

MARCELO MAGALHÃES COUTINHO

**UTILIZAÇÃO DE *Pochonia chlamydosporia* E FARINHA DE
SEMENTES DE MAMÃO (*Carica papaya* L.) PARA O CONTROLE
DE *Meloidogyne javanica***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

MARCELO MAGALHÃES COUTINHO

**UTILIZAÇÃO DE *Pochonia chlamydosporia* E FARINHA DE
SEMENTES DE MAMÃO (*Carica papaya* L.) PARA O CONTROLE
DE *Meloidogyne javanica***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 10 de março de 2008

Prof. Silamar Ferraz
(Co-Orientador)

Prof. Rosângela D'Arc de Lima
Oliveira
(Co-Orientadora)

Dr. Trazilbo José de Paula Júnior

Dr. Everaldo Antônio Lopes

Prof. Leandro Grassi de Freitas
(Orientador)

“Uma mente que se abre para uma nova idéia nunca volta para o seu tamanho normal..”

(Albert Einstein)

Aos meus pais pelo amor, pelo carinho e pela dedicação durante todos os
momentos.
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela vida e por me dar forças nos momentos difíceis desta caminhada.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar este Curso de Mestrado.

Aos professores do Departamento pelos ensinamentos, em especial ao meu orientador Prof. Leandro Grassi de Freitas pela confiança, incentivo e, sobretudo, amizade durante estes sete anos de convivência.

Aos meus conselheiros, Prof. Silamar Ferraz e Prof.^a Rosângela, pelas críticas e sugestões durante a elaboração deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa durante o período de pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pelo apoio e financiamento de parte deste trabalho.

À Tropical Indústria de Alimentos S/A (Tial) pela concessão das sementes de mamão utilizadas nos experimentos.

À minha turma de mestrado 2006, em especial, ao Capucho, Geraldo, Peixe e Robertinho.

À “família” do Laboratório de Nematologia que me acolheram como mais um de seu membro. Em especial a Cléia, pela amizade e festas realizadas em sua casa; a Deisy pela amizade; ao Everaldo, pelos ensinamentos estatísticos, além da parceria no futebol da quarta; ao Paulinho, pela amizade e pelas “fugidas” para dar uma voltinha a cavalo; a Rosangela, pela amizade e trocas de artigos; e é claro, a Waninha, que me incentivou e me ajudou muito nestes anos. Não posso deixar de agradecer aos que já passaram e conviveram comigo no laboratório e também aos recém chegados; Janaína, Alessandro, Fernanda, Guilherme, Larissa, Marilene, Ronaldinho e Vanessa.

À “diretoria”, pelos momentos de descontração vividos nestes últimos anos.

Aos meus pais, Otacilio e Ivanete, pelo amor, pelo carinho, pela vibração e pelo apoio.

À minha irmã Luciana, pelo apoio e pela amizade.

À Talyta, pelo amor, pelo companheirismo, pela dedicação e pela ajuda da formatação desta dissertação.

À “Sagrada Família”, pelos momentos de alegrias vividos durante os encontros familiares, em especial, ao Tio Acelino por mostrar o caminho da Fitopatologia, acreditar no meu trabalho e me incentivar a seguir nesta área profissional.

A todos os meus amigos que mesmo indiretamente me apoiaram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

MARCELO MAGALHÃES COUTINHO, filho de Otacilio Leandro Coutinho e Ivanete Magalhães Coutinho, nasceu em 17 de dezembro de 1980, em Viçosa, Estado de Minas Gerais.

Em 2001, iniciou o Curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), quando foi bolsista de Iniciação Científica no Departamento de Fitopatologia, sob a orientação do Professor Leandro Grassi de Freitas.

Em maio de 2006, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Fitopatologia da UFV, sob a orientação do Professor Leandro Grassi de Freitas, submetendo-se à defesa da dissertação em março de 2008.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
LITERATURA CITADA	4
CAPÍTULO - 1	7
Avaliação da dose mínima efetiva de farinha de sementes de mamão (<i>Carica papaya</i> L.) em solo coberto ou não para o controle de <i>Meloidogyne javanica</i>	7
Resumo	7
Summary	9
1. Introdução	11
2. Material e Métodos	13
2.1. Obtenção do inóculo	13
2.2. Obtenção da farinha de sementes de mamão (FSM)	13
2.3. Efeito da dose mínima de farinha de sementes de mamão para uso no controle de <i>M. javanica</i> em solo coberto ou não com plástico	13
2.3.1. Bioensaios em casa de vegetação	13
2.3.2. Bioensaio em câmara de crescimento	14
2.4. Delineamento experimental e análises estatísticas	14
3. Resultados e Discussão	15
4. Literatura Citada	22
CAPÍTULO - 2	25
Efeito de <i>Pochonia chlamydosporia</i> e de farinha de sementes de mamão para o controle de <i>Meloidogyne javanica</i>	25
Resumo	25
Summary	Erro! Indicador não definido.
1. Introdução	28
2. Material e Métodos	30
2.1. Produção do nematóide para inóculo	30

2.2. Efeitos da incorporação de farinha de sementes de mamão (FSM) e de <i>P. chlamydosporia</i> , aplicado na forma de clamidósporos, sobre <i>M. javanica</i> _____	30
2.2.1. Produção dos clamidósporos de <i>P. chlamydosporia</i> _____	30
2.2.2. Bioensaio em casa de vegetação _____	31
2.3. Efeito da incorporação de fibra de coco colonizada por <i>P. chlamydosporia</i> e de farinha de sementes de mamão sobre <i>M. javanica</i> _____	32
2.3.1. Produção do inóculo do fungo na fibra de coco _____	32
2.3.2. Bioensaio em casa de vegetação _____	32
2.4. Delineamento experimental e análises estatísticas _____	33
3. Resultados e Discussão _____	34
4. Literatura Citada _____	42
 CAPÍTULO - 3 _____	 46
Avaliação de isolados de bactérias e de <i>Trichoderma</i> spp. obtidos de solos tratados com farinha de sementes de mamão para o controle de <i>Meloidogyne javanica</i> _____	46
Resumo _____	46
Summary _____	48
1. Introdução _____	49
2. Material e Métodos _____	51
2.1. Produção do inóculo do nematóide _____	51
2.2. Isolamento de rizobactérias do solo tratado com farinha de sementes de mamão (FSM) com potencial de controle sobre <i>M. javanica</i> _____	51
2.3. Seleção massal de bactérias de solo tratado com farinha de sementes de mamão com potencial para o controle de <i>M. javanica</i> _____	52
2.4. Isolamento de <i>Trichoderma</i> spp. de solos tratados com FSM e o seu potencial para o controle de <i>M. javanica</i> _____	52
2.5. Seleção de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. para o controle de <i>M. javanica</i> _____	53
2.5.1. Ensaio 1 _____	53
2.5.2. Ensaio 2 _____	53

2.6. Delineamento experimental e análise estatística	53
3. Resultados e Discussão	54
4. Literatura Citada	60
Conclusões Gerais	63

RESUMO

COUTINHO, Marcelo Magalhães, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2008. **Utilização de *Pochonia chlamydosporia* e farinha de sementes de mamão para o controle de *Meloidogyne javanica*.** Orientador: Leandro Grassi de Freitas. Co-Orientadores: Silamar Ferraz e Rosângela D'Arc de Lima Oliveira.

O uso indiscriminado de nematicidas, além de onerar o custo de produção, pode colocar em risco a saúde dos aplicadores, dos consumidores e contaminar o meio ambiente. Desta forma, métodos alternativos para o manejo de nematóides são cada vez mais desejáveis, tais como o uso de fungos nematófagos aliado à incorporação de matéria orgânica. Os objetivos do presente trabalho foram avaliar a dose mínima efetiva de farinha de sementes de mamão (FSM) em biofumigação ou não, para o controle de *M. javanica*; testar o efeito de *Pochonia chlamydosporia*, aplicado na forma de clamidósporos ou de fibra de coco colonizada, juntamente com diferentes doses de FSM sobre *M. javanica* e verificar o efeito de fungos e bactérias, isolados de solos tratados com FSM sobre *M. javanica*. O efeito conjunto e cumulativo dos gases tóxicos liberados durante a decomposição da FSM, aliado às elevadas temperaturas proporcionou uma considerável redução da quantidade de FSM a ser incorporada no solo, principalmente se o solo for coberto imediatamente após a incorporação desse material. Ao se avaliar a forma de aplicação do fungo *P. chlamydosporia* constatou-se que a fibra de coco colonizada não foi efetiva como método de introdução deste microrganismo. A aplicação de *P. chlamydosporia* deve ser feita em solo infestado e deve-se aguardar um período maior do que uma semana antes do plantio para que o fungo possa se estabelecer e atuar sobre o inóculo inicial do nematóide, o que reduz a penetração e os números de galhas e ovos no final do ciclo de vida do nematóide. Bactérias isoladas de solo onde havia sido incorporado FSM não apresentaram atividade antagônica ao nematóide. Somente um isolado do fungo *Trichoderma* sp. resultou em controle do nematóide e apenas quando introduzido no solo no plantio com o hospedeiro, isto é, 15 dias antes da introdução dos ovos do nematóide. Este período de exposição não foi proporcionado no experimento de onde este fungo foi isolado, portanto não é possível determinar o papel desse isolado no controle do nematóide.

ABSTRACT

COUTINHO, Marcelo Magalhães, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2008. **Use of *Pochonia chlamydosporia* and papaw seed's flour for the control of *Meloidogyne javanica*.** Advisor: Leandro Grassi de Freitas. Counselors: Silamar Ferraz and Rosangela D'Arc de Lima Oliveira.

Besides increasing production fees, the indiscriminate use of nematicidal chemicals may threaten farmers and consumers health, as well as contaminate the environment. Consequently, alternative methods for management of nematodes are preferred, such as the use of nematophagous fungi allied to organic matter incorporation to the soil. The objectives of this work were: 1- to evaluate the minimum effective dose of papaw seed's flour (FSM) with and without biofumigation, for the control of *M. javanica*; 2- to evaluate the effect of *Pochonia chlamydosporia*, applied in the form of chlamydospore or colonized coconut fiber, together with different doses of FSM against *M. javanica* and 3- to evaluate the effect of fungi and bacteria, isolated from soils treated with FSM, over *M. javanica*. The collective and accumulative effect of the toxic gasses released during the FSM decomposition, together with the high temperatures, conferred a considerable reduction in the quantity of FSM to be incorporated to the soil, especially if the soil was immediately covered after incorporation. Evaluating the applying of *P. chlamydosporia* fungi, it was determined that colonized coconut fiber was not efficient as a method for the introduction of this microorganism. Soil application of *P. chlamydosporia* must be done on infested soil and a period of more than seven days has to be held before planting, in order to allow fungi establishment and its activity over the initial nematode inoculum, with a consequent reduction in penetration, number of root knots and number of eggs at end of the nematode's life cycle. No antagonistic activity against nematodes was observed in bacteria isolated from soils where FSM was incorporated. Only one isolate of the fungi *Trichoderma* sp. resulted in nematode control, and only when introduced in the soil together with the host planting, 15 days before nematode eggs introduction. This period of exposition was not proportioned in the experiment from where the fungi was isolated, thus it was impossible to determine the role of such isolate in the control of the nematode.

INTRODUÇÃO GERAL

Grande ênfase é dada ao desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de nematicidas para o manejo de fitonematóides. Dentre estes métodos, o controle biológico, aliado à adição de matéria orgânica ao solo, são alternativas que merecem ser melhor investigada (Dickson *et al.*, 1994; Dalla Pria & Ferraz, 1996; Freitas *et al.*, 2000; Nico *et al.*, 2004).

A incorporação de matéria orgânica ao solo pode favorecer o controle de diversas doenças de plantas, além de melhorar as características físico-químicas do solo e aumentar a diversidade da microbiota (Hoitink & Fahy, 1986). Entretanto, quando implantada de forma isolada, pode não ser muito efetiva no controle de nematóides, pois pode ocorrer, por volatilização, perda de substâncias tóxicas, resultantes da decomposição do material incorporado (Stapleton, 2000; Souza, 2004). Aliar esta medida de controle a outros métodos já empregados no controle de nematóides é muito oportuno. O emprego da biofumigação proporciona efeito conjunto dos compostos formados durante a decomposição do material e aprisionados sob o plástico e as altas temperaturas resultantes da cobertura do solo com plástico, obtendo o maior controle deste fitopatógeno.

