência de fungos nematófagos. Os resultados das análises *in vitro* são indicativos de que existe uma infinidade de isolados fúngicos atuando isoladamente cada um com um potencial, mas que serve para manter o equilíbrio entre as interações tróficas existente no solo, realçando a necessidade de adoção de um manejo sustentável e de uma visão holística sobre todos os aspectos que envolvem seres vivos em geral, antes de tomar qualquer decisão que possa causar um desequilíbrio. Porém, estudos posteriores em casa de vegetação e no campo, devem ser conduzidos para confirmar a eficácia e a compatibilidade entre os dois isolados.

CONCLUSÕES

1. Nas condições de realização desse trabalho foi possível concluir que os isolados fúngicos de *P. chlamydosporia* (*Pc1*) e *Fusarium solani* (*Hg*) apresentam eficiência satisfatória na colonização de ovos de *M. javanica* e de *H. glycines*, e 83% e 75,3% de colonização dos ovos dentro do cisto de *H. glycines*, respectivamente pelos mesmos isolados.

2. O fungo endoparasita *Catenaria* sp. apresentou alta taxa de parasitismo em juvenis e adultos de *P. brachyurus*, demonstrando uma especificidade ainda não relatada na literatura, além de parasitar ovos dessa mesma

espécie, indicando que o fungo pode produzir enzimas que degradam a casca de ovos do nematoide.

AGRADECIMENTO

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

REFERÊNCIAS

BARRON, G.L. The nematode-destroying fungi. Ontario: **Canadian Biological Publications**, 1977. 140p.

BIRCHFIELD, W. A new species of *Catenaria* parasitic on nematodes of sugarcane. V.11, 1960

CASTILLO, J.D., LAWRENCE, K.S. 2011. First report of *Catenaria auxiliaris* parasitizing the reniform nematode *Rotylenchulus reniformis* on cotton in Alabama. **Plant Disease** 95:490.

COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Gent: **State Agricultural Research Center**, 1972. 77p.

CURTIS, R. H. C.; JONES, J. T.; DAVIES, K.G.; SHARON, E.; SPIEGEL, Y. Plant Nematode Surfaces. In: Davies. K.; Spiegel, Y. (Ed.) **Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Building Coherence between Microbial Ecology and Molecular Mechanisms**, 2011. p.115-144.

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

EAPEN, S.J.; BEENA, B & RAMANA, K.V. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.88, p.218-225, 2005

ELAD, Y.; ZIMMAND, G.; ZAQS, Y.; ZURIEL, S. & CHET, I. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. **Plant Pathology**, v.42, 324-332, 1993.

EVANS, A.A.F. 1987. Diapause in nematodes as a survival strategy. In: VEECH, J.A. & D.W. DIECKSON. (eds). **Vistas on Nematology: A Commemoration of the Twenty-fifth Anniversary of the Society of Nematologists**. E.O Painter Printing Co., DeLeon Springs, Florida. Pp. 180-187.

FLORES-CAMACHO, R.; MANZANILLA-LOPEZ, R.H.; CID DEL PIRADO-VERA, I. (2007). Control of *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne and Allen with *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Gams and Zare. **Revista Mexicana de fitopatología** **25:26-43**

FLORES-CAMACHO, R.; MANZANILLA-LOPEZ, R.H.; CID DEL PIRADO-VERA, I. 2008. Characterisation of Mexican isolates of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Goddard) Gams and Zare for biological control of *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne and Allen. **Revista Mexicana de fitopatología** 26:93-104.

GINTIS, B.O.; G. MORGAN-JONES & R. RODRÍGUES-KÁBANA, 1983. Mycoflora of Young cysts of *Heterodera glycines* in North Caroline state soils. **Nematropica** 12: 295-303.

GONZAGA, V.; SANTOS, J. M.; COSTA, M. A. F. Multiplicação de *Pratylenchus* spp. "in vitro" em cilindros de cenoura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 39, Salvador. **Resumos...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, v. 31, Suplemento, 2006. p. 208.

HIDALGO-DÍAZ. L, BOURNE, J.M.; KERRY, B.R ET AL. (2000). Nematophagous *Vertucillium* spp. In soils infested with *Meloidogyne* spp. In Cuba: isolation and screening. **International journal pest management** 46: 277-284.

JENKINS,W.R. A rapid centrifugal- flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, Washington, v.48. p. 692, 1964.

KERRY, B.R.(1975). Fungi and the decrease of cereal cysts-nematode populations in cereal monoculture. **European and Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin** 5: 353-361.

