

MÔNICA APARECIDA DE FREITAS

**POTENCIAIS AGENTES DE BIOCONTROLE PARA
Meloidogyne incognita EM CANA-DE-AÇÚCAR**

**RECIFE - PE
JULHO, 2011**

MÔNICA APARECIDA DE FREITAS

**POTENCIAIS AGENTES DE BIOCONTROLE PARA
Meloidogyne incognita EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO

Prof.^a Dr.^a Elvira Maria Regis Pedrosa - Orientadora

Prof.^a Dr.^a Rosa de Lima Ramos Mariano – Co-Orientadora

Prof.^a Dr.^a Delson Laranjeira - Co-Orientadora

**RECIFE - PE
JULHO, 2011**

Ficha catalográfica

F866p Freitas, Mônica Aparecida de
Potenciais agentes de biocontrole para *Meloidogyne incógnita* em cana-de-açúcar / Mônica Aparecida de Freitas.
-- Recife, 2011.
73 f.: il.

Orientadora: Elvira Maria Régis Pedrosa.
Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2011.
Inclui referências e apêndice.

1. *Pseudomonas* 2. *Bacillus* 3. *Saccharum*
4. Nematóides das galhas I. Pedrosa, Elvira Maria Régis, orientadora II. Título

CDD 581.2

**POTENCIAIS AGENTES DE BIOCONTROLE PARA
Meloidogyne incognita EM CANA-DE-AÇÚCAR**

MÔNICA APARECIDA DE FREITAS

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em 29 de Julho de 2011.

ORIENTADORA:

Prof.^a Dr.^a Elvira Maria Régis Pedrosa

EXAMINADORES:

Prof.^a Dr.^a Sônia Maria Alves de Oliveira

Prof.^a Dr.^a Elineide Barbosa de Souza

Prof.^a Dr.^a Lilian Margarete Paes Guimarães

**RECIFE
JULHO, 2011**

"Por não saber que era impossível, ele foi lá e fez."

Jean Cocteau

Aos meus pais e irmão, Marcelo
C. Freitas, Maria D. B. Freitas e
Marcelo de Freitas Junior pelo
constante e incondicional apoio e
incentivo.

DEDICO

Aos meus familiares e amigos
pela amizade, carinho, atenção e
apoio

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, pela força e amparo nos momentos difíceis.

A minha orientadora, **Prof^a. Dra. Elvira Maria Régis Pedrosa**, pela seriedade, competência, ensino, orientação, amizade e por todo o apoio a mim empregado.

Aos meus co-orientadores **Prof^a. Rosa de Lima Mariano e Prof. Delson Lanjeira** pela dedicação.

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em fitopatologia** pelos ensinamentos.

Aos funcionários **Darcy Martins** pelo auxílio nos procedimentos relativos à pesquisa, aos assuntos burocráticos e institucionais. E **Luiz Coelho** pelas histórias e apoio em casa de vegetação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos amigos da fitonematologia da UFRPE, **Arinaldo Silva, Ana Karina Oliveira, Cícero Costa, Diego Leitão, Jefferson Serpa, Lilian Guimarães, Marcela Andrade, Natalya Ribeiro, Patrícia Ângelo, Sandra Maranhão e Thais Fernanda** pela amizade e companheirismo.

Aos meus pais **Marcelo C. Freitas e Maria D. B. Freitas** por todo o apoio, paciência, carinho, amor e dedicação a mim conferido.

Ao meu irmão **Marcelo de Freitas Junior**, pelos anos de parceria, amizade e amor.

As amigas de sempre: **Kalina Gonçalves, Jussileide Magalhães, Fabiana Valente, Karina Bonon, Eliane Mayumi, Juliana Deolinda, Angelica Takayama e Ana Alice de Freitas**, pela amizade, carinho, em todos os momentos.

Ao **Adriano Giorgi** meu agradecimento especial, pelo apoio, carinho e pelos dias mais agradáveis ao longo dessa jornada.

Aos amigos da fitobacteriologia de Viçosa-MG, **Adriana Neves, Flavio Garcia, Hélvio Ferraz, Marcio Godinho, Thais Santiago, Roberto Lanna** pela amizade e companheirismo.

Ao meu querido amigo (*in memoriam*) **Prof. Reginaldo Romeiro**, pelos ensinamentos, paciência, por estar sempre presente, mesmo que em boas lembranças e por seu exemplo de ser humano. Sou muito grata pela oportunidade de tê-lo conhecido um dia.

Aos **colegas** do curso de Mestrado em fitopatologia pelos bons momentos vividos.

Em fim a todos aqueles que direta ou indiretamente se fizeram presente contribuindo para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	VI
RESUMO	9
ABSTRACT	11
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
CAPÍTULO II – PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PARA BIOCONTROLE DE <i>Meloidogyne incognita</i> EM CANA-DE-AÇÚCAR	34
Abstract.....	35
Resumo.....	36
Introdução.....	36
Material e Métodos.....	38
Resultados e Discussão.....	40
Literatura citada.....	43
CAPÍTULO III- SELEÇÃO DE <i>Trichoderma</i> spp. COMO POTENCIAIS AGENTES DE BIOCONTROLE PARA <i>Meloidogyne incognita</i> EM CANA DE AÇUCAR	50
Abstract.....	51
Resumo.....	52
Introdução.....	53
Material e Métodos.....	55
Resultados e Discussão.....	58
Literatura citada.....	62
CONSIDERAÇÕES FINAIS	72

RESUMO GERAL

A cana-de-açúcar tem especial significado econômico para o Brasil, que lidera a lista dos 80 países produtores. Dentre os patógenos que reduzem sua produtividade destacam-se os fitonematóides do gênero *Meloidogyne*. A presente pesquisa teve por objetivo buscar e selecionar possíveis antagonistas para o controle de *M. incognita* entre treze isolados bacterianos residentes da rizosfera previamente selecionados como agentes de controle biológico na cultura da soja, feijoeiro e tomateiro, contra os respectivos patógenos, *Phakopsora pachyrhizi*, *Xantomonas campestris* pv. *Phaseoli*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, e ainda a busca e seleção entre vinte e três isolados de *Trichoderma* spp. contra *M. incognita*, em plantas de cana de açúcar variedade RB863129. Os isolados fúngicos e bacterianos foram cedidos das coleções de culturas da Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal de Viçosa, respectivamente. Para os experimentos, dois dias antes da infestação do solo com a suspensão bacteriana e suspensão de esporos de *Trichoderma* spp., plântulas de cana-de-açúcar com 30 dias tiveram o solo infestado com 5.000 e 10.000 ovos de *M. incognita* respectivamente. Nos dois estudos, as plantas foram arranjadas em delineamento experimental inteiramente casualizado e mantidas em casa de vegetação à 24-36 °C. Decorridos 90 dias da infestação do solo com o nematóide, foram determinadas as biomassa fresca da parte aérea e da raiz, comprimento da parte aérea e da raiz, número e diâmetro de nós, índice de galhas e o fator de reprodução do fitonematóide. Em testes *in vitro*, avaliou-se o efeito nematicida e nematostático dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre *M. incognita*, determinando-se a mortalidade e eclosão de juvenis provenientes de ovos depositados em filtrados dos isolados, e o parasitismo de ovos pelo fungo. Os isolados de rizobacterianos 38B, 39B, 44B, 49B e 53B mostraram alto potencial para controle de *M. incognita* reduzindo significativamente o fator de reprodução e índice de galha do nematóide em cana-de-açúcar. Os isolados 101B e 172B foram significativos em relação a testemunha e positivos para colonização de raízes *in vitro*, caracterizando-os como bactérias promotoras de crescimento (PGPR). Para *Trichoderma* spp., os isolados 3M, 8M, 17M e 225T e os isolados 1M, 3M, 10M, 17M, 311T e 322 mostraram alto potencial para controle de *M. incognita* reduzindo significativamente o índice de galhas e o fator de reprodução do nematóide, respectivamente, em cana-de-açúcar. *In vitro*, todos os filtrados dos isolados de *Trichoderma* spp. mostraram-se eficientes em promover mortalidade dos juvenis. Em avaliações em ovos de nematóides, dos vinte e dois isolados dezesseis foram significativos em relação a

testemunha para parasitismo de ovos com destaque aos isolados 8M, 11M, 13M, 15M, e 17M como os mais promissores.

Palavras-chave: *Bacillus*, controle biológico, *Pseudomonas*, *Saccharum*.

GENERAL ABSTRACT

Sugarcane is a crop of special economic importance to Brazil which leads the rank among the 80 country producers. Highly decreasing sugarcane production, the nematodes of the genus *Meloydogyne* are pointed out as one of the most important pathogen. The present research had as objective screening potential rizobacterias, previously isolated from screening soybean, bean and tomato against to their respective pathogen *Phakopsora pachyrhizi*, *Xantomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, as well *Trichoderma* spp. as antagonists to *M. incognita* in sugarcane variety RB863129. For rizobacteria studies, isolates were obtained from Universidade Federal de Viçosa and added to soil two days prior 30-day sugarcane seedlings had the soil infested with 5,000 eggs of *M. incognita*. *Trichoderma* spp. isolates were obtained from Universidade Federal Rural de Pernambuco and added to soil two days prior 30-day sugarcane seedlings had the soil infested with 10,000 eggs of the nematode. In both studies, plants were arranged in a complete randomized design and kept under greenhouse at 24-36 °C. Ninety days after infestation with the nematode, it was evaluated extent and fresh biomass of shoot and roots, number and diameter of stalk node, gall index and nematode reproduction.

The bacterial strains 38B, 39B, 44B, 49B and 53B presented high potential for *M. incognita* control decreasing significantly the nematode reproduction factor and gall index in sugarcane. The strains 101B and 172B. were significant in relation to control and positive for root colonization in vitro, being characterized as plant growth-promoting bacteria (PGPR). For *Trichoderma* spp. the strains 3M, 8M, 17M and 225T and the strains 1M, 3M, 10M, 17M, 311T and 322 showed a high potential to control *M. incognita* significantly reducing the gall index and nematode reproduction factor, respectively, in sugarcane. *In vitro*, all the filtrates of *Trichoderma* spp. were effective in promoting juvenile mortality. In assessments of nematode eggs, sixteen among twenty-two strains were significant in relation to controls for parasitism of eggs with emphasis on strains 8M, 11M, 13M, 15M and 17M as the most promising.

Key-word: *Bacillus*, biological control, *Pseudomona*, *Saccharum*.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

POTENCIAIS AGENTES DE BIOCONTROLE PARA *Meloidogyne incognita* EM CANA-DE-AÇUCAR

INTRODUÇÃO GERAL

Cultura da cana de açúcar

- **Classificação botânica e características morfológicas**

A cana-de-açúcar (híbridos *Sacharum* spp. L.) pertence à classe Liliopsida, subclasse Commelinidae, ordem Cyperales (Graminales), família Poaceae, genero *Sacharum* spp., tribo Andropogoneae e sub-tribo Saccharinineae (LUCCHESI, 2001). As principais características dessa família são a forma da inflorescência (espiga), o crescimento do caule em colmos, as folhas com lâminas de sílica em suas bordas e bainha aberta. E como a maioria das Poáceas é uma planta C4, assim chamada por formar compostos orgânicos com quatro carbonos, apresenta maior taxa fotossintética e de eficiência na utilização e resgate do CO₂ (gás carbonico) da atmosfera. A planta se desenvolve em forma de touceira, as raízes são fasciculadas ou em cabeleira (SEGATO, 2006).

Trata-se de uma planta cultivada numa extensa área territorial, compreendida entre os paralelos 35° de latitude Norte e Sul do Equador e apresenta melhor comportamento nas regiões quentes. O clima ideal é aquele que inclui duas estações distintas, uma quente e úmida, para proporcionar a germinação, perfilhamento e desenvolvimento vegetativo, seguido de outra fria e seca, para promover a maturação e conseqüente acúmulo de sacarose nos colmos (GUIMARÃES, 2007). Segundo Lucchesi, (2001); Matsuoka; Garcia e Arizono (1999) a espécie *S. officinarum* L. é descrita como um complexo poliplóide, sendo o centro de diversidade Nova Guiné, e o centro de origem desconhecido. Entretanto, é possível que a planta seja nativa do Pacífico, talvez de Papua, Nova Guiné, onde era conhecida há 12 mil anos (GOMES, 2006).

- **Aspectos históricos e econômicos**

Em Nova Guiné o homem teve o primeiro contato com a cana-de-açúcar. No entanto, dados históricos relevantes se deu a partir do século VIII, quando as conquistas

árabes no ocidente disseminaram o cultivo da cana-de-açúcar nas margens do mar mediterrâneos e propagaram a cultura da cana-de-açúcar no norte da África e sul da Europa na época das invasões (SEGATO, 2006). A chegada ao Brasil se deu oficialmente por Martim Affonso de Souza que, em 1532, trouxe a primeira muda de cana ao Brasil e iniciou seu cultivo na Capitania de São Vicente, onde ele próprio construiu o primeiro engenho de açúcar (JUNQUEIRA, 2006). No entanto, foi no Nordeste, principalmente nas Capitanias de Pernambuco e da Bahia, que os engenhos de açúcar se multiplicaram. Assim, após 50 anos, o Brasil passou a monopolizar a produção mundial de açúcar e hoje lidera a lista dos 80 países produtores, respondendo por 25% da produção mundial (SEGATO, 2006).

Dados da FAO (2011) mostram que a produção mundial da safra de 2007 foi de 1.590.701.773 toneladas, ocupando o Brasil o primeiro lugar com produção de 420.120.992 toneladas, seguido da Índia, China e Tailândia. Com significativo aumento na safra brasileira de 2010, ocupando atualmente uma área de aproximadamente 9.08 milhões de hectares, produção de 719.156.742 toneladas, com rendimento médio de 79 t/ha (IBGE, 2011). Dentre os maiores produtores nacionais de cana-de-açúcar destaca-se o estado de São Paulo com aproximadamente 60% da produção, cerca de 427.945.873 toneladas, seguido pelo estado de Minas Gerais (60.603.247), Paraná (48.360.397), Alagoas (25.707.782), Pernambuco (19.708.936), Mato Grosso (16.097.696) e Goiás (16.097.696). A região Nordeste participa com 16% da produção nacional, o que representa uma diferença significativa quando comparada a produção na região Sudeste do país (IBGE, 2011). Como resultado, no ano de 2010, a produção da cana-de-açúcar movimentou 56 bilhões de reais, o que representou 2% do PIB brasileiro, gerando 4,5 milhões de empregos direto e indireto, em uma produção nacional de 33 milhões de toneladas de açúcar e 29 bilhões de litros de álcool (JORNAL DA CANA, 2010).

Fitonematoides

- **Fitonematoides na cultura da cana-de-açúcar**

Parasitas obrigatórios, os fitonematóides obtêm nutrientes para o desenvolvimento e reprodução a partir do citoplasma de células vivas. As interações entre esses parasitos e as plantas hospedeiras são complexas e dinâmicas e podem envolver, dependendo da espécie, estímulo à eclosão, atração até o hospedeiro, penetração, migração dentro dos

tecidos, reconhecimento do tecido adequado para alimentação e a elaboração de modificações das células hospedeiras. As mudanças celulares destrutivas vão da remoção do conteúdo celular para alimentação, até a completa destruição das células. Alguns fitonematóides induzem modificações formando sítios de alimentação bem elaborados para prover a remoção de nutrientes (HUSSEY; WILLIAMSON, 1998).

