
**BIOCONTROLE DE ESPÉCIES DE *Trichoderma*
SOBRE *Meloidogyne enterolobii*****ANA CLÁUDIA TENÓRIO DO AMARAL¹****VANESSA LOPES LIRA¹****ROMERO MARINHO DE MOURA^{1,2,3}****PATRÍCIA VIEIRA TIAGO¹****NEIVA TINTI DE OLIVEIRA¹**¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências.² Academia Pernambucana de Ciência Agronômica.³ Academia Brasileira de Ciência Agronômica.E-mail para correspondência: ana-claudia52@hotmail.com

Resumo: Este estudo teve por objetivo avaliar o potencial de biocontrole *in vitro* de espécies de *Trichoderma* sobre *Meloidogyne enterolobii*, por meio de testes de parasitismo e inibição da eclosão de formas juvenis deste nematoide. Foram utilizados nove isolados de *Trichoderma*, pertencentes às espécies *T. longibrachiatum* (T1), *T. asperellum* (T2), *T. atroviride* (T5, T8 e T9), *T. brevicompactum* (T11), *T. breve* (T12), *T. asperelloides* (T13) e *T. asperellum* (T15). Os isolados de *Trichoderma* foram cultivados por sete dias em meio BDA e mantidos a 25°C em BOD. Em seguida, conídios dos isolados foram adicionados a uma solução de Tween (0,01%) e ajustada para concentração de $1,5 \times 10^4$ conídios/ml. Em placas de Petri contendo papel filtro umedecido, foram adicionados discos de ágar-água sobre lâmina de vidro. Posteriormente, foram adicionados 10µL da suspensão dos isolados de *Trichoderma* sobre 40 ovos de *M. enterolobii*. O material foi incubado por sete dias em BOD a 25°C, em seguida, realizou-se a contagem de 15 ovos e determinou-se o percentual de ovos parasitados e a eclosão de formas juvenis. A partir dos dados obtidos constatou-se que os isolados T9 (*T. atroviride*), T15 (*T. asperellum*) e T12 (*T. breve*) foram os mais eficientes, colonizando os ovos em 75, 100 e 100%, respectivamente. Os isolados T8 (*T. atroviride*) e T12 (*T. breve*) inibiram a eclosão dos juvenis em 75,55 e 100%, respectivamente. Os resultados indicam a espécie *T. breve* (T12) como potencial agente para o controle biológico, sendo o primeiro registro da utilização desta espécie no controle de nematoides.

Termos para indexação: Antagonismo, nematoide das galhas, *Psidium guajava*.

Abstrate: This study aimed to evaluate the *in vitro* biocontrol potential of *Trichoderma* species on *Meloidogyne enterolobii*, by parasitism tests of and inhibition of forms juvenile the hatching this nematode. Nine *Trichoderma* isolates were used, *T. longibrachiatum* (T1), *T. asperellum* (T2), *T. atroviride* (T5, T8 and T9), *T. brevicompactum* (T11), *T. breve* (T13) and *T. asperellum* (T15). *Trichoderma* isolates were cultured for seven days in BDA medium and continued at 25

° C in BOD. The conditions were then replaced with a Tween (0.01%) and adjusted to a concentration of 1.5×10^4 conidia/ml. Petri dishes contain a paper filter, consisting of water disks on the glass slide. Subsequently, 10 μ l of the suspension of *Trichoderma* isolates on 40 eggs of *M. enterolobii* were added. The material was incubated for seven days in BOD at 25 ° C in the same period, a count of 15 eggs was produced and the percentage of parasitized eggs and a hatching of were determined. From the data obtained, T9 (*T. atroviride*), T15 (*T. asperellum*) and T12 (*T. breve*) were more efficient, colonizing eggs at 75. 100 and 100%, respectively. The isolates T8 (*T. atroviride*) and T12 (*T. breve*) inhibited juvenile hatching at 75.55 and 100%, respectively. The results indicate the species *T. breve* (T12) as a potential agent for biological control, being the first record of the use of this species in the control of nematodes.