KERRY, B.R., HIRSCH, P. R. Ecology of *Pochonia chlamydosporia* in the Rhizosphere at the Population, Whole Organism and Molecular Scales. In: Davies. K.; Spiegel, Y. (Ed.) **Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Building Coherence between Microbial Ecology and Molecular Mechanisms**, 2011. P.171-182.

LOFFREDO, A.; BENT, E.; MCKENRY, M.V. et al. (2007). Understanding a root-knot nematode suppressive soil. **Journal Nematology** 39:86p

MANZANILLA-LÓPEZ, R.H.; ATKINS, S.D.; CLARK, I.M et al. (2009). Measuring abundance, diversity and parasitic ability in two populations of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. **Biocontrol Science Technology** 19:391-406.

MIZOBUTSI, E.H.; FERRAZ, S.; RIBEIRO, R.C.F. 2000. Avaliação do Parasitismo de Diversos Isolados Fúngicos em ovos de *Heterodera glycines* e *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, 2000, vol. 24(2): 167-172.

MOODY, E. H.; LOWNSBERY, B. F.; AHMED, J. M. Culture of the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* on carrot disks. **Journal of Nematology**, St. Paul, v. 5, n. 3, p. 225-226, 1973.

MORTON, C.O.;HIRSCH, P.R.; PEBERDY, J. P at al. (2003a). Cloning of and Genetic Variation in the Protease VCP1 from the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. **Mycological Research** 107:38-46.

MORTON, C.O.; MAUCLINE, T.H.; KERRY, B.R (2003b). PCR-based DNA fingerprinting indicates host related genetic variation in the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. **Mycological Research** 107: 198-205.

SANTOS, M.A. 1991. **Detecção, identificação e avaliação do potencial antagonista de fungos nematófagos em solos do Brasil**. 97f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1991.

SHARON, E.; CHET, I.; VITERBO, A. et al. (2007). Parasitism of Trichoderma on Meloidogyne javanica and role of the gelatinous matrix. *European Journal of Plant Pathology* 118:247-258.

SILVA, F. DE A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. 2009. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, **Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers**.

SILVA, J.F.V.; S.M.T. PIZA & R.G. CARNEIRO, 1994. Fungos associados a ovos de *Heterodera glycines*. **Nematologia Brasileira** 18: 73-78.

STIRLING, G. R. Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects. Wallingford, UK: **CAB International**, Wallingford, 1991, 282p.

WYSS, U., VOSS, B. & JANSSON, H.B. 1990. *In vitro* observations on the infection of *Meloidogyne incognita* eggs by the zoosporic fungus *Catenaria anguilulae* Sorokin. **Fundamental Applied Nematology Journal** 15:133-139.

CAPÍTULO 3- CONTROLE DE NEMATOIDES COM SEMENTES TRATADAS COM FUNGOS

RESUMO – O interesse pelo controle biológico de nematoides vem aumentando ano após ano, estimulado pelas crescentes restrições ao uso de agrotóxicos. Entre os agentes do controle biológico de nematoides, os fungos parasitas vêm se destacando, dada a facilidade de crescimento em meios artificiais e substratos diversos e a comprovada eficácia no tratamento de sementes. No presente estudo, confirmou-se que *Pochonia chlamydosporia*, *Fusarium solani* e *Trichoderma sp.*, fungos nematófagos facilmente encontrados nos solos do Brasil, crescem em subprodutos da agroindústria, potencializando a formulação desses agentes a baixo custo e pode tornar-se recurso vantajoso para o manejo de nematoides em grandes culturas. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar isolados de *P. chlamydosporia*, *F. solani* e de *Trichoderma sp.* quanto à capacidade de parasitar ovos de *Meloidogyne incognita*, *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus* nas respectivas culturas, algodão, soja e milho, bem como avaliar o potencial dos isolados numa aplicação conjunta em condições de casa de vegetação. No tratamento de sementes com os fungos foram usados 20 gramas de arroz colonizado e 200 mL de água, batidos em liquidificador por 15 segundos para a obtenção das suspensões, cujas concentrações foram de $1,5 \times 10^8$ conídios g^{-1} de *P. chlamydosporia*, $2,4 \times 10^9$ conídios de *Trichoderma sp.* e $1,5 \times 10^9$ conídios g^{-1} de *F. solani*, as sementes foram tratadas dentro de câmara de fluxo laminar, onde as sementes foram embebidas na suspensão de conídios do fungo e, em seguida, colocadas para secar sobre papel toalha. O tratamento com a mistura de fungos foi composto pela mistura proporcional de 20 mL da suspensão de cada isolado de fungo. Os três isolados foram eficientes no controle biológico de *M. incognita* em algodão e *H. glycines* em soja, apresentando um fator de reprodução menor que um ($FR < 1$) para todos os tratamentos e diferindo da testemunha. O isolado de *P. chlamydosporia* foi o que apresentou melhor resultado para controle de *P. brachyurus* em milho, obtendo se $FR = 0,55$.

