

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

POTENCIAL DO USO DOS FUNGOS *Trichoderma* spp. E *Paecilomyces lilacinus* NO
BIOCONTROLE DE *Meloidogyne incognita* EM *Phaseolus vulgaris*.

Rita de Cássia Madail Santin
Bióloga/UCPel

Tese apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia
Área de Concentração Fitossanidade

Porto Alegre (RS), Brasil
Setembro de 2008

Agradecimentos

Ao Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade de realização do doutorado e pela concessão da bolsa de estudos.

A minha querida mãe (*in memoriam*) pelo seu exemplo de força de viver, acreditar e transmitir amor, a qual partiu durante a fase em que finalizava este trabalho.

Ao meu pai pelo incentivo e por seu incondicionável amor.

Ao meu irmão por seus conselhos, apoio e paciência.

Ao Fabrício, pelo amor, paciência, compreensão, companherismo e estímulo nos momentos difíceis.

A orientadora prof^a. Dr^a. Aida Matsumura pela ajuda, conselhos, incentivo e conhecimentos transmitidos que jamais serão esquecidos.

Aos funcionários Renê e Fabiane do Laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Clima Temperado e aos estagiários.

Aos bibliotecários da Embrapa Clima Temperado Regina e Wilson.

Aos colegas Daniel e Veridiana do Laboratório de Fitopatologia Vegetal pela ajuda e paciência.

Aos pesquisadores Dr^a. Ângela Diniz e Dr. Irajá Ferreira Antunes pelo incentivo e contribuição para minha formação acadêmica.

Ao pesquisador César Bauer Gomes pela incansável ajuda na condução dos experimentos.

A Dr^a Marcia Eloisa, pela amizade e auxílio na identificação morfológica dos fungos.

Às amigas Camila, Lúcia e Rita Ariane pela ajuda e amizade no decorrer deste trabalho.

A professora Ana Paula, ao prof. Valmir Duarte e demais professores e funcionários da UFRGS.

A secretária do PPG/Fitotecnia Marisa pela ajuda e atenção.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), Priscila, Alexandre, Juliana e Precila pelo apoio e agradável convívio e, em especial à amiga Isabel pelo apoio, sugestões, conversas e as boas risadas.

POTENCIAL DO USO DOS FUNGOS *Trichoderma* spp. E *Paecilomyces lilacinus* NO BIOCONTROLE DE *Meloidogyne incognita* EM *Phaseolus vulgaris*¹.

Autora: Rita de Cássia Madail Santin

Orientadora: Aida Terezinha Santos Matsumura

RESUMO

O cultivo de feijão no Brasil tem sido limitado por diversos patógenos. Entre os problemas da cultura estão os nematóides do gênero *Meloidogyne*, os quais constituem uma das principais razões da baixa produtividade das lavouras. Além dos danos diretos causados pelos nematóides às plantas, estes causam danos indiretos devido aos ferimentos que servem como porta de entrada a patógenos, como o *Fusarium* sp. Atualmente, um dos métodos mais usados no controle de nematóides é o controle químico, o qual é caro e extremamente prejudicial ao meio ambiente. Portanto, tem por objetivo este trabalho estudar o potencial dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no controle de *M. incognita*, assim como os mecanismos utilizados por estes em biotestes realizados *in vivo* associados a plantas de feijão. Testes realizados *in vitro* evidenciaram a produção de enzimas líticas como quitinases, glucanases e proteases, metabólitos voláteis dos fungos e hifas modificadas pelos isolados dos referidos fungos. Os filtrados fúngicos ocasionaram mortalidade de 100% dos J2 (juvenis de 2º estágio) de *M. incognita*. A análise microscópica demonstrou a adesão de conídios de *Trichoderma* spp. em ovos de *M. incognita*. Em testes *in vivo* com plantas de feijão cv. Engopa Ouro, obteve-se menor número de galhas e do fator de reprodução nos tratamentos onde foram aplicados isolados *T. harzianum* (6T), *T. pseudokonigii* (2T) e o fungo nematófago *P. lilacinus*. Os resultados evidenciam que os isolados de *Trichoderma* spp. apresentam potencial no controle de *M. incognita*; os mecanismos utilizados consistem na produção de metabólitos voláteis, difusíveis e inibitórios aos nematóides, na produção de enzimas líticas que degradam a quitina dos ovos e capturam formas ativas do nematóide, além da formação de hifas modificadas denominadas “armadilhas”.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (92 p.) Setembro, 2008.

POTENTIAL USE OF *Trichoderma* spp. AND *Paecilomyces lilacinus* FUNGUS IN THE BIOCONTROL OF *Meloidogyne incognita* IN *Phaseolus vulgaris*¹

Author: Rita de Cássia Madail Santin

Adviser: Aida Terezinha Santos Matsumura

ABSTRACT

The bean cultivate in Brazil has been limited by several pathogens. One of the most important problems in the culture are *Meloidogyne* nematodes, which constitute one of the main reasons behind the low productivity in the agriculture. Besides the direct damages caused by nematodes to plants, they also bring indirect damages due to the wounds acting as entrance points to pathogens, like *Fusarium* sp. Chemical control is currently one of the most used methods to control nematodes, which is expensive and extremely harmful to the environment. Thus, this work objective is studying the possible action of *Trichoderma* spp. and *Paecilomyces lilacinus* to control *M. incognita*, as well as the mechanisms used by them through *in vivo* tests associated to bean plants. *In vitro* performed tests evidenced the production of lytic enzymes as chitinases, glucanases, and proteases, volatile metabolic and hyphae modified by those fungus' isolates. The fungal filtrate caused 100% mortality to *M. incognita* J2 (second-stage juveniles). The microscopical analysis demonstrated the attachment of *Trichoderma* spp. conidia in *M. incognita* eggs. *In vivo* tests with Engopa Ouro bean plants achieved lower numbers of root-knot and reproduction factor when applying isolates of *T. harzianum* (6T), *T. pseudokonigii* (2T), and *P. lilacinus* nematophagous fungus. The results point out that *Trichoderma* spp. isolates are promising controllers of *M. incognita*, and the used mechanisms consist on producing volatile metabolics, which are diffusive and therefore inhibitory to nematodes, producing lytic enzymes that damage the egg chitina and capture active nematodes, and developing modified hyphae named "traps".

¹ Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (92 p.) September, 2008.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| RELAÇÃO DE TABELAS | IX |
| RELAÇÃO DE FIGURAS | X |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 4 |
| 2.1 Controle Biológico | 4 |
| 2.2 Fungos antagonistas | 6 |
| 2.2.1 <i>Trichoderma</i> sp..... | 7 |
| 2.2.2 <i>Paecilomyces lilacinus</i> | 9 |
| 2.2.3 <i>Meloidogyne</i> sp..... | 10 |
| 2.3 Mecanismos de ação de fungos antagonistas como agentes de biocontrole..... | 15 |
| 2.3.1 Micoparasitismo | 15 |
| 2.3.2 Competição..... | 18 |
| 2.3.3 Antibiose | 18 |
| 2.3.4 Indução de resistência..... | 20 |
| 2.4 Sideróforos..... | 20 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 23 |
| 3.1 Identificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e do <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> | 23 |
| 3.2 Avaliação de competição entre <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> e compatibilidade <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>P. lilacinus</i> | 24 |
| 3.2.1 Competição <i>in vitro</i> | 24 |
| 3.2.2 Avaliação do efeito de metabólitos voláteis | 25 |
| 3.2.3 Avaliação da compatibilidade entre <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Paecilomyces lilacinus</i> | 25 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.3 | Avaliação da concentração e inoculação à <i>Meloidogyne incognita</i> em plantas de feijão..... | 25 |
| 3.4 | Avaliação de aspectos bioquímicos de microrganismos que podem estar associados ao biocontrole | 27 |
| 3.4.1 | Atividade quitinásica e glucanásica..... | 27 |
| 3.4.2 | Atividade proteolítica..... | 28 |
| 3.4.3 | Atividade lipolítica (em meio sólido)..... | 29 |
| 3.4.4 | Detecção de sideróforos em culturas de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>P. lilacinus</i> | 30 |
| 3.5 | Avaliação, <i>in vitro</i> , do efeito nematicida e nematostático de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>P. lilacinus</i> sobre <i>M. incognita</i> | 30 |
| 3.5.1 | Obtenção dos filtrados fúngicos para avaliação da atividade inibitória..... | 30 |
| 3.5.2 | Testes de mortalidade de J2 e de eclosão de <i>M. incognita</i> (%) quando em contato com filtrados de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>P. lilacinus</i> | 31 |
| 3.6 | Teste de parasitismo de <i>P. lilacinus</i> e <i>Trichoderma</i> spp. em ovos de <i>M. incognita</i> | 32 |
| 3.7 | Testes <i>in vivo</i> | 33 |
| 3.7.1 | Produção massal de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>P. lilacinus</i> | 33 |
| 3.7.2 | Biocontrole de plantas de feijão tratadas com <i>Trichoderma</i> spp. e <i>P. lilacinus</i> no controle de <i>M. incognita</i> | 33 |
| 3.8 | Análises estatísticas..... | 35 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 36 |
| 4.1 | Identificação..... | 36 |
| 4.2 | Competição <i>in vitro</i> entre <i>Trichoderma</i> spp., <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> e <i>P. lilacinus</i> | 36 |
| 4.3 | Produção de sideróforos pelos fungos antagonistas | 43 |
| 4.4 | Avaliação <i>in vivo</i> | 45 |
| 4.4.1 | Métodos de inoculação associados a <i>Meloidogyne incognita</i> na cultura do feijão..... | 45 |
| 4.5 | Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas como mecanismo de controle de <i>M. incognita</i> | 47 |
| 4.5.1 | Atividade quitinásica..... | 47 |
| 4.5.2 | Atividade glucanásica..... | 50 |
| 4.5.3 | Atividade lipolítica | 51 |
| 4.5.4 | Atividade proteásica..... | 53 |
| 4.6 | Ação dos filtrados de fungos antagonistas na mortalidade de <i>M. incognita</i> e na eclosão de juvenis de segundo estágio de <i>M. incognita in vitro</i> | 55 |

| | | |
|-----|---|----|
| 4.7 | Teste de virulência de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>P. lilacinus</i> , <i>in vitro</i> à <i>M. incognita</i> | 59 |
| 4.8 | Potencial dos fungos <i>Trichoderma</i> spp. e <i>P. lilacinus</i> no biocontrole de <i>M. incognita</i> na cultura do feijão. | 64 |
| 5 | CONCLUSÕES | 69 |
| 6 | PERSPECTIVAS | 70 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 71 |
| 8 | ANEXOS | 81 |

RELAÇÃO DE TABELAS

| | Página |
|--|--------|
| 1. Competição in vitro de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> | 37 |
| 2. Crescimento micelial (cm) de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>P. lilacinus</i> | 40 |
| 3. Crescimento de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> na presença de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> , Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2006. | 41 |
| 4. Produção de sideróforos pelos fungos <i>Trichoderma</i> spp. e <i>P. lilacinus</i> pelo método CAS (cromoazurol –S), Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007. | 43 |
| 5. Número médio de galhas em duas concentrações de nematóides nas cultivares de feijão Engopa Ouro e Carioca após inoculação de duas concentrações de ovos+J2, respectivamente; 1250 e 2500 com <i>M. incognita</i> em plantas aos 22 dias após a semeadura, com e sem corte das raízes, Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007. | 46 |
| 6. Atividade lipolítica de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>P. lilacinus</i> em meio sólido, Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008. | 52 |
| 7. Efeito de filtrados de culturas fúngicas nos meios Czapek Dox e BD (batata-dextrose) estes sem crescimento fúngico e água, na mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>M. incognita</i> , após 24 h com NaOH e na eclosão, após 14 dias, Embrapa Clima Temperado, 2007. | 56 |
| 8. Peso fresco de raízes e parte aérea de feijão, cv. Engopa Ouro com <i>Trichoderma</i> spp. (Mistura), <i>P. lilacinus</i> e <i>M. incognita</i> em casa de vegetação, Embrapa Clima Temperado, 2007. | 66 |
| 9. Número de galhas transformadas e fator de reprodução (FR) referente ao bioensaio com os fungos <i>Trichoderma</i> spp. (Mistura) e <i>P. lilacinus</i> testados em plantas de feijão cv. Engopa Ouro em casa de vegetação, Embrapa Clima Temperado, 2007. | 67 |

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

| | |
|--|----|
| 1. Ciclo de vida do nematóide formador de galhas <i>Meloidogyne</i> sp. (Seg. AGRIOS In: Tihohod, 2000)..... | 13 |
| 2. Colônias de <i>Trichoderma harzianum</i> (S11) em confronto direto com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> | 37 |
| 3. Detecção de sideróforo em sobrenadante de <i>T. harzianum</i> (6T) em solução CAS. A) Controle + BD; B) CAS + sobrenadante de <i>T. harzianum</i> (6T), Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007. | 45 |
| 4. Atividade quitinásica de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>P. lilacinus</i> . Letras iguais indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Valores referentes à liberação de uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde à liberação de 1 µmol de glicose/ml/min Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007. | 49 |
| 5. Atividade glucanásica de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>P. lilacinus</i> . Letras iguais indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Valores referentes à liberação de uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde à liberação de 1 µmol de glicose/ml/min Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007. | 50 |
| 6. Atividade proteásica produzida por <i>Trichoderma</i> spp. e <i>P. lilacinus</i> . Letras iguais indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Valores referentes à, uma unidade da atividade proteásica (U) é definida como sendo a quantidade de enzima requerida para produzir uma absorbância de 1 unidade em 30 min. a 25° C, num $\lambda = 440$ nm. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2006. | 54 |
| 7. Eficiência de diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e um de <i>P. lilacinus</i> quanto à capacidade de colonização <i>in vitro</i> de ovos de <i>M. incognita</i> . Barras seguidas de letras iguais, não diferem pelo teste Tukey (5%), Embrapa Clima Temperado, 2008. | 60 |
| 8. Fotomicrografia (A e B) de ovo com embrião imóvel de <i>M. incognita</i> colonizado por <i>P. lilacinus</i> , com emissão de conidióforos (40x), Embrapa Clima Temperado, 2008. | 62 |
| 9. Fotomicrografia (A e B) <i>Trichoderma harzianum</i> (S11) com hifas em forma de “armadilhas”, Embrapa Clima Temperado, 2008..... | 62 |
| 10. Hifas de <i>Trichoderma pseudokonigii</i> (2T) em meio AA (1%) mantidas em Placa de Petri com papel filtro, formando armadilhas para <i>M. incognita</i> , Embrapa Clima Temperado, 2008. | 63 |

1 INTRODUÇÃO

A cultura do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) tem grande importância na alimentação humana, em vista de suas características protéicas e energéticas, sendo esta leguminosa de grande importância social e econômica, por ser responsável pelo suprimento de grande parte das necessidades nutricionais, servindo como fonte básica e barata de proteínas e calorias para a população de baixo poder aquisitivo, e também pelo contingente de pequenos produtores que se dedicam à cultura.

O Brasil se encontra entre os maiores produtores e consumidores mundiais de feijão, sendo o maior produtor mundial do gênero *Phaseolus*. Mesmo sendo um dos líderes do *ranking* mundial, a produtividade média brasileira é muito baixa. Na safra de 2002, o Brasil obteve uma produtividade de 926 kg.ha⁻¹, valor aquém do potencial genético da cultura, estimada em 4.000 kg.ha⁻¹.

Dentre os principais fatores responsáveis pela baixa produtividade do feijão no Brasil, encontram-se as doenças, que podem provocar prejuízos da ordem de 80-100% na produção, além de diminuir a qualidade fisiológica, nutricional e sanitária do produto.

Entre os fatores bióticos que reduzem a produtividade do feijão destacam-se os nematóides do gênero *Meloidogyne*, principalmente as espécies *M. incognita* (Kofoid & White) e *M. javanica* (Treub), as quais aumentam sua população devido ao cultivo sucessivo da cultura. *Meloidogyne* spp. formam galhas no sistema radicular, impedindo

a absorção de água e nutrientes do solo, provocando deficiência mineral e perda de produtividade da ordem de 25 a 85%.

A utilização de tecnologias de produção diferenciadas na cultura do feijão, tais como o uso da irrigação principalmente sob pivô central, permite plantios sucessivos, com conseqüente aumento da rentabilidade da cultura. Apesar de possibilitar o aumento da produtividade e o número de safras durante o ano, tal tecnologia cria condições de umidade e temperatura ideais ao desenvolvimento de patógenos, favorecendo a ocorrência de doenças.

Além dos danos direto ocasionados pelo ataque dos nematóides, estes ainda causam ferimentos nas raízes das plantas que servem como porta de entrada para vários patógenos, com destaque para *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder, causador da Murcha de Fusarium.

Atualmente o controle químico é uma das medidas que vem sendo adotada para minimizar os danos causados por *Meloidogyne* sp. Todavia, devido ao impacto ambiental, a baixa eficiência e alto custo desta medida de controle torna-se necessário estudar alternativas de controle, as quais possam ser utilizadas como novas estratégias e, assim, reduzir os prejuízos.

Entre as medidas que vêm sendo pesquisadas para o controle de nematóides destaca-se o controle biológico com a utilização de diversos microrganismos antagonistas, como o uso da bactéria *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr e dos fungos *Paecylomyces lilacinus* (Thom.) Samson, *Verticillium* sp., *Monacrosporium* sp., entre outros.

Recentemente, trabalhos apontam para o potencial uso de *Trichoderma* sp. no controle de nematóides. Entre os motivos, destaca-se sua ação sobre a colonização da

matriz gelatinosa e o parasitismo de ovos e de J2 (juvenis de segundo estágio). No entanto, não existem trabalhos elucidando os mecanismos envolvidos na ação parasítica de *Trichoderma* sp. sobre nematóides.

A hipótese formulada para essa pesquisa supõe que isolados de *Trichoderma* sp. e *P. lilacinus* apresentam mecanismos de ação que podem ser usados efetivamente no controle de *M. incognita*. E, ainda, que o uso consorciado destes microrganismos pode mostrar-se eficiente no controle do nematóide das galhas.

Diante disso, este trabalho objetiva determinar o potencial de biocontrole e os mecanismos de ação de *Trichoderma* spp. e *P. lilacinus* envolvidos no controle de *M. incognita* *in vitro* e *in vivo* na cultura do feijão.

Para testar a hipótese exposta acima, foram propostos os seguintes objetivos:

1. Identificação dos isolados de *Trichoderma* spp.;
2. Avaliação, *in vitro*, do potencial de parasitismo a *M. incognita* dos fungos propostos;
3. Avaliação, *in vivo*, da eficiência dos fungos no biocontrole de *M. incognita* na cultivar de feijão Engopa Ouro;
4. Avaliação do efeito dos metabólitos produzidos pelos fungos na mortalidade de juvenis de segundo estágio e na eclosão de ovos de *M. incognita*; assim como a capacidade destes fungos em produzir enzimas relacionadas ao biocontrole;
5. Avaliação, *in vitro*, da ação de *Trichoderma* spp. no antagonismo a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Controle Biológico

O controle biológico de patógenos é a total ou a parcial redução da população do patógeno por outros organismos, e ocorre rotineiramente na natureza (Agrios, 2004). Segundo Bettioli (1991), a doença da planta é o resultado da interação entre o hospedeiro, o patógeno e diversos não patógenos que habitam o sítio de infecção, apresentando potencial para limitar a atividade do patógeno ou aumentar a resistência do hospedeiro. Para o autor, os componentes do controle biológico são o patógeno, o hospedeiro e os antagonistas, sob a influência do ambiente, todos interagindo num sistema biológico.

Cook & Baker (1993) definem controle biológico como “a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença realizadas por/ou através de um ou mais organismos que não o homem”.

A procura por alternativas de controle de patógenos intensificou-se e o uso do controle biológico vem sendo considerado uma medida que pode proporcionar reduções na população de fitonematóides para limiares abaixo do nível de dano econômico (Duncan, 1991).

Para se obter um controle biológico mais efetivo é importante estudar os mecanismos de ação dos antagonistas. O controle biológico baseia-se na relação antagonica entre microrganismos e fitopatógenos, podendo ser caracterizado por diferentes modos de atuação: competição por espaço e nutrientes, antibiose, parasitismo

e indução de resistência da planta hospedeira (Moraes, 1991; Melo & Azevedo, 1998; Papavizas, 1985).