Index terms: Antagonism, root-knot nematode, *Psidium guajava*.

INTRODUÇÃO

Os fitonematoides estão entre as principais pragas da agricultura, pois são responsáveis por perdas na produtividade em diversas plantações de importância econômica, chegando a causar prejuízos de 35 bilhões ao ano (NASCIMENTO, 2018).

O gênero *Meloidogyne*, também conhecido como “nematóide das galhas”, apresenta mais de 100 espécies descritas (HUNT; HANDOO, 2009). Constitui o maior grupo de nematoides fitopatogênicos, sendo espécies polífagas e de fácil disseminação, podendo infectar mais de 3.000 espécies de plantas, afetando o agronegócio em diversas regiões do mundo (TRUDGILL; BLOK, 2001).

Meloidogyne enterolobii Yang e Eisenback é considerada uma das mais importantes espécies do gênero, devido sua ampla distribuição geográfica e numerosa gama de hospedeiros (MOENS; PERRY; STARR, 2009), além de ter a capacidade de quebrar a resistência de genótipos de plantas como tomateiros e pimenteiros resistentes a *M. javanica* (TREUB) Chitwood, *M. incognita* (KOFOID e WHITE) Chitwood e *M. arenaria* (NEAL) Chitwood (CARNEIRO et al., 2006). Entre seus principais hospedeiros, estão a goiabeira (*Psidium guajava* L.), soja [*Glycine max* (L.) MERR.] e batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) LAM.] (PERRY; MOENS; STARR, 2009).

Há várias formas de controle para o nematóide das galhas e o uso de agentes biológicos tem se mostrado promissor. Diversos organismos são considerados inimigos naturais dos nematoides e de acordo com estudos, os fungos são considerados os de maior potencial (LI; ZHANG, 2014). A forma de controle por fungos pode ocorrer por diversos mecanismos de ação, entre eles o endoparasitismo, predação, parasitismo de ovos e fêmeas também chamado de oportunistas e por meio de fungos que tem a capacidade de produzir substâncias com propriedades nematicidas (FERRAZ et al., 2010).

Entre os fungos nematófagos, os oportunistas merecem destaque, pois estudos tem mostrado o quanto são eficientes no controle biológico de fitonematoides, sendo *Paecilomyces lilacinus* (THOM) Samson e *Pochonia chlamydosporia* (GODDARD) Zare e W. Gams os mais utilizados (CHEN; DICKSON, 2004).

Diversas espécies de *Trichoderma* também tem se mostrado promissoras no biocontrole de fitonematoides, sendo que a principal forma de controle por este gênero se dá pela produção de metabólitos tóxicos, embora diversos relatos na literatura apontem que espécies de *Trichoderma* também apresentam grande potencial para o parasitismo de ovos e

fêmeas de *M. exigua* Goeldi e *M. incognita* (FERREIRA et al., 2008; FREITAS et al., 2012).

Dessa forma o objetivo deste trabalho foi avaliar por meio de testes *in*

vitro, o potencial de biocontrole de espécies de *Trichoderma* para o parasitismo de ovos e inibição da eclosão de formas juvenis de segundo estágio de *M. enterolobii*.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados de *Trichoderma* e de *M. enterolobii*

Foram utilizados nove isolados de *Trichoderma* oriundos de diferentes solos de sistemas agroflorestais, pertencentes às espécies *T. longibrachiatum* (T1), *T. asperellum* (T2), *T. atroviride* (T5, T8 e T9), *T. brevicompactum* (T11), *T. breve* (T12), *T. asperelloides* (T13) e *T. asperellum* (T15). Para confirmação das espécies foi estudada a região gênica do DNA TEF-1 α (CARBONE; KOHN, 1999; SAMUELS et al., 2002), os produtos amplificados foram purificados e sequenciados na Plataforma de

Sequenciamento do Laboratório Central do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco e as sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no GenBank.

Os inóculos de *M. enterolobii* foram obtidos a partir de raízes da goiabeira (*P. guajava*), multiplicados em vasos plásticos com capacidade para 3 Kg contendo tomateiros (*Solanum lycopersicum* L.) Cultivar Santa Cruz Kada e mantidos sob condições de casa de vegetação por 90 dias.