Mundialmente, 310 espécies de 48 gêneros já foram registradas associadas à cultura da cana-de-açúcar, sendo os ectoparasitos os mais freqüentes (CADET; SPAULL, 2005). Alguns gêneros são mais freqüentes a exemplo de *Pratylenchus* Fillipjev (cerca de 20 espécies assinaladas), *Meloidogyne* Göeldi (07 espécies), *Helicotylenchus* Steiner (35 espécies), *Xiphinema* Cobb (52 espécies), *Hoplolaimus* Von Dabay (11 espécies), *Paratrichodorus* Siddiqi e *Trichodorus* Cobb (09 espécies) (CADET; SPAULL, 2005; CRUZ; SILVA; RIBEIRO, 1986; MOURA et al., 1999. NOVARETTI et al., 1985). Porém, os mais importantes para a cultura são os endoparasitos sedentários pertencentes aos gêneros *Meloidogyne*, representados pelas espécies *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood e *M. javanica* (Treb) Chitwood, e o endoparasito migrador *Pratylenchus zae* (Graham), devido à severidade das doenças que causam e expressiva disseminação em todas as regiões açucareiras do mundo. Nas condições brasileiras essas três espécies de fitonematóides são reconhecidamente importantes para a cana-de-açúcar, em função dos danos que causam à cultura (DINARDO-MIRANDA, 2005).

Dinardo-Miranda (2005) menciona que embora *P. zae* seja a espécie mais comum, *M. incognita* é a que geralmente causa danos mais severos ao canavial. Outros gêneros de nematóides patogênicos à cana-de-açúcar são: *Tylenchorhynchus* Cobb, *Hemicycliophora* De Man, *Xiphinema*, *Longidorus* (Micoletzky) Torne e Swanger, *Rotylenchulus* Linford e Oliveira e *Criconemella* De Grisse e Loof, encontrados no Nordeste, principalmente em áreas com produtividades agrícolas abaixo de 50 t/ha (APT; KOIKE, 1962; CRUZ; SILVA; RIBEIRO, 1986; MOURA, 2000; MOURA; ALMEIDA, 1981; MOURA et al., 1999; ROSA; MOURA; PEDROSA., 2003). Na região Nordeste, Moura et al. (1999) efetuaram levantamento da ocorrência de espécies dos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus* em campos de cana-de-açúcar nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Alagoas, através da análise de 1.097 amostras coletadas em áreas consideradas de baixa produtividade agrícola. Os resultados mostraram que esses nematóides ocorrem em todos os estados, em muitos casos com populações consideradas altas, com predominância de *P. zae* e *Meloidogyne* spp., com raros assinalamentos do *P. brachyurus* (Godfrey) Filipjev e Stekhoven.

A severidade dos fitonematóides em cana-de-açúcar vem aumentando há muitos anos, na região Nordeste por serem confundido com deficiência nutricional, pelo cultivo contínuo, como monocultura, cuja renovação dos campos em muitos casos ocorrem sem pousio entre remoção de soqueiras velhas e replantio, pela utilização contínua de variedades suscetíveis; e pela expansão da área de cultivo em solos arenosos nas regiões de tabuleiros costeiros, junto com a ocorrência de períodos com secas prolongadas (MOURA, 2000). Dessa forma, o monitoramento em áreas que apresentem o mau desenvolvimento da cultura é fundamental, pois a existência de altas populações de fitonematóides geralmente ocasiona perdas significativas na produtividade (CHAVES; PEDROSA; MOURA, 2002). Quando em altas densidades populacionais, os fitonematóides causam severos danos ao sistema radicular que torna-se mal desenvolvido e pouco eficiente, reduzindo a produtividade agrícola (MOURA; REGIS; MOURA, 1990; CADET; SPAULL, 2005).

- **Controle**

Muitas técnicas são recomendadas para o manejo de fitonematóides em cana-de-açúcar, no entanto, na prática, a eficiência dessas técnicas, quando empregadas isoladamente, muitas vezes é questionável, embora tenham sido testadas por alguns pesquisadores (CHAVES; PEDROSA; MELO, 2004; CHAVES; PEDROSA; MOURA, 2002; NOVARETTI et al., 1989). Entre as medidas de controle que podem ser adotadas em cana-de-açúcar, para reduzir as populações de nematóides, o uso de variedades resistentes ou tolerantes é sem dúvidas, o mais prático e econômico (LORDELLO, 1981). Essa medida não interfere em outras práticas culturais e não apresenta problemas com resíduos no ambiente. Entretanto, os fatores que conferem à cana-de-açúcar alta produtividade e riqueza, parecem ser antagônicas aquelas que propiciam rusticidade, como resistência a fitonematóides de importância econômica (*M. incognita*, *M. javanica* e *P. zae*). Associado a tais fatos, ao detectar resistência em determinadas variedades de cana-de-açúcar, essa resistência restringe-se a uma das espécies de fitonematóide. Como em campo é freqüente a ocorrência de duas ou mais espécies conjuntamente, o emprego de uma variedade resistente a somente uma espécie de nematóides torna-se inviável. Além do mais, no momento não existem variedades comerciais resistentes às principais espécies de fitonematóides que parasitam a cultura (DINARDO-MIRANDA, 2005).

A existência no mercado de poucos, porém eficientes produtos nematicidas, possíveis de emprego em canaviais infestados, tem proporcionado aos agricultores a possibilidade de uma escolha correta, pela aquisição de um produto reconhecidamente eficaz, de uso prático, econômico e seguro. Produtos esses que, quando aplicados corretamente, podem proporcionar ganhos da ordem de 20 a 30%, suficientes para compensar os gastos com aplicação (MOURA et al., 1998). Em estudos com diversas variedades nos quais se aplicaram nematicidas no momento do plantio, no fundo do sulco, em campos infestados por uma ou mais espécies desses parasitos, foram observados incrementos significativos de produtividade agrícola na cana planta que atingiram cifras de até 41 t/ha (BARROS; MOURA; PEDROSA, 2000; DINARDO-MIRANDA et al., 1995; GARCIA; SILVA; DINARDO-MIRANDA, 1997; MOURA, 1995).

Estes incrementos, aparentemente variáveis em função da espécie do nematóide presente na área, do nível populacional do patógeno, das condições de chuva no momento do plantio e da variedade cultivada, quando significativos, justificam economicamente a prática para produção de cana planta, com aumentos da ordem de 15 a 30%. No Nordeste, entretanto, o sucesso dos nematicidas só tem sido verificado quando as condições ambientais são favoráveis ao uso do produto (BARROS; MOURA; PEDROSA, 2000). Moura e Macedo (1997) concluíram que embora o uso do produto tivesse promovido ganhos reais por ocasião da colheita da cana planta, era evidente a necessidade de métodos de proteção para as socarias, devido à rápida recuperação das populações de fitonematóides após o tratamento químico. Resultados semelhantes foram obtidos por Barros; Moura e Pedrosa (2000) e Ferreira Lima (1997). Chaves; Pedrosa e Moura (2002) ressaltando a necessidade do emprego de sistema integrado de medidas para o controle eficiente.

Alem de proporcionar maior capacidade da planta em resistir ao parasitismo, a adição de matéria orgânica ao solo resulta em redução na população do fitonematóide, por criar condições favoráveis a multiplicação da microbiota antagonista, principalmente fungos, e por liberar, durante sua decomposição, fitoquímicos secundários, ou outros compostos, substâncias orgânicas como ácidos graxos voláteis, que podem ter ação nematicida. (CHAVARIA-CARVAJAL; RITZINGER; MCSORLEY, 1998; RODRIGUEZ-KABANA, 1998). Essa pratica é uma das

alternativas mais estudadas (AKHTAR; MALIK, 2000; NICO JIMÉNEZ-DÍAZ; CASTILLO, 2004). Como exemplo, diversos produtos ou resíduos da árvore indiana nim (*Azadirachta indica* A. Juss) têm apresentado potencial para o controle de várias espécies de nematóides, quando aplicados incorporados ao solo. (AKHTAR; MAHMOOD; 1996; RITZINGER; MCSORLEY, 1998; JAVED et al., 2007). Entretanto, a quantidade de material orgânico no solo para que se obtenha controle satisfatório de nematóides é muito variável. Além disso, em certos casos, a quantidade exigida para a redução é inviável para a aplicação no campo. Em 2003, Dinardo-Miranda et al. conduziram dois experimentos em áreas infestadas por fitonematoides, associando a aplicação de tortas de filtro (20 a 30 t/ha) com nematicidas nas variedades RB7245 e SP87-365. Os autores não verificaram significativa redução na população de nematóides mas observaram incrementos em produtividade de 16,8 t/ha, atribuídos aos efeitos nutricionais da torta.

Outra prática alvo de estudos é a rotação de culturas com espécies vegetais não hospedeiras, visando principalmente os benefícios da adubação verde, que inclui entre outros, a incorporação de nutrientes ao solo. Entre as leguminosas promissoras para a prática destacam-se: A mucuna-preta (*Stilozobium aterrimum* Piper e Tracy), a crotalária (*Crotalaria juncea* L.) e o feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* D.C.) por serem plantas rústicas e de eficiente desenvolvimento vegetativo, adaptadas às condições de baixa fertilidade e elevadas temperaturas (PEREIRA; BURLE; RESCK, 1992). *Crotalaria. juncea* é a espécie mais utilizada, por ser a de maior produção de massa vegetativa, o que reflete diretamente na produtividade do canavial (CACERES; ALCARDE, 1995). Em estudos conduzidos no Nordeste, Moura (1991) verificou que o cultivo por dois anos de *C. juncea* propiciou redução nas populações de *M. incognita*. Posteriormente, Rosa, Moura e Pedrosa (2003) verificaram que o cultivo de *C. juncea* por um ano reduziu drasticamente as populações de *Meloidogyne* spp., mas aumentou a de *P. zae*. Com tais trabalhos revela-se que a rotação de culturas pode trazer benefícios as áreas infestadas por fitonematóides, especialmente pela adição de nutrientes ao solo, porém sem efeito direto.

Prática também utilizada é o revolvimento do solo, expondo os fitonematoides à superfície. Dutra e Campos (1998) observaram redução significativa da população de *M. incognita* quando submeteram a área ao revolvimento do solo, irrigação e pousio durante 14 dias. O revolvimento do solo eliminou 54% da população de *M. javanica*

remanescente no solo após 72 h. Diversas outras práticas a exemplo de controle biológico, solarização, inundação, cultivos intercalares e cobertura do solo podem ser adotadas, uma vez que são eficientes em reduzir a população de fitonematóides e mantêm a biodiversidade nos diferentes agroecossistemas (FREITAS, 2003). No entanto, dentre as possíveis alternativas, o controle biológico é um método alternativo que vem obtendo os maiores avanços e sendo mais estudado (BETTIOL, 1999; NORDLUND, 1996; ROMEIRO, 1995).

- **Controle biológico**

O controle biológico insere-se como opção ecológica aos métodos tradicionais de controle. Exemplos em campo são escassos, apesar dos estudos com vários microrganismos durante anos. No entanto, um novo campo de pesquisa em controle biológico está emergindo no Brasil. Trata-se do uso de bactérias colonizadoras de raízes de plantas, denominadas rizobactérias (ROMEIRO, 1999). Nos Estados Unidos esse método apresenta bons resultados há 20 anos e na China desde os anos 60 (CHEN et al., 1996). As rizobactérias benéficas às plantas por promoverem seu crescimento e/ou atuarem no controle biológico de fitopatógenos são chamadas de bactérias promotoras de crescimento de plantas ou PGPR (KLOEPPER; SCHROTH, 1981).

Diversos microrganismos têm revelado potencial antagônico a diferentes fitopatógenos, principalmente, fungos habitantes do solo, e entre estes têm-se destacado isolados selvagens, melhorados de *Trichoderma* spp., devido a produção de enzimas líticas, extracelulares degradadoras, tais como quitinase, β -1,4- glucanases e proteases. A capacidade de degradar quitina do *Trichoderma* spp. permite a sua atuação no controle e fitonematoide visto que este polímero é o principal constituinte do ovo. A eficiência desse fungo tem sido relatada em trabalhos de laboratório, casa de vegetação e campo, demonstra melhor atuação contra patógenos de solo. Por tratar-se de um habitante de solo, suas características de antagonista são melhores expressas neste ambiente (MELO, 1996)

- **Rizobactérias no controle de fitonematóides**

A rizosfera, palavra de origem grega criada a partir dos termos "rhizo" e "sphera", expressa o volume de solo influenciado pela raiz, até a distância de 1 a 5 mm. Inicialmente denominada por HILTNER (1904), a rizosfera favorece intensamente a

atividade microbiana pela liberação de compostos orgânicos, ricos em açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e outros, presentes nos exsudatos, secreções, mucilagens e mucigel. Os organismos ali presente têm a rizosfera e o rizoplano das plantas como sítios preferenciais para a multiplicação e a sobrevivência (ROMEIRO, 1995).

A maioria das rizobactérias pertence aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, os quais apresentam a capacidade de colonizar raízes de plantas e estimular seu crescimento. Outros gêneros de rizobactérias são *Azobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Acetobacter* e *Burkholderia* (BROWN, 1974; ELMERICH, 1984; GLICK, 1995; KLOEPPER et al., 1986). Para que certos microrganismos possam se estabelecer em um ambiente competitivo como a rizosfera, além da destreza de multiplicação e diversidade metabólica, a capacidade de produzir substâncias antagônicas pode favorecer certos grupos de rizobactérias durante o processo de colonização radicular (ROMEIRO; GARCIA, 2003). Por exemplo, *Pseudomonas* e *Bacillus* podem apresentar tempo de geração 15 e 2,5 vezes, respectivamente, maiores na rizosfera do que em solo não rizosférico devido à disponibilidade de substratos. (CARDOSO; FREITAS, 1992; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

As rizobactérias controlam os fitonematóides por produzirem compostos tóxicos, por alterarem os exsudatos radiculares, ou por induzirem resistência em planta (CHEN; DICKSON, 2004; FREITAS et al., 2005). Podem atuar diretamente sobre os fitonematóides por meio de toxinas e antibióticos que inibem a eclosão e a mobilidade dos juvenis de segundo estágio (J2) e reduzir a invasão dos fitonematóides nas raízes das plantas. De forma indireta, as rizobactérias desencadeiam reações na planta que impedem a formação de células gigantes ou acarretam modificações dos exsudatos radiculares, fazendo com que não sejam reconhecidos pelos fitonematóides e deixem de estimular a eclosão, o movimento e a penetração nas raízes (FREITAS et al., 2005; OOSTENDORP; SIKORA, 1990).