Os testes de seleção de microrganismos com potencial para o controle biológico de organismos patogênicos podem ser realizados *in vitro* e *in vivo*, em condições controladas ou em condições naturais. Ambos métodos são complementares. Os principais métodos de seleção de microrganismos *in vitro* existentes são: pareamento de culturas, papel celofane, placa sobreposta e líquido metabólico (Mariano, 1993; Ethur, *et al.* 2005). A seleção de microrganismo *in vivo* é realizada através da aplicação do antagonista, seguida da inoculação do patógeno no hospedeiro por meio de pulverização de suspensão de células, imersão de raízes, ferimentos, entre outros (Melo & Azevedo, 1998).

Após o isolamento e seleção de um antagonista, o emprego deste como agente de controle biológico de fitopatógenos ocorre principalmente por meio do tratamento das sementes, do solo, das partes aéreas das plantas e na pós-colheita.

Métodos de produção massal e de formulações são objetos de pesquisas que necessitam do suporte da indústria. Existem algumas preparações comerciais de fungos nematófagos, como Royal 300 e Royal 350, desenvolvidos na França. O primeiro é à base do fungo *Arthrobotrys robusta* (Duddington) para controle de *Ditylenchus myceliophagus* (Goodey) em cogumelo e o Royal 350 é à base de *Arthrobotrys superba* destinado ao controle de espécies de *Meloidogyne* (Goeldi) em tomate. O produto Biocon, desenvolvido pela Universidade das Filipinas à base de um isolado de *P. lilacinus* (Thom.) Samson, recebeu desta universidade os direitos de comercialização, passando a denominar-se Bioact (Santos, 1996).

2.2 Fungos antagonistas

O termo antagonista emprega-se aos agentes biológicos com potencial para interferir nos processos vitais dos fitopatógenos. Desta forma, o nicho ecológico ocupado por fungos antagonistas favorece o controle biológico, pois neste local podem competir por nutrientes e espaço com os patógenos, bem como produzir substâncias tóxicas a estes organismos ou, ainda, induzir a planta a desenvolver resistência às doenças (Melo & Azevedo, 1998).

Atualmente, diversos microrganismos são utilizados como agentes no controle de fungos fitopatogênicos, entre eles podemos citar espécies de *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pythium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Streptomyces*, entre outros (Melo & Azevedo, 1998).

O fungo filamentoso *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson é conhecido por sua ação parasita sobre os ovos e fêmeas de *Meloidogyne* sp. Muitas pesquisas foram realizadas com este fungo para o controle de nematóides galhadores, mas frequentemente os métodos de produção de biomassa utilizados não estavam descritos ou eram realizados com meios de cultura onerosos (Stirling 1991; Gaspard *et al.* 1990 *et al.*; Khan *et al.* 1997; Mittal *et al.* 1995). A indústria alemã Prophyta comercializa um produto com *P. lilacinus* em vários países. Três outras formulações deste fungo filamentoso são produzidas na África do Sul, na Austrália e na Colômbia.

O fungo antagonista *Trichoderma* sp. vem sendo pesquisado no controle de fungos patogênicos e fitonematóides (Ethur *et al.*, 2001; Sharon, *et al.*, 2007; Sharon, *et al.*, 2001). O gênero *Trichoderma* por tratar-se de um micoparasita necrotrófico, apresenta grande eficácia no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp., *Pythium aphanidermatum*

entre outros (Ethur *et al.*, 2001; Mafia, *et al.*, 2003; Ethur, 2006; Patrício, *et al.*, 2007). Esta atividade de biocontrole tem sido intensamente estudada devido principalmente à produção de enzimas líticas extracelulares degradadoras da parede celular dos fungos, tais como quitinases, β -1, 4-glucanases e proteases (Corabi-Abell & Lucon, 2002). No entanto, a capacidade de degradar quitina do *Trichoderma* sp. permite a sua atuação no controle dos nematóides, visto que este polímero é o principal constituinte do ovo.

De acordo com Sharon *et al.*, (2001) verificaram que a atividade proteolítica de isolados de *T. harzianum* pode ser importante no controle biológico de nematóides.

Testes de antagonismo *in vitro* com *T. viride* e *T. koningii* verificaram que estes isolados atuam através da antibiose, da competição por substrato e hiperparasitismo, apresentando potencial para antagonizar *Verticillium dahlie* (Martins-Corder & Melo, 1998).

2.2.1 *Trichoderma* sp.

O gênero *Trichoderma* corresponde à fase anamórfica do gênero *Hypocrea*, pertencente à classe dos fungos Mitospóricos, subclasse Hifomicetos, ordem Moniliales, família Moniliaceae (Samuel, 1996). Dos fungos com potencial de antagonismo, este gênero é um dos mais pesquisados e estudados.

A eficiência do fungo *Trichoderma* sp. tem sido demonstrada em trabalhos de laboratório, casa de vegetação e campo, mostrando-se eficiente como um agente biocontrolador de patógenos em diferentes situações. Este antagonista tem mostrado melhor atuação a patógenos habitantes do solo e menos especializados como, por exemplo, *Pythium* sp., *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Sclerotium* sp., pois como também é um habitante do solo suas características de antagonismo são melhor expressas neste ambiente (Melo, 1991; Melo, 1996).

A principal característica morfológica do fungo *Trichoderma* sp. é a presença de micélio, inicialmente de coloração branca e de crescimento rápido. Com o desenvolvimento, torna-se cotonoso e compacto com tufo verde. A coloração da colônia depende da quantidade de conídios e da pigmentação destes (Domsch, *et al.*, 1980).

Os conídios são unicelulares, de forma subglobosa, ovóide, elipsóide ou elíptica-cilíndrica, com textura lisa ou rugosa e coloração hialina, verde-amarelo ou verde-escuro, sendo a última mais comum. Sua posição é no ápice das fiálides, em forma de esfera. As fiálides têm forma de cantil com o centro dilatado e ápice afilado, solitárias ou em grupos, hialinas, formando um ângulo reto com os conidióforos. Os conidióforos são muito ramificados, solitários ou em tufo compactos, geralmente de formato cônico ou piramidal. Normalmente mostram-se eretos, formando um ângulo reto com a hifa vegetativa. As áreas conidiais apresentam-se em forma de faixas concêntricas de coloração verde (Domsch, *et al.* 1980).

Em meio de cultura, as colônias de *Trichoderma* sp. crescem rapidamente, apresentando, inicialmente, superfície lisa e quase translúcida, tornando-se posteriormente flocosas ou compactas. A coloração da colônia exibe vários tons de verde (às vezes, muito claro – cor gelo), podendo ser influenciada pelo pH do meio de cultivo (Domsch, *et al.* 1980).

O micélio é composto por hifas hialinas muito ramificadas e de parede lisa. Clamidósporos estão presentes na maioria das espécies, intercalados nas hifas ou, ocasionalmente, terminais (Melo, 1991).

Existem poucas informações sobre os mecanismos utilizados pelas espécies de *Trichoderma* no controle de nematóides. Sendo que Sahebani & Hadavi (2008) citam

dois (1) parasitismo direto de ovos e larvas através do aumento da atividade de quitinases e proteases, sendo esta um indicativo da capacidade de infectar ovos (Sharon *et al.* 2001; Suarez *et al.* 2004); (2) indução dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Enzimas extracelulares tais como quitinase e protease com atividade anti-fúngica participam da relação de interação de *M. javanica* e *Trichoderma* sp. (Sharon, *et al.* 2001).

A Murcha de Fusarium é agravada pela presença de nematóides dos gêneros *Meloidogyne*, *Pratylenchus* e *Rotylenchulus*, que aumentam a severidade pois causam debilidade da planta e provocam ferimentos nas raízes, facilitando a penetração do patógeno no seu sistema radicular (Coutinho & Suassuna, 2007). Estudos com uso de *T. harzianum* em diferentes concentrações demonstraram um decréscimo na infecção por *M. javanica* em plantas de tomate (Sahebani & Hadavi, 2008).

2.2.2 *Paecilomyces lilacinus*

O gênero *Paecilomyces* pertence à divisão *Eumycota*, classe Deuteromycetes, ordem *Moniliales* e família *Moniliaceae*. Os conidióforos deste gênero são ramificados em grupos de bifurcações irregulares. Os conídios são separados das fiálides em forma de corrente. Os conidióforos têm cerca de 600µm de comprimento e desenvolvem grupos de correntes laterais (Domsch, *et al.* 1980).

O fungo *P. lilacinus* (Thom.) Samson pode ser isolado na maioria dos solos agrícolas, sendo também frequentemente isolado em ovos e nas fêmeas de *Meloidogyne*.

O parasitismo de *P. lilacinus* é facultativo, podendo infectar nematóides nas fases móveis (J2), fêmeas sedentárias ou mais agressivamente ovos (Jacobs, 2002).

Fungos antagonistas de nematóides podem ser divididos em: predadores, endoparasitos, parasitas oportunistas (parasitas de ovos, cistos e fêmeas sedentárias) e aqueles que produzem metabólitos tóxicos aos nematóides (Jatala, 1986).

A grande maioria dos fungos nematófagos isolados e/ou testados para o controle de *Heterodera glycines* (Ichinohe) e *Meloidogyne* sp. é do tipo oportunista (Freitas *et al.*, 1999). A habilidade dos fungos nematófagos em colonizar a rizosfera tem sido apontada como uma característica importante para um agente de biocontrole (Maia *et al.*, 2001; Stolf, 2006).

O fungo *P. lilacinus* tem apresentado potencial como agente de controle biológico do nematóide da galha *M. incognita* em banana (Jonathan & Rajendran, 2001). O controle se dá pela penetração do micélio na matriz de ovos das fêmeas adultas (Jatala *et al.*, 1979), além dos filtrados deste fungo possuírem efeito tóxico sobre adultos de *Meloidogyne* sp. (Devrajan & Seenivasan, 2002). Este fungo também foi eficiente no controle de *Radopholus similis* (Coob) em banana (Devrajan & Seenivasan, 2001).

Comparando o efeito do controle químico de nematóides com a utilização de carbofuran (40 g/planta) e o controle biológico com a utilização do fungo *P. lilacinus*, Devrajan & Rajendran (2001) verificaram que o controle químico efetivo com carbofuran foi obtido 150 dias após a aplicação, obtendo 129 nematóides/ 5 g de raiz. Com a aplicação de *P. lilacinus* neste estágio, o hospedeiro apresentou uma população de 143,3 nematóides/ 5 g de raiz, quase comparável ao resultado obtido quando aplicado o carbofuran (Stolf, 2006).

2.2.3 *Meloidogyne* sp.

Os nematóides são organismos tipicamente vermiformes, não segmentados, e a maioria completa seu ciclo de vida no solo. Não são vistos a olho nu, devido a sua

coloração transparente e ao tamanho minúsculo. Seu deslocamento no solo é bastante limitado, não ultrapassando poucos centímetros. Sua disseminação, portanto, é altamente dependente do homem, por meio de mudas contaminadas, deslocamento de equipamentos de áreas contaminadas para áreas saudas e por meio da irrigação e/ou água das chuvas. Geralmente, a manifestação dos sintomas causados por fitonematóides ocorre em reboleiras (Ritzinger & Costa, 2008).

As espécies do gênero *Meloidogyne* caracterizam-se por acentuado dimorfismo sexual; a fêmea apresenta corpo globoso, periforme ou em forma de saco, e imóvel; o macho tem corpo vermiforme e é incapaz de causar galhas (Tihohod, 2000).

A penetração dos nematóides do gênero *Meloidogyne* nas raízes ocorre no estágio juvenil vermiforme (J2), pela região meristemática; em seguida este migra até a zona de maturação, onde estabelece um local de alimentação na região vascular, tornando-se sedentário (Figura 1). Posteriormente, os machos adultos abandonam o sistema radicular e as fêmeas permanecem no interior das raízes, como endoparasitas sedentárias, até o final do seu ciclo de vida, induzindo a formação de galhas (Tihohod, 2000).

Após a penetração do J2 de *Meloidogyne* sp. na raiz, o nematóide passa por mais três ecdises até atingir a fase adulta. As fêmeas quando adquire corpos globosos, depositando seus ovos no exterior da raiz. Os ovos são circundados por uma matriz gelatinosa secretada pela própria fêmea durante a oviposição (Costa *et al.*, 2000).

Segundo Rocha (2007) para que ocorra o parasitismo por fitonematóides são necessárias diversas etapas: atração do juvenil pela planta, penetração pela região meristemática da raiz, movimentação dentro do hospedeiro para identificação do local receptivo do elicitor, excreção dos produtos da glândula esofagiana dorsal,

reconhecimento do elicitador pela planta e formação das células gigantes. Portanto, o sucesso do parasitismo do J2 em plantas envolve o cumprimento de todas essas etapas, o que demanda energia e condições fisiológicas adequadas.

O ciclo de vida do nematóide das galhas é de aproximadamente quatro semanas, podendo prolongar-se sob condições de temperatura desfavoráveis. Temperaturas inferiores a 20°C ou superiores a 35°C e condições de seca ou de encharcamento do solo afetam o desenvolvimento e a sobrevivência do nematóide, tornando o ciclo mais longo (Costa *et al.*, 2000).

O sintoma característico do ataque desse nematóide é o engrossamento localizado nas radículas e raízes, formando galhas. O desenvolvimento das galhas radiculares se dá pela hipertrofia e hiperplasia de células do parênquima vascular da raiz (Tihohod, 2000).

As galhas podem ser diminutas ou atingir diâmetro superior a 15 mm. As células hipertróficas multinucleadas funcionam como verdadeiros armazéns no suprimento alimentar dos nematóides sedentários (Costa *et al.*, 2000). A formação de células gigantes, como resultado da infecção pelo nematóide, provoca uma interrupção e desorganização do sistema vascular. Conseqüentemente há uma diminuição na absorção e no transporte de água e nutrientes, diretamente influenciando a produtividade (Cofcewicz *et al.*, 2001). Em consequência da infestação severa de nematóides, o sistema radicular pode apodrecer facilmente fazendo com que as plantas não absorvam água e nutrientes do solo de forma adequada.

Alguns fatores parecem contribuir para a rápida multiplicação do nematóide, como solos arenosos e altas temperaturas (Tihohod, 2000; Lordello, 1992).

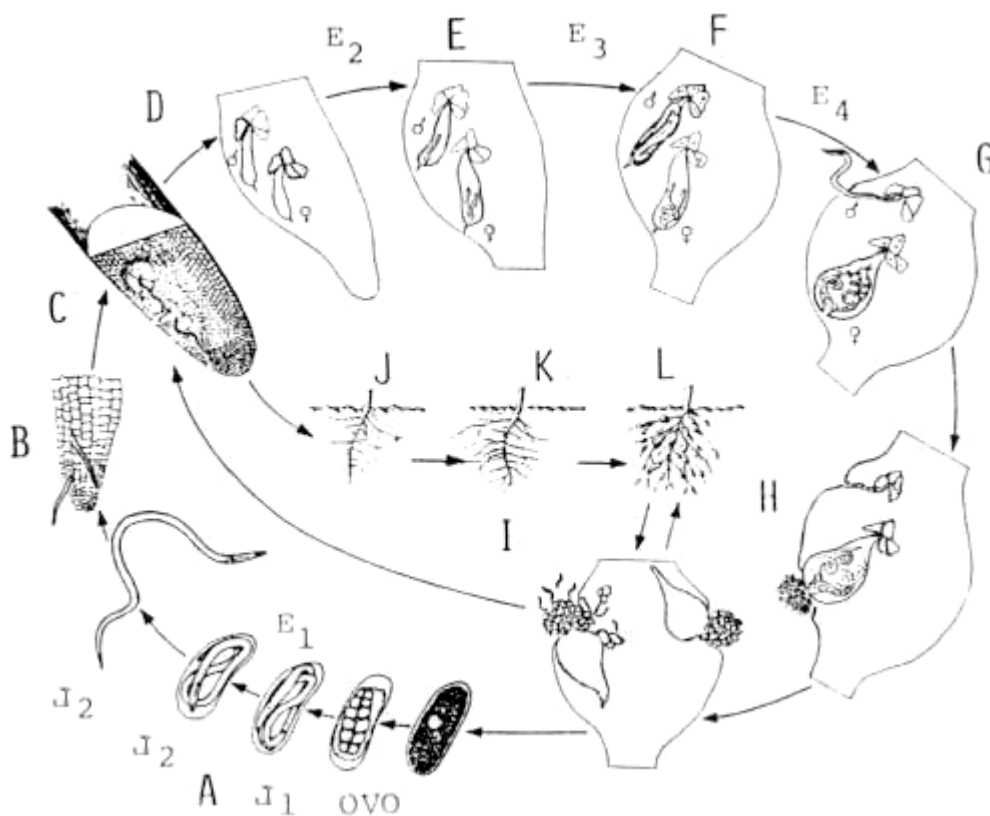


FIGURA 1. Ciclo de vida do nematóide formador de galhas *Meloidogyne* sp. (Seg. AGRIOS In: Tihohod, 2000)

Muitos dos estudos de controle biológico recaem sobre fitonematóides endoparasitos sedentários (*Meloidogyne* Goeldi, *Heterodera* Schmidt e *Globodera* Skarbilvitch), endoparasitos migradores (*Pratylenchus* Filipvej e *Radopholus* Linford e Oliveira) e ectoparasitos migradores (*Xiphinema* Cobb, *Trichodorus* Cobb e *Criconemella* de Grisse e Loof, entre outros nematóides. Entretanto, para os nematóides endoparasitos sedentários, apenas os juvenis de 2º estágio ficam expostos fora da raiz antes da penetração, fase que ocorre rapidamente no solo (Santos, 1996).

As espécies de nematóides de maior ocorrência no Brasil são *M. incognita* e *M. javanica*. Embora essas espécies apresentem hábito sedentário, sua multiplicação e

permanência no solo dificultam muito o manejo, pois cada fêmea pode depositar mais de 500 ovos (Carneiro, *et al.*, 2003; Carneiro, *et al.*, 2007).

A Murcha de Fusarium é agravada pela presença de nematóides dos gêneros *Meloidogyne*, *Pratylenchus* e *Rotylenchulus*, que aumentam a severidade em função de causarem debilitação da planta e de provocarem ferimentos nas raízes, facilitando a penetração do patógeno no seu sistema radicular (Coutinho & Suassuna, 2007).

Os ferimentos provocados por nematóides do gênero *Meloidogyne* têm um papel importante na ocorrência da Murcha de Fusarium, a tal ponto de comprometer o controle da doença, mesmo quando variedades resistentes são utilizadas. Estudos apontam para a interação entre *F. oxysporum* e *Meloidogyne* sp. na cultura do feijão.

Segundo Simão *et al.*, (2005) a cultura do feijão é considerada uma boa hospedeira para *M. javanica* e *M. incognita* causando perdas de cerca de 50-90%. Ainda, segundo este mesmo autor, no Brasil, os nematóides formadores de galhas são considerados um dos principais responsáveis pela baixa produtividade da cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), principalmente em regiões com predominância de elevadas temperaturas, fator que aumenta o estresse e interfere na manifestação da resistência das plantas ao parasitismo dos nematóides.

Em diversas culturas é comum ocorrerem infestações múltiplas com nematóides e outros organismos patogênicos, como insetos, fungos, bactérias e vírus, levando a erros de diagnose pelo desconhecimento por parte dos produtores e especialistas, que ignoram a importância dos fitonematóides como patógenos (Ritzinger & Costa, 2008).

2.3 Mecanismos de ação de fungos antagonistas como agentes de biocontrole

A ação de *Trichoderma* sp. como agente de biocontrole ocorre devido à associação ou não dos mecanismos de antibiose, hiperparasitismo e competição (Melo, 1998). Howell *et al.* (1987) desconsideram o hiperparasitismo e acrescentam a indução de resistência do hospedeiro, além do favorecimento da planta na tolerância a estresse ambiental, solubilização e sequestro de nutrientes inorgânicos, e inativação de enzimas dos patógenos (Harman, 2000).

2.3.1 Micoparasitismo

O micoparasitismo é o processo de destruição física da parede celular, mediada pela ação de enzimas hidrolíticas produzidas pelos agentes de biocontrole. A relação hospedeiro-parasita é caracterizada por um período relativamente longo de contato, que pode ser físico ou metabólico com digestão por enzimas hidrolíticas (quitinases, proteases, glucanases e lipases) (Bettiol, 1991).