Efeito dos isolados de *Trichoderma* no parasitismo de ovos e juvenis de *M. enterolobii*

Os inóculos dos isolados de *Trichoderma* foram preparados em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), mantidos em BOD a 25°C por sete dias. Em seguida, conídios das colônias dos isolados foram adicionados, separadamente, em água destilada esterilizada contendo Tween 80 (0,01%) e ajustada à concentração de 10⁴ conídios/ml (HADDAD; LUCON, 2017).

Massas de ovos *M. enterolobii* foram isoladas a partir das raízes de mudas do tomateiro e os ovos extraídos conforme a metodologia de Hussey e Baker (1973). Em placas de Petri (90 mm) contendo papel filtro umedecidos, foram adicionados sobre lâmina de vidro, discos de ágar-água (2 cm) e posteriormente foram depositados sobre os discos 40 ovos de *M. enterolobii* (CARNEIRO; GOMES, 1993). Em seguida, foram adicionados,

separadamente, 10 μ L das suspensões dos isolados de *Trichoderma*, sobre os ovos do nematoide. O material foi levado a BOD a 25°C por sete dias. Após esse período, o material foi corado com *lactofenol* de Amann e observado em microscópio ótico, realizando-se a contagem aleatória de 15 ovos por disco e determinando-se o percentual de ovos parasitados e inibição da eclosão de juvenis de segundo estágio de *M. enterolobii* (HADDAD; LUCON, 2017, adaptado).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições por tratamento. Os dados foram transformados por $\sqrt{x/100}$ e submetidos à ANOVA e as médias, comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), utilizando o software SASM – Agri (CANTERI et al., 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos nove isolados de *Trichoderma* avaliados, três pertencentes às espécies *T. breve* (T12), *T. asperellum* (T15) e *T. atroviride* (T9) foram os mais eficientes no parasitismo dos ovos de *M. enterolobii*, colonizando 100, 100 e 75,55%, respectivamente. O isolado T13 de *T. asperelloides* foi o menos eficaz na colonização (0%) (Tabela 1).

Os resultados obtidos neste estudo, foram semelhantes aos encontrados por Hussain et al. (2017), que ao utilizarem 12 isolados fúngicos pertencentes a seis gêneros, constataram que as espécies *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & W. Gams e *T. hamatum* (Bonord.) Bainier foram as mais eficientes, promovendo colonização de ovos de *M. incognita* em 79 e 68%, respectivamente. Os autores também destacaram a eficiência da espécie *T. harzianum* que parasitou 62% dos ovos avaliados. A colonização por *T. harzianum* sobre ovos de *M. javanica* também foi relatada (SHARON et al., 2007; SAHEBANI; HADAVI, 2008) e este mecanismo pode ocorrer pela ação de enzimas, tais como a quitinase (SAHEBANI; HADAVI, 2008), já que a

quitina é um importante componente estrutural dos ovos de nematoides (YANG et al., 2014).

Seidl et al. (2005) identificaram 18 tipos de quitinases de *Hypocrea jecorina* Berk. & Broome (anamorfo: *Trichoderma reesei* E.G. Simmons). Em *Trichoderma harzianum*, a presença de quitinases também foram constatadas, mas apenas uma delas, denominada chit 33, apresentou melhor desempenho em teste com fitopatógenos (LIMON et al., 1999).