A eficiência do material orgânico no controle de nematóides depende de sua composição química, podendo liberar ou não subprodutos nematicidas durante a sua decomposição (Rodríguez-Kábana *et al.*, 1987; Dias-Arieira, 2002). Sementes de mamão (*Carica papaya* L.), um subproduto da indústria de sucos, doces, geléias e outros produtos alimentícios, possuem ação anti-helmíntica e são usadas na medicina popular no controle de vermes. As sementes contêm glucosinolatos, que são hidrolisados pela enzima mirosinase na presença de água, originando o composto benzil-isotiocianato, componente químico com ação ovicida e larvicida (Krishnakumari & Majumder, 1960; Dar *et al.*, 1965; Lal *et al.*, 1976; Seo & Tang, 1982; Kermanshai *et al.*, 2001). Poucas são as publicações tratando do uso de farinha de sementes de mamão para o controle de fitonematóides de planta, portanto, investigar seu uso como material orgânico a ser incorporado no solo passa a ser uma opção importante para o manejo alternativo de fitonematóides.

Entre os agentes de biocontrole de nematóides com potencial de uso prático, pode-se destacar o fungo *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & Gams, anteriormente conhecido como *Verticillium chlamydosporium* (Stirling, 1991). Esse fungo possui características relevantes que favorecem seu uso como agente de controle de nematóides tais como: a) não ser patogênico a plantas, seres humanos e outros animais; b) ser capaz de se estabelecer no solo, mesmo na ausência de nematóides; c) ser parasita de ovos e fêmeas de *Meloidogyne* spp. (Stirling, 1991; Kerry, 2001); d) ser considerado um forte competidor saprofítico, na forma de conídios, micélios (Kerry *et al.*, 1984) e clamidósporos (Crump & Kerry, 1981); e) ser capaz de colonizar as raízes de plantas e promover seu desenvolvimento (Lopez-Llorca *et al.*; 2002; Hidago-Díaz *et al.*, 2000; Monfort *et al.*, 2005; Dallemole-Giaretta, 2008).

Um possível agente de controle biológico, frequentemente encontrado após a incorporação de matéria orgânica, é o fungo *Trichoderma* spp.. Esse microrganismo possui rápido crescimento e abundante esporulação (Howell, 2003). Vários mecanismos podem estar envolvendo no controle de fitopatógenos por esse fungo tais como: micoparasitismo, antibiose, competição, produção de enzimas, indução de resistência da planta, estímulo de germinação e mecanismos adjuntos (Howell, 2003).

Vários estudos são realizados com rizobactérias e bactérias endofíticas, visando à redução dos danos causados por fitonematóides (Kloepper *et al.*, 1999), com o benefício extra de alguns isolados promoverem o crescimento das plantas (Weller, 1988; Kloepper *et al.*, 1989; Kloepper, *et al.*, 1999).

Como há relatos científicos do controle de *Meloidogyne* spp. por fungos do gênero *Pochonia* (Stirling, 1991), *Trichoderma* (Windham *et al.*, 1989 & Sharon *et al.*, 2001), rizobactérias (Kloepper *et al.*, 1999) e pela ação de metabólitos secundários produzidos ao se incorporar a farinha de sementes de mamão ao solo, separadamente, decidiu-se estudar a utilização integrada desses organismos aliado à adição de matéria orgânica como métodos alternativos ao uso de agroquímicos.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivos: a) avaliar a dose mínima efetiva de FSM para o controle de *M. javanica* no solo biofumigado ou não biofumigado, em casa de vegetação; b) avaliar a eficiência das doses de FSM no controle de *M. javanica* a 26°C, em câmara de crescimento; c) avaliar a aplicação de *P. chlamydosporia*, incorporada ao solo na forma de clamidósporos ou fibra de coco colonizada, juntamente com diferentes doses de farinha de sementes de mamão; d) isolar *Trichoderma* spp. e bactérias de solo onde foram incorporados a farinha de sementes de mamão e verificar o seu efeito no controle de *M. javanica*.

LITERATURA CITADA

- CRUMP, D.H. & B.R. KERRY. 1981. A quantitative method for extracting resting spores of two nematode parasitic fungi, *Nematophthora gynophila* and *Verticillium chlamydosporium*, from soil. *Nematologica*, 27: 330-339.
- DALLA PRIA, M. & S. FERRAZ. 1996. Controle biológico de *Meloidogyne incognita*, raça 3, por seis espécies de *Monacrosporium*, isoladas ou combinadas com *Verticillium chlamydosporium*. *Fitopatologia Brasileira*, 21 (1): 30-34.
- DALLEMOLE-GIARETTA, R. 2008. Isolamento e identificação de *Pochonia chlamydosporia* de solos infestados com *Meloidogyne* spp. e avaliação do potencial de controle de *M. javanica* e de promoção de crescimento de tomateiro (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Viçosa – Departamento de Fitopatologia, Viçosa, 132 p.
- DAR, R.N., L.C. GARG & R.D. PATHAK. 1965. Anthelmintic activity of *Caryca papaya* seeds. *Indian Journal of Pharmacy*, 27: 335-336.
- DIAS-ARIEIRA, C. R. 2002. Controle de *Heterodera glycines* e *Meloidogyne* spp. por gramíneas forrageiras. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 78 p.
- DICKSON, D.W., M. OOSTENDORP., R.M. GIBLIN-DAVIS & D.J. MITCHELL. 1994. Control of plant-parasitic nematodes by biological antagonists. In: ROSEN, D., F.D. BENNETT & J.L. CAPINERA. (ed). *Pest management in the subtropics. Biological control - A Florida perspective*, Editorial, London. p. 575-601.
- FREITAS, L.G., W.S. NEVES., D.N. CARMO & G.S. SILVA. 2000. First case of induction of soil suppressiveness to root-knot nematode by *Pasteuria penetrans* in large areas in the field in Brazil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, XXII, Uberlândia. Resumos, p. 129.
- HIDALGO-DÍAZ, L.; J.M. BOURNE; B.R. KERRY & M.G. RODRÍGUEZ. 2000. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. *International Journal of Pest Management*, 46(4): 277-284.
- HOITINK, H.A.J. & P.C. FAHY. 1986. Basis for the control of soilborne plant pathogens with compost. *Annual Review Phytopathology*, 24: 93-114.

- HOWELL, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*, 87 (1): 1- 10.
- KERMANSYAI, R., B.E. MCCARRY, J. ROSENFELD, P.S. SUMMERS, E.A. WERETILNYK, & G.J. SORGER. 2001. Benzyl isothiocyanate is the chief or sole anthelmintic in papaya seed extracts. *Phytochemistry*, 57: 427-435.
- KERRY, B.R. 2001. Exploitation of nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: BUTT, T.M., C. JACKSON, & N. MAGAN. (ed). *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential*. CAB International, Wallingford, p. 380.
- KERRY, B.R., A. SIMON. & A.D. ROVIRA. 1984. Observations on the introduction of *Verticillium chlamydosporium* and other parasitic fungi into soil for control of the cereal cyst-nematode *Heterodera avenae*. *Annals. Applied. Biology*, 105: 509-516.
- KLOEPPER, J.W., R. LIFSHITZ & R.M. ZABLOTOWICZ. 1989. Free-Living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnology*, 7: 39-43.
- KLOEPPER, J.W., R. RODRIGUEZ-KÁBANA, G.W. ZEHNDER, J.F. MURPHY, E. SIKORA & C. FERNÁNDEZ. 1999. Plant root-bacterial interactions in control of soilborne disease and potential extension to systemic and foliar disease. *Australian Plant Pathology*, 28 (1): 21-26.
- KRISHNAKUMARI, M.K. & S.K. MAJUMDER. 1960. Studies on anthelmintic activities of seeds of *Carica papaya* Linn. *Annals of Biochemistry and Experimental Medicine*, 20: 551-556.
- LAL, J., S. CHANDRA, V. RAVIPRKASH & M. SABIR. 1976. *In vitro* anthelmintic action of some indigenous medicinal plants on *Ascaridia gali* worms. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 20: 64-68.
- LOPEZ-LLORCA, L.V., J.J. BORDALLO; J. SALINAS; E. MONFORT & M.L. LÓPEZ-SERNA. 2002. Use of light and scanning electron microscopy to examine colonisation of barley rhizosphere by the nematophagous *Verticillium chlamydosporium*. *Micron*, 33: 61-67.

- MONFORT, E.; L.V. LOPEZ-LLORCA; H.B. JANSSON; J. SALINAS; J. ON PARK & K. SIVASITHAMPARAM. 2005. Colonization of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root-rot. *Soil Biology & Biochemistry*, 1-17.
- NICO, A.I., R.M. JIMÉNEZ-DÍAZ & P. CASTILLO. 2004. Control of root-knot nematodes by composted agro-industrial wastes in potting mixtures. *Crop Protection*, 23: 581-587.
- RODRÍGUEZ-KÁBANA, R., G. MORGAN-JONES & I. CHET. 1987. Biological control of nematodes: Soil amendments and microbial antagonists. *Plant and Soil*, 100: 237-247.
- SEO, S.T. & C.S. TANG. 1982. Hawaiian fruit flies Diptera: (*Tephritidae*) toxicity of benzyl isothiocyanate against eggs or 1st instars of three species. *Journal Economic Entomology*, Maryland, 75: 1132-1135.
- SHARON, E., M. BAR-EYAL, I. CHET, A. HERRA- ESTRELLA, O. KLEIFELD & Y. SPIEGEL. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 91: 687- 693.
- SOUZA, N.L. 2004. Interação entre solarização e incorporação prévia de matéria orgânica no solo. *Summa Phytopathologica*, 30 (1): 142-143.
- STAPLETON, J.J. 2000. Soil solarization in various agricultural production systems. *Crop Protection*, 19: 837-84.
- STIRLING, G.R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes: Progress, problems and perspects. CAB International, Wallingford, 282 p.
- WELLER, D.M. 1988. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 26: 1508-15012.
- WINDHAM, G. L., M.T. WINDHAM & W.P. WILLIAMS. 1989. Effects of *Trichoderma* spp. on maize growth and *Meloidogyne arenaria* reproduction. *Plant Disease*, 73: 493-494.

Capítulo - 1

Avaliação da dose mínima efetiva de farinha de sementes de mamão (*Carica papaya* L.) em solo coberto ou não para o controle de *Meloidogyne javanica*

MARCELO M. COUTINHO^{1,2}, LEANDRO G. FREITAS², WÂNIA S.
NEVES², ROSANGELA DALLEMOLE-GIARETTA², SILAMAR
FERRAZ² & ROSÂNGELA D'ARC DE LIMA OLIVEIRA²

*Parte da dissertação do primeiro autor para obtenção do grau de Mestre
pela Universidade Federal de Viçosa (MG), Brasil.

¹Bolsista da CAPES

²Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, 36571-000,
Viçosa (MG) Brasil.

Autor para correspondência: mmagalhaescoutinho@yahoo.com.br

Recebido para publicação em xx/xx/2008. Aceito em xx/xx/2008

Resumo - Coutinho, M.M., Freitas, L.G., Neves W.S., Dallemole-Giaretta, R., Ferraz, S., Oliveira, R.D.L. 2008. Avaliação da dose mínima efetiva de farinha de sementes de mamão (*Carica papaya* L.) em solo coberto ou não para o controle de *Meloidogyne javanica*

Sementes de mamão contêm glucosinolatos, que no solo são hidrolisados e liberam isotiocianatos, compostos tóxicos a fitonematóides. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a dose mínima efetiva de farinha de sementes de mamão (FSM), em biofumigação ou não, para o controle de *M. javanica*. Para isso, três experimentos foram montados para testar os efeitos das seguintes doses de FSM: 0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 ou 8 g FSM/kg de solo. O primeiro e o segundo experimentos foram conduzidos simultaneamente na mesma casa de vegetação. No primeiro experimento, vasos de 0,5 L de solo e areia foram infestados com 4.000 ovos de

nematóide e, após três dias, incorporaram-se as doses de FSM. Em seguida, os vasos foram cobertos com plástico transparente de polietileno por um período de cinco dias proporcionando a biofumigação do solo em casa de vegetação. Após a permanência dos vasos cobertos, transplantou-se uma planta de tomate e conduziu o experimento por 45 dias. No segundo experimento, realizou-se os mesmos tratamentos mencionados anteriormente, embora neste caso, o solo não tenha sido coberto. Com o objetivo de isolar o efeito da elevada temperatura observada durante o processo de biofumigação, um ensaio foi conduzido em câmara de crescimento a 26°C. Neste ensaio, os vasos permaneceram cobertos com plástico de polietileno por 5 dias e, após este período na câmara de crescimento, o plástico foi retirado e os vasos foram transferidos para casa de vegetação. A solarização empregada no primeiro ensaio reduziu em 98% o número de galhas e em 100% o número de ovos, quando comparado à testemunha não biofumigada independente da dose de FSM. No solo não solarizado, houve redução de 48 e 68% ao se incorporar 2 g de FSM/kg de solo para o número de galhas e de ovos, respectivamente, e de 82 e 95% ao se incorporar 4 g de FSM/kg de solo para as mesmas variáveis. A altura das plantas não foi influenciada pela adição de FSM e nem pela biofumigação do solo. Para o peso de raiz, tanto no primeiro quanto no segundo experimento, as doses 1, 4 e 8 g FSM/kg de solo foram superiores ao tratamento testemunha ($p < 0,05$). O peso da parte aérea foi influenciado positivamente em todas as doses de FSM incorporadas ao solo. No terceiro experimento, montado em câmara de crescimento, não foi observada diferença significativa da altura das plantas, peso de parte aérea e peso das raízes. Entretanto, observou-se uma redução no número de galhas nas doses de 0,125; 0,5; 4; e 8 g de FSM/kg de solo de 31, 35, 46 e 71%, respectivamente. Todas as doses testadas reduziram o número de ovos de *M. javanica* por sistema radicular, quando comparada com a testemunha sem FSM.