Palavras-chave: *Fusarium solani*, *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita*, *Pochonia chlamydosporia*, *Pratylenchus brachyurus*, *Trichoderma sp.*

Abstract - Interest in the biological control of nematodes is increasing year after year, spurred by the growing restrictions on the use of pesticides. Among the agents of biological control of nematodes, fungi, parasites have been highlighted due to the ease of growing in artificial media and various substrates and the proven efficacy in the treatment of seeds. In this study, it was confirmed that *Pochonia chlamydosporia*, *Fusarium solani* and *Trichoderma* sp., Fungi nematophagous easily found in Brazil soils, grow in the agro-products, enhancing the development of these agents at low cost and can become useful resource for management of nematodes in field crops. Given the above, this study aimed to evaluate isolates of *P. chlamydosporia*, *F. solani* and *Trichoderma* sp. for their ability to parasitize eggs of *Meloidogyne incognita*, *Heterodera glycines* and *Pratylenchus brachyurus* in their cultures, cotton, soybean and corn, and to assess the potential of isolated a joint application under greenhouse conditions. In the treatment of seeds with the fungi used were 20 grams of colonized rice and 200 mL of water, beaten in a blender for 15 seconds to obtain suspensions with concentrations were $1.5 \times 10^8 \text{ g}^{-1}$ conidia of *P. chlamydosporia*, 2.4×10^9 conidia of *Trichoderma* sp. and 1.5×10^9 conidia g^{-1} *F. solani*. The seeds were treated in a laminar flow chamber, where the seeds were soaked in conidia suspension of the fungus and then placed on paper towels to dry. The treatment with the mixture of fungi was made by proportionate mixture of 20 mL of the suspension of each fungal isolate. The three isolates were effective in the biological control of *M. incognita* in cotton and *H. glycines* on soybeans, with a smaller reproduction factor a (FR <1) for all treatments and differing witness. The isolate of *P. chlamydosporia* showed the best result for the nematode control in corn, obtaining FR = 0.55

Keywords: *Fusarium solani*, *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita*, *Pochonia chlamydosporia*, *Pratylenchus brachyurus*, *Trichoderma* sp.

INTRODUÇÃO

Os nematoides constituem o grupo de organismos pluricelulares mais abundantes no planeta (KIMPINSKI; STURZ, 2003). Normalmente, são classificados segundo seu hábito de alimentação. Dentre os grandes grupos de nematoides estão os nematoides parasitas de plantas, que causam danos indiretos e perdas econômicas significativas em uma grande variedade de culturas. Estes organismos alimentam-se e reproduzem-se em plantas vivas, podendo migrar para a região rizosférica, para dentro das raízes, ou em direção à parte aérea. Possuem expressiva gama de hospedeiros, ocasionando perdas dramáticas na agricultura principalmente em regiões tropicais e subtropicais (SIKORA; FERNANDEZ, 2005). Podem ainda, estar associados a fungos fitopatogênicos habitantes do solo em áreas cultivadas (FISCHER et al., 2010). Para o manejo destes parasitas frequentemente se recorre ao controle químico. Entretanto, os nematicidas químicos têm seu uso cada vez mais restrito por sua alta toxicidade, risco de contaminação ambiental, alto custo, baixa disponibilidade em países em desenvolvimento ou baixa eficácia de controle após repetidas aplicações (DONG; ZHANG, 2006). Dentre os principais fitonematoides no Brasil, encontram-se os nematoides de galha *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood e *M. javanica* (Treb) Chitwood, nematoides das lesões radiculares *Pratylenchus brachyurus* e *P. zaeae*, e o nematoide do cisto da soja *Heterodera glycines* Ichinohe. Os nematoides do gênero *Meloidogyne* Goeldi possuem ampla distribuição geográfica e representam um dos principais problemas para a cultura da soja. Formam estruturas no sistema radicular da planta denominadas galhas e podem ocasionar murchas das plantas durante os períodos mais quentes do dia, menor desenvolvimento das plantas pelo comprometimento do sistema radicular, desfolha prematura, sintomas de deficiência mineral, clorose, redução e deformação do sistema radicular, decréscimo da eficiência das raízes em absorver e transportar água e nutrientes e menor crescimento da parte aérea, culminando com menor produção, comprometendo ou até inviabilizando o cultivo quando em infestações mais severas (TIHOHOD, 2000). *Meloidogyne incognita* geralmente é um sério problema em áreas cultivadas