Os micoparasitas atacam hifas e estruturas de reprodução e sobrevivência dos patógenos de planta, reduzindo a infecção e o inóculo do patógeno (Ethur, 2006). *Trichoderma* sp. possui característica micoparasita, pois pode detectar e localizar hifas de fungos suscetíveis, crescendo em sua direção presumivelmente em resposta a estímulos químicos produzidos pela hifa hospedeira, formando estruturas semelhantes a apressórios e enrolando-se em toda a sua extensão para, então, penetrar e digerir a hifa (Melo, 1998). Segundo Harman *et al.* (2004) suspeita-se que existam de 20 a 30 genes envolvidos no processo de micoparasitismo, devido a quantidade de proteínas e outros metabólitos envolvidos nessa interação.

As espécies de *Trichoderma* têm sido estudadas por produzirem uma série de enzimas extracelulares (Harman *et al.*, 2004), tais como quitinases, lipases, proteases e glucanases, capazes de degradar paredes celulares fúngicas e parasitar nematóides (Sharon *et al.*, 2001; Suarez *et al.*, 2004), sendo importantes no antagonismo contra fungos patogênicos e fitonematóides.

As quitinases formam um grupo complexo de enzimas hidrolíticas que clivam as ligações β -1,4 glicosídicas do polímero linear quitina, em açúcares de N-acetil- β -D-glicosamina (Loguercio-Leite & Esposito, 2004).

Estas enzimas são sintetizadas principalmente por organismos que possuem quitina na sua parede celular (fungos filamentosos, leveduras e algas verdes) e têm o polímero como constituinte do exoesqueleto e/ou carapaça encontrada em crustáceos e insetos. Em fungos as quitinases estão envolvidas na morfogênese e em plantas estão relacionadas ao mecanismo de defesa contra fungos fitopatogênicos (Loguercio-Leite & Esposito, 2004).

Trichoderma sp. é capaz de parasitar vários fungos, entre eles, *Fusarium oxysporum*, no qual ocorre enrolamento de hifas, penetração e crescimento intracelular de *T. longibrachiatum* no patógeno (Melo, 1991).

As glucanases atuam sobre β 1,3-glucano, importante constituinte da parede celular de fungos. Segundo Theis & Stahl (2003) muitas glucanases de fungos têm sido caracterizadas. De acordo com Giese *et al.* (2008), a produção de glucanases de *T. harzianum* e *T. asperellum* aumentaram significativamente quando utilizou-se paredes celulares fúngicas purificadas de *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* como única fonte de carbono. Estes resultados sugerem que a regulação da expressão de

β -1,3-glucanase nestes fungos pode ser influenciada pela quantidade de β -glucano presente no meio de cultivo, que atua como agente indutor.

Ainda segundo o mesmo autor, o gênero *Trichoderma* apresenta capacidade de secretar quitinases, β 1,3-glucanases e β 1,6-glucanases, que resultam na inibição do crescimento de fungos patogênicos.

Segundo Rocha (2007), após eclosão os J2 de *M. javanica* possuem 30% do seu peso corporal em lipídios, como fonte de reserva energética, a qual é utilizada no processo de migração e parasitismo na planta. Ainda, segundo o mesmo autor, a porcentagem de lipídios está intimamente ligada à capacidade dos nematóides de parasitar o seu hospedeiro. Ainda segundo o mesmo autor, a flutuação populacional de nematóides no solo varia em função do ambiente, dos fatores bióticos e abióticos, além das interações com o hospedeiro, os quais afetam o desenvolvimento embrionário, eclosão, migração e infectividade no hospedeiro.

No solo, a movimentação do juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidgyne* sp. em direção ao local de penetração ocorre, entre outros fatores, em resposta à atração por substâncias exsudadas pela raiz (Rocha, 2007). Para isso, o J2 traz consigo 30% de seu peso corporal em lipídios, constituindo-se a principal fonte energética para os gastos no processo de penetração e parasitismo do hospedeiro (Freire *et al.*, 2007).

De acordo com Freire *et al.* (2007), a perda dessas reservas reduz a infectividade e a reprodução, podendo levar até mesmo à morte. Quando há redução de 50 a 60% das reservas energéticas lipídicas de J2 de *M. javanica*, há uma redução substancial do seu potencial infectivo. Ainda segundo este mesmo autor, a energia necessária está, principalmente, no conteúdo lipídico corporal acumulado durante o seu desenvolvimento embrionário, que deve ser suficiente para o juvenil eclodir e cumprir,

com sucesso, todas as etapas do processo de parasitismo. A prolongada ausência de hospedeiro no campo leva o J2 a usar sua reserva para movimentação no solo.

As lipases são importantes no controle de nematóides por degradarem as reservas energéticas dos nematóides e por atuar nos lipídios de membrana (Arduim, 2006; Rocha, 2007).

2.3.2 Competição

Competição é um processo referente à interação entre dois ou mais organismos, empenhados na mesma ação. A competição entre microrganismos ocorre principalmente por nutrientes, espaço e oxigênio (Bettiol, 1991), e mesmo sendo um mecanismo importante, é extremamente difícil de ser comprovado experimentalmente, o que não ocorre com a antibiose e o micoparasitismo (Harman, 2000).

Segundo Harman *et al.* (2004), *Trichoderma* sp. compete pelos exsudatos liberados pelas sementes no processo de germinação de propágulos de fungos fitopatogênicos. De acordo com Ethur (2006), a competição é uma das principais características de isolados de *Trichoderma* sp. usados como agentes de biocontrole, pois somente assim terão capacidade de se desenvolver na rizosfera.

2.3.3 Antibiose

Antibiose é definida como uma interação entre organismos, na qual um ou mais metabólitos, produzidos por um organismo, têm um efeito danoso sobre o outro (Bettiol, 1991). Usualmente, ocorre inibição no crescimento e/ou na germinação, podendo ser letal ao hospedeiro. O metabólito produzido por antagonistas pode penetrar na célula e inibir sua atividade por toxicidade química.

A produção de metabólitos pode resultar na completa lise e dissolução da estrutura celular e independe do contato físico entre os microrganismos. Grande parte

dos microrganismos envolvidos no controle biológico atua através de antibiose (Bettiol, 1991).

Os metabólitos produzidos podem ser voláteis e não-voláteis. Dos antibióticos produzidos por *Trichoderma* sp., Bastos (1991) cita gliotoxina, viridina e trichodermina, como substâncias capazes de inibir o desenvolvimento de outros fungos. De acordo com Ethur (2006), a gliotoxina é responsável pela inibição da germinação de esporângios e do crescimento micelial de *Pythium ultimum*.

Isolados de *Trichoderma* sp. obtidos de tomateiro, alface e fumo, apresentaram inibição a *Sclerotinia sclerotiorum* com 94, 93 e 86% de eficácia, respectivamente, sendo sugerido pelo autor que o principal mecanismo de ação foi a antibiose (Ethur *et al.*, 2001). Segundo Melo (1998) muitas espécies de *Trichoderma* sp. já estudadas possuem a capacidade de produzir antibióticos capazes de inibir propágulos de fungos fitopatogênicos.

Metabólitos fúngicos de *P. lilacinus*, *Fusarium moniliforme* e *Fusarium oxysporum* foram capazes de reduzir a motilidade e eclosão e aumentaram a mortalidade de J2 de *M. incognita* (Costa, *et al.* 2001). A lactona 6-pentil- α -pirona é um metabólito volátil, característico de algumas espécies de *Trichoderma* (*T. viride*), que produzem um aroma de coco muito utilizado na indústria alimentícia (Kalyani *et al.* 2000).

Estudos com filtrados de *Trichoderma lignorum* (T-203) controlaram de 25-80% de *M. javanica*, (Spiegel & Chet 1998). Sousa *et al.* (2006) testaram filtrados de culturas de isolados de *Streptomyces purpuraceans* e *Streptomyces thermotolerans* e obtiveram 37% e 39% de mortalidade dos J2 de *M. incognita*, respectivamente.

2.3.4 Indução de resistência

A indução de resistência é outro mecanismo utilizado por agentes de biocontrole na redução de doenças. Esse processo ocorre quando as plantas expostas a um agente indutor têm seus mecanismos de defesa ativados, não apenas no sítio de indução como também em outros locais dele distantes, de forma mais ou menos generalizada (Romeiro, 1999). Tem ocorrido muito progresso na elucidação dos caminhos que envolvem a indução de resistência, sendo que, em muitos casos, o ácido salicílico e o ácido jasmônico, juntamente com o etileno, induzem a cascata de eventos que provocam a produção de uma grande variedade de metabólitos e proteínas com diversas funções na planta, induzindo barreiras físicas e químicas de proteção contra fitopatógenos (Harman *et al.*, 2004). De acordo com Boscato *et al.* (2007), isolados do fungo *T. harzianum* foram capazes de estimular a planta a produzir proteínas relacionadas a resistência *Plasmopara viticola* e *Botrytis cinerea* agentes causais de míldio e podridão cinzenta, respectivamente em *Vitis vinifera*.

No entanto, todos os mecanismos envolvidos no parasitismo do fungo *Trichoderma* sp. podem atuar através de um ou da associação de mecanismos como parasitismo, antibiose, competição e indução de resistência (Cook & Baker, 1993), segundo Bettiol & Ghini (1995).

2.4 Sideróforos

Os sideróforos (do grego “carreadores de ferro”) são metabólitos secundários de baixo peso molecular que possuem alta afinidade pelo Fe (III), os transportando para o interior da célula. Podem ser produzidos por espécies aeróbias ou aeróbias facultativas. Na variedade de microrganismos conhecidos que sintetizam sideróforos estão incluídos

vários fungos, bactérias, animais e plantas; cianobactérias e algas superiores; bactérias fixadoras de nitrogênio e alguns tipos de leveduras (Neilands, 1995).

Os microrganismos aeróbios precisam do ferro para realizar várias funções como redução do oxigênio para a síntese de ATP, formação do grupo heme e outras finalidades. É necessário cerca de um micromolar de ferro para um crescimento bacteriano ótimo (Neilands, 1995).

Como estratégia para a obtenção do ferro, os fungos como *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., entre outros, produzem metabólitos secundários que conseguem se ligar ao Fe e transportá-lo para dentro da célula (Benite & Machado, 2002; Patriarca *et al.*, 2002).

A função dos sideróforos envolve o transporte de ferro através da membrana celular. A entrada do ferro no citoplasma somente acontece depois que o ferro é reduzido e/ou desmembrado de seu ligante. Em alguns casos o sideróforo é reciclado para iniciar novamente o processo de absorção do ferro (Neilands, 1995).

Os sideróforos fúngicos possuem pelo menos um ácido hidroxâmico como sítios ligantes. Uma característica comum destes sítios é a formação de anéis quelatos de cinco membros muito estáveis com o Fe (III). Os sideróforos podem apresentar afinidade por outros ligantes formando complexos relativamente estáveis com o cobre (II), gálio (III), molibdênio (II), alumínio (III), entre outros.

Para que ocorra a disponibilização do ferro para o fungo são necessários vários processos químicos para a solubilização e a captação do ferro mediado pelo sideróforo: 1) quelação seletiva do ferro; 2) reconhecimento molecular do complexo sideróforo-Fe (III); 3) transporte do Fe complexado através da membrana celular; 4) deposição do Fe dentro de um sítio apropriado na célula (superfície ou interior celular), sendo que neste

último a troca do ligante pode ou não ser seguida pela redução de Fe (III) e/ou pela hidrólise do ligante (Benite & Machado, 2002).

Os sideróforos apresentam efeitos negativos sobre microrganismos fitopatogênicos, sequestrando o ferro disponível e desta forma inibindo o crescimento ou atividade metabólica dos patógenos. Estudos apontaram que microrganismos produtores de sideróforos podem atuar no biocontrole. Renshaw *et al.* (2002) descreveram um isolado de *Fusarium* sp. não patogênico que produziu mais sideróforos e foi capaz de suprimir o crescimento dos isolados patogênicos de *Fusarium* sp.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Microbiologia Fitopatológica, Departamento de Fitossanidade na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, localizado em Porto Alegre, e nos laboratórios de Fitopatologia e Fisiologia Vegetal da Embrapa Clima Temperado, localizados em Pelotas/RS.

A obtenção dos quatro isolados de *Trichoderma* spp. S11, 2T, 5T e 6T (sendo o primeiro isolado de capão nativo e os demais de solo de lavoura) e *Fusarium oxysporum* (Schlecht) f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder foi realizada a partir da coleta em diferentes locais de solo de lavouras de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) da cultivar Pérola, do grupo carioca, suscetível ao patógeno em estudo, localizada em Formosa e coletados e isolados pela Dr^a Aida Terezinha Santos Matsumura. O fungo *P. lilacinus* foi isolado de solo de mata nativa de Venâncio Aires, RS e gentilmente cedido pela Dr^a Marcia Eloisa da Silva.

As sementes de feijão foram cedidas pelos produtores de Formosa, onde também foram coletados os fungos antagonistas e o patógeno *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

3.1 Identificação dos isolados de *Trichoderma* spp. e do *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram cultivados em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) a 28 e 40 °C para posterior observação e medição das estruturas em microscópio óptico para diferenciação de espécies na chave. As medidas e

características obtidas foram colocadas na chave interativa *on line* para identificação de espécies de *Trichoderma* sp. proposta por Samuels *et al.* (2007).

A identificação também foi realizada seguindo a chave de identificação de Gams & Bissett (1998). Esta baseia-se na identificação da forma e do diâmetro de conídios, tipo de ramificação dos conídios e o modo de disposição das fiáldes.

O fungo *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* foi cultivado em BDA a 25 ± 2 °C, por sete dias e identificado seguindo as características morfológicas indicadas nas chaves de Booth (1977) e Toussoun & Nelson (1976).

3.2 Avaliação de competição entre *Trichoderma* spp. sobre *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e compatibilidade *in vitro* de *Trichoderma* spp. e *P. lilacinus*.

O delineamento estatístico dos experimentos *in vitro* foi inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento. As culturas foram incubadas em temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12h.

3.2.1 Competição *in vitro*

Os quatro isolados de *Trichoderma* spp., foram testados contra *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Discos de ágar contendo micélio e conídios de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* foram colocados em placas de Petri (90mm), contendo meio de BDA, a uma distância de aproximadamente 1,0 cm da borda, confrontados, separadamente, com cada um dos isolados de *Trichoderma* spp. Como controle utilizou-se somente o patógeno. Avaliou-se o crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* no quinto dia. A avaliação foi realizada de acordo com os critérios propostos por Bell *et al.* (1982) com as seguintes notas: 1 – antagonista cresce por toda a placa de Petri, 2 – antagonista

crece sobre 2/3 da placa, 3 – antagonista e patógeno crescem até a metade da placa, 4 – patógeno cresce sobre 2/3 da placa e 5 – patógeno cresce por toda a placa de Petri.

3.2.2 Avaliação do efeito de metabólitos voláteis

O método consistiu em posicionar fundos de placas de Petri uma sobre a outra, após ter vertido meio de BDA em cada uma delas. No centro da placa inferior colocou-se *Trichoderma* spp. e no centro da placa superior *Fusarium*, ambos na forma de discos de ágar (1cm) contendo micélio e conídios. Lateralmente, vedou-se as tampas com filme plástico. Utilizou-se os mesmos isolados do teste anterior. O controle recebeu somente o patógeno.

3.2.3 Avaliação da compatibilidade entre *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus*.

Os mesmos isolados de *Trichoderma* spp. do teste anterior de competição *in vitro*, seguindo o mesmo método foram utilizados em confronto com *P. lilacinus*. Como controle utilizou-se somente *Trichoderma* spp. e *P. lilacinus*. Avaliou-se o crescimento micelial de ambos fungos após 48 h.

3.3 Avaliação da concentração e inoculação à *Meloidogyne incognita* em plantas de feijão

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de janeiro a março de 2007. Foram avaliadas plantas das cultivares de feijão Engopa Ouro e Carioca com relação às concentrações iniciais de inóculo com 1250 e 2500 ovos e J2 de *M. incognita*.

A semeadura das cultivares foi realizada em copos plásticos com capacidade para 300 mL, contendo terra autoclavada. Em 11 de janeiro de 2007 aos 20 dias após a semeadura foi realizada a inoculação com as suspensões de inóculo com concentrações iniciais de 1250 e 2500 ovos + J2 por planta no estágio V2 (folhas primárias). Utilizou-se como inóculo do nematóide uma população pura de *M. incognita* multiplicada em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), cv. Santa Cruz, mantidos em condições de casa de vegetação, na Embrapa Clima Temperado, a partir das quais se procederam à extração dos ovos e J2, seguindo metodologia de Hussey & Barker, 1973.

O delineamento experimental foi de blocos casualizados, com seis tratamentos (duas cultivares x dois tratamentos x duas concentrações) e cinco repetições constituídas por um vaso com uma planta.

O comportamento das cultivares frente ao parasitismo dos nematóides foi avaliado mediante o número de galhas comparados com os métodos usualmente utilizados na inoculação de *Fusarium* sp. (Cavalcanti *et al.*, 2002). As plantas foram avaliadas 40 dias após a inoculação.

O primeiro método foi denominado método de corte de raízes, onde as plantas, após uma semana, obtidas de copos com solo autoclavado, foram retiradas, lavadas em água corrente e cortadas a cerca de 2 cm do sistema radicular e, após, plantadas e inoculadas com 10 mL da suspensão de nematóides, por planta, dispostos em três orifícios com 10 cm de profundidade no solo. O segundo método foi realizado pela infestação na região da rizosfera das plântulas de feijão, onde foram colocados 10 mL da suspensão de nematóides. Em ambos métodos foram utilizadas as duas concentrações acima citadas.

3.4 Avaliação de aspectos bioquímicos de microrganismos que podem estar associados ao biocontrole

As próximas seções descrevem os testes relacionados às atividades enzimáticas e produção de sideróforos dos fungos propostos.

3.4.1 Atividade quitinásica e glucanásica

A análise da atividade quitinásica (EC 3.2.1.14) e glucanásica (EC 3.2.1.39) foi baseada no método de Miller (1959), o qual mede a liberação de açúcares redutores a partir da hidrólise da quitina e laminarina, através do uso do DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico).

Primeiramente os isolados fúngicos foram crescidos em meio de cultura de Mandel & Reese (1960) (peptona bacteriológica 0,1%; KH_2PO_4 0,2%; $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 0,14%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,03%; uréia 0,03%; glicose 3%; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,03%; micélio seco de *Cilindrocladium gracile* 0,5%; 100 μL de solução de elemento traço, pH 6,0). O micélio seco de *C. gracile* foi obtido com a inoculação de três discos de 8 mm contendo micélio do fungo crescido em meio BDA. Estes foram colocados em frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de BD e incubados durante sete dias com agitação orbital (150 rpm). Após, o micélio foi filtrado em papel Whatman n° 1, seco em estufa a 70°C e então triturado. A solução de elemento traço foi obtida a partir da solução de sais de Mandel & Reese (1960) (5 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,5 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,4 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2% CaCO_3). Após o crescimento foi colocado 1 mL de meio de cultura de cada frasco com os isolados em tubos de reação e centrifugados por cinco minutos a 14000 rpm.

Para análise da atividade quitinásica e glucanásica foram colocados em tubos de ensaio 100 μL da amostra (sobrenadante do meio de cultura centrifugado) e 550 μL de tampão citrato de sódio 50 mg/mL pH 4,8 e, após homogeneização, foram colocados em

banho-maria a 50°C. Em seguida, adicionou-se 250µL de quitina coloidal 0,5% para avaliação da atividade quitinásica e 250µL de laminarina 0,5% para avaliação da atividade glucanásica, também a temperatura de 50°C, e então incubados pelo período de 1 hora. Após este período adicionou-se 1 mL de DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico, 10,6 g; NaOH 19,8 g; 1416 mL de água destilada, dissolução a quente com posterior adição de 7,6 g de fenol (fundido a 50°C) e 8,3g de de metabissulfito de sódio) ainda no banho, seguido da adição de 100µL de glicose 0,5 mg/mL. Em seguida, a solução foi fervida por 5 minutos e após resfriar adicionou-se 2,0 mL de água destilada, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a $\lambda=545$ nm. O controle (branco) consistiu na solução sem a adição de quitina coloidal e de laminarina a reação. Para determinação da atividade enzimática foi preparada uma curva de calibração com glicose nas concentrações de zero, 0,05, 0,1, 0,2 e 0,3 mg/mL.

Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde a liberação de 1 µmol de glicose/mL/min.

3.4.2 Atividade proteolítica

Os isolados fúngicos foram crescidos durante cinco dias em meio Mandels & Resse (1960), suplementados com micélio seco de *C. gracile*, e então centrifugados.

A atividade proteolítica foi determinada segundo Sarath *et al.* (1989), o substrato azocaseína e a enzima foram colocados em banho maria a 25°C, pipetou-se 250 µl de substrato e 150 µl da amostra, misturou-se gentilmente e incubou-se a 25°C por 30 minutos.

Para o preparo do branco, a enzima (amostra) foi substituída pelo tampão fosfato e executado o procedimento acima (Branco 1).

Foram feitas três repetições para cada amostra. Logo após, adicionou-se 1,2 mL de ácido tricloroacético (10g/100mL de água destilada), 10% em cada tubo. Após misturado, deixou-se descansar por 15 min para precipitação da azocaseína.

Preparou-se o Branco 2 das enzimas adicionando na seguinte ordem: 150 µl de tampão fosfato, 150 µl de amostra, 1,2 ml de TCA (ácido tricloroacético) e 250 µl de substrato.

As amostras foram centrifugadas em 14000 rpm por cinco minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 1,4 mL de NaOH 1M. A leitura foi feita a 440 de absorbância.

Uma unidade da atividade proteásica (U) é definida como sendo a quantidade de enzima requerida para produzir uma absorbância de 1 unidade em 30 min. A 25°C, num $\lambda = 440$ nm.

3.4.3 Atividade lipolítica (em meio sólido)

A produção de lipases extracelulares foi detectada pelos procedimentos descritos por Hankin & Anagnostakis (1975). Foram utilizadas cinco repetições. Em todos os ensaios foram colocados 20 ml de meio de cultura em cada placa de Petri e mantidas sob as mesmas condições de cultivo. Os fungos foram incubados a 28°C durante três dias. Na detecção de lipases em meio sólido, utilizou-se meio composto de 1% de peptona, 0,5% de NaCl, 0,01% de CaCl, 2% de ágar, ao qual foi adicionado 1% de Tween 20, pH 6,0. A atividade lipolítica foi evidenciada pela presença de cristais de cálcio do ácido láurico, liberado pela enzima ao redor da colônia.

3.4.4 Detecção de sideróforos em culturas de *Trichoderma* spp. e *P. lilacinus*

Toda a vidraria utilizada no desenvolvimento dos ensaios foi imersa em mistura sulfocrômica (HCl 6M) por 48 h e enxaguada seguidas vezes em água deionizada. Empregou-se a técnica universal para detecção de sideróforos desenvolvida por Schwyn & Neilands (1987). Os microrganismos a serem testados foram cultivados por cinco dias sob agitação orbital (150 rpm), em meio batata-dextrose (BD). Como controle utilizou-se o meio sem inoculação do microrganismo. As células foram precipitadas por centrifugação e 1 mL do sobrenadante foi misturado a 1 mL da solução indicadora de cromo azurol S (CAS). A solução de CAS foi preparada misturando-se 6 mL de solução de HDTMA 10 mM e 30 mL de água. Foi acrescentado sob agitação 1,5 mL de solução férrica ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM), preparada em HCl 0,01 N e 7,5 mL de solução de cromo azurol S 2 mM. Separadamente foram dissolvidos 4,307 g de piperazina anidra em 20 mL de água, posteriormente acrescida de 6,25 mL de HCl. Esta solução foi adicionada ao restante dos componentes já preparados, totalizando 100 mL de volume. A mudança de cor da mistura do sobrenadante-indicador foi de azulado para amarelo-avermelhado no período de 15 min, indicando a produção de sideróforos pelos fungos.

3.5 Avaliação, *in vitro*, do efeito nematicida e nematostático de *Trichoderma* spp. e *P. lilacinus* sobre *M. incognita*.

3.5.1 Obtenção dos filtrados fúngicos para avaliação da atividade inibitória

Os fungos *Trichoderma* spp. e *P. lilacinus*, previamente isolados e selecionados, foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar.

Após sete dias de incubação a 28°C, discos de 5mm de diâmetro dessas culturas foram colocados em frascos de 250ml, contendo 100ml de meio líquido CzapekDox (0,5 g de KCl, 1g de KH₂PO₄, 2 g de NaNO₃, 30 g de sacarose, 0,01 g de FeSO₄.H₂O e 0,5 g de MgSO₄.7H₂O por 1000ml de água destilada), previamente esterilizado a 120°C por 20 min. Colocou-se três discos de cada cultura por frasco, mantidos em incubadora a 25°C com agitação orbital de 150 rpm, por 15 dias. Após esse período, todo o conteúdo dos Erlenmeyers foi filtrado em algodão e logo após em membrana de acetato celulose 0,22 µm, com o auxílio de uma bomba de vácuo, obtendo-se, assim, as fases líquidas denominadas de filtrados fúngicos. Os filtrados fúngicos permaneceram sob refrigeração no período de 48h, até o estabelecimento do ensaio.

3.5.2 Testes de mortalidade de J2 e de eclosão de *M. incognita* (%) quando em contato com filtrados de *Trichoderma* spp. e *P. lilacinus*.

O inóculo de nematóides foi obtido a partir de uma população pura de *M. incognita*, mantida em plantas de tomate suscetíveis (*Lycopersicon esculentum* L.) cv. Santa Cruz, em condições de casa de vegetação, na Embrapa Clima Temperado, a extração foi segundo metodologia proposta por Hussey & Barker (1973).

Para a obtenção dos J2 utilizados no ensaio de mortalidade preparou-se câmara de eclosão com papel *Kleenex* colocados em um béquer.

A partir de suspensão obtida dos J2 foram pescados 35 nematóides e colocou-se 80 µl dos filtrados e 20 µl da suspensão dos nematóides por cavidade da placa de Elisa. Cada tratamento foi constituído de quatro repetições, os antagonistas foram crescidos nos meios CzapekDox e BD. Em seguida, as placas foram mantidas fechadas com filme plástico e colocadas em estufa a 25°C, no escuro. A avaliação da mortalidade foi feita após 24 horas (Silva *et al.*, 2002).

No momento da avaliação, em cada cavidade da placa de Elisa foram adicionados 10 µL de Hidróxido de sódio (NaOH) 1M a 1% para melhor observação dos nematóides vivos, pois o contato com o NaOH faz com que estes movam-se (adaptação da metodologia proposta por Chen & Dickson (2000)), onde foram caracterizados como mortos os J2 cujos corpos permaneceram completamente distendidos durante 3 minutos após a adição de NaOH.

A partir da suspensão de ovos obtidos conforme metodologia de Hussey & Barker (1973) o teste de eclosão foi constituído de 35 ovos por cavidade da placa de Elisa, seguindo a mesma metodologia descrita para mortalidade de J2 e os mesmos tratamentos, metodologia adaptada de Silva *et al.*, (2002). No entanto, neste teste foi utilizado somente o meio CzapekDox, sendo a avaliação realizada no 14º dia.

3.6 Teste de parasitismo de *P. lilacinus* e *Trichoderma* spp. em ovos de *M. incognita*.

Os ovos de *M. incognita* foram extraídos manualmente a partir de massas de ovos retiradas de plantas de tomate contaminadas, e colocados em tubos de ensaio com solução de hipoclorito 0,5% e agitados manualmente por um minuto. A seguir, os ovos foram desinfestados com estreptomicina 1% e mercaptaetanol 0,1%, durante quatro minutos, lavados em água esterilizada e coletados com micropipetas esterilizadas.

Em lâminas de vidro previamente esterilizadas foram dispostos dois discos de ágar 1%, com diâmetro de 10 mm, contendo vinte ovos imaturos no disco da direita e vinte ovos maduros no da esquerda, conforme metodologia descrita por Carneiro & Gomes, 1993. As avaliações de parasitismo foram realizadas até o 15º dia. Foi avaliada a porcentagem de ovos imaturos (ovos em divisão celular) colonizados e mortos pelos

fungos; porcentagem de ovos maduros (embriões móveis) colonizados vivos e porcentagem de ovos maduro colonizados mortos (embriões imóveis).

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado composto por cinco repetições e sete tratamentos, cujos ovos foram inoculados com seis isolados.

3.7 Testes *in vivo*

3.7.1 Produção massal de *Trichoderma* spp. e *P. lilacinus*.

Para produção do inóculo foram utilizados sacos plásticos transparentes de 2 L, contendo 100 g de grãos de arroz parboilizado, com 50 mL de água destilada e previamente esterilizado em autoclave por 30 min a 120°C e 1 atm de pressão. Após, o substrato foi inoculado com 10 mL de uma suspensão de 10^7 esporos de *Trichoderma* spp. em 10mL de água destilada e esterilizada, e incubado em câmara de crescimento com temperatura de $26\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ por sete dias. Em seguida, o inóculo foi triturado até ser obtido um pó fino e homogêneo. Para uniformização da granulometria passou-se o inóculo por peneiras de 80 mesh. O mesmo procedimento foi feito para a obtenção do inóculo de *P. lilacinus*.

3.7.2 Biocontrole de plantas de feijão tratadas com *Trichoderma* spp. e *P. lilacinus* no controle de *M. incognita*.

O plantio e a inoculação das plantas foi realizado no dia 13 de dezembro de 2007 em casa de vegetação na Embrapa Clima Temperado. Foram testados quatro isolados de *Trichoderma* spp. (S11, 2T, 5T e 6T) aplicados isoladamente e em conjunto, constituindo uma mistura. O fungo *P. lilacinus*, além de aplicado isoladamente, foi misturado a cada isolado de *Trichoderma* spp. e também aplicado ao conjunto das

espécies de *Trichoderma*. Como controle utilizaram-se plantas com e sem nematóides, ambos grupos sem aplicação dos fungos.

O plantio da cultivar Engopa Ouro foi realizado em sacos plásticos com capacidade de 500 mL com solo autoclavado, cada tratamento foi composto de seis repetições, totalizando 13 tratamentos. Para os antagonistas aplicados isoladamente utilizou-se 4 g, aplicando 2 g de *Trichoderma* spp. e 2 g de *P. lilacinus*. O tratamento com a mistura de *Trichoderma* spp. foi composto por 1 g de cada isolado. Quando aplicados todos os isolados de *Trichoderma* spp. em conjunto com *P. lilacinus*, utilizou-se 0,5 g e 2 g, respectivamente. No controle utilizou-se somente água. Foi inoculado 10 mL com 3000 ovos/J2 por planta.

Diluições das amostras de solo foram realizadas para certificação da presença de fungos dos gêneros *Trichoderma* e *P. lilacinus*. Para as suspensões, foram pesados 10 g de solo de cada amostra e adicionados em frascos de vidro contendo 90 mL de água destilada e esterilizada, os quais foram agitados durante 1 min. Dessa suspensão, foram retirados 5 mL e acrescentados em frascos com 95 mL de água destilada e esterilizada. Após agitação, uma alíquota de 1 mL por placa⁻¹ foi espalhada em três placas de Petri contendo meio BDA. Antes do meio de cultura ser vertido nas placas com BDA, adicionou-se uma solução de cloranfenicol a 10% (5 mL L⁻¹). As placas foram incubadas em câmara climatizada a 28°C, com fotoperíodo de 12 h, durante três dias.

O peso da matéria fresca da parte aérea e da raiz foi obtido com a pesagem da planta imediatamente após a colheita, exatos 60 dias após o plantio, em balança digital com aproximação de três casas decimais. A seguir avaliou-se o número de galhas por sistema radicular e logo após procedeu-se a extração de ovos das raízes das plantas

(Hussey & Barker, 1973) para avaliar o fator de reprodução (FR = População final/População inicial) de *M. incognita*.

3.8 Análises estatísticas

Os valores médios foram analisados usando os programas estatísticos SPSS for Windows 16.0, SANEST e SAS 9.1. Os dados referentes ao número de galhas e FR (fator de reprodução) foram transformados $\sqrt{(X+1)}$ para a realização da análise de variância (ANOVA). Os dados obtidos na mortalidade de J2, na eclosão e no parasitismo foram transformados por $\arcsen \sqrt{x/100}$, e submetidos à ANOVA. Os resultados expressos em valores contínuos que seguiram a normalidade foram analisados por ANOVA, seguidos de pós teste de Tukey 5% ou Duncan 5% para comparação entre médias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação

As espécies das populações de *Trichoderma* spp. foram identificadas conforme as características morfológicas dos fungos crescidos em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e observadas em microscópio (aumento 400 e 1000 x). Sendo identificadas as seguintes espécies: S11 e 6T – *Trichoderma harzianum*, 2T – *Trichoderma pseudokonigii*, 5T – *Trichoderma viride*.

4.2 Competição *in vitro* entre *Trichoderma* spp., *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *P. lilacinus*

Com base no modo de ação de *Trichoderma* sp. e *P. lilacinus* utilizou-se os testes a seguir. Para selecionar os melhores isolados de *Trichoderma* spp. e *P. lilacinus* no biocontrole de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood foram utilizados os testes de competição direta em placa de Petri.

No teste de competição direto, identificou-se a inibição no crescimento micelial *in vitro* de *Trichoderma* spp. em confronto com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, avaliando-se a compatibilidade por espaço e nutrientes de *Trichoderma* spp. e *P. lilacinus*, constatou-se que todos os antagonistas cresceram sobre as colônias de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, sobrepondo a colônia do fitopatógeno e possivelmente parasitando-o (Figura 2), exceto o isolado 6T.

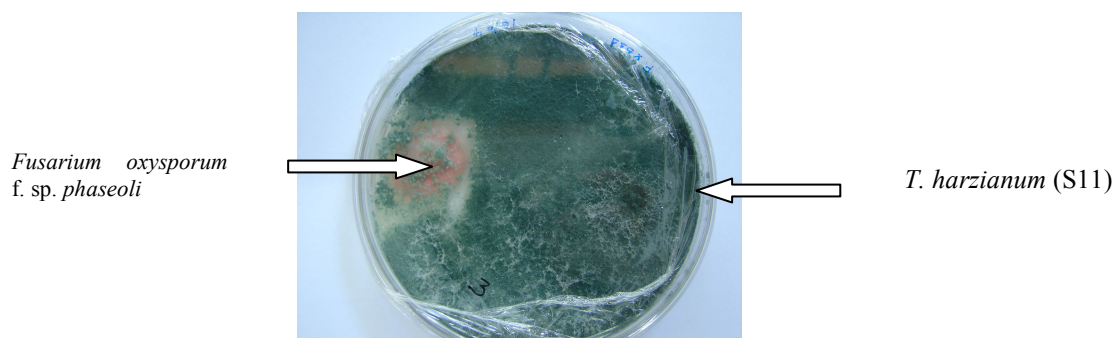


FIGURA 2. Colônias de *Trichoderma harzianum* (S11) em confronto direto com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Na avaliação do teste de antagonismo direto adotou-se a escala de Bell, (1982) a qual considera que os fungos com notas ≤ 2 apresentam potencial de antagonismo. As espécies *Trichoderma harzianum* (S11), *Trichoderma pseudokonnigii* (2T) e *Trichoderma viride* (5T) apresentaram nota 1 e *Trichoderma harzianum* (6T) apresentou nota 2, conforme Tabela 1.

Verificou-se que no teste de competição direta todos os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram rápido crescimento micelial, inibindo o crescimento de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

TABELA 1. Competição in vitro de *Trichoderma* spp. e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

| Isolados | Escala de notas segundo Bell* |
|--|-------------------------------|
| <i>Trichoderma harzianum</i> (S11) | 1 |
| <i>Trichoderma pseudokonnigii</i> (2T) | 1 |
| <i>Trichoderma viride</i> (5T) | 1 |
| <i>Trichoderma harzianum</i> (6T) | 2 |

* notas: 1 – antagonista cresce por toda a placa de Petri, 2 – antagonista cresce sobre 2/3 da placa, 3 – antagonista e patógeno crescem até a metade da placa, 4 – patógeno cresce sobre 2/3 da placa e 5 – patógeno cresce por toda a placa de Petri.

Os resultados deste bioensaio estão de acordo com os observados por Ethur *et al.* (2001), pois estes autores verificaram que os isolados de *Trichoderma* sp. cresceram sobre o patógeno, apresentando nota menor que 2 e indicando o potencial de

Trichoderma spp. em competir por espaço e nutrientes com o *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

O biocontrole de *Trichoderma* sp. dá-se pelos mecanismos de produção de antibióticos voláteis e não-voláteis; competição por espaço e nutrientes; e micoparasitismo, degradando a parede celular através da secreção de enzimas líticas (Spiegel & Chet 1998).

A potencialidade de antagonismo de *Trichoderma* sp. no controle de *Fusarium* sp. foi testada por Carvalho *et al.* (2008) com 10 isolados de *Trichoderma* sp., onde foi verificado que três destes foram capazes de colonizar pelo menos 66,66% da superfície do meio de cultura, inibindo fortemente o desenvolvimento de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. A capacidade de antagonismo de *Trichoderma* sp. também foi citada em trabalho realizado por Vaz *et al.* (2008), inibindo o crescimento micelial de *Fusarium solani* isolado em plantas de maracujá.

Estudos *in vivo* mostram que a presença de *T. harzianum* combinado com o fungo micorrízico *Glomus intraradices*, resultou no decréscimo da incidência e severidade da Murcha de Fusarium em raízes de tomate causadas por *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Spiegel & Chet 1998).

Em trabalho realizado por Corabi-Adell & Lucon (2002), os metabólitos produzidos por *Trichoderma* sp. foram capazes de produzir halos de inibição acima de 2 cm, sendo que o maior foi de 2,6 cm em ensaio de pareamento de culturas com *Pythium aphanidermatum*. A maioria dos antagonistas recebeu nota 1 na escala de Bell, crescendo vigorosamente sobre o patógeno. Em casa de vegetação, nove isolados reduziram até 75% o número de plantas de pepino mortas.

A influência do nematóide sobre a Murcha de Fusarium vem sendo relatada em inúmeras culturas, como feijão, algodão, tomate, fumo, ervilha, milho e bananeira (Tihohod, 2000).

Todos estes fatores indicam que um controle biológico mais eficiente pode ser obtido mediante a aplicação de microrganismos que atuem tanto no controle da população de *Fusarium* sp. quanto na população de nematóides.

A atividade de biocontrole pode ser aumentada quando combinados os agentes de biocontrole associados ao *Trichoderma* sp., como bactérias ou outros fungos benéficos. *Trichoderma* sp. produz uma variedade de metabólitos antifúngicos, incluindo antibióticos e enzimas que degradam a parede celular, diferentes daquelas produzidas por bactérias. A ação destes metabólitos combinada com a de bactérias benéficas pode expandir o espectro no controle de patógenos (Spiegel & Chet 1998).

Apesar dos resultados promissores no uso consorciado de microrganismos antagonistas, existem poucos estudos sobre o tema, especialmente com relação a *Trichoderma* sp. no controle de fitonematóides.

A ação de biocontrole de *Trichoderma* sp. associado a outros fungos ou bactérias antagonistas tem sido relatada, por exemplo Siddiqui & Saukat (2003) usaram *T. harzianum* e *Pseudomonas fluorescens* e verificaram a produção de compostos nematicidas a *M. javanica* em tomate, *in vitro* e em casa de vegetação.

Portanto, visando uma aplicação consorciada dos antagonistas, fez-se necessário testar a aplicação conjunta das espécies de *Trichoderma* e *P. lilacinus* “*in vitro*”. Utilizou-se teste de pareamento de culturas e notou-se que o crescimento de *P. lilacinus* não diferiu do controle, quando comparado com o seu crescimento micelial na presença dos isolados de *Trichoderma* spp. Já para o crescimento micelial dos isolados de

Trichoderma spp., os isolados *T. pseudokonigii* (2T) e *T. harzianum* (S11) apresentaram maior crescimento micelial quando comparados com os demais isolados de *Trichoderma* spp., no entanto, o isolado 2T destacou-se na presença de *P. lilacinus*, com maior crescimento micelial (Tabela 2). Os isolados de *Trichoderma* spp. não inibiram o crescimento micelial do fungo *P. lilacinus*.

Em estudo realizado *in vivo*, com *Pseudomonas fluorescens* aplicada sozinha ou combinada com *T. harzianum* Th6, estes se mostraram eficazes na redução da densidade populacional de *M. javanica* em raízes de tomate. Quando aplicado somente *T. harzianum*, este foi responsável pelo aumento na altura das plantas de tomate (Siddiqui & Saukat 2003).