São diversos os exemplos: *Rizobium radiobacter* isolado G12, isolada da rizosfera de plantas de batateira (*Solanum tuberosum* L.) por Hasky-Günter; Hofmann e Sikora (1998) é utilizada para o controle do nematóide do cisto da batateira (*Solanum tuberosum*), *Globodera pallida*. Seu potencial antagonístico foi associado à indução de resistência. Em outro estudo, apresentou atividade antagonística contra *M. incognita*, em diferentes plantas hospedeiras (MAHDY; ALLMANN e SIKORA, 2001). Outras citações demonstraram que as *Pseudomonas* não fluorescentes e *Bacillus* spp. também são frequentemente associadas ao controle de fitonematóides. Segundo Habe (1997)

uma rizobactéria do grupo das *Pseudomonas* fluorescentes, três *Pseudomonas* não fluorescentes e uma *Bacillus* spp. reduziram em até 53% o número de galhas de *M. incognita*. Rizobactérias do gênero *Bacillus* também estão frequentemente associadas ao controle de fitonematóides, mas outros gêneros também mostram-se promissores, a exemplo o gênero *Pseudomonas*. Sikora (1988) observou reduções de infecção de *M. arenaria* Chitwood, *M. incognita* e *Rotylenchulus reniformis* Linford e Oliveira em torno de 60 a 65% com o tratamento de sementes de várias culturas com um isolado de *B. subtilis* Coh.

Rizobactérias degradam os exsudatos radiculares que atuam como fator de eclosão para muitas espécies de fitonematóides, compostos absorvidos pelos ovos seriam responsáveis por inativar o nematóide ou causar deformações que o impeçam de sair do ovo (FREITAS 2003; OOSTENDORP; SIKORA 1990). Westcott e Kluepfel (1993) testaram nove isolados de *Pseudomonas* sp., um isolado de *Escherichia coli* Theodor Escherich e um isolado de *Rhizobium fredii* Fred quanto à capacidade de inibir a eclosão de juvenis do fitonematóide. Um isolado de *P. aeurofaciens* Kluyver inibiu a eclosão em 95% quando presente na concentração de $2,4 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias/mL. Os autores atribuíram o efeito sobre a eclosão como o responsável pelo declínio da população do fitonematóide em experimento de casa de vegetação.

Alguns gêneros de fitonematóides possuem gama de hospedeiros restrita, portanto o reconhecimento do hospedeiro correto é fator primordial para sua sobrevivência. Porém compostos produzidos pela rizobactérias são absorvidas pelas raízes, alterando sua composição química e faz com que o fitonematóide não reconheça seu hospedeiro (FREITAS, 2003). Caso o nematóide reconheça os exsudatos radiculares e se direcione para as raízes, alguns produtos bacterianos podem apresentar características nematostáticas e reduzir a mobilidade do nematóide a ponto de impedir que ele atinja a raiz. Becker et al. (1988) encontrou cerca de 50 rizobactérias que causaram inibição parcial ou total do movimento de *M. incognita* em testes *in vitro*. Destas bactérias, 20% reduziram significativamente o número de galhas em plantas de pepino (*Cucumis sativus*), demonstrando a importância deste modo de ação.

Segundo Neves et al. (2000), 10 isolados com constatado efeito de indução de resistência à *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* Van Hall foram testados contra *M. javanica* e *M. incognita* em tomateiro com reduções de até 77,4 % no número de ovos e 66,4% no número de galhas em relação ao controle não tratado. Mas os isolados que apresentaram maior controle de *M. javanica* não foram os mais eficientes para *M.*

incognita e vice versa, isso indica especificidade para as espécies do fitonematóide (NEVES et al., 2000). A resistência sistêmica induzida por rizobactérias é um fenômeno comprovado para vários microrganismos patogênicos, tais como fungos, bactérias e fitonematóides, onde ocorre a síntese pela planta de algum metabólito deletério ao patógeno e não a ação direta de toxinas PGPR sobre este (GLICK, 1995; VAN PEER; NIEMANN; SCHIPPERS, 1991; WEI; KLOPPER; TUZUN, 1991).

- ***Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole de fitonematóides**

O gênero *Trichoderma* pertence ao gênero *Hypocrea*, pertencente à classe dos fungos Mitosporicos, subclasse Hifomicetos, ordem Moniliales, família Moniliaceae (SAMUEL, 1996). Sua ação como agente de biocontrole ocorre devido a mecanismos de antibiose, hiperparasitismo e competição (MELO, 1998). Já Howell (1997) acrescenta a indução de resistência do hospedeiro. Além do favorecimento da planta na tolerância a estresse ambiental, solubilização e seqüestro de nutrientes inorgânicos e inativação de enzimas dos patógenos (HARMAN, 2000).

As espécies de *Trichoderma* têm sido estudadas por produzirem uma série de enzimas extracelulares, por degradarem paredes de células fúngica e por serem ativas na produção de metabólitos extracelulares com atividade antimicrobiana (MELO, 1991) que, segundo Harman et al. (2004), chegam a mais de 100. Os metabólitos produzidos podem ser voláteis e não-voláteis. Dos antibióticos produzidos por *Trichoderma*, Bastos (1996) cita gliotoxina, viridina, trichodermina, suzucacilina, alameticina e dermadina, que têm a capacidade de inibir o desenvolvimento de outros fungos. De acordo com Roberts e Lumsden (1990), 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; MELO 1998).

Segundo Harman et al. (2004), há de 20 a 30 genes envolvidos no processo de micoparasitismo devido a quantidade de proteínas e outros metabólitos que estão envolvidos nessa interação. 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* spp. compete pelos exsudatos liberados pelas sementes no

processo de germinação que inibem a eclosão de ovos por falta de estímulo. De acordo com Howell (2003), a competição é uma das principais características de isolados de *Trichoderma* usados como agentes de biocontrole, pois somente assim terão capacidade de se desenvolver na rizosfera. Atualmente 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 ou óxido nitroso, induzem a cascata de eventos que provocam a produção de uma grande variedade de metabólitos e proteínas com diversas funções na planta e modifica o proteoma vegetal (HARMAN et. al., 2004).

Existem poucas informações sobre os mecanismos utilizados pelas espécies de *Trichoderma* no controle de fitonematoides, sendo que SHARON et al. (2001) citam dois: 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) e indução dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Enzimas extracelulares como quitinase e protease com atividade anti-fúngica participam da relação de interação de *Meloidogyne* spp. e *Trichoderma* sp. (SHARON, et al. 2001).

A atividade proteolítica de isolados de *T. harzianum* pode ser importante no controle biológico de nematóides, em testes de antagonismo *in vitro* com *T. viride* Pers e *T. koningii* Oudem, onde estes isolados atuaram através dos mecanismos da antibiose, competição por substrato e hiperparasitismo (MARTINS-CORDER; MELO, 1998). Estudos com filtrados de *Trichoderma linorum* controlaram de 25-80% de *M. javanica* (MELO, 1998). A ação de *Trichoderma* spp., como agente de biocontrole ocorre além do favorecimento da planta a tolerância a estresse ambiental, solubilização e seqüestro de nutrientes inorgânicos, e inativação de enzimas dos patógenos (HARMAN, 2000). Associado ao fato de serem capazes de Produzirem uma série de enzimas extracelulares, tais como quitinase, lípases, proteases e glucanases, capazes de degradar cutícula e parasitar fitonematoides (SHARON et al., 2001; SUAREZ et al, 2004), importante antagonismo contra fitonematoides. Segundo Rocha (2007), após eclosão, o J2 possui 30% do seu peso corporal em lipídios como fonte de reservas energéticas, a qual é utilizada no processo de migração e parasitismo nas plantas. Assim as enzimas lípases são importante no controle de fitonematoides por degradarem as reservas do mesmos e por atuar nos lipídios da membrana Metabólitos como a lactona 6- pentil- α -piona são

voláteis, característico em algumas espécies de *Trichoderma* (*T. viride*), capaz de reduzir a motilidade e eclosão, e aumentar a mortalidade de J2 de *M. incognita*.

Trichoderma apresenta algumas características que são essenciais para um agente de biocontrole, tais como: ser inócuo ao ser humano, não apresentar impacto negativo ao meio ambiente e apresentar estruturas de reprodução de fácil propagação Bettiol et al. (2009). Apresenta meia vida de prateleira, quando formulado, razoavelmente longa e com boa viabilidade (MELO, 1996). O uso de *Trichoderma* tem sido efetivo contra patógenos radiculares como fitonematóide de raiz *Meloidogyne javanica* (SHARON et al., 2001). Segundo Bettiol et al. (2009), 13 empresas produzem e comercializam produto formulado à base de isolados de *Trichoderma*, as quais estão localizadas, principalmente no Centro-Sul do Brasil. Nesse sentido, o objetivo da presente pesquisa foi selecionar entre os isolados de *Trichoderma* spp. e rizobactérias possíveis antagonistas para o controle biológico de *M. incognita* na cultura da cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTAR, M.; MAHMOOD, I. Control of plant-parasitic nematodes with organic and inorganic amendments in agricultural soil. **Applied Soil Ecology**, New York, v. 4, p. 243-247, 1996.

AKHTAR, M.; MALIK, A. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. **Bioresource Technology**, New York, v. 74, p. 35-47, 2000.

APT, W. J.; KOIKE, H. Pathogenicity of *Helicotylenchus nanus* and its relation with *Pytium graminicola* on sugarcane in Hawaii. **Phytopathology**, St. Paul, v. 52, p. 797-802, 1962.

BARROS, A. C. B.; MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R. Aplicação de terbufós no controle de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *Pratylenchus zeae* em cinco variedades de cana-de-açúcar no Nordeste. Parte 1 – efeitos na cana planta. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 73-78, 2000.

BASTOS, C. N. Potencial de *Trichoderma viride* no controle da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 509-512, 1996.

BECKER, J. O.; ZAVALETA-MEJIA, E.; COLBERT, S. F. SCHROTH, M. N.; WEINHOLD, A. R.; HANCOCK, J. G.; VAN GUNDY, S. D. Effect of rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, p. 1466-1469, 1988.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 1-5 (EMBRAPA-CNPDA. Documento, 15).

BETTIOL, W. Controle biológico de doenças. **Ação Ambiental**, Viçosa. v. 2, p. 30-33, 1999.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MARIANO, R. R. L.; MICHEREFF, S. J.; MATTOS, L. P. V.; ALVARADO, I. C. M.; PINTO, Z. V. Supressividade a fitopatógenos habitantes do solo. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 1. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 187-208.

BROWN, M. E. Seed and root bacterization. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 12, p. 181-197, 1974.

CACERES, N. T.; ALCARDE, J. C. Adubação verde com leguminosa em rotação com cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **STAB: Açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, v. 13, p. 16-20, 1995.

CADET, P.; SPAULL, V. W. Nematode parasites of sugarcane. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Eds.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. 2. ed. Wallingford: CABI International Publishing, 2005. p. 645-674.

CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, S. S. A rizosfera. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Eds.). **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 41-57.

CHAVARRÍA-CARVAJAL, J. A.; RODRÍGUEZ-KÁBANA R. Changes in soil enzymatic activity and control of *Meloidogyne incognita* using four organic amendments. **Nematropica**, Auburn, v. 28, p. 7-18, 1998.

CHAVES, A.; PEDROSA, E. M. R.; MOURA, R. M. Efeitos da aplicação de terbufós sobre a densidade populacional de nematóides endoparasitos em cinco variedades de cana-de-açúcar no nordeste. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 167-176, 2002.

CHAVES, A.; PEDROSA, E. M. R.; MELO, L. J. O. Efeito de carbofuran, torta de filtro e variedades sobre a densidade populacional de nematóides em áreas com mau desenvolvimento da cana-de-açúcar. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 101-103, 2004.

CHEN, Y.; MEI, R.; LU, S.; LIU, L.; KLOEPPER, J. W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in chinese agriculture. In: V. K. Gupta and R. Utkehde (Eds.). **Management of soilborne disease**. New Delhi: M/S Narosa Publishing House, 1996. p. 164-184.

CHEN, Z. X.; DICKSON, D. W. Biological control of nematodes with bacterial antagonists. In: CHEN, Z. X.; CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. (Ed.). **Nematology advances and perspectives**. Nematode Management and Utilization. Beijing: CABI Publishing, 2004. v. 2, p. 1041-1082.

CRUZ, M. M.; SILVA, S. M. S.; RIBEIRO, A. G. Levantamento populacional de nematóides em cana de açúcar em áreas de baixa produtividade nos estados de Alagoas e Sergipe. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 10, p. 27-28, 1986.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Manejo de nematóides em cana-de-açúcar. **Jornal Cana**, Ribeirão Preto, v. 5, p. 64-67, 2005.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; GIL, M. A.; COELHO, A. L.; GARCIA, V.; MENEGATTI, C. C. Efeito da torta de filtro e nematicida sobre as infecções de nematóides e a produtividade da cana-de-açúcar. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 61-67, 2005.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; NOVARETTI, W. R. T.; MORELLI, J. L.; NELLI, E. J. Comportamento de variedades de cana-de-açúcar em relação à *Meloidogyne javanica* em condições de campo. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 19, p. 60-66, 1995.

DUTRA, M. R.; CAMPOS, V. P. Efeito do preparo do solo na população dos fitonematóides das galhas (*Meloidogyne* spp.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 21., 1998. Maringá. **Resumos...** Brasília: Sociedade Brasileira de Nematologia, 1998. p. 45.

ELMERICH, C. Molecular biology and ecology of diazotrophs associated with non-leguminous plants. **Bio/Technology**, New York ,v. 2, p. 967-978, 1984.

FAO-FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **FAOASTAT – Agricultural statistics database**. Rome: World Agricultural Information Centre, 2011. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 30 mai. 2011.

FREITAS, L. G. Controle biológico dentro do contexto de manejo integrado de nematóides. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 24-30, 2003.

FREITAS, L. G.; NEVES, W. S.; FABRY, C. F. S.; B. M. MARRA; M. M. COUTINHO, R. S; ROMEIRO, S. FERRAZ. Isolamento e seleção de rizobactérias para controle de nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) na cultura do tomateiro. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 215-220, 2005.

GARCIA, V.; SILVA, S. F.; DINARDO-MIRANDA, L. L. Comportamento de variedades de cana-de-açúcar em relação a *Meloidogyne incognita*. **Revista Nacional do Álcool e Açúcar**, Piracicaba, v. 17, p. 14-19, 1997.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 109-117, 1995.

GOMES, G. **Engenho e arquitetura**. Recife: Massangana, 2006. 411 p.
GUIMARÃES, L. M. P. **Eficiência de indutores no manejo integrado de *Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus zae* em cana-de-açúcar**. 2007, 114 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

HABE, H. M. **Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas - RPCP – no controle do nematóide das galhas *Meloidogyne incognita* em tomateiro**. 1997, 102 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 1997.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol – Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, p. 377-392, 2000.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, p. 43- 56, 2004.

HASKY-GÜNTHER, K. S.; HOFMANN, H.; SIKORA, R. A. Resistance against the potato cyst nematode *Globodera pallid* systematically induced by the rhizobacteria *Agrobacterium radiobacter* (G12) and *Bacillus sphaericus* (B43). **Fundamental and Applied, Nematology**, Orstom, v. 21, p. 511-517, 1998.