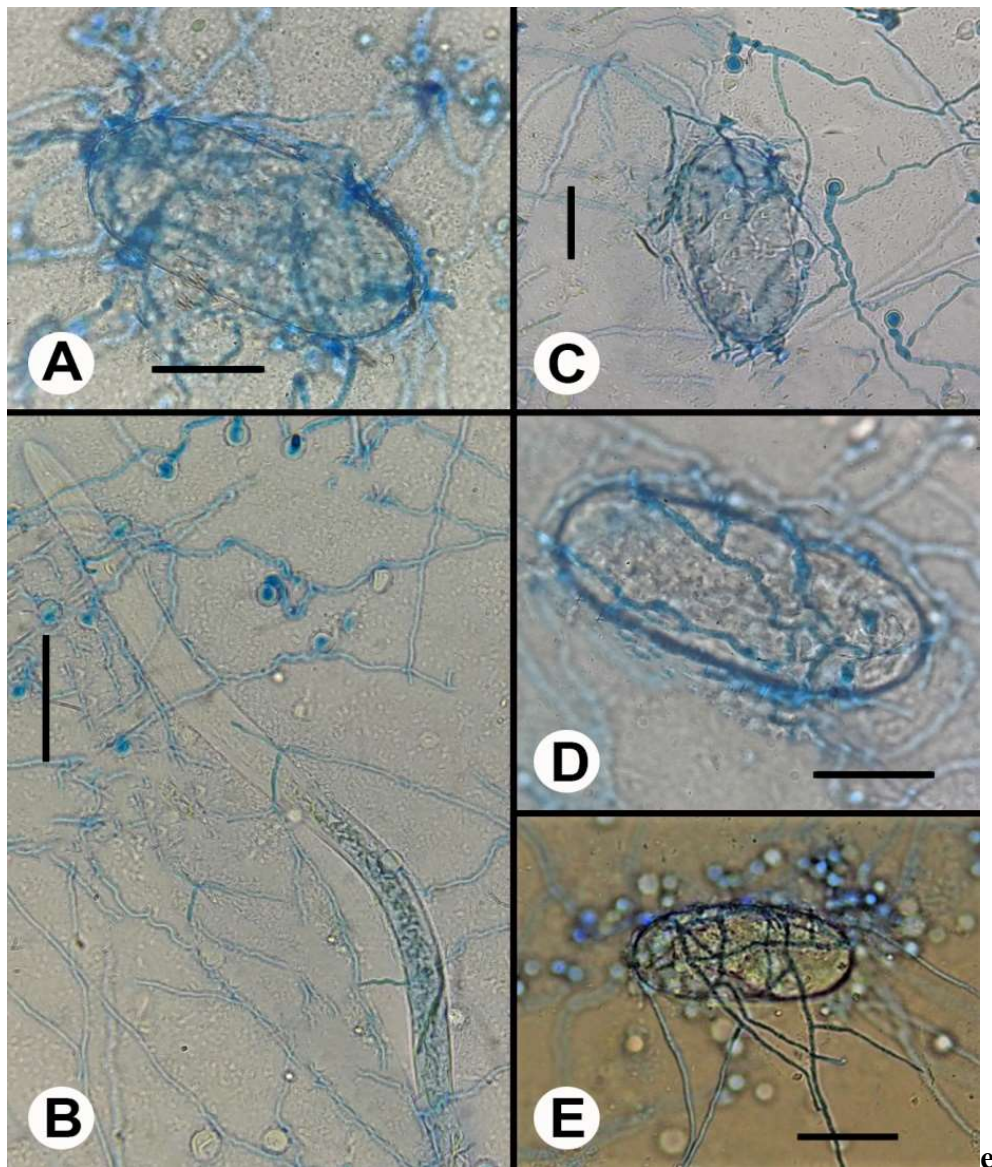
De acordo com os dados obtidos, os isolados T8 de *T. atroviride* e T12 de *T. breve* causaram inibição significativa na eclosão de juvenis de *M. enterolobii*, com 75,55 e 100%, respectivamente. Não foi verificada diferença estatística nos demais tratamentos (Tabela 1). A inibição da eclosão de juvenis de *M. javanica* por isolado de *T. harzianum* foi relatada por Sahebani e Hadavi (2008). *Trichoderma harzianum* também foi eficiente na inibição do desenvolvimento de juvenis de *M. enterolobii* (JINDAPUNNAPAT; CHINNASRI; KWANKUAE, 2013). A figura 1 ilustra o parasitismo de isolados de *Trichoderma* sobre *M. enterolobii*.