Summary - Coutinho, M.M., Freitas, L.G., Neves W.S., Dallemole-Giaretta, R., Ferraz, S., Oliveira, R.D.L. 2008. **Evaluation of the minimum effective dose of papaw (*Carica papaya* L.) seed's flour, in covered and uncovered soil, for the control of *Meloidogyne javanica***

Papaw seed contains glucosinolated compounds, that when hydrolyzed in soils release isotiocyanates, a group of toxic compounds to phytonematodes. The objective of this work was to evaluate the minimum effective dose of papaw seed's flour (FSM), with and without biofumigation, for the control of *M. javanica*. Three experiments were performed in order to test the effect of FSM doses at: 0; 0,0625; 0,125; 0,25; 1; 2; 4 and 8 g FMS kg⁻¹ of soil. The first and second experiments were simultaneously executed in greenhouse conditions. In the first experiment, 0,5 L capacity buckets filled with a mixture of soil and sand were infested with 4.000 nematode eggs and, after three days, FSM doses were incorporated. Then, buckets were covered with transparent polyethylene plastic for a period of five days allowing soil biofumigation in greenhouse conditions. After this period, a tomato plant was transplanted to each bucket and cultivated during 45 days. In the second experiment, the same procedures previously mentioned were performed, but without covering soil with the polyethylene plastic. With the objective to isolate the effect of the high temperature observed during the biofumigation process, a test was carried out in a growth chamber at 26 °C, with buckets covered with polyethylene plastic during five days. After this period the plastic cover was retired and buckets transferred to a greenhouse. Solarization used in the first experiment reduced the number of root knots in 98 % and the number of eggs in 100 %, when compared with the non-biofumigated control independently of FSM dose. In non-solarized soil, a reduction of 48 % of root knots and 68 % in the number of eggs was observed when incorporating 2 g of FSM kg⁻¹ of soil, and a reduction of 82 and 95 % , of the same parameters, when incorporating 4 g of FSM kg⁻¹ of soil. Plant height was not affected by the addition of FSM neither by soil biofumigation. Concerning to root weight, in the first as much as in the second experiment, doses of 1, 4 and 8 g FSM kg⁻¹ of soil resulted in higher values than the control (p<0,05). Weight of aerial portion was positively

influenced by all FSM doses incorporated to the soil. In the third experiment, carried out in a growth chamber, a significant difference in plant height, weight of aerial portion and root weight was not observed. However, a reduction in the number of root knots was observed for the doses of 0,125: 0,5: 4 and 8 g of FSM kg⁻¹ of soil, in 31, 35, 46 and 71 % respectively. All doses tested reduced the number of eggs of *M. javanica* in the root system, when compared to control without FSM.

1. Introdução

Os nematóides-das-galhas, *Meloidogyne* spp., causam perdas econômicas significativas que podem variar de 30 a 80% na cultura do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Chitwood, 1951., Sayre & Toyama, 1964., Barker *et al.*, 1976., Lordello, 1978., Ferraz & Churata-Masca, 1983., Roberts & May, 1986, Charchar & Aragão, 2005). O controle químico é uma opção utilizada para o manejo de nematóides, entretanto, o uso intensivo e indiscriminado dos nematicidas tem causado diversos prejuízos à saúde humana e ao ambiente. Para poder reduzir estes riscos proporcionados pela adoção deste método de controle, muitos pesquisadores têm estudado métodos alternativos que minimizem o uso de insumos químicos para o controle de doenças e pragas. Dentro desse contexto, a incorporação de matéria orgânica ao solo é um dos métodos mais estudados, pois além de favorecer o controle de diversas doenças de plantas, pode também melhorar as características físico-químicas do solo e aumentar a diversidade da microbiota (Hoitink & Fahy, 1986). Entretanto, quando implantada de forma isolada, pode não ser muito efetiva no controle de nematóides, pois pode ocorrer, por volatilização, perda de substâncias tóxicas, resultantes da decomposição do material incorporado (Stapleton, 2000; Souza, 2004). Portanto, aliar a incorporação de material orgânico à solarização pode ser uma alternativa de controle eficiente de fitonematóides. Nessa condição, o efeito conjunto e cumulativo dos compostos formados durante a decomposição e as altas temperaturas aprisionadas sob o plástico podem favorecer o controle dos nematóides. Essa prática, conhecida como biofumigação, pode ser vantajosa, pois, na maioria das vezes, reduz a quantidade do material a ser incorporado ao solo.

A eficiência de determinado material orgânico no controle de nematóides depende de sua composição química, havendo liberação ou não de subprodutos nematicidas durante a sua decomposição (Rodríguez-Kábana *et al.*, 1987; Dias-Arieira, 2002).

Sementes de mamão (*Carica papaya* L.), um subproduto da indústria de sucos, doces, geléias e outros produtos alimentícios, possuem ação anti-helmíntica e são usadas na medicina popular no controle de vermes. As

sementes contêm glucosinolatos, que são hidrolisados pela enzima mirosinase na presença de água, originando o composto benzil-isotiocianato, componente químico com ação ovicida e larvicida (Krishnakumari & Majumder, 1960; Dar *et al.*, 1965; Lal *et al.*, 1976; Seo & Tang, 1982; Kermanshai *et al.*, 2001). Poucas são as publicações tratando do uso de farinha de sementes de mamão para o controle de fitonematóides de planta, portanto, investigar seu uso como material orgânico a ser incorporado no solo passa a ser uma opção importante para o manejo alternativo de fitonematóides.

O uso da matéria orgânica no controle de patógenos do solo pode, em alguns casos, favorecer a melhoria das características físicas e químicas do solo (Stirling, 1991), melhorando o desenvolvimento das plantas e aumentando a população de microrganismos antagonistas aos nematóides (Linford *et al.*, 1938; Sitaramaiah & Singh, 1978). Quando a solarização é aliada à adição de matéria orgânica proporcionando a biofumigação, as doses de matéria orgânica podem ser reduzidas devido ao efeito conjunto entre a temperatura atingida no solo e os gases liberados durante a decomposição deste material.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivos: a) Avaliar a dose mínima efetiva de FSM para o controle de *M. javanica* no solo biofumigado ou não biofumigado, em casa de vegetação; b) Avaliar a eficiência das doses de FSM no controle de *M. javanica* a 26°C, em câmara de crescimento.

2. Material e Métodos

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação e em câmara de crescimento do Departamento de Fitopatologia localizados no campus da Universidade Federal de Viçosa.

2.1. Obtenção do inóculo

Para a obtenção e multiplicação do inóculo, populações de *Meloidogyne javanica* foram multiplicadas em plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* var. Santa Clara), mantidas sob condições de casa de vegetação, por aproximadamente 70 dias. Antes da condução dos experimentos, foi realizada eletroforese de isoenzimas para a confirmação da espécie e a verificação da pureza do inóculo.

2.2. Obtenção da farinha de sementes de mamão (FSM)

As sementes de mamão foram cedidas pela Tropical Indústria de Alimentos S/A (Tial) e secas em terreiro de café. Após a secagem, foram trituradas em moinho de martelos rotativos equipado com peneira de 3 mm de abertura e a farinha resultante foi armazenada em local seco e ventilado, para posterior utilização.

2.3. Efeito da dose mínima de farinha de sementes de mamão para uso no controle de *M. javanica* em solo coberto ou não com plástico

2.3.1. Bioensaios em casa de vegetação

No primeiro experimento, o solo contido em vasos plásticos de 0,5 L de capacidade foi infestado com 4.000 ovos de *M. javanica*. Três dias após a infestação do solo, foram incorporadas as seguintes doses de FSM: 0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 ou 8 g FSM/kg de solo. Após a incorporação, os vasos foram cobertos e vedados com plástico de polietileno transparente, com espessura de 150 µm, para verificar o efeito da solarização e biofumigação. Decorrido cinco dias em que o solo permaneceu coberto, transplantou-se uma muda de tomateiro por vaso com 21 dias de idade e o experimento conduzido por

mais quarenta e cinco dias. Avaliou-se os números de galhas e de ovos, o peso da parte aérea, a altura das plantas e o peso das raízes.

No segundo experimento, foram incorporadas as mesmas doses de FSM descritas anteriormente. Entretanto, após a incorporação da FSM, os vasos não foram cobertos com plástico transparente e uma muda de tomateiro foi transplantada por vaso após cinco dias. O primeiro e o segundo experimento foram conduzidos simultaneamente na mesma casa de vegetação e foram avaliados as mesmas variáveis. A temperatura do ar e do solo foi monitorada duas vezes ao dia durante os ensaios.

2.3.2. Bioensaio em câmara de crescimento

Vasos plásticos contendo de 0,5 kg de solo infestado com 4000 ovos de *M. javanica* foram mantidos em câmara de crescimento a 26°C, para isolar o efeito da solarização. Após 3 dias, foram incorporadas 0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 ou 8 g de FSM/kg de solo e os vasos foram cobertos com plástico de polietileno transparente com espessura de 150 µm, para verificar o possível efeito da retenção de produtos voláteis produzidos durante a decomposição da FSM. A cobertura plástica foi retirada após 5 dias e uma muda de tomateiro foi transplantada em cada vaso. Em seguida, os vasos foram transferidos para casa de vegetação, onde permaneceram por 45 dias até a avaliação. A temperatura da casa de vegetação e do solo foi monitorada durante todo o experimento. Avaliaram-se os números de galhas e de ovos, peso da parte aérea, altura das plantas e peso da raiz.

2.4. Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento adotado nos experimentos foi do tipo inteiramente casualizado, empregando-se oito repetições por tratamento. Os dados foram analisados com o auxílio do programa Statistica 7.0 (Statsoft, 2004), procedendo-se a análise do intervalo de confiança entre as médias, associada ao teste T, a 5% de probabilidade, pois nenhum modelo foi ajustado para uma possível análise de regressão dos dados.

3. Resultados e Discussão

A incorporação de farinha de sementes de mamão ao solo e posterior cobertura com plástico de polietileno resultou no maior controle do nematóide, quando comparado ao experimento em que ao solo somente foi incorporada FSM (Figura 1). A temperatura máxima média do solo biofumigado foi de 41,8°C e, no solo não biofumigado, foi de 35,5°C. A elevação da temperatura acima de 40°C no solo biofumigado pode ter contribuído para a redução de 98% no número de galhas e de ovos, mesmo no tratamento sem a incorporação de FSM, funcionando apenas como solarização do solo. Neste caso, seria desnecessário o uso de FSM, pois a solarização do solo já seria suficientemente efetiva no controle do nematóide. (Figura 1). Stapleton & Duncan (1998) constataram que quando houve a incorporação de resíduos de brássicas ao solo, em combinação com o aquecimento do substrato durante sete dias a 38°C, o número de galhas em plantas de tomateiro foi reduzido de 95 a 100%. A temperatura ideal para a eclosão de *M. javanica* é de 30°C e para a mobilidade dos juvenis é de 25°C (Bird & Wallace, 1965). Dessa forma, sugere-se que o controle obtido no solo biofumigado pode estar relacionado à elevada temperatura alcançada durante o período em que o solo estava coberto.

No solo não coberto, houve redução de 48, 82 e 86% no número de galhas e de 68, 91 e 95% no número de ovos ao se incorporar 2, 4, 8 g FSM/kg de solo (Figura 1). A altura das plantas não foi influenciada pela adição de FSM ou pela biofumigação do solo. Para o peso de raiz, tanto no experimento do solo coberto quanto no do solo não coberto, as doses 1, 4 e 8 g FSM/kg solo foram estatisticamente superiores ao controle. O peso da parte aérea foi influenciado positivamente com a incorporação de FSM ao solo, e pode ser resultado da melhoria das características do solo após a incorporação do material orgânico (Stirling, 1991).

No terceiro experimento, montado em câmara de crescimento, não houve diferença significativa na altura das plantas, no peso da parte aérea e no peso das raízes. Entretanto, observou-se redução no número de galhas nas doses de 0,125; 0,5; 4; e 8 g de FSM/kg de solo de 31, 35, 46 e 71%, respectivamente (Figura 2). Todas as doses de FSM testadas reduziram o

número de ovos quando comparados com a testemunha (Figura 3). Desse modo, pode-se concluir que a decomposição da FSM no solo liberou gases nocivos ao nematóide, visto que mesmo em doses baixas de FSM o controle foi eficiente.