TABELA 2. Crescimento micelial (cm) de isolados de *Trichoderma* spp. e *P. lilacinus*.

| Isolados | Crescimento micelial (cm)* |
|--|----------------------------|
| <i>T. pseudokonigii</i> (2T) | 2,39 a |
| <i>T. viride</i> (5T) | 2,32 b |
| <i>T. harzianum</i> (6T) | 2,32 b |
| <i>T. harzianum</i> (S11) | 2,46 a |
| <i>T. pseudokonigii</i> (2T) x <i>P. lilacinus</i> | 2,82 b |
| <i>T. viride</i> (5T) x <i>P. lilacinus</i> | 3,60 a |
| <i>T. harzianum</i> (6T) x <i>P. lilacinus</i> | 3,60 a |
| <i>T. harzianum</i> (S11) x <i>P. lilacinus</i> | 3,34 a |
| <i>P. lilacinus</i> | 0,43 a |
| <i>P. lilacinus</i> x <i>T. pseudokonigii</i> (2T) | 0,36 a |
| <i>P. lilacinus</i> x <i>T. viride</i> (5T) | 0,38 a |
| <i>P. lilacinus</i> x <i>T. harzianum</i> (6T) | 0,36 a |
| <i>P. lilacinus</i> x <i>T. pseudokonigii</i> (2T) | 0,36 a |
| <i>P. lilacinus</i> x <i>T. harzianum</i> (S11) | 0,28 a |

*Médias de cinco repetições. Letras iguais na mesma coluna não diferem pelo teste de Duncan (5%).

Martins-Corder & Melo (1998) realizaram diferentes testes de antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* sp. contra *Verticillium dahlie* (Kleb), e estes demonstraram ampla capacidade antagonista através da secreção de metabólitos tóxicos por *Trichoderma* sp.,

degradação das hifas hospedeiras e inibição do desenvolvimento de *V. dahlie*. Segundo os pesquisadores, os mecanismos de controle biológico podem ocorrer ao longo do processo de vida do antagonista, os quais se sobrepõem e prejudicam os competidores.

Nesta pesquisa, todos os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram rápido crescimento micelial no teste de competição. No entanto, no ensaio de metabólitos voláteis, somente *T. harzianum* (S11) reduziu o crescimento de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. As demais espécies de *Trichoderma* não diferiram estatisticamente, sendo o crescimento micelial do patógeno igual ao controle, conforme Tabela 3.

É importante o estudo de metabólitos voláteis, pois além de atuarem no biocontrole de patógenos de solo, como *Fusarium* sp., estes também poderão atuar na reação de quimiotropismo do nematóide, fazendo com que este não reconheça o hospedeiro (Silva *et al.*, 2002).

TABELA 3. Crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* na presença de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2006.

| Isolados | Diâmetro médio colônia de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> (cm)* |
|--|--|
| <i>Trichoderma harzianum</i> (S11) | 1,210 a |
| <i>Trichoderma harzianum</i> (6T) | 1,530 ab |
| <i>Trichoderma viride</i> 5T | 1,600 b |
| <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> | 1,602 b |
| <i>Trichoderma pseudokonigii</i> (2T) | 1,640 b |

Médias de 5 repetições. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Testes indicam que antibióticos voláteis de *Trichoderma* sp. reduziram o crescimento de *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*, fungo causador de podridões em maçã, onde observou-se a redução na porcentagem de 52,07 - 65,79% após 48 h e 52,85 - 68,71% após 72 horas. O nível de inibição aumentou com o acréscimo do tempo de incubação (Kexiang *et al.*, 2002).

Os fungos antagonistas com potencial de produção de metabólitos voláteis são importantes no desenvolvimento de novos métodos de controle de fitonematóides, pois estes compostos podem atuar interferindo nas respostas sensoriais dos nematóides, fator indispensável em algumas fases do ciclo de vida como a atração e a migração em direção ao hospedeiro (Silva *et al.*, 2002).

Segundo Junior (2000), metabólitos voláteis têm vantagens sobre aqueles não voláteis, como a capacidade de difusão em interstícios. A natureza volátil de certos antibióticos, como as pironas produzidas por *T. harzianum* e por *T. koningii*, confere uma vantagem distinta sobre inibidores não voláteis, já que sua ação pode atingir microrganismos fisicamente distantes do sítio de produção.

Segundo Stolf (2006), a maioria das cepas de *Trichoderma* sp. produzem metabólitos tóxicos voláteis e não voláteis que impedem a colonização por microrganismos antagonistas. Associados a estes metabólitos, podem ser produzidos outros componentes como ácido harzianico, antibióticos, 6-pentil- α -pirona, viridina, gliovirina, glisopreninas, ácido heptelidico, entre outros. Sendo assim, a grande gama de compostos produzidos permite que *Trichoderma* sp. exerça antagonismo mais eficiente abrangendo maior quantidade de espécies de fungos patogênicos e nematóides quando comparado a outros fungos utilizados em controle biológico.

4.3 Produção de sideróforos pelos fungos antagonistas

Os ensaios do presente trabalho revelaram que todos os isolados de *Trichoderma* spp. testados produziram sideróforos, entretanto não foram detectados sideróforos na cultura de *P. lilacinus* (Tabela 5). A capacidade de produção e utilização de sideróforos por agentes de biocontrole pode atuar pela indisponibilidade de nutrientes para outros microrganismos, inclusive fitopatógenos. Microrganismos com esta capacidade podem atuar indiretamente na biossíntese de outros compostos antimicrobianos com o aumento de elementos traço importantes (Duffy & Défago, 1999).

TABELA 4. Produção de sideróforos pelos fungos *Trichoderma* spp. e *P. lilacinus* pelo método CAS (cromoazurol –S), Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007.

| Isolados | Produção de sideróforos* |
|-------------------------------|--------------------------|
| Controle (BD) | - |
| <i>T. harzianum</i> (S11) | + |
| <i>T. pseudokoningii</i> (2T) | + |
| <i>T. viride</i> (5T) | + |
| <i>T. harzianum</i> (6T) | + |
| <i>Paecilomyces lilacinus</i> | - |

*Reação positiva = (+). Reação negativa = (-)

Em estudo realizado por Fedrizzi (2006) com isolados bacterianos; este obteve a não produção de sideróforos em 50% dos isolados estudados, fato este explicado devido a muitos microrganismos não expressarem os genes NRPS e PKS, o que pode ter ocorrido com o isolado *P. lilacinus*.

Sideróforos do tipo hidroxamato são comumente sintetizados por fungos (Paz, 2005; Wilhite *et al.*, 2001). A não produção de sideróforos pelo fungo *P. lilacinus* também pode estar relacionada à baixa produção de compostos quelantes em meio líquido. Em estudo realizado por Paz (2005), os fungos cresceram de forma diferente em meio sólido e líquido, sendo que no meio sólido este crescimento pode aumentar a excreção de sideróforos, como já observado em enzimas e outros metabólitos.

É importante a produção de sideróforos por microrganismos biocontroladores de patógenos, pois organismos que produzem este composto atuam por competição, prevenindo a proliferação de organismos deletérios bem como de fitopatógenos no ambiente rizosférico, sequestrando a maioria do Fe^{+3} disponível neste ambiente e facilitando desta forma o crescimento vegetal. Entretanto, este mecanismo é eficaz somente quando a disponibilidade de Fe^{+3} é muito baixa (Oliveira *et al.*, 2003). Os sideróforos podem atuar como promotores de crescimento e também como biocontroladores.

O complexo cromoazurol S- Fe^{3+} pode ser utilizado para detectar a produção de sideróforos, uma vez que o teste é baseado na troca competitiva por Fe^{3+} e as substâncias quelantes com afinidade pelo metal. Dessa forma, quelantes fortes como os sideróforos reagem em uma proporção de 1:1, enquanto os quelantes fracos necessitam estar presentes em excesso para a ligação com o ferro, que é indicado pela liberação do corante livre de ferro acompanhada de alteração da coloração do meio (Schwyn & Neilands, 1987) de azul para amarelo-avermelhado ou rosado, indicativo da produção de sideróforos (Cattelan, 1999), conforme Figura 4.

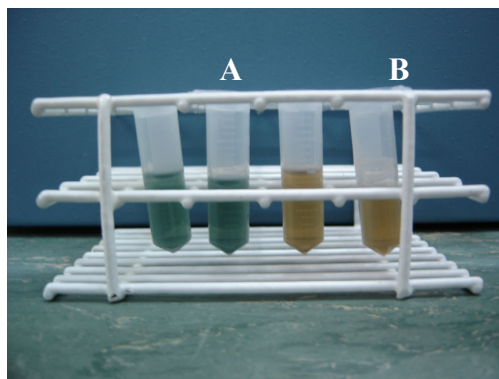


FIGURA 3. Detecção de sideróforo em sobrenadante de *T. harzianum* (6T) em solução CAS. A) Controle + BD; B) CAS + sobrenadante de *T. harzianum* (6T), Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007.

A produção de sideróforos por microrganismos é reconhecida como uma forma de competição por nutrientes. No entanto, ainda são escassos os trabalhos utilizando fungos antagonistas (Paz, 2005; Wilhite *et al.*, 2001).

4.4 Avaliação *in vivo*

4.4.1 Métodos de inoculação associados a *Meloidogyne incognita* na cultura do feijão.

Este teste foi realizado com o intuito de selecionar e avaliar as cultivares e o método de inoculação para posterior teste em casa de vegetação, foram utilizadas duas das cultivares que os produtores normalmente plantavam no período de estabelecimento deste ensaio (Cavalcanti *et al.*, 2002).

No entanto, no respectivo teste não foram observados sintomas na presença do fungo *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, o que pode ser explicado pela manipulação com repiques por longo período e pela preservação do fungo em geladeira. O gênero *Fusarium* apresenta variabilidade morfológica em cultura e pode sofrer mutações com

repetidos repiques em meios de cultura normalmente utilizados em laboratório (Meirelles *et al.*, 2006).

Segundo Bueno (2008) a repicagem periódica implica no fato de que muitos fungos podem adaptar-se ao crescimento saprofítico induzido pelo método, levando os mesmos a perderem a capacidade de esporular e a patogenicidade.

As cultivares de feijão Engopa Ouro e Carioca comportaram-se como suscetíveis, sendo que a cultivar Engopa Ouro apresentou maior número de galhas nas duas concentrações testadas com os nematóides (Tabela 4).

TABELA 5. Número médio de galhas em duas concentrações de nematóides nas cultivares de feijão Engopa Ouro e Carioca após inoculação de duas concentrações de ovos+J2, respectivamente; 1250 e 2500 com *M. incognita* em plantas aos 22 dias após a semeadura, com e sem corte das raízes, Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007.

| Cultivares | Carioca | | Engopa | |
|-------------------|----------------------------|---------|----------------------------|----------|
| | Concentrações de J2 e ovos | | Concentrações de J2 e ovos | |
| | 1250 | 2500 | 1250 | 2500 |
| Raízes com cortes | 43,63 B | 57,25 A | 178,75 A | 228,25 A |
| Raízes sem cortes | 92,50 A | 68,62 A | 81,88 B | 135,63 B |

Médias de cinco repetições. Letras distintas na mesma coluna diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Duncan

Nos testes de inoculação sem e com corte nas raízes na cultivar Carioca evidencia-se não haver diferença estatística pelo teste de Duncan (5%) na concentração de 2500 J2 e ovos, nesta cultivar, somente na concentração de 1250 as plantas sem corte apresentaram maior número de galhas.

A cultivar Engopa Ouro apresentou diferença estatística nos tratamentos, sendo que, quando as raízes desta cultivar foram cortadas observou-se maior número de galhas por sistema radicular.

Estes métodos de inoculação, sem e com corte, visaram simular e comparar os ferimentos causados por nematóides que facilitam a entrada do fungo *Fusarium* sp. na planta hospedeira. No entanto, notou-se que as raízes que foram cortadas da cultivar Engopa Ouro apresentaram diferença estatística neste tratamento, com o maior número de galhas por sistema radicular quando comparadas com raízes sem corte (Tabela 4). Esta forma de inoculação pode ter facilitado a entrada dos nematóides nas raízes, visto que a forma convencional de inoculação ocorre normalmente pela pressão mecânica do estilete do nematóide sobre a região meristemática do hospedeiro (Tihohod, 2000).

Em ambos os métodos de inoculação *M. incognita* foi patogênico às cultivares. Neste trabalho, a cultivar Engopa Ouro foi selecionada para os testes com os fungos propostos no controle do nematóide, por apresentar maior número de galhas por sistema radicular.

4.5 Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas como mecanismo de controle de *M. incognita*.

Outro possível mecanismo de biocontrole consiste na produção de enzimas como proteases, quitinases e lipases que atuam no parasitismo de nematóides (Park *et al.*, 2002).

4.5.1 Atividade quitinásica

Nota-se que todos os isolados de *Trichoderma* spp. nesta pesquisa apresentaram capacidade quitinolítica, mecanismo importante no parasitismo de ovos, assim como o

nematófago *P. lilacinus*. Este mecanismo pode ter sido o utilizado pelos isolados 6T e *P. lilacinus*, pois diminuíram o número de galhas e o fator de reprodução de *M. incognita* nos testes *in vivo*.

Segundo Graminha *et al.* (2001), muitos microrganismos apresentam atividades quitinolíticas. Sabe-se que a quitina constitui uma grande porção externa do ovo dos nematóides, portanto os fungos que produzem quitinases devem ser mais eficientes no parasitismo de ovos. Ainda segundo o mesmo autor, a pressão exercida na cutícula do ovo aliada à atividade enzimática causa ruptura e, subsequentemente, penetração do fungo.

O fungo nematófago *P. lilacinus* vem sendo estudado por sua capacidade de produzir quitinases. Este foi multiplicado em grãos de arroz e testado em vasos com adição de quitina em plantas de tomate infectadas com *M. arenaria*. Os resultados indicaram que a combinação com *P. lilacinus* e quitina foi efetiva no controle do nematóide testado (Culbreath *et al.*, 1986).

De Marco *et al.* (2003) avaliaram a produção de enzimas líticas de isolados de *Trichoderma* sp. com atividade antagonista ao fungo *Crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura de bruxa em plantas de cacau. Estes autores verificaram que para o controle do patógeno fúngico o máximo de atividade foi de 0,39 U, obtida após 72 h pelo isolado *T. harzianum*. No trabalho aqui descrito, *P. lilacinus* e 6T produziram 7,9-7,3 U, respectivamente; sendo o tempo de incubação de uma hora, tais resultados demonstram que estes organismos são potentes produtores de quitinases e possivelmente biocontroladores de nematóides (Figura 4). Os isolados S11, 5T e 2T apresentaram 2,6; 2,5 e 1,9U, respectivamente. Em estudo realizado por Dias *et al.* (2008) com *Penicillium* sp., 39 das 45 amostras analisadas obtiveram atividade de 10 U.

O fungo *P. lilacinus* apresenta capacidade de degradar a cutícula da parede de ovos de nematóides, que tem como principal componente a quitina. A população de nematóides foi reduzida drasticamente, ocorrendo penetração das hifas na cutícula e/ou atividade enzimática (Jatala, 1986). Fato também observado no presente trabalho durante a avaliação da atividade quitinásica, sendo que os isolados *P. lilacinus* e 6T apresentaram maior atividade na produção desta enzima.

Em pesquisa realizada por Sahebani & Hadavi (2008) no controle de *M. javanica* com a utilização de quitina coloidal, o máximo de atividade quitinásica pelo fungo *T. harzianum* foi de 1,15 U, sendo que os demais isolados apresentaram entre 0,1 e 1,2 U. Enquanto que no presente trabalho, *P. lilacinus* e 6T produziram 7,9-7,3 U, respectivamente, correspondendo aos resultados obtidos *in vivo*, já que estes isolados diminuíram significativamente o número de galhas de *M. incognita* e o fator de reprodução.

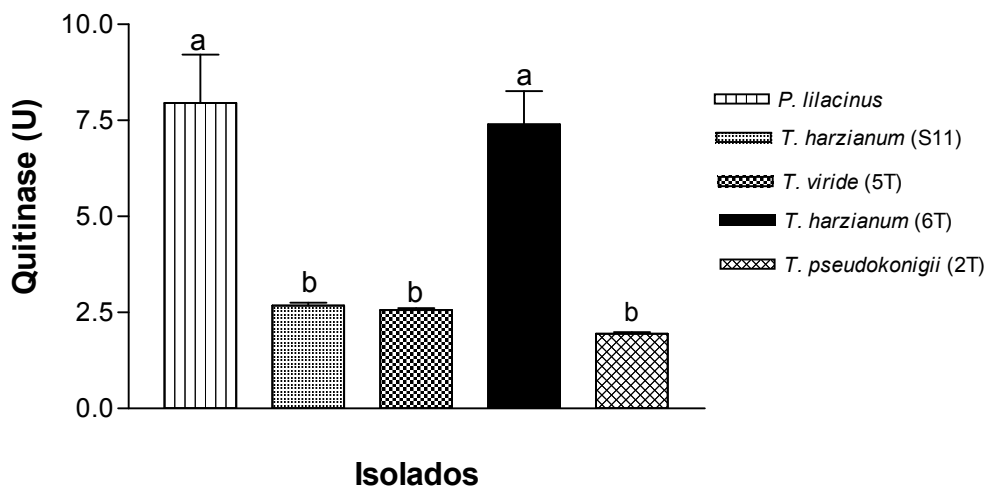


FIGURA 4. Atividade quitinásica de *Trichoderma* spp. e *P. lilacinus*. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Valores referentes à liberação de uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde à liberação de 1 μ mol de glicose/ml/min Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007.

4.5.2 Atividade glucanásica

A capacidade do fungo *Trichoderma* sp. de produzir enzimas líticas como β -1,3 glucanase é importante na lise de parede celular de fungos (Fleuri, 2005), a qual foi comprovada neste estudo, sendo que o isolado 6T e *P. lilacinus* foram os mais promissores por apresentarem alta produção da enzima 7,9-7,7 U, respectivamente (Figura 5). Estudo realizado por Okolo (2005) verificou que a alta produção de endoglucanase (6,4 UmL-1) por *Paecilomyces* sp. foi obtida após oito dias de incubação da cultura. Os isolados 2T, S11 e 2T apresentaram 3,7; 3,2 e 2,6U, respectivamente.

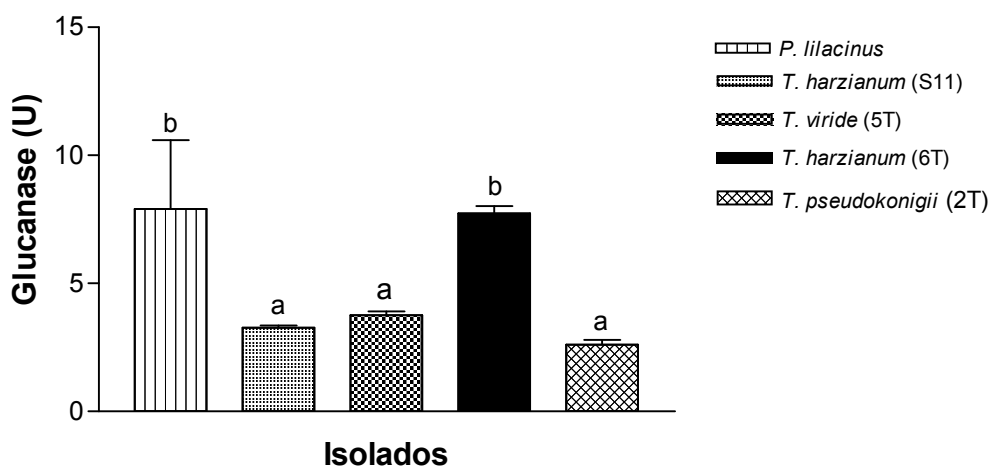


FIGURA 5. Atividade glucanásica de *Trichoderma* spp. e *P. lilacinus*. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Valores referentes à liberação de uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde à liberação de 1 μ mol de glicose/ml/min Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2007.