Tabela 1- Parasitismo e inibição da eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne enterolobii* por isolados de *Trichoderma*, *in vitro*, após sete dias de incubação em meio de cultura ágar-água.

Tratamento	Percentual de ovos parasitados	Tratamento	Percentual de ovos eclodidos
T12	100a	T12	0b
T15	100a	T8	2,22b
T9	75,55a	T5	6,66ab
T1	62,29ab	T9	11,11ab
T11	44,44ab	T11	17,77ab
T8	37,78ab	T1	31,11ab
T2	32,44ab	T15	31,11ab
T5	31,11ab	T13	35,55ab
T13	0b	T2	56,29ab
Controle	0b	Controle	77,77a

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Valores transformados para $\arcsen \sqrt{x/100}$.

Figura 1- Efeito de isolados de *Trichoderma* sobre ovos e formas juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne enterolobii*. Parasitismo de *Trichoderma longibrachiatum* (T1) sobre ovo de *M. enterolobii* (A). Enrolamento das hifas de *T. atroviride* (T9) sobre J2 de *M. enterolobii* (B). Degradação da parede celular do ovo de *M. enterolobii* por *T. atroviride* (T9) (C). Parasitismo de *T. brevicompactum* (T11) sobre ovo de *M. enterolobii* (D). Colonização de ovo de *M. enterolobii* por *T. asperellum* (T15) (E). Escala de barras: A, C e D= 30µm, B= 70µm, E= 40µm.



Foto/crédito: A. C. T. Amaral; V. L. Lira

O controle de nematoides pode ser realizado por meio de agentes químicos (DONG et al., 2017) ou biológicos (BETTIOL et al., 2012). As espécies *P. lilacinus*, *P. chlamydosporia*, *Arthrobotrys oligospora* Fresen. e *A. botryospora* G.L.

Barron estão entre as mais utilizadas na formulação de produtos de controle biológicos para o manejo de fitonematoides (BETTIOL et al., 2012). Entretanto, não há relatos na literatura sobre a utilização de bioprodutos para o controle de *M.*

enterolobii e os dados apresentados nesta pesquisa, podem apresentar potencial como base para formulações de uso comercial, após estudos complementares

Pesquisas envolvendo o uso de espécies de *Trichoderma* no controle de *M. enterolobii* ainda são escassas. A ação isolada de *T. harzianum* no controle de *M. enterolobii* foi demonstrada por Jindapunnapat, Chinnasri e Kwankuae (2013). Porém, novos estudos são necessários para identificação de possíveis espécies deste gênero passíveis de uso contra a meloidoginose.

Entre os isolados estudados e avaliados neste trabalho, o isolado T12 que pertencente à espécie *T. breve* foi o mais eficiente no parasitismo e inibição da eclosão de juvenis. Na literatura não há relatos anteriores sobre a utilização desta espécie no controle de fitonematoides. O conhecimento do potencial antagônico *in vitro* é de suma importância para posteriores ensaios em campo que podem constituir uma medida de manejo eficiente contra o *M. enterolobii*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela Coordenação de Aperfeiçoamento de concessão de bolsa ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; PAULA JUNIOR, T. J.; CORREA, E. B., M. A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. C. B., BEZERRA, J. L. **Produtos Comerciais à Base de Agentes de Biocontrole de Doenças de Plantas**. Embrapa Meio Ambiente, Documento 88, 155, 2012.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, 91: 553-556, 1999.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, 1: 18-24, 2001.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; BRAGA, R. S.; de AMEIDA, C. A.; GLÓRIA, R. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* parasitando plantas de tomate e pimentão resistentes à meloidoginose no Estado de São Paulo. **Nematologia Brasileira**, 30: 81-86, 2006.

CARNEIRO, R.M.D.G.; GOMES, C.B. Metodologia e teste de patogenicidade de *Paecilomyces lilacinus* e *P. fumosoroseus* em ovos de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, 7: 66-75, 1993.