HILTNER, L. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. **Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft**, v. 98, p. 59-78, 1904.

HOWELL, C. R. Field control of cotton seedling diseases with *Trichoderma virens* in combination with fungicide seed treatments. **Journal of Cotton Science**, Baton Rouge, v. 1, p. 15-20, 1997.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, p. 4-10, 2003.

HUSSEY, R. S.; WILLIAMSON, V. M. Physiological and molecular aspects of nematodes parasitism. In: BARKER, K. R.; PEDERSON, G. A.; WINDHAM, G. L. (Eds.). **Plant and nematodes interactions**. Winconsin: ASA-ESSA, 1998. p. 87-108.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **SIDRA 2006**: Sistema IBGE de Recuperação Automática. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1618&z=t&o=26>>. Acesso em: 30 mai. 2011.

JAVED, N.; GOWEN, S. R.; INAM-ULHAQ, M.; ANWAR, S.A. Protective and curative effect of neem (*Azadirachta indica*) formulations on the development of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in roots of tomato plants. **Crop Protection**, Oxford, v. 26, p. 530-534, 2007.

JORNAL DA CANA. **Conheça o setor – Os impressionantes números do setor sucroenergéticos (Safrá 2009/2010)**. Ribeirão Preto: Procana, 2010. Disponível em <<http://www.jornalcana.com.br/Conteudo/Conheca%20o%20Setor.asp>>. Acesso em: 27 mai. 2011.

JUNQUEIRA, E. D. **A Cana-de-açúcar, origem e influência**. São Paulo: JornalCana – A Melhor Notícia do Setor, 2006. Disponível em: <<http://www.canaweb.com.br/Conteudo/HistoriadoSetor.asp>>. Acesso em: 01 ago. 2010.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Relationship of *in vitro* antibiosis of plant growthpromoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, p. 1020-1024, 1981.

KLOEPPER, J. W.; SCHER, F. M.; LALIBERTÉ, M.; TIPPING, B. Emergence promoting rhizobacteria: description and implications for agriculture. In: SWINBURN, T. R. (Ed.). **Iron, siderophores and plant disease**. New York: Plenum Press, 1986. p. 155-164.

LORDELLO, L. G. E. **Nematóides das plantas cultivadas**. 6^a.ed. São Paulo, Nobel, 314 p., 1981.

LUCCHESI, A. A. Cana-de-açúcar. In: CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A. (Eds.). **Ecofisiologia de culturas extrativistas: cana-de-açúcar, seringueira, coqueiro, dendzeneiro e oliveira**. Piracicaba: Cosmópolis Stoller do Brasil, 2001. v. 1, p. 13-45.

MAHDY, M.; ALLMANN, J. H.; SIKORA, R. A. Influence of plant species on the biological control activity of the antagonistic rhizobacterium *Rhizobium etli* strain G12 toward the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit**, Universiteit Gent, v. 66, p. 655-662, 2001.

MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. Antagonismo "in vitro" de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* KLEB. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 55, p. 1-7, 1998.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. Melhoria da cana-de-açúcar. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 1999. p. 205-251.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. v. 1, p.17-67

MELO, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 135-156.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 261-295, 1996.

MOURA, R. M. Controle integrado dos nematóides da cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 22. 2000, Uberlândia. **Resumo...** Brasília: Sociedade Brasileira de Nematologia, 2000. p. 88-94.

MOURA, R. M. Dois anos de rotação de cultura em campos de cana-de-açúcar para controle da meloidoginose. 2. Considerações sobre o método e reflexos na produtividade agro-industrial da cana planta. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 597-600, 1995.

MOURA, R. M. Dois anos de rotação de cultura em campos de cana-de-açúcar para controle de meloidoginose. Efeito dos tratamentos na população do nematóide. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 15, p.1-7, 1991.

MOURA, R. M.; ALMEIDA, A. V. Estudos preliminares sobre a ocorrência de fitonematóides associados à cana-de-açúcar em área de baixa produtividade agrícola no estado de Pernambuco. **Sociedade Brasileira de Nematologia**, Piracicaba, v. 5, p. 213-220, 1981.

MOURA, R. M.; MACEDO, M. E. A. Efeito da aplicação de carbofuran em populações de fitonematóides ecto e endoparasitas da cana-de-açúcar e no desenvolvimento de cana-planta. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 20., 1997, Gramado. **Resumos...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Nematologia, 1997. p. 73.

MOURA, R. M.; RÉGIS, E. M.; A. M. MOURA. Espécies e raças de *Meloidogyne* assinaladas em cana-de-açúcar no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 14, p. 33-38, 1990.

MOURA, R. M.; MACEDO, M. E. A.; SILVA, E. G.; SILVA, I. P. Efeito da aplicação de carbofuran em cana-de-açúcar, variedade CB45-3. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 503, 1998 (Nota Fitopatológica).

MOURA, R. M.; PEDOSA, E. M. R.; MARANHÃO, S. R. V. L.; MOURA, A. M.; MACEDO, M. E. A.; SILVA, E. G. Nematóide associados à cana-de-açúcar no estado de Pernambuco. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 92-99, 1999.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Rizosfera. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. (Eds.). **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. p. 361-397.

- NEVES, W. S.; FREITAS, L. G.; ROMEIRO, R. S.; SILVA, A. H. S. Controle de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* em tomateiro por bactérias endofíticas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 102-103, 2000.
- NICO, A. I.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.; CASTILLO, P. Control of root-knot nematodes by composted agroindustrial wastes in potting mixtures. **Crop Protection**, Oxford, v. 23, p. 581-587, 2004.
- NORDLUND, D. A. Biological control, integrated pest management and conceptual models. **Biocontrol News and Information**, New York, v. 17, p. 35-44, 1996.
- NOVARETTI, W. R. T.; CARDERAN, J. O.; STRABELLI, J.; AMORIM, E. Efeitos da utilização de composto, associado ou não a nematicida e adubos minerais, no controle de nematóides e na produtividade de cana-de-açúcar. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 13, p. 93-107, 1989.
- NOVARETTI, W. R. T.; STRABELLI, J.; DINARDO-MIRANDA, L. L.; AMOIM, E. Comportamento varietal de cana-de-açúcar em relação ao nematóide *Meloidogyne incognita*. In: REUNIAO BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA, 9., 1985, Piracicaba. **Resumo...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Nematologia, 1985. p. 43.
- OOSTENDORP, M.; SIKORA, R. A. *In vitro* interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. **Revue Nématologie**, Bondy, v. 14, p. 269-274, 1990.
- PEREIRA, J.; BURLE, M. L.; RESCK, D. V. S. Adubos verdes e sua utilização no cerrado. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E CONSERVAÇÃO DO SOLO NO CERRADO, 1., 1992, Goiânia. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1992. p. 140-154.
- RITZINGER, C. H. S.; MCSORLEY, R. Effect of castor and velvetbean organic amendments on *Meloidogyne arenaria* in greenhouse experiments. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 30, p. 624-631, 1998.
- ROBERTS, D. P.; LUMSDEN, R. D. Effect of extracellular metabolites from *Gliocladium virens* on germination of sporangia and mycelial growth of *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, p. 461-465, 1990.
- ROCHA, F. S. **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.** 2007, 148 f. Dissertação (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. 1ª. ed. Viçosa: Editora UFV, 1995, 283 p.

ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Editora UFV, 1999, 45 p. (Caderno Didático, 56).

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. Controle Biológico de enfermidades de plantas incitadas por bactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, p.195-228, 2003.

ROSA, R. C. T.; MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R. Ocorrência de *Rotylenchulus reniformis* em cana-de-açúcar no Brasil. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 93-95, 2003.

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

SEGATO, S. V. Terminologias no setor sucroalcooleiro. In: SEGATO, S. V.; ALONSO, O. LAROSA, G. (Eds.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba, 2006. p. 430.

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

SIKORA, R. A. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. **Med. Fac. Kandbouww. Rijksuniv**, Universiteit Gent, v. 53, p. 867-878, 1988.

SUAREZ, B.; REY, M.; CASTILLO, P.; MONTE, E.; LLOBELLO, A. Isolation and characterization of PRA1, a trypsinlike protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.65, p. 46-55, 2004.

VAN PEER, R.; NIEMANN, G. J.; SCHIPPERS, B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WC-417r. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, p. 728-734, 1991.

WEI, G.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, p. 1508-1512, 1991.

WESTCOTT, S. W.; KLUEPFEL, D. A. Inhibition of *Criconebella xenoplax* egg hatch by *Pseudomonas aureofaciens*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 1245-1249, 1993.

CAPÍTULO 2

PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PARA BIOCONTROLE DE

Meloidogyne incognita EM CANA-DE-AÇÚCAR

1 **PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PARA BIOCONTROLE DE *Meloidogyne***
2 ***incognita* EM CANA-DE-AÇÚCAR¹**

3
4 M. A. FREITAS², E. M. R. PEDROSA^{3*}, R. L. R. MARIANO³ and S. R.V. L.

5 MARANHAO⁴.

6 ¹Parte da dissertação da primeira autora. ²Aluna de pós-graduação, Universidade

7 Federal Rural de Pernambuco, Brasil. ³Professor, Universidade Federal Rural de

8 Pernambuco, Departamento de Tecnologia Rural Brasil. ⁴Professor, Universidade

9 Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Brasil. ⁵Pós doutoranda em

10 fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de agronomia,

11 Brasil. *Autor por correspondência: Universidade Federal Rural de Pernambuco,

12 Departamento de Tecnologia Rural, Dois irmãos, Recife, PE, Brasil, CEP: 52171-900,

13 Phone: 55-81-85151222, Fax: 55-81-33206205, e-mail: elvira.pedrosa@dtr.ufrpe.br

14 **ABSTRACT**

15 Freitas, M. A., E. M. R. Pedrosa, R. L. R. Mariano and R. V. L. Maranhão. 2011.

16 Prospection of rizobacteria for biocontrol of *Meloidogyne incognita* in sugarcane.

17 Nematropica

18 The present research had as objective screening potential rizobacteria antagonists to

19 *Meloidogyne incognita* and evaluating their potentiality as resistance inducer and plant

20 growth promoter for sugarcane variety RB863129. Bacterial isolates, were added to soil

21 two days prior 30-day sugarcane seedlings had the soil infested with 5000 eggs of *M.*

22 *incognita*. Plants were arranged in a complete randomized design and kept under

23 greenhouse at 24-36 °C. Ninety days after soil infestation with nematode, it was

24 evaluated extent and fresh biomass of shoot and roots, number and diameter of stalk

25 node, gall index and nematode reproduction. The bacterial strains 38B, 39B, 44B, 49B

26 and 53B presented high potential for *M. incognita* control decreasing significantly the

1 nematode reproduction factor and gall index in sugarcane. The strains 101B and 172B
2 were positive for root colonization in the *in vitro* tests.

3 Key-word: *Bacillus*, *Pseudomonas*, root-knot nematode, *Saccharum*.

4 RESUMO

5 Freitas, M. A., E. M. R. Pedrosa, R. L. R. Mariano, S. R. V. Maranhão. 2011.

6 Prospecção de rizobacterias para o biocontrole de *Meloidogyne incognita* em cana-de-
7 açúcar. Nematropica.

8 A presente pesquisa teve por objetivo selecionar, entre isolados de rizobacterias,
9 possíveis antagonistas para o manejo de *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar
10 variedade RB863129 em condições de casa de vegetação. Dois dias antes da infestação
11 do solo com a suspensão bacteriana OD₅₇₀= 0,7, plântulas de cana-de-açúcar com 30
12 dias tiveram o solo infestado com 5000 ovos de *M. incognita*. As plantas foram
13 arranjadas em delineamento experimental inteiramente casualizado e mantidas em casa
14 de vegetação à 24-36 °C. Decorridos 90 dias da infestação do solo com o nematóide,
15 foram determinadas as biomassa fresca da parte aérea, biomassa fresca da raiz,
16 comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, número e diâmetro de nós, índice de
17 galhas e reprodução do nematóide. Os isolados de rizobacterianos 38B, 39B, 44B, 49B
18 e 53B mostraram alto potencial para controle de *M. incognita* reduzindo
19 significativamente o fator de reprodução e índice de galha do nematóide em cana-de-
20 açúcar. Os isolados 101B e 172B em relação a testemunha mostraram-se positivos para
21 colonização de raízes em testes *in vitro*.

22 Palavras chave: *Bacillus*, nematoide das galhas, *Pseudomonas*, *Saccharum*.

23 INTRODUÇÃO

24 Devido à severidade da doença e expressiva redução da produtividade da cana-
25 de-açúcar (*Saccharum* L.) com perdas que chegam à 93% das áreas de plantio e

1 prejuízos de 30 a 50% da lavoura (Campo e Negócios, 2011), os endoparasitos
2 sedentários pertencentes ao gênero *Meloidogyne* Goeldi constituem um dos mais
3 importantes patógenos da cana-de-açúcar, com destaque para *M. incognita*, amplamente
4 disseminada no Nordeste do Brasil (Freitas, 2003).

5 Na busca pelo controle do fitonematóide, a aplicação de nematicidas tem sido
6 um método atrativo para os produtores pelo fato de alcançar resultados satisfatórios em
7 um período relativamente curto (Halbrent e James, 2003). Quando aplicado
8 corretamente, os nematicidas proporcionam ganhos equivalentes a 30% na
9 produtividade da cana planta, sendo suficientes para compensar o custo da aquisição e
10 aplicação do produto (Barros *et al.*, 2000; Dinardo-Miranda *et al.*, 2000; Moura *et al.*,
11 1998). No Nordeste, entretanto, o sucesso dos nematicidas só tem sido verificado
12 quando as condições ambientais são favoráveis ao uso do produto. Além do mais, o
13 tratamento químico não destrói por completo as populações do nematóide, apenas
14 protege as plantas temporariamente contra a população inicial, por um período máximo
15 de três meses. Passado o período residual do produto, as populações voltam a altas
16 densidades em poucos meses, devido à existência de grande quantidade de raízes sadias
17 (Barros *et al.*, 2000; Chaves *et al.*, 2002; Chaves *et al.*, 2004; Doihara, 2005).

18 A utilização de medidas não poluentes e mais duradoras tem sido cada vez mais
19 preconizada entre os pesquisadores. Dentre as possíveis alternativas, o controle
20 biológico é o método mais promissor e o mais estudado (Bettiol, 1999; Romeiro, 2005).
21 Exemplos de biocontrole de fitonematóides em campo são poucos, apesar dos estudos
22 com vários microrganismos por anos (Freitas, 2003). Um novo campo de pesquisa que
23 vem emergindo, com resultados satisfatórios em biocontrole de fitonematoide é o uso de
24 bactérias residente de rizosfera (rizobactérias), com possibilidade de serem benéficas às
25 plantas como promotora de crescimento, no biocontrole de fitopatógenos e/ou como

1 indutora de resistência (Romeiro, 2005). Em sua maioria, as bactérias que apresentam
2 capacidade de colonizar raízes e estimular o crescimento de plantas pertencem aos
3 gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*. No entanto, outros gêneros também podem ser
4 encontrados sendo alvo de estudos, como *Azobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter* e
5 *Burkholderia* (Brown, 1974; Elmerich, 1984; Glick, 1995; Kloepper *et al.*, 1986).