anteriormente com algodão ou café. Zanella et al. (2005) encontraram que seis cultivares de algodoeiro se mostraram sensíveis a *M. incognita*, e apenas a cultivar IAC 23 apresentou redução no número de galhas e de massas de ovos em relação às demais cultivares avaliadas. No manejo integrado de nematoides, devem ser utilizadas várias estratégias combinadas, tais como medidas de exclusão, utilização de plantas antagonistas, controle químico, adubação verde, cultivares resistentes, rotação de culturas, pousio e controle biológico (BARKER; KOENNING, 1998). Dentre os vários fungos nematófagos, os ovicidas ou oportunistas estão entre os mais promissores, tanto pela capacidade saprofítica quanto pelo fácil crescimento in vitro. Para o controle de nematoides de galhas podem ser muito eficientes, visto que a massa de ovos desses nematoides é compacta, envolta numa matriz gelatinosa depositada na região posterior de cada fêmea, facilitando a colonização fúngica. Dentre o grande número de fungos parasitas de ovos conhecidos, apenas *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* (*Paecilomyces lilacinum*) têm sido mais bem estudados, devido aos resultados promissores encontrados (ATKINS et al., 2003).

Em virtude do sério problema que os nematoides representam para as culturas agrícolas, novos estudos se fazem necessários para viabilizar o uso de agentes biológicos a estratégias integradas de manejo destes parasitas. Assim, neste trabalho, avaliou-se a eficácia de isolados de fungos a partir do tratamento de sementes de algodão, soja e milho, no controle de *Meloidogyne incognita*, *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus*, respectivamente, em casa de vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Nematologia do Departamento de Fitossanidade da FCAV/UNESP - Campus de Jaboticabal, São Paulo, no período de Outubro a Dezembro de 2014. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com cinco tratamentos e seis repetições para cada cultura. Os agentes de controle biológico *P. chlamydosporia* e *F. solani* e

Trichoderma sp. foram usados no tratamento de sementes. Foi incluído um tratamento testemunha somente com o nematoide e a respectiva cultura. As sementes tratadas foram semeadas em vasos de plástico de dois litros contendo uma mistura de terra de barranco e areia na proporção 2:1, previamente autoclavada. Quinze dias após o plantio 10 mL de suspensão com nematoides foram inoculados por planta. As avaliações ocorreram 45 dias depois da inoculação dos nematoides.

Obtenção dos isolados fúngicos

Os isolados fúngicos foram obtidos através do plaqueamento de solo. Os fungos foram repicados para meio de cultura BDA, para obtenção da cultura pura, em seguida foram incubados em BOD a 25 °C ±1, depois de 11 dias, foram inoculados em arroz pré-cozido acondicionado em sacos de polipropileno com filtro, previamente autoclavados por 30 min.

Obtenção dos inóculos

As espécies de nematoides *M. incognita*, *H. glycines* (raça 3) e *P. brachyurus* foram multiplicados em plantas de algodão, soja e milho suscetíveis respectivamente, em vaso de 5 litros contendo mistura de terra de barranco e areia na proporção 2:1, previamente autoclavada. Os ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* e *H. glycines* foram extraídos conforme Jenkins (1964) e Hussey e Barker (1973), respectivamente, e ovos e formas ativas de *P. brachyurus* foram extraídos conforme a metodologia de Coolen & D'Herde (1972) pela flotação centrífuga em solução de sacarose com caulim. Em seguida as suspensões foram calibradas para 5000 ovos e J2/10 mL de *M. incognita*, 3000 ovos/10 mL de *H. glycines*, e 2000 ovos e formas ativas/10mL de suspensão de *P. brachyurus*.