Os resultados obtidos com a atividade glucanásica dos fungos neste estudo demonstraram que o isolado *T. harzianum* (6T) foi o que obteve maior atividade glucanásica, contrastando com o resultado obtido no antagonismo direto, onde verificou-se que este isolado foi o menos agressivo, não sobrepondo *F. oxysporum* f. sp.

phaseoli. Este fato pode estar relacionado aos mecanismos de biocontrole das espécies de *Trichoderma*, visto que este isolado obteve um crescimento mais lento, competindo menos por espaço no teste do antagonismo direto, no entanto apresentou maior capacidade de produção de enzimas líticas como glucanase, protease e quitinase.

O micoparasitismo de *Trichoderma* sp. é um processo complexo, no qual enzimas líticas secretadas pelo fungos, como proteinases, quitinases e β -1,3 glucanases, estão envolvidas no processo de penetração na parede celular do hospedeiro (Spiegel & Chet, 1998).

Observou-se que o isolado *P. lilacinus* produziu glucanases, igualando-se ao isolado 6T, apesar de não existirem relatos na literatura de *P. lilacinus* como parasita de fungos. No entanto, sendo os glucanos o principal constituinte da parede de fungos, este fungo deve ser melhor investigado como um possível antagonista de fungos fitopatogênicos.

4.5.3 Atividade lipolítica

A produção de lipase por fungos antagonistas pode influenciar na fase de larva dos nematóides, atuando em sua reserva energética e assim dificultando o parasitismo. Neste estudo visualmente somente *P. lilacinus* produziu lipase (Tabela 6). A ausência de halos de degradação nos isolados de *Trichoderma* spp. pode estar relacionada a permanência de grande parte das enzimas extracelulares, presas externamente na parede celular fúngica após secreção (Barbosa *et al.*, 2001).

No entanto, os isolados de *Trichoderma* spp. cresceram no meio específico para lipase, sendo o Tween 20 a única fonte de carbono do meio. Portanto, sugere-se que este antagonista também apresenta capacidade de degradar os ácidos graxos contidos neste meio. Em trabalho realizado com microrganismos endofíticos em plantas de cacau

utilizando *T. viride* no controle de *Crinipellis pernicioso*, este antagonista não apresentou halo de degradação no meio, onde havia somente quitina como fonte de carbono. No entanto, sugeriu-se que a atividade quitinolítica deve-se ao crescimento do antagonista no meio específico (Paz, 2005).

TABELA 6. Atividade lipolítica de *Trichoderma* spp. e *P. lilacinus* em meio sólido, Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008.

| Isolados | Atividade lipolítica* |
|-------------------------------|-----------------------|
| Controle (BD) | - |
| <i>T. harzianum</i> (S11) | - |
| <i>T. pseudokoningii</i> (2T) | - |
| <i>T. viride</i> (5T) | - |
| <i>T. harzianum</i> (6T) | - |
| <i>Paecilomyces lilacinus</i> | + |

*Reação positiva = (+). Reação negativa = (-)

Trabalhos abordam a dinâmica entre diferentes concentrações de inóculo de *Pausteria penetrans*, uma bactéria patogênica a nematóides, e a taxa de infecção do nematóide na planta hospedeira. Porém, a correlação entre o nível lipídico do J2 com o sucesso no parasitismo e na reprodução do antagonista ainda não foi estudada (Rocha, 2007). Outra hipótese sugerida por este autor é de que os ovos de nematóides sofrem lise devido à produção de várias enzimas (lipolítica, proteolítica e quitinolítica) pela bactéria, pois quando os ovos foram tratados com quitinases observou-se que não houve eclosão dos mesmos, permitindo afirmar que mudanças na permeabilidade podem ocorrer sem mudanças drásticas na forma do ovo.

A atividade lipolítica pelos microrganismos descrita nesta pesquisa pode ser considerada um mecanismo de biocontrole de J2, atuando na reserva energética do nematóide e dificultando desta forma sua infectividade.

Portanto, a atividade lipolítica dos fungos antagonistas é importante nas fases iniciais de desenvolvimento e no parasitismo de J2, atuando nos lipídios de sua membrana. Estudos apontam que o parasitismo mais eficiente ocorre nas fases iniciais de formação dos nematóides, devido à ausência da cutícula, que pode servir como uma barreira (Rocha, 2007).

4.5.4 Atividade proteásica

Os isolados de *Trichoderma* sp. (1051 e TVC) secretaram em torno de 1,41 U de atividade proteolítica após 72 horas de crescimento (De Marco *et al.*, 2003). No presente trabalho, a maior capacidade de atividade proteásica foi obtida no isolado de *T. harzianum* (6T) com 1,4 U (Figura 6). Os demais apresentaram capacidade abaixo de 0,3 U.

De acordo com Suarez *et al.* (2004), o principal papel no micoparasitismo tem sido atribuído às quitinases e às glucanases. Entretanto, as proteases dos fungos devem estar significativamente envolvidas na atividade antagonista, não somente no desarranjo da parede celular do hospedeiro (composto por polímeros de quitina e glucanos, entremeados por proteínas), mas também por agir como inativadores proteolíticos das enzimas dos patógenos envolvidos no processo de infecção nas plantas. Sendo que no presente estudo o isolado 6T obteve 1,5 U, destacando-se dos demais que apresentaram índices abaixo de 0,3U.

De acordo com Ethur (2006), embora o isolado T-35 de *T. harzianum* tenha produzido β -1,3 glucanases e quitinases, ocorrendo o micoparasitismo de *Rhizoctonia solani* e *Pythium aphanidermatum*, não apresentou a mesma ação sobre *F. oxysporum*, sendo que a interferência deveria estar nas proteínas da parede celular do patógeno que devem ter interferido na ação das enzimas, aumentando sua resistência à lise.

A produção de proteases por fungos do gênero *Trichoderma* vem sendo estudada no processo de micoparasitismo, no entanto, esta enzima também é importante no mecanismo de parasitismo de nematóides, pois a matriz gelatinosa que envolve ovos de *Meloidogyne* sp. é glicoproteica.

Em estudo realizado por Sharon *et al.* (2007) com massas de ovos, ovos e J2 obtidos de massas de ovos de plantas de tomate, expostos a diferentes isolados de *Trichoderma* spp., os conídios dos fungos *T. atroviride* e *T. asperellum* aderiram-se ao redor da matriz gelatinosa da massa de ovos, e hifas penetraram parasitando ovos e J2.

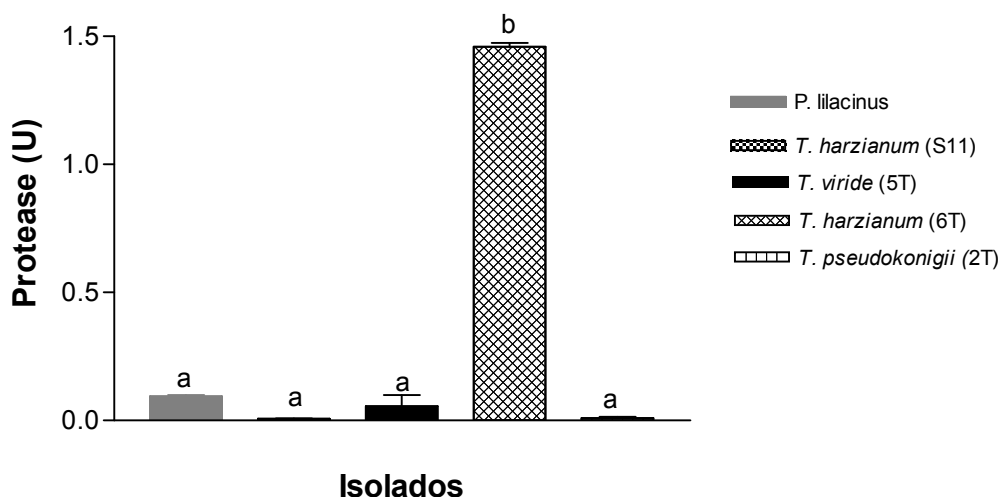


FIGURA 6. Atividade proteásica produzida por *Trichoderma* spp. e *P. lilacinus*. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Valores referentes à, uma unidade da atividade proteásica (U) é definida como sendo a quantidade de enzima requerida para produzir uma absorbância de 1 unidade em 30 min. a 25° C, num $\lambda = 440$ nm. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2006.

De acordo com Sharon *et al.* (2001), o fungo *Trichoderma* sp. (WT) apresenta habilidade de parasitar ovos e J2 de *M. javanica* em ensaio *in vitro*, e o mutante (P-2) apresentou capacidade de colonizar a massa de ovos. Ainda segundo os mesmos autores, a atividade proteolítica imobilizou a infecção de J2. Entretanto, a imobilização

de J2 e a atividade proteolítica de P-2 e WT foram mais altas que as obtidas pelo isolado de *Trichoderma* sp. (T-203).

Em trabalho realizado por Sousa *et al.* (2006), os autores verificaram que todos os isolados de estreptomicetos testados produziram a enzima lipase e, com exceção do isolado *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* (AC-92), apresentaram capacidade de produção de quitinase. Miller & Sands (1977), ao testar os efeitos *in vitro* das enzimas protease, lipase e quitinase sobre *Tylenchorhynchus dubius*, observaram que, depois de 24 horas, houve modificações estruturais na cutícula do nematóide, devido à provável degradação enzimática.

Neste trabalho todos os antagonistas selecionados foram capazes de produzir as enzimas lipases, proteases e quitinases importantes no parasitismo dos nematóides, com destaque para o isolado *T. harzianum* (6T). Estes dados estão de acordo com os obtidos em casa de vegetação, sendo que este isolado foi capaz de diminuir o número de galhas em plantas de feijão. O isolado *T. pseudokonigii* (2T), apesar de apresentar controle no número de galhas e no fator de reprodução, *in vivo*, não obteve índices elevados na produção de enzimas líticas. No entanto, esta diferença pode estar relacionada por se tratarem de espécies diferentes de *Trichoderma*. Os resultados em casa de vegetação serão apresentados e discutidos posteriormente.

4.6 Ação dos filtrados de fungos antagonistas na mortalidade de *M. incognita* e na eclosão de juvenis de segundo estágio de *M. incognita* *in vitro*

No presente trabalho, os filtrados fúngicos apresentaram de 100-12,67% de mortalidade de J2 e 44,28-12,85% na eclosão. Estas diferenças entre os isolados de

Trichoderma spp. se devem possivelmente à produção de diferentes metabólitos por parte dos fungos (Tabela 7).

TABELA 7. Efeito de filtrados de culturas fúngicas nos meios Czapek Dox e BD (batata-dextrose) estes sem crescimento fúngico e água, na mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita*, após 24 h com NaOH e na eclosão, após 14 dias, Embrapa Clima Temperado, 2007.

| Tratamentos | Filtrados fúngicos J2 mortos (%)* | | Eclosão (%) |
|-------------------------------|-----------------------------------|--------------|-------------|
| | CzapekDox | BD | CzapekDox |
| <i>Paecilomyces lilacinus</i> | 100 a A | 88,47 abc AB | 65,71 cd |
| <i>T. harzianum</i> (6T) | 100 a A | 95,08 ab AB | 12,85 a |
| <i>T. viride</i> (5T) | 92,53 ab AB | 86,26 abc AB | 37,85 ab |
| <i>T. harzianum</i> (S11) | 12,67 bc B | 42,59 abc AB | 44,28 bc |
| <i>T. pseudokonigii</i> (2T) | 35,60 abc AB | 14,72 bc B | 29,99 ab |
| Meio sem crescimento fúngico | 7,31 c B | 13,07 bc B | 82,85 d |
| Água destilada (controle) | 30,18 bc AB | 30,18 bc AB | 89,28 d |

* Médias de quatro repetições. Medidas seguidas por letras minúscula distintas na mesma coluna e maiúscula na mesma linha, diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

A Tabela 7 demonstra o efeito dos filtrados de culturas fúngicas na mortalidade de J2 de *M. incognita*, nos meios Czapek Dox e BD e na eclosão no meio Czapek Dox. Não houve diferença estatística dos tratamentos em relação aos meios líquidos utilizados para avaliar o efeito nematicida sobre juvenis de segundo estágio do nematóide.

De acordo com a Tabela 7 verifica-se que houve mortalidade dos J2 quando em contato com os filtrados de *Trichoderma* spp. No entanto, faz-se necessário novos testes no intuito de testar outros meios líquidos para o crescimento dos fungos, visto que o meio BD não é utilizado em testes de mortalidade com filtrados fúngicos, mas este não diferiu estatisticamente do meio Czapek Dox, normalmente utilizado. O meio batata

dextrose apresenta a vantagem de ser um meio de cultura, mais prático, pois requer poucos componentes.

No teste com filtrados fúngicos notou-se que *P. lilacinus*, 6T e 5T apresentaram mortalidade de 100-92% no controle de J2 de *M. incognita* no meio Czapek Dox, portanto apresentando potencial no controle do nematóide. Estes dados estão de acordo com Spiegel & Chet (1998), que testaram filtrados de *T. lignorum* no controle de *M. javanica*, obtendo de 25-80% de J2 não móveis em ensaios *in vitro*, e quando as plantas de tomate foram tratadas com *Trichoderma* sp. houve redução do número de galhas e número de ovos. No entanto, ainda são poucos os estudos com filtrados de *Trichoderma* sp. no controle de nematóides.

Em estudo realizado por Costa *et al.* (2001) com filtrados de *P. lilacinus*, *F. moniliforme* e *F. oxysporum*, houve redução na eclosão de *M. incognita*, sendo que o primeiro obteve 40-13% de eclosão e aumento na mortalidade de J2 de *M. incognita* de forma semelhante à observada com o nematicida Aldicarbe, com 90%. No caso específico de *P. lilacinus*, os autores observaram que este respondeu com mortalidade de J2 de 100%.

Os resultados obtidos na mortalidade de J2, pelos filtrados fúngicos mais promissores na presente pesquisa foram: *P. lilacinus*, *T. harzianum* (6T) e *T. viride* (5T), com 100-92,53%, respectivamente. Exceto o último isolado, os demais responderam ao ataque, controlando os nematóides em casa de vegetação na cv. Engopa Ouro. Estes dados estão de acordo com os citados por Sousa *et al.* (2006), que selecionam filtrados de culturas bacterianas e observaram que *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* proporcionou 98,2% de mortalidade dos J2, quando comparado aos

27,3% observados no controle, e destacaram este isolado como o mais eficiente no controle de *M. incognita in vitro*.

No teste de eclosão o filtrado de *T. harzianum* (6T) sobressaiu aos demais, permitindo que somente 12,85% dos J2 eclodissem. Estes dados estão de acordo com os obtidos por Costa *et al.* (2001), que obteve nos filtrados mais promissores de *Fusarium moniliforme*, 10,9 e 12% de eclosão de J2, sendo comparados ao resultado obtido pelo nematicida Aldicarbe, com 14%. No presente trabalho, o isolado de *P. lilacinus* permitiu a eclosão de 65,71% de J2, enquanto que no trabalho realizado por Costa *et al.*(2001) 40-43% dos J2 de J2 eclodiram.

O teste com filtrados fúngicos na mortalidade de J2 sugere que os isolados *T. harzianum* (6T), *T. viride* (5T) e *P. lilacinus* possuem moléculas com ação nematicida, apresentando toxidez à *M. incognita*. O isolado *T. pseudokonigii* (2T) apresentou capacidade de controlar *M. incognita* em casa de vegetação, no entanto os filtrados fúngicos deste isolado apresentaram resultados insatisfatórios na mortalidade de J2. Sugere-se que fungos predadores de nematóides as estruturas de captura como hifas adesivas tenham maior importância do que a produção de metabólitos tóxicos no controle dos nematóides, conforme observado por Costa *et al.*, (2001).

No presente estudo não foram utilizadas diluições dos filtrados, pois Costa *et al.* (2001) verificaram que houve queda na porcentagem de J2 de *M. incognita* mortos, passando de aproximadamente 95% para 30%, quando o filtrado do fungo *P. lilacinus* passou da diluição de 1:2 para 1:3 (filtrado:água).

4.7 Teste de virulência de *Trichoderma* spp. e *P. lilacinus*, *in vitro* à *M. incognita*.

Este ensaio demonstrou a capacidade das espécies de *Trichoderma* spp. e *P. lilacinus*, em colonizar ovos maduros e ovos imaturos de *M. incognita* (Figura 7).

Os ovos imaturos foram mais sensíveis à colonização pelos fungos do que os ovos contendo embriões móveis (Figura 7). Essas observações também foram realizadas por Carneiro & Gomes (1993), que demonstraram que ovos completamente desenvolvidos eram mais resistentes à colonização por *P. lilacinus* do que os ovos em estádios embrionários iniciais, especialmente aqueles contendo formas juvenis de primeiro e segundo estádios.

Westcott & Kluepfel (1993) relatam maior sensibilidade nos estádios iniciais de desenvolvimento do nematóide, estes autores verificaram que não houve efeito nematicida sobre juvenis de segundo estágio (J2) e adultos de *Mesocriconema xenoplax* Raski (Loof and de Grisse). Estes autores justificam o menor parasitismo em ovos maduros devido à presença da cutícula nestas últimas fases, o que pode ter formado uma barreira, impedindo a morte do nematóide. Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os obtidos por Westcott & Kluepfel (1993) visto que, houve maior adesão de hifas em ovos imaturos tratados com os isolados 6T e 2T apresentando 34 e 35% de ovos parasitados, respectivamente. Os demais isolados apresentaram parasitismo inferior a 30% (Figura 7).

Entre os isolados avaliados nesta pesquisa, observou-se que somente o isolado 2T diferiu no parasitismo de ovos maduros vivos com 48%. Os demais isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram baixa porcentagem de colonização de *M. incognita*, chegando ao máximo de 13% pelo isolado S11. A baixa porcentagem de parasitismo

dos isolados de *Trichoderma* spp. pode ter sido devido à capacidade deste fungo em formar hifas modificadas, “armadilhas”, atuando, preferencialmente, na fase de J2 (Figura 10), no entanto, não foi possível quantificar a taxa de captura de J2 pelas hifas de *Trichoderma* spp., devido ao rápido crescimento micelial do antagonista, demonstrada na Figura 8.

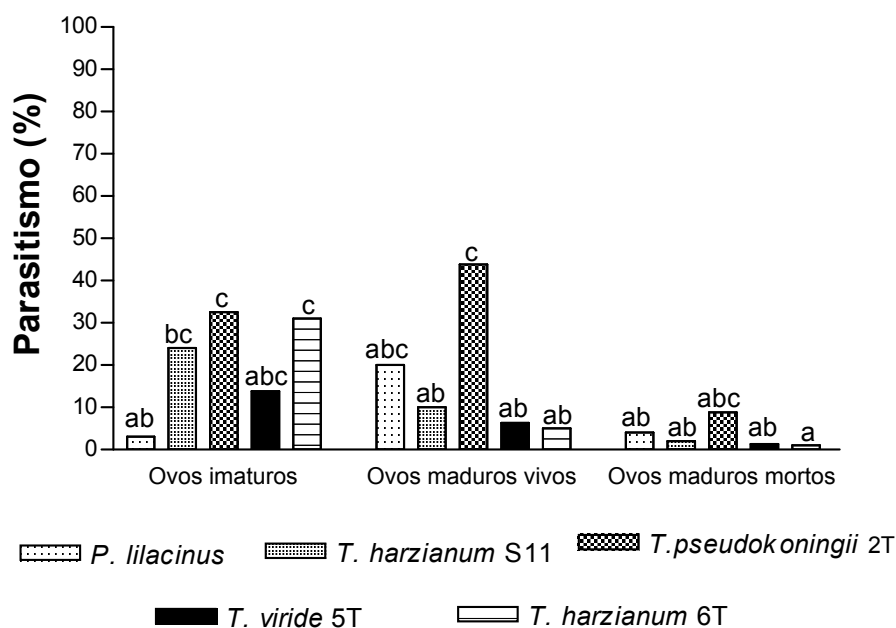


FIGURA 7. Eficiência de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. e um de *P. lilacinus* quanto à capacidade de colonização *in vitro* de ovos de *M. incognita*. Barras seguidas de letras iguais, não diferem pelo teste Tukey (5%), Embrapa Clima Temperado, 2008.