6 Dentre os mecanismos de ação, as rizobactérias controlam os fitonematóides por
7 produzirem compostos tóxicos, por alterar os exsudatos radiculares, ou por indução de
8 resistência nas plantas (Chen e Dickson, 2004; Freitas *et al.*, 2005). Atuam diretamente
9 sobre os fitonematóides por meio de toxinas e antibióticos, inibem a eclosão de ovos e a
10 mobilidade dos juvenis de segundo estágio (J_2), e reduzem a invasão dos nematóides
11 nas raízes das plantas. Indiretamente podem promover reações na planta o que impede a
12 formação de células gigantes ou acarreta modificações dos exsudatos radiculares,
13 resultando na ausência do reconhecimento pelo nematóide, redução do estímulo a
14 eclosão de ovos e da capacidade de penetração nas raízes (Kerry, 2000; Oostendorp e
15 Sikora, 1990; Ramamoorthy *et al.*, 2001). Dessa forma, o uso de rizobactérias pode ser
16 de grande importância para o controle de fitonematóides, uma vez que não causam
17 impacto ambiental e oferecem maior segurança para aplicadores e consumidores. O
18 objetivo deste trabalho foi selecionar, entre os isolados de rizobactérias, possíveis
19 antagonistas para controle biológico de *M. incognita* na cultura da cana-de-açúcar.

20 MATERIAL E MÉTODOS

21 O estudo foi desenvolvido em casa de vegetação do Laboratório de
22 Fitonematologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A variedade de cana-
23 de-açúcar utilizada foi RB863129, desenvolvida pelo Programa de Melhoramento
24 Genético da Cana-de-açúcar, RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento
25 do Setor Sucroalcooleiro). As mudas foram obtidas do cultivo por micropropagação da

1 biofábrica Governador Miguel Arraes do CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas
2 do Nordeste), Recife-PE. As populações de *M. incognita* foram obtidas de áreas
3 produtoras de cana-de-açúcar no litoral norte do estado de Pernambuco, e mantidas em
4 vasos cultivados com plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Santa
5 Cruz durante todo o período do experimento.

6 Para obtenção do inoculo nematológico da espécie *Meloidogyne incognita* foram
7 feitas extrações de ovos das plantas de tomateiro (*S. lycopersicum* L.), utilizando-se a
8 metodologia descrita por Hussey e Barker (1973), ajuste da concentração em câmara de
9 Peters sob microscópio óptico. Plantas de pimentão (*Capsicum annum* L.) cultivar
10 impacto foram inoculadas com 5000 ovos e mantidas por aproximadamente 70 dias.
11 Confirmação da espécie foi efetuada pela técnica de eletroforese de isoenzimas de
12 acordo com Carneiro *et al.* (1993).

13 As rizobacterias, pertencentes à coleção da Universidade Federal de Viçosa,
14 foram previamente selecionados como agentes de controle biológico na cultura da soja
15 (*Gycine max* L.), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e do tomateiro (*S. lycopersicum* L.),
16 contra seus respectivos patógenos alvo, *Phakopsora pachyrhizi*, *Xantomonas campestris*
17 *pv. phaseoli*, *Pseudomonas syringae* *pv. Tomato*. A seleção das rizobactérias como
18 agentes de biocontrole de *M. incognita* fundamentou-se no potencial antagônico de cada
19 isolado. Cada um dos possíveis antagonistas foi cultivado em meio de cultura 523
20 (Kado e Heskett, 1970) e na fase exponencial de crescimento, células bacterianas foram
21 colhidas em solução salina (NaCl 0,85%) com concentração da suspensão ajustada em
22 espectrofotômetro a 570 nm para absorbância 0,7. Para o estudo do potencial
23 antagonista dos isolados, plântulas de cana de açúcar com 30 dias de idade, cultivadas
24 em vasos com capacidade para 5 L contendo solo esterilizado, foram inoculadas com

1 5000 ovos de *M. incognita*, depositados em quatro perfurações de 2 cm de profundidade
2 ao redor do colo da planta.

3 Dois dias antes da infestação do solo com o fitonematoide, em cada vaso foram
4 depositados 100 mL da suspensão bacteriana com concentração ajustada para OD₅₇₀ =
5 0,7, no solo em 4 perfurações ao redor do colo da planta. As plantas foram mantidas em
6 casa de vegetação a uma temperatura média mínima de 25°C, média máxima de 36°C. O
7 delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado e os tratamentos
8 representados por 13 isolados de rizobactérias 1B, 2B, 5B, 6B, 15B, 38B, 39B, 44B,
9 49B, 53B, 101B, 172B e testemunha, com cinco repetições. Após 90 dias da infestação
10 do solo, foi determinado o comprimento e a biomassa fresca da parte aérea e da raiz, o
11 número de nós por planta, o diâmetro do primeiro nó, o índice de galhas e o fator de
12 reprodução de *M. incognita* (relação entre a população final e a população inicial do
13 nematóides) de acordo com Hussey e Barker (1973). Para estimativa do índice de galhas
14 foi utilizado a escala de notas do “International *Meloidogyne* Project” (Taylor e Sasser,
15 1978). Foi aferido o número de galhas entre 0,5 e 1,0 cm e entre 1,0 e 2,0 cm.

16 Seguindo a mesma metodologia, os quatro isolados com resultados mais
17 promissores quanto aos parâmetros avaliados foram submetidos a novos testes para
18 confirmação dos resultados obtidos. Os dados foram submetidos à análise de variância
19 (ANOVA), utilizando-se o programa estatístico SAS (Statistical Analysis System, 2002)
20 versão 9.1), Os dados obtidos foram transformados para $\sqrt{(X+0,5)}$ e as médias
21 comparadas pelo teste de Fisher (Proteated) LSD ao nível de 5% de probabilidade.

22 RESULTADOS E DISCUSSÃO

23 Dos 13 isolados bacterianos avaliados quanto ao peso da parte aérea das plantas
24 nenhum diferiu estatisticamente da testemunha (Tabela 1). Para o comprimento da parte
25 aérea, dois isolados se destacaram: 101B e 172B, diferindo significativamente da

1 testemunha. O acréscimo observado nos isolados 101B e 172B coincide com as
2 respostas positivas para o teste de colonização radicular *in vitro* das mudas de cana-de-
3 açúcar que, segundo Romeiro (2005), caracteriza a rizobactéria como PGPR;
4 conhecidas por proporcionarem crescimento e/ou o biocontrole a diversos
5 fitopatógenos, entre os quais os nematóides (Kloepper e Schroth, 1981). Segundo
6 Freitas (2003), os principais mecanismos ativados pelas PGPR consistem na
7 disponibilidade de substâncias de nutrientes à planta, produção de substâncias
8 promotoras de crescimento, biocontrole de fitopatógenos e indução de resistência. Este
9 último caracterizado por induzir a planta a produzir metabólitos deletérios a patógenos e
10 não à ação da toxina da PGPR sobre o patógeno (Freitas 2003; Glick, 1995; Van Peer *et*
11 *al.*, 1991; Wei *et al.*, 1991)

12 Com relação à biomassa do sistema radicular das plantas, o isolado 55B diferiu
13 estatisticamente da testemunha, em peso e o isolado 38B em comprimento do sistema
14 radicular (Tabela 1). Possivelmente, com a colonização do sistema radicular pelo
15 fitonematoide, as raízes desenvolveram-se mais, tornando-se mais pesadas. Em muitos
16 casos, para compensar a área colonizada pelo fitopatogeno, ocorre formação de raízes
17 laterais na tentativa de favorecer a absorção de água e nutrientes (Carneiro, 2003).

18 Apesar de não estar claro o número ideal de nós em plantas de cana-de-açúcar
19 com 120 dias, considerou-se como as mais saudáveis, as plantas com maior
20 comprimento de parte aérea e maior diâmetro de nós, tomando-se como base o número
21 apresentado por plantas sadias não inoculadas. Número esse obtidos para os tratamentos
22 com os isolados: 2B, 5B, 39B, 49B, 55B, 101B, 172B, porém sem diferir
23 significativamente da testemunha (Tabela 1). Em relação ao diâmetro do primeiro nó,
24 apenas o isolado 6B diferiu da testemunha, apresentando menor diâmetro dentre os
25 isolados.

1 A despeito do índice de galhas da maioria dos isolados ser relativamente
2 elevado, 38.46% dos isolados apresentaram índices significativamente menor do que a
3 testemunha com destaque para o isolado 49B com índices de galhas menor do que 3
4 (Tabela 1). Dentre os cinco isolados que apresentaram índice de galhas
5 significativamente menor que a testemunha, quatro são rizobactérias isoladas da
6 rizosfera da cultura da soja (*G. max L.*). Resultados semelhantes foram obtidos por
7 Freitas e Carneiro (2003), que trabalharam no biocontrole do fitonematóide do cisto da
8 soja (*Heterodera* sp.) e fitonematóide das galhas (*Meloidogyne* sp.) com rizobactérias
9 da soja, obtendo resultados favoráveis quanto ao potencial de biocontrole de tais
10 fitopatogenos em uma ampla gama de hospedeiros do fitonematóide. Esse potencial
11 pode estar relacionado ao fato de que os bacilos apresentam elevado tempo de
12 sobrevivência no solo, resistência ao calor e à dessecação (Freire, 2007)

13 Com relação ao número de galhas entre 0,5 a 1,0 cm todos os isolados foram
14 significativamente menor do que a testemunha com destaque para 2BM, 6B, 15B, 39B e
15 44B, que apresentaram reduções da ordem de 90.62, 89.84, 96.87, 98.43, 95.31 em
16 relação a testemunha. Para o número de galhas entre 1,0 e 2,0 cm, três isolados
17 apresentaram diferença significativa em relação a testemunha: 2BM, 6B, e 15B, com
18 reduções da ordem de 85.7, 80.9 e 100%, respectivamente.

19 Quanto ao fator de reprodução, dos 13 tratamentos, 12 foram significativamente
20 menores do que a testemunha, os isolados: 1BM, 2BM, 6B, 15B, 38B, 39B, 44B, 49B,
21 53B, 55B, 101B e 172B, com destaque para o isolado 172B com redução de 96.26 %. A
22 redução do fator de reprodução é o principal parâmetro para avaliar a resistência da
23 planta hospedeira ao nematóide e pode estar associado a vários mecanismos, ainda
24 pouco esclarecidos, afetando desde o estímulo à eclosão, a atração e o reconhecimento
25 do hospedeiro pelo juvenil à diferenciação sexual e fecundidade da fêmea adulta.

1 Estudos conduzidos por Freitas 2003; Oostendorp e Sikora, 1990 indicam que as
2 rizobactérias seriam responsável por degradarem os exsudatos radiculares, que
3 funcionam como fator de eclosão para muitas espécies de nematóides. Substâncias
4 produzidas pelas rizobactérias são absorvidas pelas raízes e podem alterar sua
5 composição química, fazendo com que os fitonematóides não reconheçam seu
6 hospedeiro (Zuckerman, 1983), e/ou ainda as bactérias, e/ou seus compostos
7 metabólicos, absorvidos pelas raízes podem induzir reação de hipersensibilidade nas
8 células de alimentação o que impede a formação de células gigantes (Romeiro, 2005).
9 Pesquisas revelaram que a indução de resistência por tais bactérias é comprovada contra
10 vários grupos de organismos patogênicos como bactérias, fungos e fitonematoides,
11 ocorrendo síntese de metabolitos que agiriam sobre o fitopatogeno (Glick, 1995; Van
12 Peer *et al.*, 1991; Wei *et al.*, 1991).

13 Os resultados obtidos para Índice de galhas e Fator de reprodução permitiram
14 concluir que isolados 39 e 49B e 6B, 15B, 44B, 49B, 53B, 101B e 172B possuem alto
15 potencial para biocontrole de *M. incognita* no manejo integrado da cana-de-açúcar por
16 apresentarem, respectivamente, Índice de galhas inferior a 3,0 e medias seguidas pela
17 letra f e g no teste LSD. A identificação desses isolados, através de testes bioquímicos,
18 permitiram identificar os gêneros: *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. Para caracterização a
19 nível de espécie foi realizada a análise da região intergenica 16S/23S, pela analise de
20 restrição do DNA ribossomal amplificado, que constitui uma excelente ferramenta para
21 a identificação ao nível de espécies (Rodriguez-Valera e Garcia-Martinez, 2000). Para
22 efeito de comparação as sequências obtidas foram alinhadas e depositadas no GenBank-
23 EMBL. (Dados não mencionados)

24

LITERATURA CITADA

- 1 Barros, A. C. B., R. M. Moura, and Pedrosa, E. M. R. 2000. Aplicação de terbufos no
2 controle de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *Pratylenchus zae* em cinco variedades de
3 cana-de-açúcar no Nordeste. 1. Efeitos na cana planta. *Nematologia Brasileira* 24:73-78.
- 4 Bettiol, W. 1999. Controle biológico de doenças. *Ação Ambiental*. 2: 30-33.
- 5 Brown, M. E. 1974. Seed and root bacterization. *Annual Review of Phytopathology* 12:
6 181-197.
- 7 Campo e Negocio. Nematóide, um risco evidente. Disponível em:
8 <http://www.nematoides.com.br/wordpress/wpcontent/uploads/2011/03/CampoNegocios-Nematoides-um-risco-evidente..pdf>. Acesso em 18 jun. 2011.
- 9
- 10 Carneiro, R. M. D. G. and C. B. Gomes. 1993. Metodologia e teste de patogenicidade
11 de *Paecilomyces lilacinus* e *P. fumosoroseus* em ovos de *Meloidogyne javanica*.
12 *Nematologia Brasileira* 7: 66-75.
- 13 Chaves, A., E. M. R. Pedrosa and L. J. O. Melo. 2004. Efeito de carbofuran, torta de
14 filtro e variedades sobre a densidade populacional de nematóides em áreas com
15 mau desenvolvimento da cana-de-açúcar. *Nematologia Brasileira* 28: 101-103.
- 16 Chaves, A., E. M. R. Pedrosa, and R. M. Moura. 2002. Efeitos da aplicação de terbufós
17 sobre a densidade populacional de nematóides endoparasitos em cinco variedades
18 de cana-de-açúcar no nordeste. *Nematologia Brasileira* 26: 167-176.
- 19 Chen, Z. X. and D. W. Dickson. 2004. Biological control of nematodes with bacterial
20 antagonists. *In*: Chen, Z. X., S. Y. Chen and D. W. DICKSON, eds. *Nematology
21 Advances and Perspectives. Nematode Management and Utilization* 2-1041-1082.
- 22 Dinardo-Miranda, L. L., V. Garcia and C. C. Menegatti. 2000. Controle químico de
23 nematóides em soqueiras de cana-de-açúcar. *Nematologia Brasileira* 15: 55-58.
- 24 Doihara, I. P. 2005. Efeito da aplicação do extrato pirolenhoso, óleo de nim (*Azadiracta
25 indica*) e acibenzolar-s-metil sobre a interação nematóide-planta hospedeira.