Tratamento de sementes

Para o tratamento de sementes com os fungos foram usados 20 gramas de arroz colonizado e 200 mL de água, batidos em liquidificador por 15 segundos para

a obtenção das suspensões, cujas concentrações de $1,5 \times 10^8$ conídios g^{-1} de *P. chlamydosporia*, $2,4 \times 10^9$ conídios de *Trichoderma* sp. e $1,5 \times 10^9$ conídios g^{-1} de *F. solani* foram determinadas com auxílio da câmara de Neubauer. O tratamento das sementes foi feito dentro de câmara de fluxo laminar, onde foram embebidas na suspensão de fungos e em seguida colocadas para secar sobre papel toalha (Figura 1). O tratamento com a mistura de fungos foi composto pela mistura proporcional de 20 mL da suspensão de cada isolado de fungo.



Figura 1: Tratamento de sementes com suspensão de fungos dentro da câmara de fluxo laminar.

Após o tratamento das sementes foi realizado o teste de germinação para assegurar que os isolados fúngicos não iria afetar a germinação das sementes. Para isso 25 sementes de cada tratamento, inclusive a testemunha, foram acondicionadas em caixa Gerbox sobre papel toalha umedecida com água destilada e esterilizada, em BOD a $26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ por três dias no escuro. Após o período de incubação foi observado a colonização da semente pelos fungos e se houve alguma interferência na percentagem de germinação.

Plantio e infestação

Foram utilizados vasos de plástico de 2L, contendo uma mistura de terra de barranco e areia média lavada, na proporção 2:1 previamente autoclavada. Foram semeadas três sementes por vaso, depois realizou-se o desbaste deixando-se uma planta. Quinze dias após a semeadura, foram abertos três orifícios com 2 cm de profundidade e distanciados 2 cm da plântula, onde foram distribuídos 10 mL da suspensão com tendo os respectivos nematoides. Depois da adição da suspensão, os orifícios foram fechados. As plantas foram irrigadas diariamente e receberam solução nutritiva em intervalos quinzenais. O ensaio foi conduzido por 45 dias após a inoculação.

Para a extração dos nematoides das raízes empregou-se a técnica de Coolen e D'Herde (MARCHI et al., 2007), e do solo pela metodologia da flotação centrífuga em solução de sacarose (JENKINS, 1964), e feita a contagem também em microscópio fotônico em câmara de Peters. A massa da matéria seca da parte aérea foi determinada cortando-se as mesmas na altura do colo da planta, colocando-as em estufa a 60 °C até peso constante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de seu sofisticado mecanismo de parasitismo, esses fungos dependem de uma rápida colonização do solo para que sejam eficientes no controle de nematoides. Eles atuam parasitando ovos e fêmeas que estão no solo à procura de raízes. Entretanto, a partir do momento em que os nematoides penetram nas raízes da planta hospedeira, eles ficam protegidos do parasitismo dos fungos, desta forma, os antagonistas devem esperar pela fase de exposição dos ovos e fêmeas globosas no solo. As condições experimentais favoreceram a rápida colonização dos isolados fúngicos no solo.

Os resultados positivos obtidos com os nematoides *M. incognita* e *H. glycines* nas culturas de algodão e soja respectivamente (Tabela 1), não se confirmaram neste estudo com *P. brachyurus* em milho. Certamente, esse fato foi consequência

do hábito endoparasita migrador de *Pratylenchus* spp. Esse grupo de nematoide passa todo seu ciclo de vida protegido dentro das raízes.

Tabela 1: Fator de Reprodução das espécies de *Meloidogyne incognita*, *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus* em algodão, soja e milho após tratamento com agentes biológicos.

Tratamentos	Algodão	Soja	Milho
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	0,625	0,647	0,55
<i>Trichoderma sp.</i>	0,417	0,231	1,02
<i>Fusarium solani</i>	0,393	0,1	1,315
Mistura de Fungos	0,309	0,1	1,24
Testemunha	5,194	4,02	1,63

O tratamento de sementes de milho com a mistura de fungos para controle de *P. brachyurus* foi maior que um (Tabela 1), porém foi o tratamento que obteve a maior massa fresca de raiz, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos e da testemunha (Tabela 2), indicando que houve um efeito de enraizamento promovido pela mistura de fungos. Entretanto, no tratamento de sementes de soja com a mistura de fungos apresentou resultado inverso, onde o valor médio da massa fresca de raízes e da massa seca da parte aérea desse tratamento não diferiu estatisticamente da testemunha e nem do tratamento só com *F. solani* (Tabela 1 e 3), evidenciando um efeito negativo desse fungo na cultura da soja, pois a Podridão Vermelha da Raiz (PVR), também conhecida como Síndrome da Morte Súbita (SMS), é uma das mais importantes doenças associadas à cultura da soja, podendo atingir perdas consideráveis de até 70% da produção (FREITAS et al., 2004).