Os resultados deste trabalho comprovam a eficiência da utilização de FSM para o controle de nematóide do gênero *Meloidogyne* spp., como já demonstrado por Neves *et al.* (2005a, b) que observaram observaram 95% de redução na eclosão dos juvenis e 100% de inativação e morte dos juvenis de *M. javanica* e *M. incognita* após o uso do extrato de farinha de sementes de mamão. O efeito do extrato vegetal de semente de mamão também foi estudado por Coimbra *et al.* (2006), que constataram 100% de imobilidade e 67,2% de mortalidade de juvenis e adultos de *Scutellonema bradys*. O efeito nematicida da sementes de mamão se deve à presença de composto benzil-isotiocianato, originado da hidrólise do glucosinolato (Kermanshai *et al.* 2001).

No segundo experimento, houve a eliminação do efeito de solarização pela não utilização do plástico e, assim, foi possível isolar o efeito do isotiocianato, que se mostrou efetivo contra os nematóides mesmo sem ser aprisionado por plástico, como ocorreu no terceiro experimento. Houve uma relação direta da dose de FSM com o nível de controle do nematóide.

Em câmara de crescimento, o plástico foi utilizado para aprisionar o gás porém, o efeito do aumento das doses de FSM não foi tão pronunciado quanto no experimento em casa de vegetação com o solo descoberto. Muito possivelmente esta diferença no resultado pode ser explicada devido à diferença de temperatura entre os dois experimentos, sendo quase 9 °C mais alta no experimento conduzido em casa de vegetação do que no conduzido em câmara de crescimento. A temperatura mais elevada possivelmente promoveu uma aceleração na decomposição da FSM e, portanto, resultando em maior produção do gás isotiocianato. O efeito conjunto e cumulativo dos gases tóxicos liberados durante a decomposição dos materiais orgânicos e das elevadas temperaturas atingidas durante a solarização pode proporcionar considerável redução da quantidade de material orgânico a ser incorporado

ao solo (Souza, 2004), o que torna mais viável o uso da biofumigação para o controle de nematóides.

Conclui-se que a incorporação de 4 g FSM/kg de solo, ou mais, o que equivalente a 8000 kg/ha ao incorporar esse material a 0,2 m de profundidade, resulta em uma grande redução da reprodução do nematóide e seus sintomas na planta, apesar de doses inferiores também seja efetiva a 26 °C .Esta elevada dose pode ser justificada quando se trata de ambientes protegidos ou até mesmo para o uso de tratamentos de substrato para a produção de mudas. Em temperaturas mais alta a eficiência do método se torna mais evidente como observado a 35,5 e 41,8. Alternativamente, o solo pode ser coberto com plástico transparente após a incorporação de FSM por pelo menos cinco dias, pois, durante esse intervalo de tempo, o solo pode atingir temperaturas altas, prejudiciais aos nematóides, aumentando a eficiência do controle.

Como perspectivas futuras, estudos devem ser conduzidos para verificar se o método de controle utilizado neste trabalho é eficiente também no controle de outros fitopatógenos, podendo ser utilizado no tratamento de solo para a produção de mudas.

Solo coberto

Solo não coberto

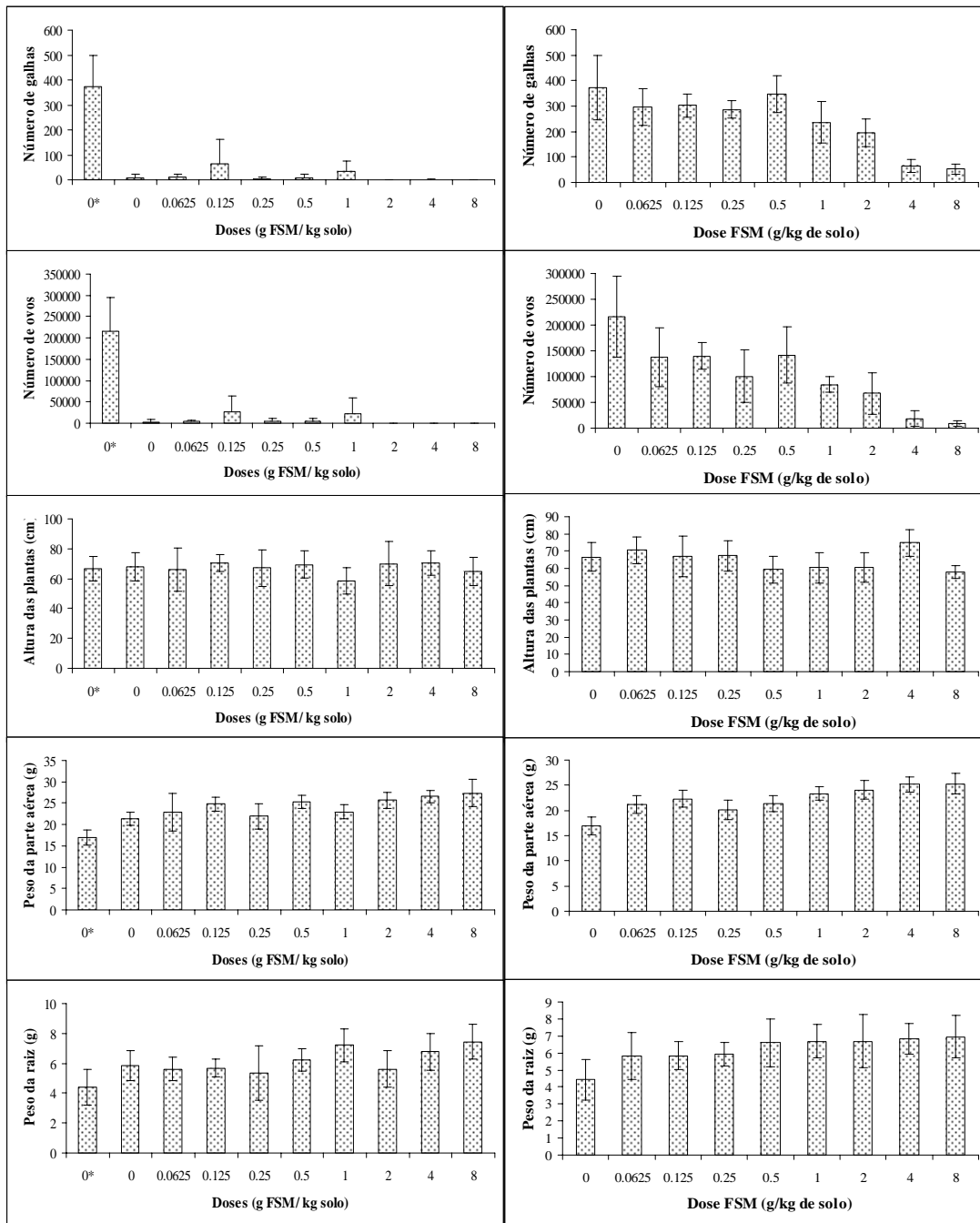


Figura 1 – Número de galhas, de ovos, altura das plantas, peso da parte aérea e das raízes de tomateiros inoculados com *M. javanica*, quarenta e cinco dias após a incorporação ao solo de diferentes doses de FSM, em solo coberto (coluna à esquerda) e não coberto (coluna à direita) com plástico transparente por 5 dias. As barras representam o intervalo de confiança, associado ao teste T a 5% de probabilidade. * Testemunha não solarizada.

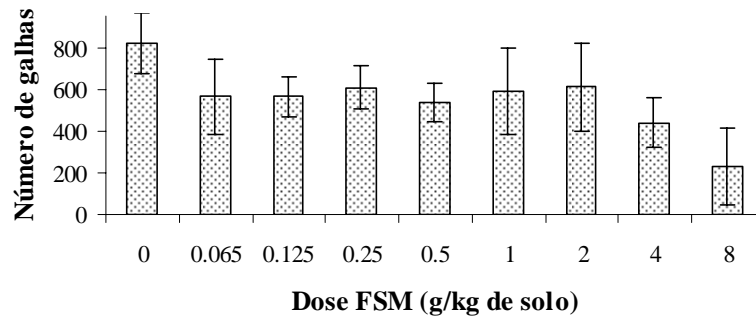


Figura 2 - Número de galhas por sistema radicular de tomateiros inoculados com *M. javanica*, quarenta e cinco dias após a incorporação ao solo de diferentes doses de FSM. Solo coberto com plástico transparente durante 5 dias em câmara de crescimento. As barras representam o intervalo de confiança, associado ao teste T, a 5% de probabilidade.

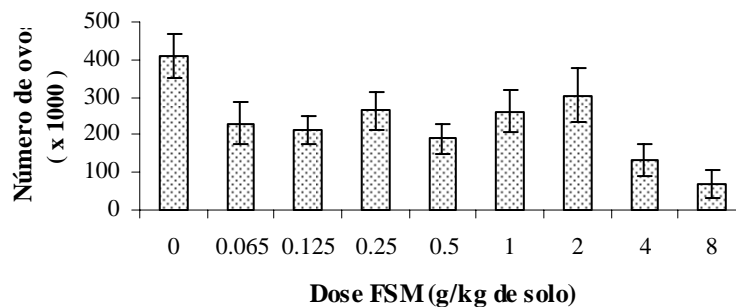


Figura 3 - Número de ovos por sistema radicular de tomateiros inoculados com *M. javanica*, quarenta e cinco dias após a incorporação ao solo de diferentes doses de FSM. Solo coberto com plástico transparente durante 5 dias em câmara de crescimento. As barras representam o intervalo de confiança, associado ao teste T, a 5% de probabilidade.

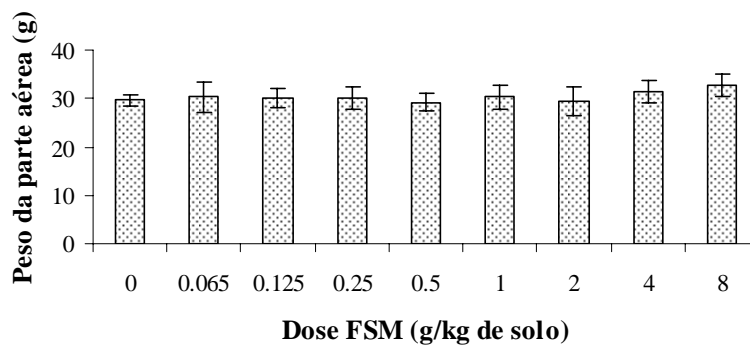


Figura 4 – Peso da parte aérea de tomateiros inoculados com *M. javanica*, quarenta e cinco dias após a incorporação ao solo de diferentes doses de FSM. Solo coberto com plástico transparente durante 5 dias em câmara de crescimento. As barras representam o intervalo de confiança, associado ao teste T, a 5% de probabilidade.

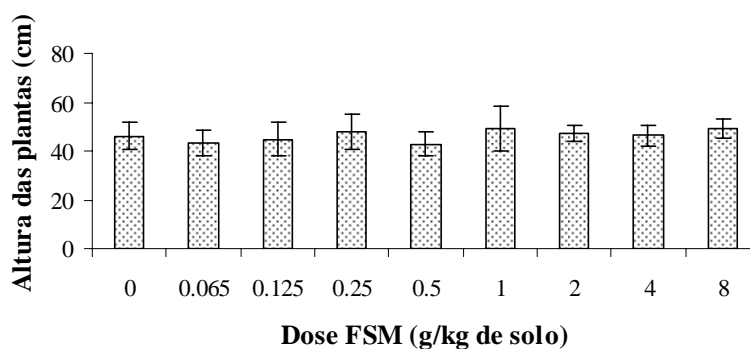


Figura 5 – Altura dos tomateiros inoculados com *M. javanica*, quarenta e cinco dias após a incorporação ao solo de diferentes doses de FSM. Solo coberto com plástico transparente durante 5 dias em câmara de crescimento. As barras representam o intervalo de confiança, associado ao teste T, a 5% de probabilidade.

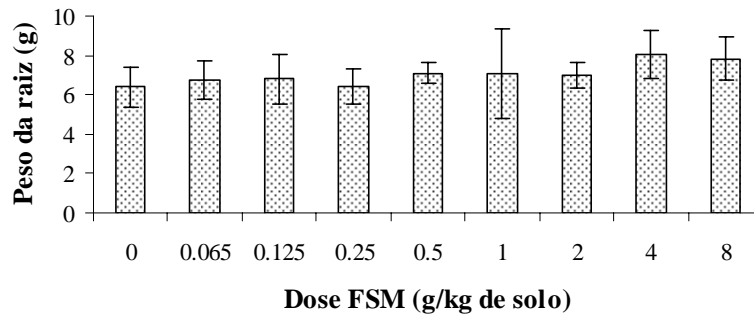


Figura 6 – Peso das raízes das plantas de tomateiros inoculados com *M. javanica*, quarenta e cinco dias após a incorporação ao solo de diferentes doses de FSM. Solo coberto com plástico transparente durante 5 dias em câmara de crescimento. As barras representam o intervalo de confiança, associado ao teste T, a 5% de probabilidade.