- 1 Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife,
2 Brasil. 73 pp.
- 3 Dultra, M. R. and V. P. CAMPOS. 2003. Efeito do manejo de solo e da irrigação como
4 nova tática de controle de *Meloidogyne incognita* em feijoeiro. Fitopatologia
5 Brasileira 28: 608-614.
- 6 Elmerich, C. 1984. Molecular biology and ecology of diazotrophs associated with non-
7 leguminous plants. Bio/Technology 2: 967-978.
- 8 Ferreira, L. R. 1997. Influência dos nematicidas carbofuran e terbufós na flutuação
9 populacional de fitonematóides e parâmetros produtivos de duas variedades de
10 cana-deaçúcar (*Saccharum* sp.). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal
11 Rural de Pernambuco, Recife, Brasil. 82 pp.
- 12 Freire, E. S. 2007. Infectivity of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in
13 tomato after starvation in soil and water at different conditions. Summa
14 Phytopathologica 33: 270-274.
- 15 Freitas, L. G. 2003. Controle biológico dentro do contexto de manejo integrado de
16 nematóides. Fitopatologia Brasileira 28: 24-30.
- 17 Freitas, L. G. and R. M. D. G. Carneiro. 2003. Controle biológico de fitonematoides por
18 Pasteuria spp. In: Melo, I. S., and J. S. Azevedo, (eds). Controle Biológico.
19 Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente 2: 91-125.
- 20 Freitas, L. G., W. S. Neves, C. F. S. Fabry, B. M. Marra, M. M. Coutinho, R. S.
21 Romeiro and S. Ferraz. 2005. Isolamento e seleção de rizobactérias para controle de
22 nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) na cultura do tomateiro.
23 Nematologia Brasileira 29: 215-220.
- 24 Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Canadian
25 Journal of Microbiology 41: 109-117.

- 1 Halbrecht, J. M. and A. L. M. James. Crop rotation and other cultural practices. *In*: Chen,
2 Z. X., S. Y. Chen and D. W. DICKSON, eds. 2003. Nematology advances and
3 perspectives – nematode management and utilization. 1. Beijing: CABI publishing
4 2: 909-930.
- 5 Hartman, K. M. and J. N. Sasser. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of
6 differential host test and perineal pattern morphology. *In*: BARKER, K. R.;
7 CARTER, C. C.; SASSER, J. N. eds. 1985. An advanced treatise on *Meloidogyne*:
8 methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics 2: 69-77.
- 9 Hussey. R. S. and K. Baker. 1973. A Comparison of methods for collecting inocula of
10 *Meloidogyne* spp. Including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57: 1025-
11 1028.
- 12 Kado, C. I. and M. G. Heskett. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*,
13 *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, Saint
14 Paul 60: 969-979.
- 15 Kerry, B. R. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for
16 the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of*
17 *Phytopathology*, 38: 423-441.
- 18 Kloepper, J. W., Scher, F. M., Laliberté, M. and Tipping, B. Emergence promoting
19 rhizobacteria: description and implications for agriculture. *In*: Swinburn, T. R. eds
20 1986. **Iron, siderophores and plant disease**, New York: Plenum Press, Pp. 155-
21 164.
- 22 Kloepper, J. W. and M. N. 1981. Schroth. Relationship of *in vitro* antibiosis of plant
23 growth promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root
24 microflora. *Phytopathology*, 71: 1020-1024.
- 25 Moura, R. M., M. E. A. Macedo, E. G. Silva, I. P. Silva. 1998. Efeito da aplicação de
26 carbofuran em cana-de-açúcar, variedade CB45-3. *Fitopatologia Brasileira* 23: 503.

- 1 Nordlund, D. A. 1996. Biological control, integrated pest management and conceptual
2 models. *Biocontrol News and Information* 17: 35-44.
- 3 Oostendorp, M. and R. A. Sikora. 1990. *In vitro* interrelationships between rhizosphere
4 bacteria and *Heterodera schachtii*. *Review of Nematology* 14: 269-274.
- 5 Paula Júnior, T. J., M. A. B. Morandi, L. Zambolim and M. B. Silva. Controle
6 Alternativo de Doenças de Plantas – Histórico. In: Venozon, M., T. L. Paula Junior,
7 T. and J. Pallini, A. eds 2005. Controle alternativo de pragas e doenças. Viçosa:
8 EPAMIG/CTZM, Pp. 135-162.
- 9 Ramamoorthy, V., R. Viswanathan, T. Raguchander, V. Prakasam and R. Semiyappan.
10 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in
11 crop plants pests and diseases. *Crop Protection* 20: 1-11.
- 12 Rodriguez-Valera, F. B. and J. Garcia-Martinez, 2000. Sparcer online. *ASM News*.
13 66:712-713.
- 14 Romeiro, R. S. Bactérias Fitopatogênicas. ed. 1995. Viçosa: Editora UFV 283.
- 15 Romeiro, R. S. Bactérias Fitopatogênicas. ed 2005. Viçosa: Editora UFV 417.
- 16 Sikora, R. A. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems
17 for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of*
18 *Phytopathology* 30: 245-270.
- 19 Taylor, A. L. and J. N. Sasser. 1978. Biology, identification and control of root-knot
20 nematodes. Raleigh: North Carolina State University Graphics 111 pp.
- 21 Van Peer, R., G. J. Niemann, and B. Schippers. 1991. Induced resistance and
22 phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by
23 *Pseudomonas* sp. Strain WC-417r. *Phytopathology* 81: 728 p.

- 1 Wei, G., J. W. Kloepper and S. Tuzun. 1991. Induction of systemic resistance of
- 2 cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting
- 3 rhizobacteria. *Phytopathology* 81: 1508-1512.
- 4 Zuckerman, B. M. 1983. Hypotheses and possibilities of intervention in nematode
- 5 chemoresponses. *Journal of Nematology* 15: 173-183.

1 **Tabela 1.** Efeito de isolados bacterianos residentes de rizosfera no biocontrole de *Meloidogyne incognita* e efeito sobre a produtividade da
 2 variedade de cana-de-açúcar RB863129. 90 dias após inoculação do fitonematóide

Tratamento	Parte aérea		Raiz		Colmos		IG ¹	N° Galhas		Reprodução
	Peso (g)	Comprimento (cm)	Peso (g)	Comprimento (cm)	Numero	Diâmetro (cm)		0,5 -1,0 (cm)	1,0 – 2,0 (cm)	FR ²
Testem.	46.262 bc ³	179.40 bc	30.95 bcd	33.200 bc	7.400 ab	3.560 ab	5.00 a	25.60 a	4.20 ab	75.27 a
1BM	51.526 abc	195.20 abc	20.28 d	29.600 c	6.400 abc	3.080 bc	5.00 a	5.000 bcde	2.80 abcd	30.78 bcd
2BM	42.966 c	192.00 abc	30.13 cd	43.000 ab	6.800 abc	3.740 a	4.80 ab	2.400 bcde	0.60 cd	30.42 bcd
5B	58.694 abc	199.00 abc	51.51 ab	36.000 bc	6.600 abc	3.760 a	5.00 a	9.200 b	5.80 a	53.96 ab
6B	56.842 abc	171.00 c	20.34 d	39.800 abc	4.400 d	2.520 c	4.40 ab	2.600 bcde	0.80 cd	11.69 efg
15B	60.522 abc	188.40 abc	27.03 d	43.800 ab	5.200 cd	3.420 ab	4.20 abc	0.800 de	0.00 d	15.41 fg
38B	45.262 c	191.80 abc	30.19 cd	52.600 a	5.800 bcd	3.240 ab	3.40 cde	11.00 b	1.60 bcd	24.97cdef
39B	56.576 abc	203.00 ab	35.34 abcd	33.600 bc	7.200 ab	3.560 ab	3.00 ef	0.400 e	1.60 bcd	38.71 bc
44B	64.830 ab	187.00 abc	34.07 abcd	38.000 bc	6.400 abc	3.760 a	4.00 bcd	1.200 cde	1.20 abcd	11.23 fg
49B	66.118 ab	209.80 ab	47.47 abc	46.400 ab	8.000 a	3.760 a	2.40 f	3.000 bcde	2.00 abcd	13.42 defg
53B	59.606 abc	185.60 abc	35.44 abcd	40.600 abc	5.800 bcd	3.560 ab	3.20 def	11.20 bc	5.40 abc	15.25 defg
55B	60.708 abc	197.20 abc	57.30 a	46.600 ab	6.600 abc	3.720 a	4.40 ab	8.200 bcd	3.80 abc	28.31 bcde
101B	67.898 ab	214.40 a	36.09 abcd	33.200 bc	7.400 ab	3.620 ab	5.00 a	9.000 bc	2.80 abcd	16.11 defg
172B	65.078 ab	216.00 a	28.93 cd	38.000 bc	6.600 abc	3.200 ab	5.00 a	8.000 bcde	1.20 bcd	2.810 g
C.V.(%)	14.93303	12.30669	22.62123	12.7993	11.36150	13.69016	16.59362	55.26916	56.11562	36.70817

3 ¹ índice calculados de acordo com Taylor e Sasser (1978), IG= índice de galhas.

4 ² Fator de reprodução de acordo com Hussey e Barcker (1973).

5 ³ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados para $\sqrt{(X+0,5)}$.

CAPÍTULO 3

SELEÇÃO DE *Trichoderma* spp. COMO POTENCIAIS AGENTES DE
BIOCONTROLE PARA *Meloidogyne incognita* EM CANA-DE-AÇUCAR

1 *M. incognita* was evaluated through tests *in vitro* for hatching and mortality of juveniles
2 from eggs deposited in *Trichoderma* spp. filtrates, and the fungus parasitism to the egg.
3 For *Trichoderma* spp. the strains 3M, 8M, 17M and 225T and the strains 1M, 3M,
4 10M, 17M, 311T and 322 showed a high potential to control *M. incognita* significantly
5 reducing the gall index and nematode reproduction factor, respectively, in sugarcane. *In*
6 *vitro*, all the filtrates of *Trichoderma* spp. were effective in promoting juvenile
7 mortality. In assessments of nematode eggs, sixteen among twenty-two strains were
8 significant in relation to controls for parasitism of eggs with emphasis on strains 8M,
9 11M, 13M, 15M and 17M as the most promising. The strains 4M, 14M, A18 and 4077T
10 showed potential in enzymatic action and mortality of juveniles after hatching.

11 Key-word: Egg parasitism, root-knot nematode, *Saccharum*.

12 RESUMO

13 Freitas, M. A., E. M. R. Pedrosa, D. Laranjeira e L. M. P. Guimarães. 2011. Seleção de
14 *Trichoderma* spp. como potenciais agentes de biocontrole para *Meloidogyne incognita*
15 em cana-de-açúcar. Nematropica

16 A presente pesquisa teve por objetivo selecionar possíveis antagonista para o
17 controle de *Meloidogyne incognita* entre isolados de *Trichoderma* spp. pertencentes a
18 coleção de fungos da Universidade Federal Rural de Pernambuco e avaliar o potencial
19 de cada isolado na indução de resistência e promoção de crescimento em cana-de-açúcar
20 variedade RB863129. Dois dias antes da infestação do solo com a suspensão de esporos
21 de *Trichoderma* spp., plântulas de cana-de-açúcar com 30 dias tiveram o solo infestado
22 com 10000 ovos de *M. incognita*. As plantas foram arranjadas em delineamento
23 experimental inteiramente casualizado e mantidas em casa de vegetação à 24-36 °C.
24 Decorridos 90 dias da infestação do solo com o nematóide, foram determinados
25 comprimento e biomassa fresca da parte aérea e da raiz, número e diâmetro de nós,

1 índice de galhas e reprodução do nematóide. O efeito nematicida e nematostático de
2 *Trichoderma* spp. sobre *M. incognita* foi avaliado através de testes *in vitro* de
3 mortalidade e eclosão de juvenis em ovos depositados em filtrados dos isolados, e
4 parasitismo do fungo a ovos do nematóide. Para os isolados de *Trichoderma* spp., os
5 isolados 3M, 8M, 17M e 225T e os isolados 1M, 3M, 10M, 17M, 311T e 322
6 mostraram alto potencial para controle de *M. incognita* diminuindo significativamente o
7 índice de galhas e o fator de reprodução do nematóide, respectivamente, em cana-de-
8 açúcar. *In vitro*, todos os filtrados dos isolados de *Trichoderma* spp. mostraram-se
9 eficientes em promover mortalidade dos juvenis. Em avaliações em ovos de nematóides,
10 dos vinte e dois isolados dezesseis foram significativos em relação a testemunha para
11 parasitismo de ovos com destaque para aos isolados 8M, 11M, 13M, 15M, e 17M como
12 os mais promissores. Os isolados 4M, 14M, A18 e 4077T destacaram-se quanto a ação
13 enzimática, e mortalidade de juvenis após eclosão.

14 Palavras chave: Nematóide das galhas, parasitismo de ovos, *Saccharum*.

15 INTRODUÇÃO

16 A cana-de-açúcar tem especial significado econômico para o Brasil, que lidera a
17 lista dos 80 países produtores. Contudo, frequentemente a cultura sofre com o ataque de
18 pragas e doenças, reduzindo substancialmente a produtividade agrícola. Dentre as
19 doenças, as causadas por nematóides do gênero *Meloidogyne*, especialmente *M.*
20 *incognita*, destaca-se pela ampla distribuição e severidade dos sintomas (Bettiol e
21 Morandi, 2009). A busca por medidas alternativas tem levado os pesquisadores a
22 vislumbrar novos caminhos para um manejo integrado mais eficiente e duradouro. O
23 controle biológico destaca-se como um método promissor e o mais estudado (Bettiol,
24 1999; Nordlund, 1996; Romeiro, 1995). Exemplos de biocontrole de fitonematóides em

1 campo são poucos, apesar dos estudos com vários microrganismos (Freitas, 2003;
2 Sikora, 1992).

3 Diversos microrganismos, principalmente fungos habitantes do solo, têm
4 revelado potencial antagônico a diferentes fitopatógenos do solo, com destaque ao
5 gênero *Trichoderma*. A ação como antagonista ocorre devido a mecanismos de
6 antibiose, parasitismo e competição (Melo, 1998). Howell (1997) acrescenta a indução
7 de resistência do hospedeiro, além do favorecimento da planta à tolerância ao estresse
8 ambiental, solubilização e seqüestro de nutrientes inorgânicos e inativação de enzimas
9 dos patógenos. *Trichoderma* tem sido estudado por produzir uma série de enzimas
10 extracelulares (Menezes e Souza, 1995); degradar parede celular e por ser ativo na
11 produção de metabólitos extracelulares com atividade antimicrobiana (Melo, 1991) que,
12 segundo Harman *et al.* (2004), chegam a mais de 100.