Portanto, como ocorrido no presente trabalho, foi observado alta eficiência dos isolados de fungos testados para controle de *Meloidogyne incognita* em algodão e *Heterodera glycines* em soja, e moderada para *P. brachyurus* em milho, com exceção do isolado de *P. chlamydosporia* que proporcionou $FR < 1$, considerando que as condições experimentais foram favoráveis à rápida colonização dos fungos no solo. Novos estudos devem ser conduzidos para validar a eficiência desses isolados no campo, em condições naturais.

Tabela 2: Médias da massa fresca de raízes de plantas de algodão, soja e milho, cujas sementes foram tratadas com fungos nematófagos e inoculadas com *Meloidogyne incognita*, *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus*.

Tratamentos	Algodão (g)	Soja (g)	Milho (g)
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	9.83 a	17.83 a	37.00 ab
<i>Trichoderma sp.</i>	9.33 a	12.33 ab	29.83 abc
<i>Fusarium solani</i>	10.67 a	9.50 ab	21.33 bc
Mistura de Fungos	10.67 a	8.50 b	42.50 a
Testemunha	6.83 a	5.33 b	17.17 c
CV (%)	36,33	48,90	38,18

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Tabela 3: Médias de matéria seca da parte aérea de plantas de algodão, soja e milho, cujas sementes foram tratadas com fungos nematófagos e inoculadas com *Meloidogyne incognita*, *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus*.

Tratamentos	Algodão (g)	Soja (g)	Milho (g)
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	7.67 a	10,17 a	13,67 a
<i>Trichoderma sp.</i>	7.50 a	12,50 a	14,00 a
<i>Fusarium solani</i>	7.00 a	9,17 ab	10,83 a
Mistura de Fungos	6.17 a	10,17 a	14,33 a
Testemunha	7.00 a	6,50 b	10,50 a
CV (%)	16,90	21,97	19,66

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

CONCLUSÃO

Os três isolados fúngicos foram eficientes no controle biológico de *M. incognita* em algodão e *Heterodera glycines* em soja.

O isolado de *Pochonia chlamydosporia* foi o que apresentou melhor resultado para controle de *Pratylenchus brachyurus* em milho, propiciando FR = 0,55.

AGRADECIMENTO

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

REFERÊNCIAS

- ATKINS, S. D.; HIDALGO-DIAZ, L.; KALISZ, H.; MAUCLINE, T. H.; KIRSCH, P. R.; HERRY, B.R. Development of a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. **Pest Management Science**, v. 59, n. 2, p. 183-189, 2003.
- BARKER, K. R.; KOENNING, S. R. Developing sustainable systems for nematode management. **Annual Review of Phytopathology**, n. 36, p. 165-205, 1998.
- COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Gent:**State Agricultural Research Center**, 1972. 77 p.
- DONG, L. Q.; ZHANG, K. Q. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant Soil**, v. 288, n. 1, p. 31-45, 2006.
- FISHER, I. H.; BUENO, C. J.; GARCIA, M. J. M.; ALMEIDA, A. M. Reação do maracujazeiro-amarelo ao complexo fusariose-nematoide de galha. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 2, p. 223-227, 2010.
- FREITAS, T.M.Q. Dano devido à podridão vermelha da raiz na cultura da soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 991-996, Aug. 2004.
- HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparasion of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter*, Washington, v. 57, p. 1025-1028, 1973.
- KIMPINSKI, J.; STURZ, A. V. Managing crop root zone ecosystems for prevention of harmful and encouragement of beneficial nematodes. **Soil and Tillage Research**, v. 72, n. 2, p. 213-221, 2003.
- MARCHI, C. E.; FERNANDES, C. D.; BORGES, C. T.; SANTOS, J. M.; JERBA, V. F.; TRENTIN, R. A.; GUIMARÃES, L. R. A. Nematofauna fitopatogênica de sementes comerciais de forrageiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 5, p. 665-660, 2007.
- SIKORA, R. A.; FERNANDEZ, E. Nematodes parasites of vegetables. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant-parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. 2nd ed. Wallingford: Cabi, 2005. p. 319-392.
- TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2000.
- ZANELLA, C. S.; GAVASSONI, W. L.; BACCHI, L. M. A.; CARVALHO, F. C. Resistência de cultivares de algodoeiro ao nematóide das galhas. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 27, n. 4, p. 655-659, 2005.