4. Literatura Citada

- BARKER, K.R., P.B. SHOEMAKER & I.A. NELSON. 1976. Relationship of initial population densities of *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* to yield of tomato. *Journal of Nematology*, 8: 232-239.
- BIRD, A.F. & H.R. WALLACE. 1965. The influence of temperature on *Meloidogyne hapla* and *M. javanica*. *Nematologica*, 11: 581-589.
- CHARCHAR, J.M. & F.A.S. ARAGÃO. 2005. Reprodução de *Meloidogyne* spp. em cultivares de tomate e pepino sob estufa plástica e campo. *Nematologia Brasileira*, 29 (2): 243-249.
- CHITWOOD, B.G. 1951. Root-knot nematodes. II – Quantitative relation of the root-knot nematode – *Meloidogyne hapla* Chitwood, 1949 with tomatoes, onions and lima beans. *Plant and Soil*, 3: 47-50.
- COIMBRA, J.L., A.C.F. SOARES., M.S. GARRIDO., C.S. SOUSA. & F.L.B. RIBEIRO. 2006. Toxicidade de extratos vegetais a *Scutellonema bradys*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41 (7): 1209-1211.
- DAR, R.N., L.C. GARG. & R.D. PATHAK. 1965. Anthelmintic activity of *Caryca papaya* seeds. *Indian Journal of Pharmacy*, 27: 335-336.
- DIAS-ARIEIRA, C. R. 2002. Controle de *Heterodera glycines* e *Meloidogyne* spp. por gramíneas forrageiras. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 78 p.
- FERRAZ, L.C.C.B. & M.G.C. CHURATA-MASSA. 1983. Comportamento dos cultivares de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) de crescimento determinado em relação ao nematóide *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949. *Científica*, 11 (1): 87-91.
- HOITINK, H.A.J. & P.C. FAHY. 1986. Basis for the control of soilborne plant pathogens with compost. *Annual Review Phytopathology*, 24: 93-114.
- KERMANS HAI, R., B.E. MCCARRY, J. ROSENFELD, P.S. SUMMERS, E.A. WERETILNYK & G.J. SORGER. 2001. Benzyl isothiocyanate is the chief or sole anthelmintic in papaya seed extracts. *Phytochemistry*, 57: 427-435.

- KRISHNAKUMARI, M.K. & S.K. MAJUMDER. 1960. Studies on anthelmintic activities of seeds of *Carica papaya* Linn. *Annals of Biochemistry and Experimental Medicine*, 20: 551-556.
- LAL, J., S. CHANDRA, V. RAVIPRKASH & M. SABIR. 1976. *In vitro* anthelmintic action of some indigenous medicinal plantas on *Ascaridia gali* worms. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 20: 64-68.
- LINFORD, M.B., Y. FRANCIS. & J.M. OLIVEIRA. 1938. Reduction of soil populations of the root-knot nematode during decomposition of organic matter. *Soil Science*, 45 (2): 127-141.
- LORDELLO, L.G.E. 1978. Nematóides das plantas cultivadas. Editora Nobel, São Paulo, 197 p.
- NEVES, W.S., M.M. COUTINHO, R. DALLEMOLE-GIARETTA, R.J.F. ZOOCA, L.G. FREITAS & C.F.S. FABRY. 2005a. Atividade nematicida de extratos de semente de mamão sobre juvenis de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, XXXIII, Brasília. Resumos, p. 32.
- NEVES, W.S., M.M. COUTINHO, R.J.F. ZOOCA, R. DALLEMOLE-GIARETTA & L.G. FREITAS. 2005b. Inibição da eclosão de juvenis de *Meloidogyne javanica* e de *M. incognita* por extrato aquoso de sementes de mamão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, XXXIII, Brasília. Resumos, p. 32.
- ROBERTS, P.A. & D. MAY. 1986. *Meloidogyne incognita* resistance characteristic in tomato genotypes developed for processing. *Journal of Nematology*, 18: 352-359.
- RODRÍGUEZ-KÁBANA, R., G. MORGAN-JONES & I. CHET. 1987. Biological control of nematodes: Soil amendments and microbial antagonists. *Plant and Soil*, 100: 237-247.
- SAYRE, R.M. & T.K. TOYAMA. 1964. The effect of root-knot nematodes on the yield of processing tomatoes. *Canadian Journal of Plant Science*, 44: 265-267.
- SEO, S.T. & C.S. TANG. 1982. Hawaiian fruit flies Diptera: (*Tephritidae*) toxicity of benzyl isothiocyanate against eggs or 1st instars of three species. *Journal Economic Entomology*., 75: 1132-1135.

- SITARAMAIAH, K. & R.S. SINGH. 1978. Effect of organic amendment on phenolic content of soil and plant response of *Meloidogyne javanica* and its host to related compounds. *Plant and Soil*, 50: 671-679.
- SOUZA, N.L. 2004. Interação entre solarização e incorporação prévia de matéria orgânica no solo. *Summa Phytopathologica*, 30 (1): 142-143.
- STAPLETON, J.J. 2000. Soil solarization in various agricultural production systems. *Crop Protection*, 19: 837-84.
- STAPLETON J.J. & R.A DUNCAN. 1998. Soil desinfestation with cruciferous amendments and sublethal heating: effects on *Meloidogyne incognita*, *Sclerotium rolfsii* and *Pythium ultimum*. *Plant Pathology*, 47: 737-742.
- STATSOFT. 2004. Inc. STATISTICA for Windows (computer program manual). Tulsa, OK. Statsoft Inc. <http://www.statsoft.com>.
- STIRLING, G.R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes: Progress, problems and perspects. CAB International, Wallingford, 282 p.

Capítulo - 2

Efeito de *Pochonia chlamydosporia* e de farinha de sementes de mamão para o controle de *Meloidogyne javanica**

MARCELO M. COUTINHO^{1,2}, LEANDRO G. FREITAS², ROSANGELA DALLEMOLE-GIARETTA², WÂNIA S. NEVES², EVERALDO ANTÔNIO LOPES². & SILAMAR FERRAZ²

*Parte da dissertação do primeiro autor para obtenção do grau de Mestre pela Universidade Federal de Viçosa (MG) Brasil.

¹Bolsista da CAPES

²Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, 36571-000, Viçosa (MG) Brasil.

Autor para correspondência: mmagalhaescoutinho@yahoo.com.br

Recebido para publicação em xx/xx/2008. Aceito em xx/xx/2008

Resumo - Coutinho, M.M., Freitas, L.G., Dallemole-Giaretta, R., Neves W.S., Lopes, E.A., Ferraz, S. Efeito de *Pochonia chlamydosporia* e de farinha de sementes de mamão para o controle de *Meloidogyne javanica*

Avaliou-se a efetividade do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*, aplicado na forma de clamidósporos ou de fibra de coco colonizada, juntamente com diferentes doses de farinha de sementes de mamão (FSM), no controle de *Meloidogyne javanica* em casa de vegetação. No primeiro experimento, o isolado PC-10 de *P. chlamydosporia* foi aplicado ao solo na forma de clamidósporos (5000/g de solo) simultaneamente com 0, 1, 2 ou 4 g de FSM/kg de solo e 4000 ovos de *M. javanica* por vaso, e, após 15 dias, uma muda de tomate foi transplantada por vaso. Na avaliação após 45 dias, constatou-se diferença significativa nos

pesos da parte aérea e das raízes e na altura das plantas tratadas em relação às da testemunha. Em todos os tratamentos onde foram incorporados os clamidósporos do fungo, independentemente da adição de FSM, o número de ovos foi 56 a 61% menor do que no tratamento testemunha e o número de galhas, de 36 a 47% menor. No segundo experimento, 20 g de fibra de coco colonizada pelo fungo foram incorporados por quilo de solo juntamente com as diferentes doses de FSM e 4000 ovos de *M. javanica* por vaso. Decorridos 7 dias da infestação, transplantou-se uma muda de tomate em cada recipiente. A avaliação foi feita após 45 dias e não houve diferença significativa para a altura das plantas, peso da parte aérea, peso da raiz. Entretanto, o número de galhas por sistema radicular foi reduzido em 20, 31, 61 e 92% para as doses da FSM 0, 1, 2 ou 4 g/Kg de solo, respectivamente. Em relação ao número de ovos, houve reduções de 0, 45, 79 e 95% quando a farinha foi incorporada nas doses de 0, 1, 2 ou 4 g/Kg de solo, respectivamente.

Summary - Coutinho, M.M., Freitas, L.G., Dallemole-Giaretta, R., Neves W.S., Lopes, E.A., Ferraz, S. **Effect of *Pochonia chlamydosporia* and papaw seed's flour in *Meloidogyne javanica* control**

The efficiency of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia*, applied in the form of chlamydospores or as colonized coconut fiber, together with different doses of papaw seed's flour (FSM), in the control of *Meloidogyne javanica* was evaluated in greenhouse conditions. In a first experiment, *P. chlamydosporia* isolated PC-10, was applied to the soil in the form of chlamydospores (500/g of soil) simultaneously with 0, 1, 2 and 4 g of FSM kg⁻¹ of soil plus 4.000 eggs of *M. javanica* per bucket. An evaluation after 45 days showed significant differences in weight of the aerial portion and roots, as well as in the treated plants height, when compared with the control. In all treatments where the clamydospores were incorporated, independently from FSM addition, the number of eggs was 56 to 61 % lower than control and the number of root-knots was 36 to 47 % lower. In a second experiment, 20 g of coconut fiber colonized by the fungi were incorporated per kilogram of soil, together with different doses of FSM and 4.000 eggs of *M. javanica* per bucket. After 7 days of infestation, one seedling of tomato was planted in each pot. An evaluation performed after 45 days showed no significant differences in plant height, aerial portion weight or root weight. However, the number of root-knots per root system was reduced in 20, 31, 61 and 92 % in the FSM doses of 0, 1, 2 and 4 g kg⁻¹ of soil respectively. Concerning to the eggs number, there was reduction of 0, 45, 79 and 95 % when the flour was incorporated in the doses of 0, 1, 2 and 4 g kg⁻¹ of soil respectively.

1. Introdução

Os nematóides das galhas são responsáveis por grandes perdas em hortaliças, podendo inviabilizar áreas de produção quando a sua infestação é considerada alta (Novaretti *et al.*, 1998). Na tentativa de reduzir a população do nematóide abaixo do nível econômico de dano, vários métodos de controle têm sido pesquisados integrando diferentes técnicas, a fim de proporcionar o controle satisfatório deste fitopatógeno, (Novaretti *et al.*, 1998), entre elas, o controle biológico. Os organismos utilizados para o controle biológico podem ser introduzidos ou estarem presentes naturalmente no solo, controlando os fitopatógenos da área (Bridge, 1996). O estímulo para aumentar a população e eficiência dos antagonistas pode ser feito através da adição ao solo de materiais orgânicos que, além disso, podem melhorar as características físico-químicas do solo e liberar compostos nematicidas.

Entre os agentes de biocontrole de nematóides com potencial de uso prático, pode-se destacar o fungo *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & Gams, anteriormente conhecido como *Verticillium chlamydosporium* (Stirling, 1991). Esse fungo possui características relevantes que favorecem seu uso como agente de controle de nematóides tais como: a) não ser patogênico a plantas, seres humanos e outros animais; b) ser capaz de se estabelecer no solo, mesmo na ausência de nematóides; c) ser parasita de ovos e fêmeas de *Meloidogyne* spp. (Stirling, 1991; Kerry, 2001); d) ser considerado um forte competidor saprofítico, na forma de conídios, micélios (Kerry *et al.*, 1984) e clamidósporos (Crump & Kerry, 1981); e) ser capaz de colonizar as raízes de plantas e promover seu desenvolvimento (Lopez-Llorca *et al.*; 2002; Hidago-Díaz *et al.*, 2000; Monfort *et al.*, 2005; Dallemole-Giaretta, 2008). Entretanto, a interação entre a planta hospedeira, o nematóide e *P. chlamydosporia* deve ser considerada, visto que, em culturas altamente suscetíveis, o antagonista é menos efetivo em controlar o *Meloidogyne* spp., devido a significante proporção de massas de ovos internas, não expostas ao parasitismo do fungo (Kerry, 1995., Bourne *et al.*, 1996). Para solucionar tal problema, uma alternativa seria combinar *P. chlamydosporia* com outros métodos de controle que não prejudicassem a

colonização do fungo, como a adição de resíduos orgânicos com propriedades nematicidas (Pandey & Sikora, 2000, Bourne, 2001, Cannayane & Rajendran, 2001., Khan *et al.*, 2002, Nico *et al.*, 2004).