Em relação ao *P. lilacinus*, este mostrou-se patogênico, somente a ovos maduros vivos, no entanto a colonização ocorreu apenas externamente e não houve formação de conidióforos neste tratamento. O isolado *P. lilacinus*, houve emissão de conidióforos em ovos com embriões imóveis e imaturos, indicando uma capacidade diferencial correspondente ao estágio de desenvolvimento do embrião pelos antagonistas. Observações semelhantes foram feitas por Carneiro & Gomes (1993) com isolados de

P. lilacinus em ovos de *M. javanica*. Estes autores observaram que houve emissão de alguns conidióforos a partir da membrana de revestimento dos ovos maduros imóveis e imaturos, não ocorrendo quando estes continham juvenis vivos, indicando uma colonização externa. Estes autores obtiveram um parasitismo de 60% em ovos maduros e de 100% em ovos imaturos.

Em estudo realizado por Cadioli *et al.*, (2007) o crescimento micelial dos isolados de *P. lilacinus* teve grande dependência da temperatura de incubação a que foram submetidos, sendo mais rápido à temperatura de 22,5°C. Os isolados de *P. lilacinus* testados por estes autores revelaram habilidade em infectar ovos de *M. paranaensis* em meio BDA, principalmente à temperatura de 25°C.

Em estudo realizado por Maia *et al.*, (2001) com o fungo nematófago *Monacrosporium robustum*, foi observado que este fungo foi capaz de parasitar 100% dos ovos dos juvenis de segundo estágio de *H. glycines* e formas ativas de *Panagrellus* sp., no período de 72 h de exposição desses nematóides ao fungo.

Existem poucos estudos de seleção de isolados de *Trichoderma* sp. “*in vitro*” para o controle de nematóides sendo estes testes preliminares são essenciais, pois permitem detectar diferenças importantes quanto a atuação dos isolados e o estágio de desenvolvimento em que atuam os fungos antagonistas. O teste realizado nesta pesquisa e descrito nesta seção foi adaptado do realizado com o fungo nematófago *P. lilacinus*.

O potencial de parasitismo em ágar-água destes fungos não representa as condições encontradas no solo, com seu complexo habitat, pois testes *in vitro* estão restritos a condições controladas de temperatura, umidade e nutrientes. O teste realizado difere das condições naturais, onde os ovos estão envolvidos por uma matriz glicoprotéica que, em geral, facilita a ação dos fungos.

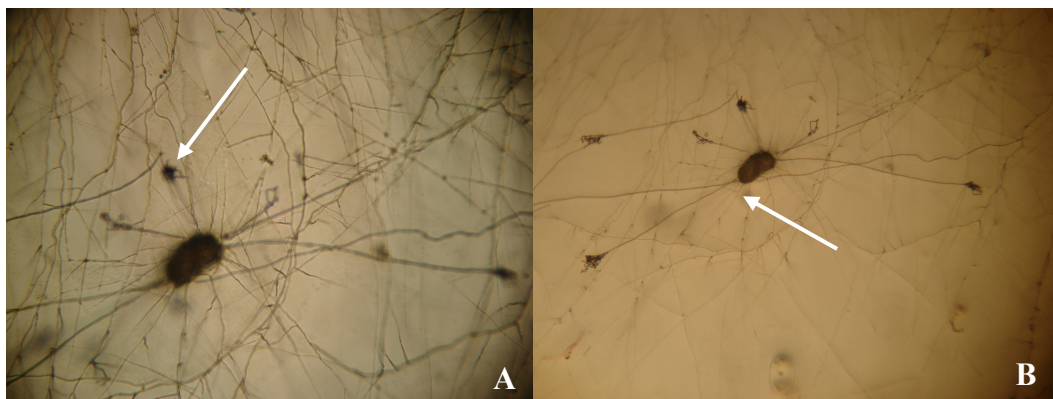


FIGURA 8. Fotomicrografia (A e B) de ovo com embrião imóvel de *M. incognita* colonizado por *P. lilacinus*, com emissão de conidióforos (40x), Embrapa Clima Temperado, 2008.

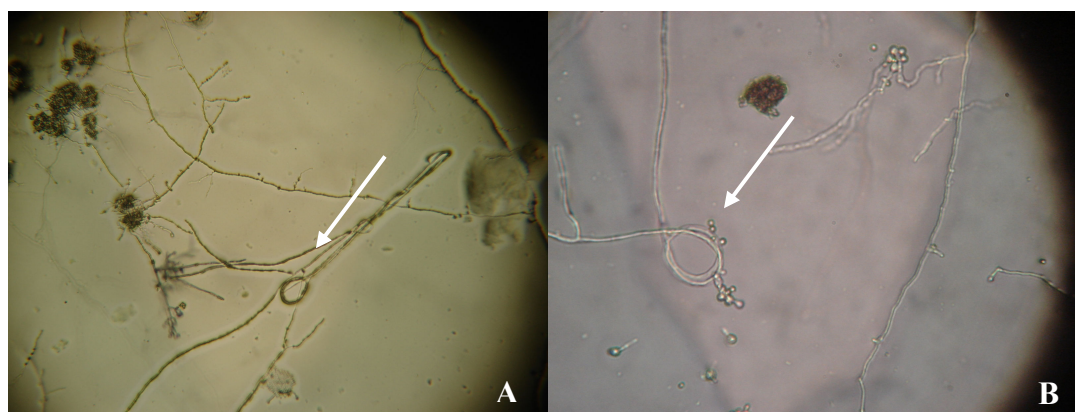


FIGURA 9. Fotomicrografia (A e B) *Trichoderma harzianum* (S11) com hifas em forma de “armadilhas”, Embrapa Clima Temperado, 2008.

Nesta pesquisa notou-se que em todos os tratamentos usando os isolados de *Trichoderma* spp. houve enrolamento de hifas nos ovos maduros e imaturos e adesão dos conídios. Estes dados estão de acordo com o trabalho realizado por Sharon *et al.*, (2007), que demonstrou a adesão de conídios e parasitismo de *Trichoderma* spp. na matriz gelatinosa e J2 de *M. javanica*, sendo os mesmos imprescindíveis na adesão do conídio. O estudo realizado por estes autores serviu para comprovar a importância da matriz gelatinosa no parasitismo de fungos nematófagos. Este autor expôs juvenis, ovos e a matriz, e demonstrou a adesão dos conídios de *T. atroviride* e *T. asperellum* e a

capacidade de parasitismo destes fungos foi similar quando expostos a matriz de ovos e a presença de J2; as hifas penetraram parasitando todos os substratos testados, indicando que estes podem ser utilizados pelos fungos como única fonte de nutriente.

Estudos apontam para a importância da matriz gelatinosa, buscando a identificação de proteínas com propriedades antimicrobianas e que atuem contra dessecação, além de detectar sequências específicas e essenciais da matriz a serem utilizadas como alvo em estratégias para controle da meloidoginose (Costa *et al.*, 2007).

Observou-se em microscópio óptico (40x) e notou-se o enrolamento das hifas de *Trichoderma* (2T) nos J2 (Figura 9) e a formação de “armadilhas” (Figura 10), mas não foi possível quantificar o parasitismo, devido ao rápido crescimento das hifas. O isolado de *T. pseudokonigii* (2T) produziu lipases que podem estar degradando os lipídios de membrana dos J2 utilizando este mecanismo no parasitismo.

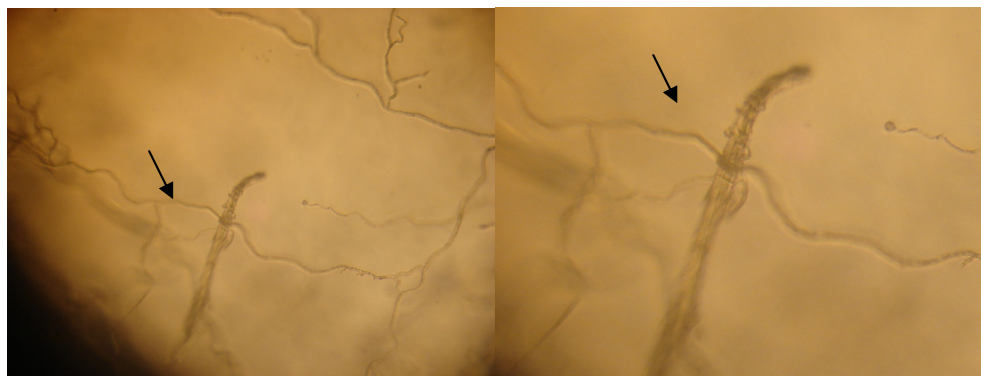


FIGURA 10. Hifas de *Trichoderma pseudokonigii* (2T) em meio AA (1%) mantidas em Placa de Petri com papel filtro, formando armadilhas para *M. incognita*, Embrapa Clima Temperado, 2008.

Jatala (1986) mencionou que muitos dos organismos que primariamente parasitam um certo estágio de desenvolvimento de um nematóide podem, ocasionalmente, parasitar outros estádios. Todavia, a habilidade de determinado fungo

em infectar vários estádios de desenvolvimento do nematóide, ao mesmo tempo ou com a mesma frequência, não é comum. Fato este observado nesta pesquisa, sendo que, os isolados de *Trichoderma* spp. colonizaram ovos imaturos e formaram hifas modificadas que atuaram no parasitismo dos J2.

4.8 Potencial dos fungos *Trichoderma* spp. e *P. lilacinus* no biocontrole de *M. incognita* na cultura do feijão.

Os tratamentos compostos pelos isolados S11 + *P. lilacinus* e S11 não foram passíveis de avaliação. Notou-se uma interação negativa quando inoculado *T. harzianum* (S11) em sementes de feijão, possivelmente devido à produção de metabólitos tóxicos a semente ou à competição por nutrientes com a plântula, fato este ainda não descrito na literatura. Este resultado mostra a importância de bioensaios na seleção de agentes de biocontrole, visto que o isolado S11 foi o mais promissor na inibição de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* *in vitro* e o mesmo mostrou ação negativa na germinação de sementes de feijão.

É conveniente distinguir entre os metabólitos voláteis obtidos em condições controladas e aqueles *in vivo*. Os resultados *in vitro* indicam apenas capacidade potencial dos microrganismos em função do balanço entre a produção e a sensibilidade dos microrganismos envolvidos. Assim, os dados obtidos nesta pesquisa podem estar indicando apenas a capacidade destes antagonistas de produzirem metabólitos. No teste em casa de vegetação o isolado S11 pode ter apresentado maior concentração de metabólitos *in vivo*, sendo estes tóxicos às plântulas de feijão.

O peso médio das raízes das plantas de feijão variou nos diferentes tratamentos (Tabela 8), sendo observado o maior percentual no *P. lilacinus* 26,36g, seguido por 5T

23,34g e 6T + *P. lilacinus* 19,51g; apenas o primeiro citado diferiu do controle, somente com *M. incognita*. Estes aumentos indicam que a redução da população de nematóides nas raízes de feijão ocorreu devido ao tratamento com os fungos, favorecendo o desenvolvimento da planta.

No presente trabalho não foi observado relação entre os tratamentos com *P. lilacinus* e o crescimento das plantas de feijão. Diaz *et al.* (1995) não observaram aumento significativo no peso seco da parte aérea de plantas de tomate inoculadas com *M. incognita* e com o fungo antagonista *Arthrobotrys* sp., quando comparados com aqueles inoculados apenas com o nematóide, mesmo encontrando reduções significativas da população do mesmo. Segundo Santiago (2006), nem sempre ocorrem aumento na produção de plantas inoculadas com *P. lilacinus* e infestadas por nematóides.

Os isolados 5T, 6T + *P. lilacinus* e *P. lilacinus* apresentaram maior peso fresco da parte aérea, no entanto não diferiram do controle, apresentando diferenças somente com *M. incognita*. Inúmeros trabalhos apontam para a capacidade do *Trichoderma* sp. como promotor de crescimento (Resende *et al.*, 2004; Fortes *et al.*, 2007; Harman, 2000). Contudo, os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que nenhum dos isolados de *Trichoderma* spp. promoveu o aumento das plantas de feijão. Estes dados estão de acordo com os observados por Santos *et al.* (2008), que verificaram que isolados de *Trichoderma* sp. não promoveram o crescimento de plantas de feijão cv. Talismã. Em relação ao *P. lilacinus*, os resultados aqui descritos discordam dos obtidos por Santiago (2006), que observou aumentos de 31,57%, 29,12% e 18,15%, no peso fresco da parte aérea quando tratadas com isolados de *P. lilacinus* no controle de *M. paranaensis*.

TABELA 8. Peso fresco de raízes e parte aérea de feijão, cv. Engopa Ouro com *Trichoderma* spp. (Mistura), *P. lilacinus* e *M. incognita* em casa de vegetação, Embrapa Clima Temperado, 2007.

| Tratamentos | Peso fresco da parte aérea (g)* | Peso fresco da raiz (g)* |
|--|---------------------------------|--------------------------|
| <i>T. pseudokonigii</i> (2T) | 12,35 a | 25,92 ab |
| Controle (água) | 13,17 ab | 20,99 a |
| <i>M. incognita</i> | 15,42 ab | 31,75 ab |
| Mistura | 15,50 ab | 36,54 ab |
| Mistura + <i>P. lilacinus</i> | 15,95 ab | 34,63 ab |
| <i>T. harzianum</i> (6T) | 16,12 ab | 32,73 ab |
| <i>T. viride</i> (5T) + <i>P. lilacinus</i> | 16,39 ab | 37,80 ab |
| <i>T. pseudokonigii</i> (2T) + <i>P. lilacinus</i> | 19,05 ab | 37,65 ab |
| <i>T. harzianum</i> (6T) + <i>P. lilacinus</i> | 19,51 ab | 39,40 b |
| <i>T. viride</i> (5T) | 23,34 bc | 42,80 b |
| <i>P. lilacinus</i> | 26,36 c | 38,32 b |

* Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de separação de médias Duncan.

No ensaio em casa de vegetação os isolados 6T, 2T e *P. lilacinus* sobressaíram-se dos demais no controle de *M. incognita*, igualando-se ao controle sem inoculação. Estes resultados podem ser relacionados aos observados nos ensaios *in vitro*, onde o isolado *T. harzianum* (6T) apresentou maior atividade quitinolítica e proteásica e o *T. pseudokonigii* (2T) atuou no parasitismo de ovos imaturos, sugerindo que as espécies de *Trichoderma* atuam em estágios e de formas diferentes no controle dos nematóides.

A maior atividade quitinolítica dos isolados 6T e *P. lilacinus* estão de acordo com os dados obtidos *in vivo*, pois estes isolados foram responsáveis pelo menor número de galhas e fator de reprodução de *M. incognita*. Os dados observados nesta

pesquisa estão de acordo com os citados na literatura que demonstram que *P. lilacinus* apresenta capacidade na redução da população de nematóides (Culbreath *et al.*, 1986; Jatala, 1986).

O *T. harzianum* (6T) parece não atuar no parasitismo com a formação de estruturas de captura para J2, mas apresenta alta atividade enzimática e produção de metabólitos voláteis, o que pode ter culminado na redução do número de galhas e FR no ensaio *in vivo* (Tabela 9).

TABELA 9. Número de galhas transformadas e fator de reprodução (FR) referente ao bioensaio com os fungos *Trichoderma* spp. (Mistura) e *P. lilacinus* testados em plantas de feijão cv. Engopa Ouro em casa de vegetação, Embrapa Clima Temperado, 2007.

| Tratamentos | FR* | Galhas* |
|--|----------|----------|
| Controle (<i>M. incognita</i>) | 6.37 AB | 113.34 A |
| Mistura | 5.57 BC | 81.42 AB |
| Mistura + <i>P. lilacinus</i> | 4.53 DC | 110.13 A |
| <i>T. pseudokonigii</i> (2T) + <i>P. lilacinus</i> | 4.14 DC | 95.25 A |
| <i>T. viride</i> (5T) + <i>P. lilacinus</i> | 3.23DEF | 39.47 DC |
| <i>T. viride</i> (5T) | 2.77 EFG | 53.05 BC |
| <i>T. harzianum</i> (6T) + <i>P. lilacinus</i> | 2.10 FG | 25.91 DC |
| <i>P. lilacinus</i> | 1.91 FG | 24.66 DC |
| <i>T. harzianum</i> (6T) | 0.00 G | 0.00 D |
| <i>T. pseudokonigii</i> (2T) | 0.00 G | 0.00 D |
| Controle (sem aplicação) | 0.00 G | 0.00 D |

Média de cinco repetições. *Valores transformados em $\sqrt{(X+1)}$. Médias com letras semelhantes na mesma linha não diferem entre si.

Trabalhos indicam que há poucas informações sobre os mecanismos que suportam o controle de *Trichoderma* sp. em nematóides (Sharon *et. al*, 2001; Sahebani & Hadavi, 2008). Estudos sugerem que o parasitismo direto de ovos é aumentado devido à produção de enzimas extracelulares, onde a quitinase produzida por *T. harzianum* pode ser um indicador da capacidade do parasitismo e também apresentar capacidade de indução de resistência na planta hospedeira (Sahebani & Hadavi, 2008).

Todos os isolados avaliados produziram pelo menos um composto associado ao biocontrole. Para um microrganismo ser considerado um agente de biocontrole, além da capacidade de produzir compostos bioativos é necessário que este antagonista se estabeleça no solo. Os isolados utilizados nesta pesquisa apresentaram capacidade de sobrevivência no solo.

Uma característica desejável a um antagonista é apresentar mais de um mecanismo de biocontrole, pois suas chances de sucesso são aumentadas. Os microrganismos avaliados neste trabalho foram capazes de produzir compostos relacionados ao biocontrole, atuando na inibição e/ou parasitando patógenos de solo, diminuindo a eclosão de nematóides ou aumentando na mortalidade de J2 de *M. incognita*.

5 CONCLUSÕES

Os testes realizados *in vitro* permitiram traçar um perfil básico dos isolados utilizados neste estudo. Provavelmente o controle de *Meloidogyne incognita* deve-se à capacidade dos isolados de *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* de produzir sideróforos, lipases, quitinases e proteases, com destaque ao isolado *T. harzianum* (6T). Notou-se que a atividade enzimática foi diferenciada quando comparada com as diversas espécies de *Trichoderma*.

Os isolados de *Trichoderma harzianum* (S11), *Trichoderma harzianum* (6T), *Trichoderma pseudokonigii* (2T) e *Trichoderma viride* (5T) mostraram-se compatíveis ao *P. lilacinus* e apresentaram potencial de antagonismo, *in vitro*, a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Cada um dos isolados de *Trichoderma* spp. produziu pelo menos um composto relacionado ao biocontrole.

Tanto individualmente quanto com *P. lilacinus*, o isolado *T. harzianum* (6T) apresentou capacidade de redução do número de galhas e do fator de reprodução em plantas de feijão cv. Engopa Ouro.

Visando a otimização de um controle efetivo, o uso consorciado de isolados de *Trichoderma* spp. com o fungo *P. lilacinus* mostraram-se eficientes no controle de *M. incognita* em plantas de feijão.

6 PERSPECTIVAS

Com o desenvolvimento da biologia molecular, novas técnicas irão possibilitar a identificação das substâncias diretamente envolvidas na interação nematóide-fungo, permitindo o conhecimento das bases bioquímicas da interação e ampliando as oportunidades de interferência no processo. A seleção de agentes de controle biológico com maiores chances de sucesso poderá interferir diretamente no ambiente, visando aumentar a eficiência no controle dos nematóides.

Faz-se necessário testes com filtrados fúngicos compostos pela mistura dos isolados de *Trichoderma* spp. no intuito de avaliar o comportamento da mistura na mortalidade de J2 e na eclosão de *M. incognita* e testar os fungos no controle de outras espécies de *Meloidogyne* sp.

Trabalhos em campo ainda devem ser realizados buscando-se o conhecimento aplicado, explorando ao máximo o potencial dos antagonistas aqui pesquisados. Futuros estudos com a utilização dos isolados mais promissores permitirão obter informações de extrema relevância para um controle eficiente de *Meloidogyne incognita*, contribuindo na estabilidade da produção e conseqüentemente garantindo retorno dos investimentos feitos pelos produtores.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N., **Plant Pathology**, 5. ed., London, 2004.

ARDUIM, G. da S. **Utilização e caracterização biológica de rizobactérias como biocontroladoras de *Meloidogyne incognita* e promotoras de crescimento em figueira**. Dissertação (mestrado em Fitopatologia)- Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Pelotas, 2006.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Editora EMBRAPA-CNPDA, p. 117-137, 1998.

BASTOS, C. N. Possibilidade do controle biológico da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosus*) do cacauzeiro. In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, Brasília, v. 72, p. 379-382, 1982.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. de P. **Sideróforos: uma resposta dos microorganismos**. **Química Nova**: São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1155-1164, 2002.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, p. 3-5, 1991.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN, A. F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p.717-728, 1995.