CHEN, S; DICKSON, D. W. Biolocal control of nematodes by fungal antagonists. In: CHEN, Z; CHEN, S.; DICKSON, D. W. (Eds.). **Nematology – Advances and perspectives**, v. 2:

Nematode Management and utilization. Tsinghua: University Press; CABI Publishing, 2004. p. 979-1039.

DONG, S.; REN, X.; ZHANG, D.; JI, X.; WANG, K.; QIAO, K. Single basal application of thiacloprid for the integrated management of *Meloidogyne incognita* and *Bemisia tabaci* in tomato crops. **Scientific Reports**, 7: 41161, 2017.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; DIAS-ARIEIRA, C. R. **Manejo sustentável de fitonematoides**, 1 ed., Viçosa: Editora UFV, 2010. 306 p.

FERREIRA, P. A.; FERRAZ, S.; LOPES, E. A.; FREITAS, L. G. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, 2:15-21. 2008.

FREITAS, M. A.; PEDROSA, E. M.; MARIANO, R. L.; MARANHÃO, S. R. Seleção de *Trichoderma* spp. como potenciais agentes para biocontrole de *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar. **Nematropica**, 42:115-122. 2012.

HADDAD, P.; LUCON, C. Experimento de Biocontrole de Fitonematoides com *Trichoderma*. Recife-PE, 2017.

HUNT, D. J.; Handoo, Z. A. Taxonomy, identification and principal species. **Root-knot nematodes**, 1: 55-88, 2009.

HUSSAIN, M.; ZOUHAR, M.; RYŠÁNEK, P. Effects of nematophagous fungi on viability of eggs and juveniles of *Meloidogyne incognita*. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, 27: 252-258, 2017.

HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. Comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Dis. Rep.**, 57:1025-1028, 1973.

JINDAPUNNAPAT, K.; CHINNASRI, B.; KWANKUAE, S. Biological Control of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne enterolobii*) in Guava by the Fungus *Trichoderma harzianum*. **Journal of Developments in Sustainable Agriculture**, 8: 110-118, 2013.

LI, G.-H.; ZHANG, K.-Q. Nematode-Toxic Fungi and their Nematicidal Metabolites. **Nematode-Trapping Fungi**, 23: 313-375, 2014.

LIMÓN, M. C.; PINTOR-TORO, J. A.; BENÍTEZ, T. Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. **Phytopathology**, 89: 254-261, 1999.

NASCIMENTO, D. Inimigo oculto: Como reconhecer e controlar populações de nematoides no solo e nas culturas. **Revista Canavieiros**, 139: 90-94, 2018.

PERRY, R. N., MOENS, M., AND STARR, J. L. **Root-knot Nematodes**. CAB International, Wallingford, UK and Cambridge, USA, 2009. 488 p.

SAMUELS, G.J.; DODD, S.L.; GAMS, W.; CASTLEBURY, L.A.; PETRINI, O. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, 94: 146-170, 2002.

SAHEBANI, N.; HADAVI, N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology & Biochemistry**, 40: 2016–2020, 2008.

SEIDL, V.; HUEMER, B.; SEIBOTH, B.; KUBICEK, C. P. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. **The FEBS journal**, 272: 5923-5939, 2005.

SHARON, E.; BAR-EYAL, M.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A.; KLEIFELD, O.; SPIEGEL, Y. Biological Control of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **The American Phytopathological Society**, 91: 687-693, 2001.

SHARON, E.; CHET, I.; VITERBO, A.; BAR-EYAL, M.; NAGAN, H.; SAMUELS, G.J.; SPIEGEL, Y. Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. **European Journal of Plant Pathology**, 118: 247-258, 2007.

TRUDGILL, D. L.; BLOCK, V. C. Apomictic, polyphagous root- knot nematodes: exceptionally successfull and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, 39: 53-77, 2001.

YANG, J. K.; LIANG, L. M.; ZOU, C. G.; ZHANG, K. Q. Molecular mechanism of nematophagous fungi infection of nematodes. In: ZHANG, K. Q.; Hyde, K. D. (Eds.). **Nematode-Trapping Fungi**. Mushroom Research Foundation, Chiang Rai, 2014. p. 262–312.