As sementes de mamão (*Carica papaya* L.), subproduto da indústria de sucos, doces, geléias e outros produtos alimentícios, merecem investigação como possível componente de um substrato utilizado para o controle de nematóides, pois é conhecida na medicina popular por sua ação anti-helmíntica. Coimbra *et al.* (2006) constataram 100% de imobilização e 67,2% de mortalidade de juvenis e adultos de *Scutellonema bradys* após serem incubados por 24 horas em extrato de sementes de mamão. Neves *et al.* (2005a, b) observaram 95% de redução na eclosão dos juvenis e 100% na inativação e morte de juvenis de *M. javanica* e *M. incognita* Após o uso do extrato de farinha de sementes de mamão. As sementes de mamão são ricas em glucosinolatos, os quais são hidrolisados pela enzima mirosinase, na presença de água, originando o composto benzil-isotiocianato, que possui ação ovicida e larvicida (Dar *et al.*, 1965; Seo & Tang, 1982; Kermanshai *et al.*, 2001).

A casca de coco é um subproduto da industrialização da água de coco, e pode compor condicionadores de solo com características nematicidas, pois a fibra de coco melhora as características físicas do solo, além de servir como substrato para a produção de *P. chlamydosporia* “in vitro” e favorecer o estabelecimento desse fungo em condições de campo. Além disso, as cascas de coco teriam uma destinação nobre, evitando o acúmulo deste resíduo em lixões e nas margens das estradas por mais de 8 anos, até sua completa decomposição (Carrizo, 2002).

A ação combinada de *P. chlamydosporia*, farinha de sementes de mamão e fibra de coco é desconhecida, mas seu estudo se justifica pelos múltiplos benefícios, como o controle exercido pelo fungo e pela FSM, aliado às melhorias estruturais do solo resultantes da incorporação da fibra de coco que, além disso, pode servir de base para o estabelecimento e desenvolvimento do agente de controle biológico. Deste modo, este trabalho teve como objetivo avaliar a aplicação de *P. chlamydosporia*, incorporada ao solo na forma de clamidósporos ou de fibra de coco colonizada, juntamente com diferentes doses de farinha de sementes de mamão.

2. Material e Métodos

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico de Fitonematóides do Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO) e em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia, no campus da Universidade Federal de Viçosa.

2.1. Produção do nematóide para inóculo

O inóculo de *M. javanica* utilizado nos experimentos foi multiplicado em tomateiros (*Lycopersicon esculentum* var. Santa Clara), mantido em vasos de 2 litros sob condições de casa de vegetação por aproximadamente 70 dias. Antes da condução dos experimentos foi realizada eletroforese de isoenzimas para a confirmação da espécie e a verificação da ausência de contaminação. Os ovos foram extraídos pelo método de Hussey & Barker (1973), modificado por Boneti & Ferraz (1981), e as suspensões resultantes foram calibradas para as inoculações com o uso de microscópio estereoscópio e câmara de Peters.

2.2. Efeitos da incorporação de farinha de sementes de mamão (FSM) e de *P. chlamydosporia*, aplicado na forma de clamidósporos, sobre *M. javanica*

2.2.1. Produção dos clamidósporos de *P. chlamydosporia*

O isolado de *P. chlamydosporia* (PC-10), pré-selecionado por reduzir o número de galhas e de ovos em experimentos preliminares, foi repicado para placas de Petri contendo o meio “Corn Meal Agar” (CMA) e incubado por 21 dias, a 26°C, no escuro. Três discos de micélio de 7 mm de diâmetro foram depositados no substrato mantido em um béquer de 250 mL. O substrato foi composto por 40 g de milho triturado, 40 g de areia (1:1, p:p) e 60 mL de água destilada, previamente autoclavados por 30 minutos. Após 21 dias, o substrato colonizado pelo fungo foi retirado do béquer, adicionou-se água de torneira e preparou-se uma suspensão fúngica, que foi

filtrada em gaze dupla. O número de clamidósporos da suspensão foi quantificado com o auxílio de câmara de Newbauer e microscópio óptico. A suspensão foi calibrada para que fossem aplicados 5.000 clamidósporos/grama de solo.

2.2.2. Bioensaio em casa de vegetação

Vasos plásticos com capacidade de 0,5 L foram cheios com mistura de solo argiloso e areia na proporção 1:1 (v:v), previamente tratada com brometo de metila. Após, esse substrato foi umedecido até aproximadamente 60% da capacidade de campo e infestado com 4.000 ovos de *M. javanica* por vaso. Em seguida, foram incorporados os 5.000 clamidósporos de *P. chlamydosporia* por grama de solo e a FSM nas doses de 0, 1, 2, ou 4g /Kg de substrato. Os componentes de cada vaso foram colocados em um saco plástico de 5 L, homogeneizados manualmente e recolocados nos vasos. Os tratamentos apenas com substrato e com substrato e nematóides foram utilizados como testemunhas negativa e positiva, respectivamente.

Decorridos quinze dias da infestação do solo, uma muda de tomateiro com 21 dias de idade foi transplantada para cada vaso. Quarenta e cinco dias após o transplante, foram avaliados o peso e a altura da parte aérea, o peso do sistema radicular, além do número de galhas e de ovos por planta. Para a retirada dos ovos do sistema radicular, as raízes de cada planta foram agitadas manualmente em NaOCl na concentração de 0,5%, durante três minutos, segundo Hussey & Barker (1973). A seguir, os ovos foram coletados em peneira de 25 µm de abertura de malha (500 mesh), enxaguados em água corrente e armazenados em tubos plásticos em geladeira a 7°C até o momento da avaliação. Os ovos foram contados com o auxílio de câmara de Peters e microscópio estereoscópio.

2.3. Efeito da incorporação de fibra de coco colonizada por *P. chlamydosporia* e de farinha de sementes de mamão sobre *M. javanica*

2.3.1. Produção do inóculo do fungo na fibra de coco

Após o crescimento de *P. chlamydosporia* em placas de Petri, discos de micélios com 7 mm de diâmetro, retirados das bordas das colônias, foram colocados em 400 g de fibra de coco esterilizada, mantida em béquer de 1 L. Em seguida, o fungo foi incubado por 21 dias, para a colonização da fibra de coco.

Para se determinar a quantidade de clamidósporos produzidos pelo fungo no substrato e utilizado no experimento, uma suspensão fúngica foi preparada através da imersão de amostras de fibra de coco colonizada em água de torneira e filtragem da suspensão em gaze dupla. O número de clamidósporos da suspensão foi quantificado com o auxílio de câmara de Newbauer e microscópio óptico.

2.3.2. Bioensaio em casa de vegetação

Solo argiloso e areia 1:1 (v:v), previamente tratados com brometo de metila e distribuídos em vasos de 0,5 L, foram infestados com 4.000 ovos de *M. javanica*, como no item 2.2.2. Em seguida, a FSM, nas doses 0, 1, 2, ou 4g juntamente com 20 g de fibra de coco colonizada pelo fungo, foram adicionadas por quilo de solo. A mistura foi homogeneizada por agitação manual em saco plástico e vertida novamente nos vasos. Vasos contendo somente o substrato e o substrato inoculado com o nematóide constituíram as testemunhas negativa e positiva respectivamente.

2.4. Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento adotado nos experimentos foi do tipo inteiramente casualizado, empregando-se oito repetições por tratamento. Os dados foram analisados com o auxílio do programa Statistica 7.0 (Statsoft, 2004). As médias foram comparadas entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade. Para a análise de regressão, calculou-se o índice de galhas e de ovos, obtido pela divisão número de galhas ou de ovos pela média das respectivas testemunhas. O gráfico da regressão foi plotado em função dos índices obtidos.

3. Resultados e Discussão

Os números de galhas e de ovos de *M. javanica* ao final do primeiro experimento foram menores com a aplicação de *P. chlamydosporia* isoladamente ou associada com a farinha de sementes de mamão do que na testemunha (Figuras 1 e 2), independente da quantidade de FSM incorporada ao solo. O fungo, aplicado isoladamente, reduziu em 60 e 36% o número de ovos e de galhas do nematóide, respectivamente; entretanto, a FSM não resultou em controle do nematóide adicional ao uso do fungo. Não houve diferença entre as doses de FSM utilizadas, portanto, a aplicação do antagonista foi o fator responsável pelo controle de *M. javanica* neste experimento. Era esperado que a aplicação conjunta de *P. chlamydosporia* com FSM promovesse controle superior à aplicação do fungo isoladamente, uma vez que, em trabalhos conduzidos por Neves *et al.* (2005a, b), a FSM proporcionou diminuição da eclosão, inativação e morte de juvenis de *M. javanica* e *M. incognita*. O peso da parte aérea e das raízes e altura das plantas, não foram influenciados significativamente por nenhum tratamento (Figuras 3, 4 e 5).

Quando a fibra de coco colonizada pelo fungo foi incorporada juntamente com a FSM, no segundo experimento, obteve-se uma resposta de função quadrática para a redução do índice do número de ovos com o aumento das doses de FSM (Figura 6). A adição do fungo, sem a incorporação da FSM, apresentou índice de galhas superior ao apresentado quando se adicionou FSM ao solo. Ao aumentar as doses de FSM, o índice de ovos decresceu, proporcionando controle de 100% do nematóide quando se incorporou 4 g de FSM para cada quilo de solo. Em relação ao número de galhas, o resultado foi semelhante, entretanto, expressa pela função linear (Figura 7). A altura das plantas, peso da parte aérea e peso da raiz não apresentaram diferenças significativas entre as médias dos tratamentos (Figuras 8, 9 e 10).

A produção de clamidósporos por grama de fibra de coco colonizada foi de 7.5×10^3 ; logo, a densidade de inóculo do fungo (clamidósporos) incorporada neste experimento foi relativamente pequena, num total de 1500 clamidósporos por grama de solo. A baixa colonização da fibra de coco

pode estar ligada à pequena quantidade de hemicelulose (3 a 12%) presente na fibra de coco, que é a fração prontamente atacada pelos microrganismos (Noguera, 2000), o que pode ter dificultado o estabelecimento de *P. chlamydosporia*. Machado & Campos (1997) demonstraram que o desenvolvimento de *P. chlamydosporia* pode ser afetado pelo tipo de substrato e que sua eficiência no controle de *M. javanica* pode ter relação direta com a maior concentração do inóculo inicial do fungo no substrato. Ao final dos experimentos, independente da adição da FSM, o fungo *P. chlamydosporia* foi recuperado do solo em todos os tratamentos, mostrando que este possui capacidade de se estabelecer nestas condições experimentais.

No primeiro experimento, adotou-se a concentração de 5000 clamidósporos/g de solo, comumente utilizada em experimentos com este fungo a qual foi determinada como a concentração ideal para o controle de nematóides (De Leij & Kerry, 1991; Kerry, 2001). A menor eficiência de *P. chlamydosporia* no controle de *M. javanica* quando aplicado na forma de fibra de coco colonizada, porém sem a FSM, observada no segundo experimento, pode ser explicada pela baixa quantidade do inóculo incorporada ao solo. Doses inferiores a 5000 clamidósporos/g de solo proporcionam baixo controle de *M. incognita* (De Leij *et al.* 1992). Outro fato que pode ter afetado o desempenho do antagonista foi o tempo inicial diferenciado entre a infestação do solo, com os clamidósporos do fungo e os ovos do nematóide, e o transplântio das mudas nos experimentos. No primeiro experimento, o tempo de contato entre o antagonista e os ovos foi de 15 dias antes do transplântio do tomateiro e de 7 dias no segundo experimento. O sucesso no controle utilizando o fungo *P. chlamydosporia* possivelmente pode estar associado ao tempo de exposição inicial entre a *P. chlamydosporia* e os ovos dos nematóides (Dalle-mole-Giaretta, 2008). Este maior tempo de exposição pode proporcionar melhor estabelecimento do fungo e, conseqüentemente, maior colonização dos ovos do nematóide, reduzindo o inóculo inicial, a infecção das raízes e, por conseqüência, o número de galhas e de ovos dos nematóides infectando as raízes.

No experimento em que se incorporou a farinha de sementes de mamão e a fibra de coco colonizada pelo fungo *P. chlamydosporia*, foi

observado o efeito de doses de FSM no controle de *M.javanica*, enquanto que no outro experimento, onde as mesmas doses de FSM foram incorporadas juntamente com o fungo na forma de clamidósporos este efeito de doses de FSM não foi observado. Uma explicação para tal efeito se deve as temperaturas atingidas durante a condução dos experimentos. No primeiro experimento, sem o efeito de dose de FSM, a temperatura média da casa de vegetação foi inferior à encontrada no experimento onde se obteve o efeito de dose deste material com valores médios de máximas de 32,2°C e 36,6 °C, respectivamente. Tal fato pode estar relacionado à velocidade de decomposição da FSM em temperaturas mais elevadas, facilitando a formação do composto benzil-isotiocianato, originado da hidrólise do glucosinolato. O efeito de elevadas temperaturas durante a decomposição de materiais orgânicos incorporados ao solo também foi observado por Souza (2004), o que permitiu a redução da quantidade de material orgânico a ser incorporada ao solo para o controle de nematóides.