BOOTH, C. **Fusarium: laboratory guide to the identification of the major species**. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, p. 58, 1977.

BOSCATO, R. *et al.* Avaliação do *Trichoderma harzianum* T1A, como elicitador de proteínas em *Vitis vinifera*. In: Resumos do II Congresso Brasileiro de Agroecologia. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Espirito Santo, p. 1568- 1571, v. 2, n. 1, fev. 2007.

BUENO, C. J. **Métodos de preservação para fungos fitopatogênicos habitantes do solo.** Disponível em: <http://www.apta regional.sp.gov.br/artigo.php?id_artigo=400>. Acesso em: 23 jul. 2008.

BARBOSA, M. A. G. *et al.* Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal Microbiological**, São Paulo, v. 32, p. 98-104, 2001.

CADIOLI, M. C. *et al.*, Crescimento micelial e parasitismo de *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Meloidogyne paranaensis* em diferentes temperaturas “*in vitro*”. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 305-311, mar./abr., 2007.

CARNEIRO, R. M. D. G. & GOMES, C. B. Metodologia e testes de patogenicidade de *Paecilomyces lilacinus* e *P. fumosoroseus* em ovos de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 17, nº1, p. 66-75.

CARNEIRO, R. M. D. G. *et al.* Resistance to *Meloidogyne mayaguensis* in *Psidium* spp. accessions and their grafting compatibility with *P. guajava* cv. Paluma. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, nº 4, p.281-284, 2007.

CARNEIRO, R. M. D. G. *et al.* Nova raça de *Meloidogyne javanica* detectada em *Arachis pintoi* no estado do Paraná. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 17, n 1, p. 66-75, 2003.

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**, v. 7, p. 66-75. 1993.

CAVALCANTI, L., S.; COELHO, R.; S. B.; PEREZ, J. O. Utilização de dois métodos de inoculação na avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.1-5, 2002.

CALVANCANTI, F. R. *et al.*, Atividades de quitinase e Beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro cotnra a manha-bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 41, n. 12, p. 1721-1730, dez., 2006.

CARVALHO, D. D. C. *et al.* Potencial de isolados de *Trichoderma* sp. para biocontrole de *Fusarium oxysporum*. In: 41º Congresso Brasileiro de Fitopatologia. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, suplemento (ago), CD-ROM-005, Brasília, 2008.

CATTELAN, A. J. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal.** Londrina: EMBRAPA, CNPS, p. 36, 1999.

CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. A technique for determining live second-stage juveniles of *heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 32, p. 117-121, 2000.

COFCEWICZ, E.T. *et. al.* Interação dos fungos micorrízicos arbusculares *Glomus etunicatum* e *Gigaspora margarita* e o nematóide das galhas *Meloidogyne javanica* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p. 65-70, 2001.

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

COSTA, M.J.N. *et. al.* Toxicidade de filtrados a *M. incognita*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 749-755, 2001.

COSTA, P. H. A. *et. al.* Estratégias proteômica para estudar a matriz gelatinosa de *Meloidogyne incognita*. In: **27º Congresso Brasileiro de Nematologia**. (Resumos). v. 27, p. 100, UFG, Goiânia, GO, 2007.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, p. 539, 1993.

CORABI-ADELL, C.; LUCON, C. M. M. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* no estado de São Paulo – Aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69 (supl.), p. 1-306, 2002.

COSTA, M. J. N. *et al.* Toxicidade de filtrados fúngicos a *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 749-755. 2001.

COUTINHO, W. M.; SUASSUNA, N. D. **Cultivo do Algodão Herbáceo na Agricultura Familiar**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/HTML/Algodao/Agricultura_Familiar_2ed/doencas.html>. Acesso em: 27 ago 2007.

CULBREATH, A. K.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; MORGAN-JONES, G. Chitin and *Paecilomyces lilacinus* for control of *Meloidogyne arenaria*. **Nematropica**, DeLeon Springs, v. 16, p.153-166, 1986.

DEVRAJAN, K.; RAJENDRAN, G. Effect of the fungus, *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Sanson on the burrowing nematode, *Radopholus similis* (Cobb) Thorne in Banana. **Pest Management in Horticultural Ecosystems**. Monheim, Germany, v.7, n.2, p.171-173, 2001.

DEVRAJAN, K.; SEENIVASAN, N. Biochemical changes in banana roots due to *Meloidogyne incognita* infected with *Paecilomyces lilacinus*. **Current Nematology**, Bigleswade, v.13, n.1. p.1-5, 2002.

DE MARCO, J. L.; VALADARES-INGLIS, C.; FELIX, C. R. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p.33-38, 2003.

DIAS, G. M. P. *et al.* **Seleção de fungo filamentosso do gênero *Penicillium* com potencial para a produção de quitinase.** Disponível em: <http://www.adtevento.com.br/jepex/cdrom/lista_area_04.htm> Acesso em: 22 abr. 2008.

DIAS, W.P., FERRAZ, S., MUCHOVEJ, J. J. Detecção, isolamento e identificação de fungos predadores de nematóides em amostras de solo de diferentes regiões do Brasil. **Revista Ceres**, Viçosa, v.42, n.244, p.615-620, 1995.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi.** CRC Press, London, p. 630, 1980.

DUFFY, B. K.; DÉFAGO, G. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain. **Applied Environmental Microbiological**, Atenas, v. 65, p. 2429-2438, 1999.

DUNCAN, L. W. Current options for nematode management. Annual Review of **Phytopathology**, Brasília, v. 29, p. 469-490, 1991.

ETHUR, L. Z.; CEMBRANEL, C. Z. & SILVA, da A. C. F. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 885-887, 2001.

ETHUR, L. Z. *et al.* Fungi antagonic to *Sclerotinia sclerotiorum* on cucumber grown in greenhouse. **Fitopatologia brasileira**. Brasília, v. 30, n. 2, 2005.

ETHUR, L. Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de Fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro.** Universidade Federal de Santa Maria (Tese). Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Santa Maria, RS, 2006.

FEDRIZZI, S. M. G. **Produção de metabólitos antimicrobianos e sideróforos de isolados provenientes de Terra Preta Antropogênica da Amazônia Ocidental.** Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 117, 2006.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. β -1,3 glucanases e quitinases: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. **Ciência Agrotécnia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1224-1231, jul./ago., 2008.

FREIRE, E. S.; *et al.* Infectivity of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in tomato after starvation in soil and water at different conditions. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.3, p.270-274, 2007.

FREITAS, L.G., FERRAZ, S. & ALMEIDA, A.M.S. Controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro pela produção de mudas em substrato infestado com *Paecilomyces*. **Nematologia Brasileira**, v. 23, p.65-73, 1999.

FORTES, F. O. *et al.* Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, v.31, n.2, p.221-228, 2007.

GAMS, W.; BISSETT, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. (Ed.) **Trichoderma & Gliocladium**, London: Taylor & Francis Ltd., v.1, p.3-34, 1998.

GASPARD, J.T.; JAFFE, B.A.; FERRIS, H. *Meloidogyne incognita* survival in soil infested with *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. **Journal of Nematology**, Marceline, USA, p. 176 – 181, 1990.

GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M.; SILVA, M. L. C. **Glucanases fúngicas**: Produção e aplicações das b-1,3 e b-1,6 glucanases. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio30/glucanases.asp>> Acesso: 08 jul. 2008.

GRAMINHA, E. B. N., *et al.* Avaliação *in vitro* da patogenicidade de fungos predadores de nematóides parasitos de animais domésticos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n.1, p. 11-16, jan./jun. 2001.

HARMAN, G. E. Myth and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, p.377-393, 2000.

HARMAN, G. E. *et al.*, *Trichoderma* species – opportuniste, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews, Microbiology**, Washington, v. 2, 2004.

HOWELL, C. R. The role of mycoparasitism in the biological control of *Rhizoctonia solani* by *Gliocladium virens*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, p. 992-994, 1987.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula for *Meloidogyne* spp. Including a new technique. **Plant Disease Reporter**, USA, v. 57, p. 1025-1028, 1973.

JACOBS, P. Nematophagous fungi: Guide by Philip Jacobs, BRIC version, 2002. Disponível em: <<http://www.biological-research.com/philip-jacobs%20BRIC/pa-lila.htm>> Acesso em: 25 mar. 2002.

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

JATALA, P.; KALTENBACH, R.; BOWNGEL, M. Biological control of *Meloidogyne incognita* acrita and *Globodera pallida* on potatoes. **Journal Nematology**, Hanover, v. 11, p. 303, 1979.

JONATHAN, E.I.; RAJENDRAN, G. Biocontrol potential of the parasitic fungus *Paecilomyces lilacinus* against the root knot nematode *Meloidogyne incognita* in banana. **Journal Biological Control**, v.14, p. 67-69. 2001.

JUNIOR, M. L.; ABREU, M. S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia Sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência Agrotecnica**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 521-526, abr./jun., 2000.

KALYANI, A.; PRAPULHA, S. G.; KARANTH, N. G. Study on the production of 6- α -pyrone using two methods of fermentation. **Applied Microbiological Biotechnol**, v. 53, p. 610-612, 2000.

KEXIANG, G. *et al.* Potencial of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma atroviride* to control *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*, the causa of apple ring rot. **Journal Phytopathological**, St. Paul, v. 150, p. 271-276, 2002.

KHAN, T.A.; SAXENA, S. K., Integrated management of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* infecting tomato using organic materials and *Paecilomyces lilacinus*. **Bioresource Technology**, USA, v. 61, 247-250, 1997.

LOGUERCIO-LEITE; ESPOSITO, E. Fungos: estrutura e ultra-estrutura. **In: fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, p. 12-44, 2004.

LORDELLO, L. G. **Nematóides das Plantas cultivadas**. 8. ed. São Paulo: Editora Gráfica Ltda., 1992.

MAFIA, R.G. *et al.* **Encapsulamento de *Trichoderma inhamatum* para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* na propagação clonal de *Eucalyptus***. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 28, p.101-105, 2003.

MAIA, A. S.; SANTOS, J. M.; DI MAURO, A. O. Estudo *in vitro* da habilidade predatória de *Monacrosporium robustum* sobre *Heterodera glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p.732-736, 2001.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 1, p. 369-409, 1993.
MANDEL, M.; REESE, E. T. 1960. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. **Journal Bacteriological**, Maryland, v. 79: p. 816, 1960.

MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. A *Verticillium dahliae* KLEB. **Science agriculture**, U.S, v. 55, n. 1, 1998.

MEIRELLES, P. G. *et al.* Produção e caracterização de exoantígenos de *Fusarium verticillioides*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 617-628, out./dez. 2006.

MELO, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. **Controle Biológico de Doenças de Plantas**, Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, p. 7-23., 1991

- MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de planta. In: LUZ, W. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v. 4, p. 261-295, 1996.
- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-DNPMA, p. 393-419, 1998.
- MILLER, P. M. & SANDS, D. C. Effects of hydrolytic enzymes on plant-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 9, p.192-197, 1977.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. Washington: AOAC, v. 31. 426–9p, 1959.
- MITTAL, N.; SAXEANA, G.; MUKERJI, K.G. Integrated control of root-knot disease in three crop plants using chitin and *Paecilomyces lilacinus*. **Crop Protection**, n. 8, p. 647-651, 1995.
- MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; MORAES, R. O. Multiplicação de agentes de controle biológico. In: BETTIOL, W. **Controle Biológico de Doenças de Plantas**, Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, p. 7-23, 1991.
- NEILANDS, J. B. Siderophores – structure and function of microbial iron transport compounds. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, p. 26723-26726, 1995.
- OKOLO, J. C. Culture conditions for endo- β -glucanase production by *Paecilomyces* species. **Bio-Research**, vol. 3(1), p. 25-30, 2005.
- OLIVEIRA, G.G. de., *et al.* Avaliação do efeito de *Trichoderma viride* no aumento do poder germinativo de sementes de *Pterocaulon polystachyum*. In: **VII REUNIÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS**, 7. Ilhéus. 2003. Anais Ceplac/Cepec. 152 p., 2003.
- PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potencial for biocontrol. **Annual Review Phytopathology**. St. Paul, v. 53, p.1985.
- PARK, J.O. *et al.* Pathogenesis of *Streptoverticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soilborne fungal pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, LOCAL?, v.35, p.361-365, 2002.
- PATRIARCA, E. J.; TATÈ, R.; IACCARINO, M. Key Role of Bacterial NH₄⁺ metabolism in *Rhizobium*-Plant Symbiosis. **Microbiology and Molecular Biology Review**, Washington, v. 66, p. 203-222, 2002.
- PATRÍCIO, F.R.A., *et al.* Efeito da solarização, associada à aplicação de *Trichoderma* spp. ou fungicidas, sobre o controle de *Pythium aphanidermatum* e de *Rhizoctonia solani* AG-4. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 2, p.142-146, 2007.

PAZ, I. C. P. **Atividade biológica de metabólitos produzidos por microrganismos endofíticos de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) e o controle biológico de *Crinipellis pernicioso***. Mestrado em Biotecnologia. (Dissertação). Universidade de Caxias do Sul, 2005.

RENSHAW J. C. *et al.* Fungal siderophores: structures, functions and applications. **Mycological Research**, U.K, v. 106 p. 1123-1142, 2002.

RESENDE, M. L. *et al.* Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 793-798, jul./ago., 2004.

RITZINGER, C. H. S. P.; COSTA, D. C. **Capítulo X – Nematóides e Alternativas de Manejo**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Livro_Banana_Cap_10ID-gRfpPx1siR.pdf> Acesso em: 05 jun. 2008.

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

ROMEIRO, R. S. Indução de resistência em plantas a patógenos. Viçosa: Ed. UFV, 45p. **Caderno Didático** n° 56, 1999.

SAHEBANI, N.; HADAVI, N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil & Biochemistry**, New York, v. 40, p. 2016-2020, 2008.

SAMUEL, G. J. *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. **Journal Of Mycology**, Columbus, v. 100, p. 923-935, 1996.

SAMUELS, G.J. *et al.* **Trichoderma Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory**. ARS, USDA. Retrieved November 29, 2007. Disponível em: <<http://nt.ars-rin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>> Acesso em: 20 out. 2007.

SANTIAGO, C. S. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Smsn para controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1055-1064, jul./ago., 2006.

SANTOS, M. A. **Estudo de alguns fungos endoparasitos e predadores no controle de fitonematóides**. (Tese) - Curso de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 1996.

SANTOS, E. R. *et al.* Avaliação de isolados de *Trichoderma sp.* e *Clonostachys rosea* selecionados para o controle biológico do mofobranco como agentes promotores de

crescimento em feijoeiro. In: 41º Congresso Brasileiro de Fitopatologia. **Tropical Plant Pathology**, v. 33 suplemento (ago), CD-ROM-073, Brasília, 2008.

SARATH, G.; MOTTE, R. S. D. L.; WAGNER, F. W. Protase assay methods, p. 25-55. In R. j. Beynon and J. S. Bond (Eds.). **Proteolytic enzymes: A practical approach**. IRL Press, Oxford, 1989.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. **Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores**. *Analysis Biochemical*, v. 160, p. 47-56, 1987.

SHARON, E. *et al.* Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**, vol. 91, n. 7, p. 687-693, 2001.

SHARON, E., *et al.* Parasitismo of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. **Europa Journal Plant Pathology**, London, v. 118 p. 247-258, 2007.

SIDDIQUI, I. A.; SAUKAT, S. S. *Trichoderma harzianum* enhances the production of nematicidal compounds in vitro and improves biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas fluorescens* in tomato. **Letters in Applied Microbiology**, Karachi, Pakistan, v. 38, p. 169-175, 2003.

SILVA, G.S.; SOUZA, I.M.R.; CUTRIM, F.A. Efeito da incorporação de sementes trituradas de feijão de porco ao solo sobre o parasitismo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 412-413, 2002.

SIMÃO, G.; *et al.* Comportamento de duas cultivares de feijoeiro em relação a *Meloidogyne javanica*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 266-270, mar-abr, 2005.

SOUSA, C. da S. *et al.* Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1759, 1766, dez, 2006.

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

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

STOLF, E. **Efeito de re-inoculações de fungos endofíticos sobre o controle do nematóide carvenícola da bananeira**. Relatório de estágio de conclusão de curso submetido ao curso de Agronomia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo. Turrialba, 2006.

SUAREZ, B.; REY, M.; CASTILLO, P. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413

displaying nematicidal activity. **Applied Microbiol Biotechnological**, Sevilla, v. 65, p. 46-55, 2004.

THEIS, T.; STAHL, U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**. Berlin, 2003.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2. ed. rev. amp. Jaboticabal: Funep, 2000, 473 p.

TOUSSOUN, T.A.; NELSON, P.E. **Fusarium: a pictorial guide to the identification of *Fusarium* species**; according to the taxonomic system of Snyder and Hansen. Pennsylvania State University, p. 43, 1976.

VAZ, A. B. *et al.* Potencial uso de *Trichoderma* spp. para o biocontrole de *Fusarium solani* em maracujazeiro. In: 41º Congresso Brasileiro de Fitopatologia. **Tropical Plant Pathology**, v. 33 suplemento (ago), CR-ROM-045, Brasília, 2008.

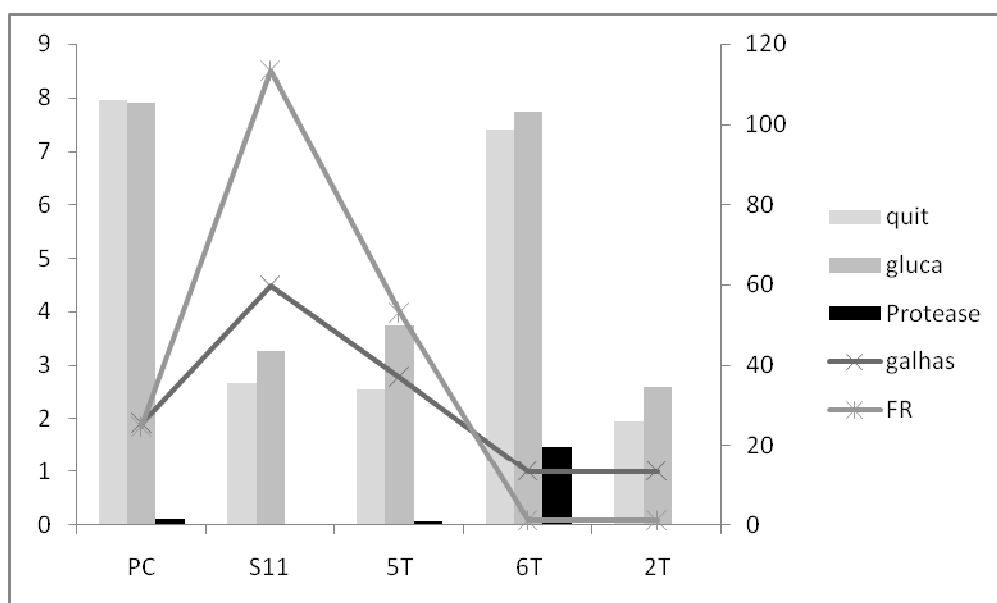
WESTCOTT, S. W.; KLUEPFEL, D. A. Inhibition of *Criconebella xenoplax* egg hatch by *Pseudomonas aurofaciens*. **Phytopathology**, Brasília. v. 83, n.11, 1993.

WILHITE, S. E.; LUMDSEN, R. D.; STRANEY, D. C. Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. **Applied Environmental Microbiological**. v. 67, p. 5055-5062, 2001.

8 ANEXOS

Tratamentos utilizados em casa de vegetação, Embrapa Clima Temperado, em plantas de feijão cv. Engopa Ouro, 2008.

| Tratamentos | Quantidade (gramas) |
|---|---------------------|
| <i>Trichoderma</i> spp. ou <i>P. lilacinus</i> aplicado separadamente | 4 |
| <i>Trichoderma</i> spp. + <i>P. lilacinus</i> | 2 + 2 |
| Mistura <i>Trichoderma</i> spp. | 1 |
| Mistura <i>Trichoderma</i> spp. + <i>P. lilacinus</i> | 0,5 + 2 |
| Controle | 0 |



Barras indicam a produção enzimática pelos fungos e as linhas o número de galhas e fator de reprodução de *M. incognita*. (FR). O eixo à direita dos gráficos corresponde a Protease.