13 Existem poucas informações sobre os mecanismos utilizados pelas espécies de
14 *Trichoderma* no controle de nematoides. Sahebani e Hadavi (2008) citam dois:
15 parasitismo direto de ovos e juvenis através do aumento da atividade de quitinases e
16 proteases, sendo esta um indicativo da capacidade de infectar ovos (Sharon *et al.* 2001;
17 Suarez *et al.*, 2004) e indução dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Enzimas
18 extracelulares tais como quitinase e protease com atividade anti-fúngica participam da
19 relação de interação de *Meloidogyne* spp. e *Trichoderma* sp. (Sharon, *et al.* 2001).

20 *Trichoderma* apresenta algumas características que são essenciais para um
21 agente de biocontrole: é inócuo ao ser humano e ao meio ambiente, possui estruturas de
22 reprodução de fácil propagação (Spiegel e Chet, 1998), principalmente em substratos
23 naturais, e apresenta meia vida de prateleira quando formulado e com boa viabilidade
24 (Melo, 1996). Segundo Bettiol e Morandi (2009), 13 empresas produzem e comercializam
25 produto formulado à base de isolados de *Trichoderma*, as quais estão localizadas,

1 principalmente, no Centro-Sul do Brasil. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi
2 selecionar entre os isolados de *Trichoderma* spp. possíveis antagonistas para o controle
3 biológico de *M. incognita* em cana-de-açúcar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

5 A pesquisa foi desenvolvida na Universidade Federal Rural de Pernambuco,
6 laboratório e casa de vegetação. A variedade de cana-de-açúcar estudada foi RB863129,
7 desenvolvida pelo Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar, RIDESA
8 (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro). As mudas
9 foram obtidas do cultivo por micropropagação da biofábrica Governador Miguel Arraes
10 do CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste), Recife-PE. As
11 populações do inóculo, de *M. incognita*, foram obtidas de áreas produtoras de cana-de-
12 açúcar no litoral norte do estado de Pernambuco, e mantidas em vasos cultivados com
13 plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Santa Cruz durante todo o
14 período do experimento. A confirmação específica foi realizada por eletroforese de
15 isoenzimas (Carneiro et al., 1993) de fêmeas adultas e a determinação da raça por
16 hospedeiros diferenciadores (Hartman e Sasser, 1985).

17 Para obtenção do inóculo nematológico foram feitas extrações de ovos das
18 plantas de tomateiro, utilizando-se a metodologia descrita por Hussey e Barker (1973) e
19 ajuste da concentração em câmara de Peters sob microscópio óptico. Para inóculo de
20 *Trichoderma* spp. foram utilizados sacos plásticos de polipropileno transparentes com
21 capacidade de 2L, contendo 100g de grãos de arroz parbolizados, umedecidos com 40
22 mL de água destilada previamente esterelizada em autoclave por 30 minutos a 120 °C.
23 O substrato foi inoculado com 10 ml de uma suspensão de 10^7 esporos/ml de
24 *Trichoderma* spp., e incubado em câmara de crescimento com temperatura de 25 °C por
25 sete dias.

1 Para o estudo da capacidade de cada isolado como provável antagonista, plantas
2 de cana-de-açúcar com idade de 30 dias, cultivadas em vasos com capacidade para 5 L,
3 contendo solo esterilizado, foram inoculadas com 10000 ovos de *M. incognita* por
4 planta, depositados em quatro perfurações de 2 cm de profundidade ao redor do colo da
5 planta. A aplicação do fungo ocorreu dois dias antes da inoculação do nematóide,
6 depositando-se em cada vaso 5 g do substrato colonizado pelo fungo, triturado e
7 homogeneizado. Para o controle foi utilizado 0,5 g de arroz não inoculado com 10000
8 ovos/J₂ por planta. As plantas foram mantidas em casa de vegetação a uma temperatura
9 média mínima de 25°C, média máxima de 36°C. O delineamento experimental foi do
10 tipo inteiramente casualizado, com 23 tratamentos que consistiram de 22 isolados de
11 *Trichoderma* spp. e testemunha, com cinco repetições. Após 90 dias da inoculação do
12 nematóide, foi determinado o comprimento e a biomassa fresca da parte aérea e da raiz,
13 numero e diâmetro de nós, o índice de galhas e o fator de reprodução do fitonematóide
14 (FR). Para estimativa do índice de galhas foi utilizado a escala de notas do
15 “International *Meloidogyne* Project” (Taylor e Sasser, 1978). Paralelamente as galhas
16 com 0,5 a 1,0 e 1,0 a 2,0 cm de comprimento foram enumeradas.

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

1 Para o teste de mortalidade de J₂, seguiu-se a metodologia modificada e adaptada
2 descrita por Silva *et al.* (2002). A suspensão de J₂ foi obtida a partir da câmara de
3 eclosão com papel Kleenes. Dessa suspensão foram pescados 35 nematoides e
4 colocados juntamente com 80 µl dos filtrados e 20 µl da suspensão do nematoide por
5 ependorf. Cada tratamento foi constituído por quatro repetições. Os antagonistas foram
6 crescidos nos meios CzapekDox e BDA, em placas à 25 °C, no escuro, e a avaliação da
7 mortalidade realizada após 24 horas. Para o teste de eclosão, a suspensão de ovos foi
8 obtida conforme metodologia de Hussey e Baker (1973) colocando-se 40 ovos por
9 ependorf. A avaliação foi realizada no 14º dia tomando-se os primeiros 35 ovos e/ou
10 juvenis.

11 Para o teste de parasitismo de *Trichoderma* spp. em ovos de *M. incognita*, os
12 ovos foram extraídos manualmente a partir de massas de ovos e colocados em tubo de
13 ensaio com solução de hipoclorito de sódio 0,5%, agitados manualmente por um
14 minuto. Os ovos foram desinfestados com estreptomicina 1% e mercaptaetanol 0,1%,
15 durante quatro minutos, lavados em água esterilizada e coletados com micropipetas. Em
16 lâmina de vidro foram dispostos dois discos de Agar 1%, com diâmetro de 10 mm,
17 contendo 20 ovos no disco da direita e 20 no da esquerda, conforme metodologia
18 descrita por Carneiro e Gomes (1993). As avaliações foram realizadas após 15 dias,
19 determinando o numero de ovos parasitados, escurecidos devido ação enzimática e
20 numero de juvenis vivos e mortos.

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

1 5% de probabilidade. Os experimentos foram repetidos para confirmação dos resultados
2 obtidos com os organismos promissores.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 Dos 22 isolados de *Trichoderma* avaliados, dois se destacaram com aumento
5 significativos de peso da biomassa da parte aérea das plantas, 12T e A18,
6 proporcionando ganhos na ordem de 51.49 e 70.79 % em relação à testemunha (Tabela
7 1). Para comprimento da parte aérea quatro isolados se destacaram com aumento
8 significativos em relação a testemunha: 1M, 11M, 225T, e A18. Esse aumento em
9 peso/comprimento da planta deve estar associado ao fato de *Trichoderma* spp. favorecer
10 a tolerância da planta ao estresse ambiental, solubilização e seqüestro de nutrientes
11 inorgânicos, e inativação de enzimas dos patógenos que alteram o desenvolvimento
12 normal das plantas (Harman, 2000).

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

21 Com relação ao sistema radicular, apenas o isolado 311T apresentou diferenças
22 significativa no peso da biomassa fresca quando comparado à testemunha. Os isolados
23 2M, 8M e 12T promoveram aumento significativo no comprimento das raízes,
24 proporcionando acréscimos de 44.60, 70.48, 48.19%, respectivamente, em relação à
25 testemunha. Sabe-se que na presença de baixas densidades do nematóide, as raízes

1 desenvolve-se mais. Além do mais, há formação de raízes laterais na tentativa de
2 melhorar a absorção de água e nutrientes (Carneiro, 2003). Em relação ao número de
3 nós, os isolados não diferiram da testemunha, exceto 14M e 15M, que apresentaram
4 valores significativamente menor (Tabela 1). Ao contrário, os isolados 15M e A18
5 apresentaram diâmetro do nó significativamente maior do que a testemunha.

6 O índice de galhas das plantas inoculadas com a maioria dos isolados dos fungos
7 foi alto (Tabela 1), embora 18.18% dos isolados tenham diferido significativamente da
8 testemunha. Quatro isolados se destacaram promovendo redução significativa no
9 número de galhas: 3M, 8M e 17M, caracterizando reação de resistência segundo Taylor
10 e Sasser (1978), por apresentarem valores para índice de galha inferiores a 3. Vinte um
11 dos 22 isolados apresentaram baixo número de galhas entre 0,5 e 1,0 cm em relação à
12 testemunha, com destaque para 17M, 311T e 8M, muito embora o isolado 311T tenha
13 apresentado índice de galhas 4,2 devido ao elevado número de galhas com 0,1 a 0,5 cm
14 de comprimento. Para o número de galhas entre 1,0 e 2,0 cm, quatro isolados: 2M, 8M,
15 12T e 17M apresentaram diferença significativa em relação à testemunha. A redução do
16 número de galhas não apresentou relação com o acréscimo no comprimento e peso da
17 biomassa da parte aérea ou raiz.

18 Seis isolados destacaram-se em diminuir significativamente a reprodução de *M.*
19 *incognita*: 1M, 3M, 10M, 17M, 311T e 322. O isolado 8M, embora com reduzido
20 número de galhas, não inibiu a reprodução do nematóide, não se mostrando eficiente
21 para o manejo do nematóide. Entre as possíveis causas para redução está a produção de
22 metabólitos tóxicos, característica muito explorada no controle biológico de
23 fitopatógenos pelo gênero *Trichoderma* (Howell, 2003). O comportamento desse fungo
24 como antagonista é essencial para uso efetivo em biocontrole, pois pode atuar por
25 diversos vários mecanismos (Küçük e Kivanç, 2003). *Trichoderma* spp. têm a

1 capacidade de competir por sítios de infecção e usar nutrientes disponíveis, podendo
2 impedir a germinação de propágulos do patógeno ou infecção (Punja e Utkhrde, 2003).
3 As espécies de *Trichoderma* são geralmente consideradas competidoras agressivas,
4 apresentando rápido crescimento e colonização, excluindo muitos patógenos. A
5 eficiência da inibição do fitopatógeno pelo *Trichoderma* parece estar também
6 relacionada a altas taxas e acumulação de CO₂ realizadas pelo antagonista (Marchetti *et*
7 *al.*, 1992).

8 Como *Trichoderma* spp. atua no ciclo de vida dos nematóides e quais os
9 mecanismos de ação envolvidos ainda são pouco esclarecidos. Presume-se, no entanto,
10 que envolva produção de toxinas, modificações dos exsudados radiculares reduzindo a
11 eclosão de ovos, atração e reconhecimento do hospedeiro e a indução de resistência
12 sistêmica (Oostendorp e Sikora, 1990). Segundo Harman *et. al.* (2004), *Trichoderma* sp.
13 compete pelos exsudatos liberados pelas sementes no processo de germinação que
14 inibem a eclosão de ovos por falta de estímulo. De acordo com Howell (2003), a
15 competição é uma das principais características de isolados de *Trichoderma* usados
16 como agentes de biocontrole, pois somente assim terão capacidade de se desenvolver na
17 rizosfera. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com Sharon *et. al.*
18 (2001) que relataram que o uso de *Trichoderma* foi efetivo contra patógenos
19 radiculares, a exemplo de *Meloidogine* sp. Campos (1994) relatou redução de 61% no
20 número de ovos desse fitonematóide após a aplicação do fungo, em casa de vegetação.
21 Resultados similares foram observados quando outras espécies de *Meloidogyne* foram
22 estudadas (De Leij e Kerry, 1991; Lopes *et al.*, 2007).

23 O teste de mortalidade de J₂ *in vitro* quando em contato com filtrado de
24 *Trichoderma* spp. mostrou que todos os isolados foram eficientes em promover
25 mortalidade dos juvenis, após 24 horas, diferindo significativamente da testemunha

1 (Tabela 2). Verificou-se alteração do pH dos filtrados, no entanto sem efeito direto na
2 mortalidade, por constatar que 11 tratamentos, 2M, 6M, 8M, 10M, 12T, 13M, 14M,
3 17M, 322, 4077 e A18, apresentavam pH= 8, não diferindo da testemunha. Resultados
4 semelhantes foram obtidos por Santin (2008) com J₂ de *M. incognita*, em que 100% dos
5 juvenis foram mortos. Devrajan e Seenivasan (2002) mencionam que filtrados deste
6 fungo possuem efeito tóxico sobre adultos de *Meloidogyne* sp. Costa (2001) trabalhando
7 com diferentes isolados fúngicos, também observou que todos os filtrados apresentaram
8 atividade tóxica contra *M. incognita*, obtendo 98% de J₂ imóveis, 98% de J₂ mortos e
9 apenas 3% de eclosão de J₂.

10 Dezesesseis isolados mostraram eficiência significativa em parasitar ovos, de *M.*
11 *incognita*, com destaque para 8M, 11M, 13M, 15M e 17M (Tabela 3). Resultados
12 semelhantes foram encontrados por Ferreira e Ferraz (2008), que relatam que dos nove
13 isolados de *Trichoderma* spp. testados, todos foram capazes de parasitar ovos do
14 nematóide e diferiram significativamente do grupo testemunha. Eapen *et al.* (2005)
15 também relataram parasitismo por espécies de *Trichoderma* spp. a ovos de *M.*
16 *incognita*, que variam de 10 a 25%. Segundo Stirling (1991) os fungos são os agentes de
17 biocontrole mais estudados para nematóides, por apresentarem estratégias sofisticadas
18 para infecção ou capturar dos nematóides, atuando como predadores, endoparasitas,
19 oportunistas (parasita de ovos e fêmeas) e produzindo metabólitos tóxicos.

20 Os resultados aqui obtidos demonstram que outro mecanismo de ação do fungo
21 seria pela mortalidade do embrião, com escurecimento dos ovos devido ação enzimática
22 (Tabela 3). Dezoito isolados apresentaram diferença significativa em relação à
23 testemunha, com destaque aos isolados 14M e A18. Para os juvenis que eclodiram, sete
24 isolados se mostraram eficientes em promover mortalidade quando comparados à
25 testemunha, os isolados: 2M, 3M, 4M, 5M, 10M, 225T E 4077, com destaque para

1 4077T e 4M. Fungos do gênero *Trichoderma* são produtores de enzimas e metabolitos
2 tóxicos (Papaviza, 1985). Muitas espécies de *Trichoderma* são conhecidas produtoras
3 de diversos metabólitos secundários, voláteis e não voláteis, com amplo espectro de
4 atividade antimicrobiana (Punja e Utkhede, 2003). Essas espécies podem secretar
5 diversos antibióticos como as pironas, isocianatos, tricotecenos, dentre outros
6 (Schirmbock et al, 1994).