Conclui-se que o isolado de *P. chlamydosporia* utilizado neste trabalho é eficiente mesmo sem a adição de FSM para o controle de nematóides. A utilização do fungo em fibra de coco colonizada não se mostrou promissora como método de introdução do fungo. Existe uma relação direta entre a dose de FSM e o controle de *M. javanica*, muito embora no experimento inoculado com clamidósporos, a FSM não tenha interferido no resultado. Em altas temperaturas, a FSM se mostrou mais eficiente. Em estudos futuros, as doses entre 2 a 4 gramas de FSM/kg de solo devem ser novamente avaliadas, considerando que o controle mais eficiente do nematóide ocorreu nesta faixa de aplicação do produto. A aplicação de *P. chlamydosporia* deve ser feita em solo infestado e deve-se aguardar um período maior do que uma semana antes do plantio, para que o fungo possa se estabelecer e atuar sobre o inóculo inicial do nematóide, sendo assim mais efetivo.

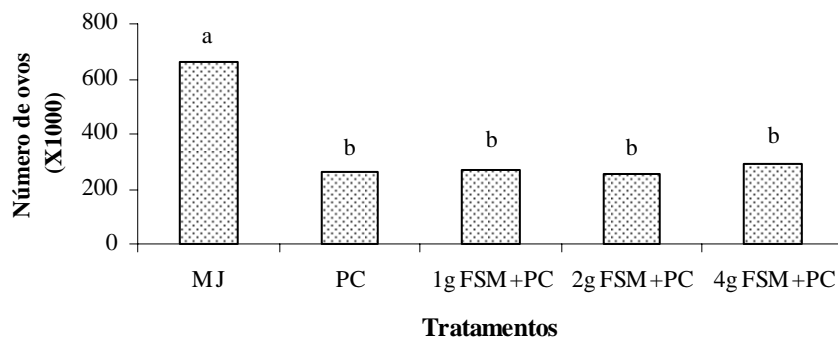


Figura 1 – Número de ovos de *M. javanica* (MJ) por sistema radicular de tomateiros, obtidos aos 45 dias após a inoculação com *P. chlamydosporia* (PC) e diferentes doses de farinha de sementes de mamão (FSM).* Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

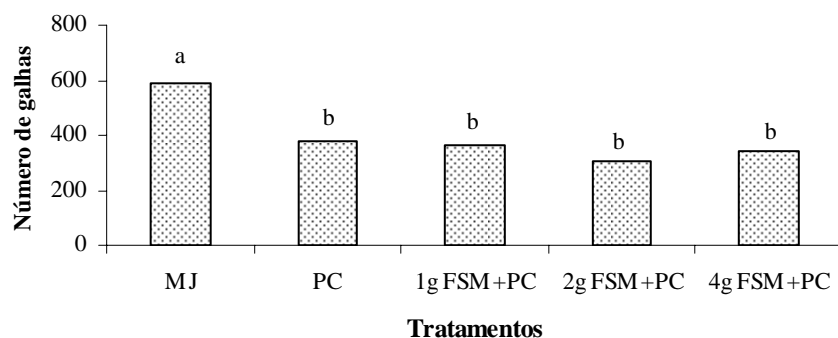


Figura 2 – Número de galhas de *M. javanica* (MJ) por sistema radicular de tomateiros, obtidos aos 45 dias após a inoculação com *P. chlamydosporia* (PC) e diferentes doses de farinha de sementes de mamão (FSM).* Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

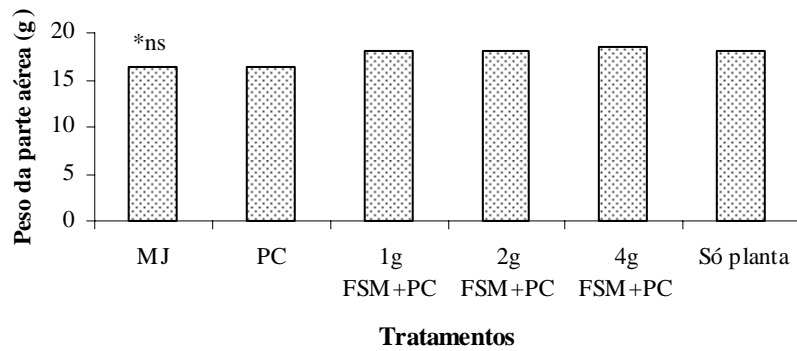


Figura 3 – Peso da parte aérea (g) de plantas de tomateiro inoculadas com *M. javanica* (MJ), obtidos aos 45 dias após a inoculação com *P. chlamydosporia* (PC) e diferentes doses de farinha de sementes de mamão (FSM). *^{ns} Não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade. Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

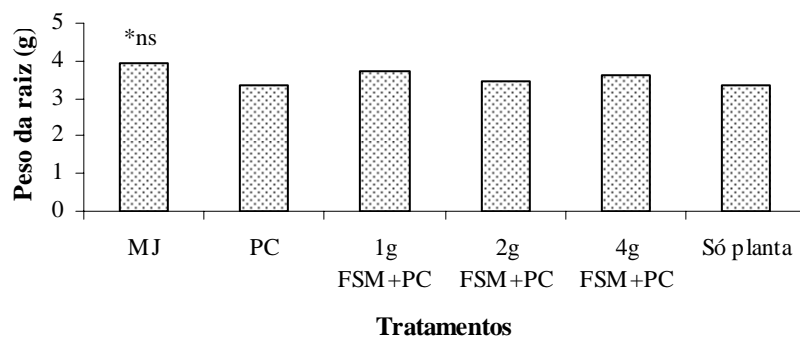


Figura 4 – Peso da raiz (g) de plantas de tomateiro inoculadas com *M. javanica* (MJ), obtidos aos 45 dias após a inoculação com *P. chlamydosporia* (PC) e diferentes doses de farinha de sementes de mamão (FSM). *^{ns} Não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade. Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

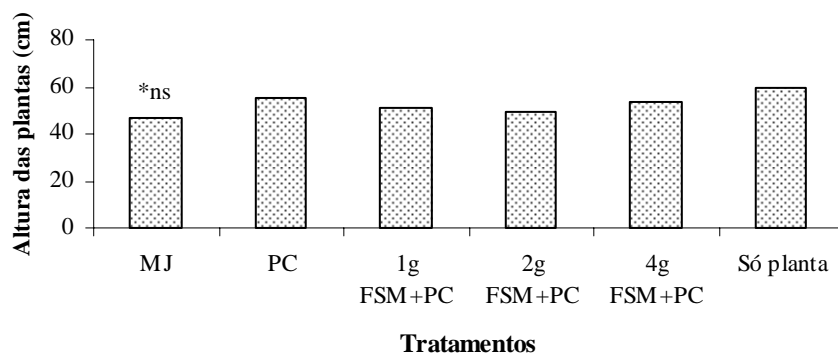


Figura 5 – Altura das plantas de tomateiro inoculadas com *M. javanica* (MJ), obtidos aos 45 dias após a inoculação com *P. chlamydosporia* (PC) e diferentes doses de farinha de sementes de mamão (FSM). *^{ns} Não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade. Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

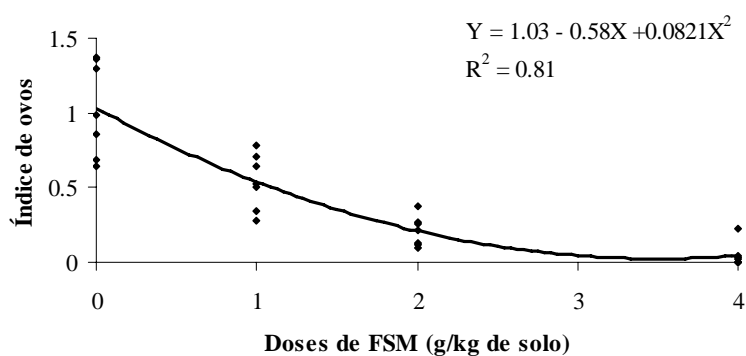


Figura 6 – Relação entre o índice de ovos e as doses 0, 1, 2, ou 4 g de FSM juntamente com 20 g de fibra de coco colonizada pelo fungo *P. chlamydosporia* por quilo de solo, 45 dias após a infestação do solo com 4.000 ovos de *M. javanica*.

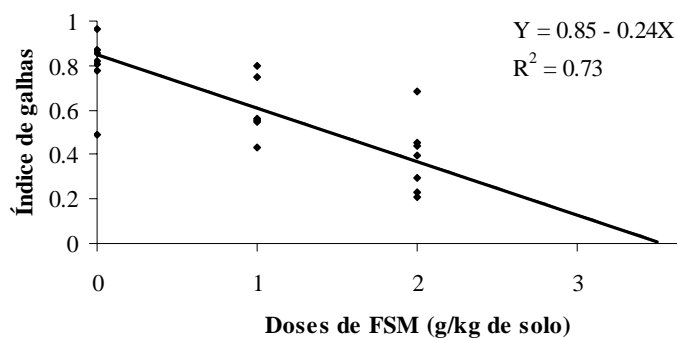


Figura 7 – Relação entre o índice de galhas e as doses 0, 1, 2, ou 4 g de FSM juntamente com 20 g de fibra de coco colonizada pelo fungo *P. chlamydosporia* por quilo de solo, 45 dias após a infestação do solo com 4.000 ovos de *M. javanica*.

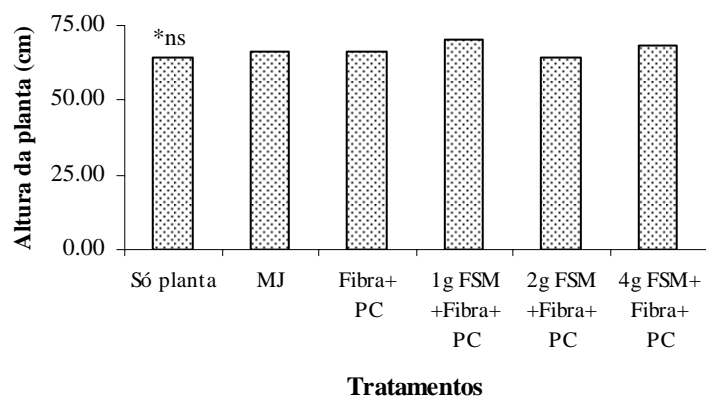


Figura 8 – Altura (cm) das plantas de tomateiro inoculadas com 4000 ovos de *M. javanica*, 45 dias após a incorporação das doses 0, 1, 2, ou 4 g de FSM juntamente com 20 g de fibra de coco colonizada pelo fungo *P. chlamydosporia* por quilo de solo. *ns Não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

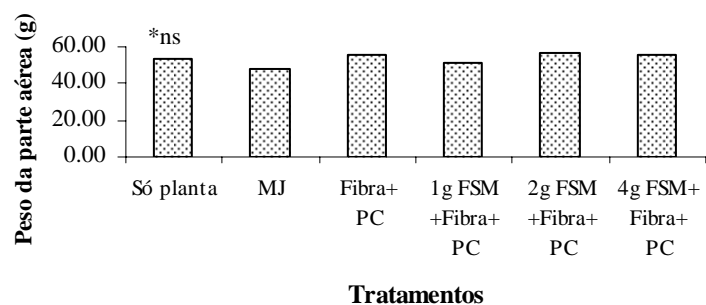


Figura 9 – Peso da parte aérea (g) de plantas de tomateiro inoculadas com 4000 ovos de *M. javanica*, 45 dias após a incorporação das doses 0, 1, 2, ou 4 g de FSM juntamente com 20 g de fibra de coco colonizada pelo fungo *P. chlamydosporia* por quilo de solo. *ns Não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

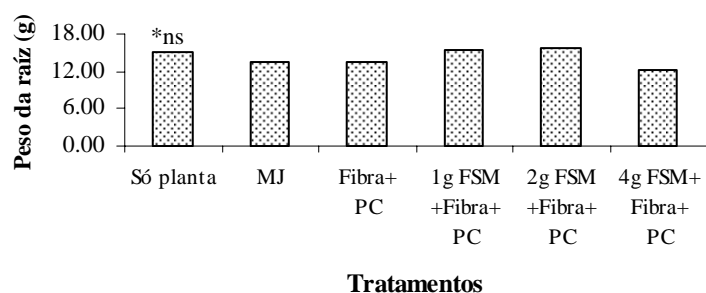


Figura 10 – Peso da raiz (g) de plantas de tomateiro inoculadas com 4000 ovos de *M. javanica*, 45 dias após a incorporação das doses 0, 1, 2, ou 4 g de FSM juntamente com 20 g de fibra de coco colonizada pelo fungo *P. chlamydosporia* por quilo de solo. *ns Não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

4. Literatura Citada

- BONETI, J.I.S. & S. FERRAZ. 1981. Modificação do método para extração de ovos para *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, 6: 553.
- BOURNE, J.M. 2001. Making a soil suppressive to root-knot nematodes by applications of *Verticillium chlamyosporium*. Tri-Trophic Interactions in the Rhizosphere IOBC/wprs Bulletin, 24 (1): 25-30.
- BOURNE, J.M., B.R. KERRY & F.A.A.M. DE LEIJ. 1996. The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus, *Verticillium chlamyosporium* Goddard. Biocontrol Science and Technology, 6: 539-548.
- BRIDGE, J. 1996. Nematode management in sustainable and subsistence agriculture. Annual Review Phytopathology (34): 201-221.
- CAMPOS, H.D & V.P. CAMPOS. 1997. Efeito da época e formação de aplicação dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamyosporium* no controle de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, 22 (3): 361-365.
- CANNAYANE, I. & G. RAJENDRAN. 2001. Application of biocontrol agents and oil cakes for the management of *Meloidogyne incognita* in brinjal (*Solanum melongena* L.). Current Nematology, 12 (1): 51-55.
- CARRIJO, O.A., R.S. LIZ & N. MAKISHIMA. 2002. Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. Horticultura Brasileira, 20 (4): 533-535.
- COIMBRA, J.L., A.C.F. SOARES, M.S. GARRIDO, C.S. SOUSA & F.L.B. RIBEIRO. 2006. Toxicidade de extratos vegetais a *Scutellonema bradys*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 41 (7): 1209-1211.
- CRUMP, D.H. & B.R. KERRY. 1981. A quantitative method for extracting resting spores of two nematode parasitic fungi, *Nematophthora gynophila* and *Verticillium chlamyosporium*, from soil. Nematologica, 27: 330-339.