7 Os resultados obtidos permitiram concluir que os isolados 1M, 3M, 10M, 17M,
8 311T e 322 mostraram alto potencial para controle de *M. incognita* diminuindo
9 significativamente a reprodução do nematóide, em cana-de-açúcar. *In vitro*, todos os
10 filtrados dos isolados de *Trichoderma* spp. mostraram-se eficientes em promover
11 mortalidade dos juvenis e os isolados em parasitar ovos do nematóide com destaque
12 para os isolados 8M, 11M, 13M, 15M, e 17M como os mais promissores. Para
13 caracterização das espécies dos isolados foi realizada análise da região intergenica
14 16S/23S (ITS) por restrição do DNA ribossomal amplificado, que constitui uma
15 excelente ferramenta para a identificação ao nível de espécies (Rodriguez-Valera e
16 Garcia-Martinez, 2000). Para efeito de comparação as seqüências obtidas foram
17 alinhadas e depositadas no GenBank-EMBL (Dados não mencionados).

18 LITERATURA CITADA

- 19 Bettiol, W. 1999. Controle biológico de doenças. Ação Ambiental. 2: 30-33.
- 20 Bettiol, W., R. Ghini, R. R. L. Mariano, S. J. Michereff, L. P. V. Mattos, I. C. M.
21 Alvarado, and Z. V. Pinto. 2009. Supressividde a fitopatógenos habitantes do solo.
22 Pp. 187-208. *In*: W, Bettiol,. and M. A. B. Morandi, eds. Biocontrole de doenças de
23 plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente.
- 24 Bettiol, W. and Morandi, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e**
25 **perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 187-208, 2009.

- 1 Campos, H. D. 1994. Controle de *Meloidogyne incognita* raça 2 em feijoeiro e
2 *Meloidogyne exigua* em cafeeiro com fungos predadores e parasitas de ovos de
3 fitonematóides. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura de Lavras,
4 Lavras, Brasil. 67 pp.
- 5 Carneiro, R. M. D. G. and C. B. Gomes. 1993. Metodologia e teste de patogenicidade
6 de *Paecilomyces lilacinus* e *P. fumosoroseus* em ovos de *Meloidogyne javanica*.
7 Nematologia Brasileira 7: 66-75.
- 8 Costa, M. J. N. 2001. Toxicidade de filtrados fungicos a *Meloidogyne incognita*.
9 Fitopatologia Brasileira 26: 749-755.
- 10 De Leij, F. A. A. M. and Kerry, B. R. 1991. The fungus *Verticillium chlamydosporium*
11 as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. Revué de
12 Nematologie 14: 157-164.
- 13 Devrajan, K. and Seenivasan, N. 2002. Biochemical changes in banana roots due to
14 *Meloidogyne incognita* infected with *Paecilomyces lilacinus*. 1. Current
15 Nematology, Bigleswade 13: 1-5.
- 16 Eapen, S. J., B. Beena and K. V. Ramana. 2005. Tropical soil microflora of spice-based
17 cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. Journal of
18 Invertebrate Pathology 88: 218-225.
- 19 Ferreira, P. A. and S. Ferraz. 2008. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por
20 fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. 3.
21 Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas 2: 17.
- 22 Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol – Changes in perceptions derived
23 from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84: 377-392.

- 1 Harman, G. E., C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet, and M. Lorito. 2004. *Trichoderma*
2 species – opportunistic, avirulent plant symbionts. 1. Nature Reviews Microbiology
3 2: 43- 56.
- 4 Hartman, K. M. and J. N. Sasser. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the
5 basis of differential host test and perineal pattern morphology. Pp. 69-77. In: K. R.,
6 Barker, C. C., Carter and J. N. Sasser, eds. An advanced treatise on *Meloidogyne*:
7 methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics.
- 8 Howell, C. R. 1997. Field control of cotton seedling diseases with *Trichoderma virens*
9 in combination with fungicide seed treatments. 1. Journal of Cotton Science 1: 15-20.
- 10 Howell, C. R. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological
11 Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. 1. Plant
12 Disease, 87: 4-10.
- 13 Hussey. R. S. and K. Baker. 1973. A Comparison of methods for collecting inocula of
14 *Meloidogyne* spp. Including a new technique. Plant Disease Reporter 57: 1025-1028.
- 15 Küçük, Ç. and M. Kivanç. 2003. Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of
16 their antifungal, biochemical and physiological features. Turk. J. Biol., 27: 247-253.
- 17 Lopes, E. A., S. Ferraz, P. A. Ferreira, L. G. Freitas, O. D. Dhingra, C. G. Gardiano and
18 S. L. Carvalho. 2007. Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de
19 *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira 31: 78-84.
- 20 Marchetti, R., P. Nipoti, N. D'ercole and M. E. Guerzoni. 1992. Competition at
21 atmosphere level as biocontrol mechanism in *Trichoderma* spp. Petria 2: 137-47.
- 22 Melo, I. S. 1991. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle
23 biológico de doenças de plantas. Pp. 130-177. In: W. Bettiol. Controle biológico de
24 doenças de plantas. Jaguariúna, SP: EMBRAPA-CNPDA.

- 1 Melo, I. S. 1996. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. Revisão
2 Anual de Patologia de Plantas 4: 261-295.
- 3 Melo, I. S. 1998. Agentes Microbianos de Controle de Fungos Fitopatogênicos. Pp.17-
4 67. *In*: Melo, I. S. and J. L. Azevedo, eds. Controle Biológico. 1. Jaguariúna:
5 Embrapa Meio Ambiente.
- 6 Menezes, M. and E. E. B. Souza. 1995. Avaliação de isolados de *Trichoderma* através
7 da análise eletroforética em gel de poliacrilamida. Suplemento da Fitopatologia
8 Brasileira 20.
- 9 Nordlund, D. A. 1996. Biological control, integrated pest management and conceptual
10 models. *Biocontrol News and Information* 17: 35-44.
- 11 Oostendorp, M. and R. A. Sikora. 1990. *In vitro* interrelationships between rhizosphere
12 bacteria and *Heterodera schachtii*. *Review of Nematology* 14: 269-274.
- 13 Papaviza, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for
14 biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23:23-54.
- 15 Punja, Z. K. and R. S., Utkhede, 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop
16 diseases. *Trends in Biotechnology* 21: 400-407.
- 17 Rodriguez-Valera, F. B. and J. Garcia-Martinez, 2000. Sparcer online. *ASM News*.
18 66:712-713.
- 19 Romeiro, R. S. 1995. Bactérias Fitopatogênicas. Editora UFV. 283, Viçosa, MG
- 20 Romeiro, R. S. 1999. Indução de resistência em plantas a patógenos. Editora UFV. 45,
21 Viçosa, MG.
- 22 Sahebani, N. and N. Hadavi, 2008. Biological control of the root-knot nematode
23 *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biol. Biochem* 40: 2016–
24 2020.

- 1 Santin, R. C. M. 2008. Pontencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces*
2 *lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris*. Tese de
3 Doutorado em Fitotecnia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
4 Brasil. 92 pp.
- 5 Schirmbock, M., M. Lorito, Y. L. Wang, C. K. Hayes, I. Arisan-Atac, F. Scala, G. E.
6 Harman, and C. Kubicek. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic
7 enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the
8 antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi.
9 *Applied Environmental Microbiology*, 60: 4363-4370.
- 10 Sharon, E., M. Bar-Ar-Eyal, I. Chet, A. Herrera-Estrella, O. Okleifeld and Y. Spiegel,
11 Y. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by
12 *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 91: 687-693.
- 13 Sikora, R. A. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems
14 for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of*
15 *Phytopathology* 30: 245-270.
- 16 Silva, G. S., I. M. R., Souza and F. A. Cutrim. 2002. Efeito da incorporação de
17 sementes trituradas de feijão de porco ao solo sobre o parasitismo de *Meloidogyne*
18 *incognita* em tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 27: 412-413.
- 19 Spiegel, Y. and I. Chet. 1998. Evaluation of *Trichoderma* spp. as biocontrol agent
20 against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. *Integrated Pest*
21 *Management Reviews*, Israel, 3: 169-175.
- 22 Stirling, G. R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems
23 and prospect. Wallingford: CAB International. 282 pp.
- 24 Suarez, B., M. Rey, M.; P. Castillo, E. Monte and A. Llobello. 2004. Isolation and
25 characterization of PRA1, a trypsinlike protease from the biocontrol agent

- 1 *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. Applied
- 2 Microbiology and Biotechnology 65: 46-55.
- 3 Taylor, A. L. and J. N. Sasser. 1978. Biology, identification and control of root-knot
- 4 nematodes (*Meloidogyne* species). Raleigh, North Carolina State University
- 5 Graphics, 111p.

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

Tratamento	Parte aérea		Raiz		Colmos		Nº Galhas	Reprodução		
	Peso (g)	Comprimento (cm)	Peso(g)	Comprimento (cm)	Numero	Diâmetro (cm)		IG ¹	0,5 -1,0 (cm)	1,0 – 2,0 (cm)
Testemunha	46.26 cd ³	179.40 de	30.95 bcd	33.20 de	7.40 abc	3.56 cdef	5.00 a	25.60 a	4.20 bcd	75.27 abc
1M	62.93 abc	210.00 ab	29.13 cd	33.40 cde	5.80 cd	3.72 bcde	4.00 ab	2.00 efg	1.80 bcdef	24.86 defg
2M	46.73 cd	176.00 e	34.45 bcd	48.01 ab	7.20 abcd	3.62 cde	4.60 ab	4.00 cdef	0.60 ef	47.94 bcdef
3M	49.33 bcd	194.40 abcde	27.43 cd	43.22 abcd	8.40 ab	2.98 f	2.40 de	7.00 bcd	4.00 bcd	13.40 efg
4M	63.03 abc	197.20 abcde	27.55 cd	33.20 de	6.60 abcd	3.58 cdef	4.80 ab	5.40 cde	2.80 bcdef	51.67 bcdef
5M	56.29 bcd	200.00 abcd	29.70 bcd	39.20 bcde	5.40 cd	3.78 abcd	5.00 a	8.60 bcd	14.8 a	31.20 bcdefg
6M	46.44 cd	179.00 de	36.21 bcd	38.60 bcde	5.60 cd	3.66 cde	5.00 a	12.60 bcd	6.60 bc	19.96 cdefg
8M	42.63 d	180.60 de	41.35 abc	56.60 a	5.80 cd	3.78 abcd	2.80 cd	0.40 fg	0.20 f	189.82 a
9M	58.07 bcd	198.20 abcde	26.87 cd	38.20 bcde	6.00 cd	3.72 bcde	5.00 a	10.20 bc	5.20 bcde	47.94 bcdef
10M	57.90 abcd	198.12 abcde	39.52 abc	39.20 bcde	5.60 cd	3.92 abcd	4.80 ab	1.20 efg	2.60 bcdef	25.09 defg
11M	49.48 bcd	203.40 abc	24.63 cd	47.00 abcd	7.00 abcd	3.14 ef	4.60 ab	9.60 bc	5.60 bc	38.46 bcdefg
12T	70.08 ab	200.40 abcd	30.56 bcd	49.20 abc	5.80 cd	3.86 abc	4.40 ab	3.00 defg	0.60 f	44.39 bcdefg
13M	56.05 bcd	198.40 abcde	29.54 cd	34.80 bcde	6.00 cd	3.48 cdef	5.00 a	5.80 cdef	6.00 b	28.89 cdefg
14M	54.69 bcd	189.00 bcde	13.73 bcd	39.40 bcde	5.20 d	3.66 cde	5.00 a	5.40 cde	3.00 bcdef	76.41 ab
15M	62.18 abc	200.20 abcd	22.14 d	29.60 e	5.20 d	4.38 a	5.00 a	4.20 cdef	1.60 bcdef	43.97 bcde
17M	49.54 cd	185.00 cde	40.23 abc	36.60 bcde	6.60 abcd	3.74 bcde	1.60 e	0.00 g	0.60 f	8.71 g

223	49.33 bcd	194.40 abcde	27.43 cd	43.22 abcd	8.40 ab	2.98 f	4.00 ab	15.00 ab	4.00 bcd	41.40 bcdefg
225T	59.98 abcd	211.80 a	41.97 abc	41.60 abcd	6.40 abcd	3.20 def	3.80 bc	3.80 defg	2.00 bcdef	53.12 bcd
311T	51.93 bcd	201.40 abcd	59.91 a	38.28 bcde	6.00 cd	3.50 cdef	4.20 ab	1.00 efg	1.60 bcdef	12.99 fg
322	58.14 abcd	193.40 abcde	28.53 cd	45.00 abcd	8.60 a	3.76 abcde	5.00 a	8.60 bcd	1.80 cdef	36.38 defg
4077T	53.86 bcd	193.60 abcde	27.53 cd	33.80 cde	6.20 bcd	3.70 cde	4.88 ab	4.20 cdef	3.20 bcdef	36.95 bcdefg
A18	79.01 a	204.60 abc	48.59 ab	36.00 bcde	6.20 bcd	4.34 ab	5.00 a	4.40 cdef	1.00 def	39.01 bcdefg
CR	57.16 abcd	190.40 abcde	23.08 d	32.20 de	7.20 abcd	3.60 cdef	4.80 ab	6.40 cde	6.20 bcd	50.80 bcd
C.V.(%)	14.10215	13.83743	21.45964	13.83743	12.20738	13.57895	19.5978	45.83078	50.13990	22.2106

1 ¹Índice calculados de acordo com Taylor e Sasser (1978). IG = Índice de Galhas.

2 ²Fator de reprodução de acordo com Hussey e Barcker (1973), médias seguidas pela letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste LSD ao nível de 5%. Dados transformados para $\log(x+1)$.

4 ³Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste LSD ao nível de 5%. Dados transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$.

1 **Tabela 2.** Efeito do filtrado de *Trichoderma* spp. quando em contato com ovos de
 2 *Meloidogyne incognita*

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

3 ¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste LSD ao nível de 5%.

4 Dados transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$.

1 **Tabela 3.** Efeito de *Trichoderma* spp. quando em contato com ovos de *Meloidogyne*
 2 *incognita*

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

3 ¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste LSD ao nível de 5%
 4 de probabilidade de $\sqrt{(x+0,5)}$

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que:

- ✓ Os isolados de rizobacterianos 38B, 39B, 44B, 49B e 53B mostraram alto potencial para controle de *M. incognita* diminuindo significativamente o fator de reprodução e índice de galha do nematóide em cana-de-açúcar;
- ✓ Para promoção de crescimento os isolados 101B e 172B foram significativos em relação a testemunha e positivos para colonização de raízes *in vitro*, caracterizando-os com bactérias promotoras de crescimento (PGPR);
- ✓ Os isolados 3M, 8M, 17M e 225 T e os isolados 1M, 3M, 10M, 17M, 311T e 322 mostraram alto potencial para controle de *M. incognita* diminuindo significativamente o índice de galhas e o fator de reprodução do nematóide, respectivamente, em cana-de-açúcar;
- ✓ Todos os filtrados de *Trichoderma* spp. foram eficientes em promover mortalidade dos juvenis *In vitro*;
- ✓ Em avaliações em ovos de nematóides, dos vinte e dois isolados, dezesseis foram significativos em relação a testemunha para parasitismo de ovos com destaque aos isolados 8M, 11M, 13M, 15M, e 17M como os mais promissores.