- DALLA PRIA, M. & S. FERRAZ. 1996. Controle biológico de *Meloidogyne incognita*, raça 3, por seis espécies de *Monacrosporium*, isoladas ou combinadas com *Verticillium chlamydosporium*. Fitopatologia Brasileira, 21 (1): 30-34.
- DAR, R.N., L.C. GARG, R.D. PATHAK. 1965. Anthelmintic activity of *Caryca papaya* seeds. Indian Journal of Pharmacy, 27: 335-336.
- DE LEIJ, F.A.A.M. & B.R. KERRY. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as biological a potential control agent for *Meloidogyne arenaria*. Review Nematology, 14 (1): 157-164.
- DE LEIJ, F.A.A.M.; B.R. KERRY. & J.A. DENNEHY 1992. The effect of fungal application rate and nematode density on the effectiveness of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita*. Nematologica 38: 112-122.
- DALLEMOLE-GIARETTA, R. 2008 Isolamento e identificação de *Pochonia chlamydosporia* de solos infestados com *Meloidogyne* spp. e avaliação do potencial de controle de *M. javanica* e de promoção de crescimento de tomateiro (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Viçosa – Departamento de Fitopatologia, Viçosa, 132 p.
- HUSSEY, R.S. & K.R. BARKER. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease Reporter, 57: 1025-1028.
- KERMANS HAI, R., B.E. MCCARRY, J. ROSENFELD, P.S. SUMMERS, E.A. WERETILNYK & G.J. SORGER. 2001. Benzyl isothiocyanate is the chief or sole anthelmintic in papaya seed extracts. Phytochemistry, 57: 427-435.
- KERRY, B.R. 1995. Microbial agents for the biological control of plant parasitic nematodes. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE NEMATOLOGIA TROPICAL, Rio Quente, GO. Resumos, (1): p. 244-250.
- KERRY, B.R. 2001. Exploitation of nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). IN: BUTT, T.M., C. JACKSON & N. MAGAN. (ed). Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential. CAB International, Wallingford, p. 380.

- KERRY, B.R., A. SIMON & A.D. ROVIRA. 1984. Observations on the introduction of *Verticillium chlamydosporium* and other parasitic fungi into soil for control of the cereal cyst-nematode *Heterodera avenae*. Annual Applied. Biology., 105: 509-516.
- KHAN, S.M., N. JAVED, S.M. KHAN, S.M. KHAN (ED.); N. JAVED (ED.) & S.M. KHAN. 2002. Control of *Meloidogyne javanica* by two antagonistic plants and a nematophagus fungus and effects of antagonistic plants on the activity of the fungus. Integrated Plant Disease Management. Proceedings of 3rd National Conference of Plant Pathology, NARC, Islamabad 129-132. (Abstract).
- MACHADO, V.O.F. & V.P. CAMPOS. 1997. Cultivo de fungos antagonistas em diferentes substratos e avaliação da eficiência no controle de *Meloidogyne javanica*. Fitopatologia Brasileira, 22: 387-391.
- NEVES, W.S., M.M. COUTINHO, R. DALLEMOLE-GIARETTA, R.J.F. ZOOCA, L.G. FREITAS & C.F.S. FABRY. 2005a. Atividade nematicida de extratos de semente de mamão sobre juvenis de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, XXXIII, Brasília. Resumos, p. 32.
- NEVES, W.S., M.M. COUTINHO, R.J.F. ZOOCA, R. DALLEMOLE-GIARETTA & L.G. FREITAS. 2005b. Inibição da eclosão de juvenis de *Meloidogyne javanica* e de *M. incognita* por extrato aquoso de sementes de mamão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, XXXIII, Brasília. Resumos, p. 32.
- NICO, A.I., R.M. JIMÉNEZ-DÍAZ & P. CASTILLO. 2004. Control of root-knot nematodes by composted agro-industrial wastes in potting mixtures. Crop Protection, 23: 581-587.
- NOGUERA, P., M. ABAD, V. NOGUERA, R. PURCHADES, A. MAQUIERA. 2000. Coconut coir waste, a new and viable ecologically-friendly peat substitute. Acta Horticulturae, 517: 279-286.

- NOVARETTI, W.R.T., A.R. MONTEIRO & L.C.C.B. FERRAZ. 1998. Controle químico de *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus zae* em cana-de-açúcar com carbofuram e terbufos. *Nematologia Brasileira*, 22 (1): 60-74.
- PANDEY, R. & R.A. SIKORA. 2000. Influence of aqueous extracts of organic matter on the sensitivity of *Heterodera schachtii* Schmidt and *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood eggs to *Verticillium chlamydosporium* Goddard infection. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 107(5): 494-497.
- SEO, S.T., C.S. TANG. 1982. Hawaiian fruit flies Diptera: (*Tephritidae*) toxicity of benzyl isothiocyanate against eggs or 1st instars of three species. *Journal Economic Entomology*, 75: 1132-1135.
- SOUZA, N.L. 2004. Interação entre solarização e incorporação prévia de matéria orgânica no solo. *Summa Phytopathologica*, 30 (1): 142-143.
- STATSOFT. 2004. Inc. STATISTICA for Windows (computer program manual). Tulsa, OK. Statsoft Inc. <http://www.statsoft.com>.
- STIRLING, G.R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes. C.A.B. International, Wallingford. 282 p.
- VERDEJO-LUCAS, S., C. ORNAT, F.J. SORRIBAS & A. STCHIEGEL. 2002. Species of root-knot nematodes and fungal egg parasites recovered from vegetables in Almería and Barcelona, Spain. *Journal of Nematology*, 34 (4): 405-408.

Capítulo - 3

Avaliação de isolados de bactérias e de *Trichoderma* spp. obtidos de solos tratados com farinha de sementes de mamão para o controle de *Meloidogyne javanica**

MARCELO M. COUTINHO^{1,2}, LEANDRO G. FREITAS², WÂNIA S. NEVES², ROSANGELA DALLEMOLE-GIARETTA², VANESSA ALMEIDA SABIONI² & SILAMAR FERRAZ²

*Parte da dissertação do primeiro autor para obtenção do grau de Mestre pela Universidade Federal de Viçosa (MG), Brasil.

¹Bolsista da CAPES

²Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, 36571-000, Viçosa (MG), Brasil.

Autor para correspondência: mmagalhaescoutinho@yahoo.com.br

Recebido para publicação em xx/xx/2008. Aceito em xx/xx/2008

Resumo - Coutinho, M.M., L.G. Freitas, W.S. Neves, R. Dallemole-Giaretta, V.S. Almeida, & S. Ferraz. **Avaliação de isolados de bactérias e de *Trichoderma* spp. obtidos de solos tratados com farinha de sementes de mamão para o controle de *Meloidogyne javanica***

Abundante crescimento do fungo *Trichoderma* sp. foi observado em solos de experimentos onde havia sido incorporada farinha de sementes de mamão (FSM) para promover o controle de *M. javanica* em experimentos anteriores. Em razão do efetivo controle observado, decidiu-se verificar se fungos e bactérias que se desenvolveram após a incorporação da FSM no solo apresentavam atividade antagônica ao nematóide. Cinco isolados de *Trichoderma* spp. foram obtidos do solo ao final do experimento e multiplicados em grãos de arroz por 10 dias. O solo de cada vaso foi infestado com 10⁸ conídios/kg de *Trichoderma* spp., juntamente com 3.000

ovos de *M. javanica*. Após 7 dias, uma muda de tomateiro foi transplantada para cada vaso e o experimento foi conduzido por mais 45 dias. Nenhum dos isolados testados resultou em redução do número de galhas ou de ovos do nematóide, em comparação com o tratamento testemunha. Para o isolamento das bactérias foi adotado o método de diluição de solo e semeio em meio de cultura. Vinte e oito isolados bacterianos foram obtidos e submetidos a uma seleção massal, visando o controle de *M. javanica* em tomateiros em casa de vegetação. Quatro isolados (I-2, I-4, I-9, I-23,) que se destacaram no controle do nematóide, foram novamente testados para a confirmação do seu potencial de controle. Tais isolados não apresentaram consistência nos resultados, indicando que a redução da população de *M. javanica* foi resultado do efeito nematicida do isotiocianato produzido pela decomposição da farinha de sementes de mamão e não da ação dos microrganismos que se desenvolveram nesse substrato.

Summary - Coutinho, M.M., L.G. Freitas, W.S. Neves, R. Dallemole-Giaretta, V.S. Almeida, & S. Ferraz. **Evaluation of bacterial and *Trichoderma* spp. isolates, obtained from soils treated with papaw seed's flour, for the control of *Meloidogyne javanica***

Profuse growth of *Trichoderma* sp. fungi was observed in soils where papaw seed's flour (FSM) was incorporated to promote control of *M. javanica* during previous experiments. Due to the efficient control observed, it was decided to verify if fungi and bacteria developed after FSM incorporation to the soil had antagonistic activity against the nematode. Five isolates of *Trichoderma* spp. were obtained from soil at the end of the experiment and multiplied in rice during 10 days. The soil of each bucket was infected with 10^8 conidia kg^{-1} of *Trichoderma* spp., together with 3.000 eggs of *M. javanica*. After 7 days, a tomato seedling was transplanted into each pot and cultivated during 45 days. None of the isolates tested resulted in reduction in the number of root-knots or nematode eggs, when compared with the control. For bacterial isolation the method of soil dilution and seeding in culture media was used. Twenty eight bacterial isolates were obtained and submitted to a bulk selection, aiming control of *M. javanica* in tomato plants in greenhouse conditions. Four isolates (I-2, I-4, I-9, I-23) that exceeded in controlling nematode were tested again to confirm its control potential. The results for these isolates were not consistent, thus showing that population reduction of *M. javanica* was a consequence of the nematicidal effect of the isotiocianates, produced by the decomposition of the papaw seed's flour and not by the action of microorganisms developed in such substrate.

1. Introdução

O controle de fitonematóides pode ser feito pelo uso de defensivos químicos, mas devido à pressão crescente para a redução dos impactos negativos na agricultura e meio ambiente que esses agroquímicos causam, grande ênfase vem sendo dada aos métodos alternativos de manejo, como o controle biológico. Solos agrícolas têm grande diversidade microbiana e os microrganismos já presentes no solo pode exercer o controle natural do patógeno (Bridge, 1996). O estímulo à ocorrência natural de microrganismos antagonistas aos nematóides pode ser feito por meio da adição de materiais orgânicos que servem de substrato, e estes ainda podem melhorar as características físico-químicas dos solos e liberar substâncias com propriedades nematicidas durante a sua decomposição.

Os fungos são os agentes de biocontrole de nematóides mais estudados, seguidos das bactérias. As bactérias vêm sendo cada vez mais estudadas como agentes de biocontrole de fitonematóides (Becker *et al.*, 1988, Sikora, 1988, Kloepper *et al.*, 1999) por serem encontradas em grande quantidade no solo, serem facilmente cultivadas em meio de cultura, facilitando o uso em formulações comerciais (Weller, 1988).

Dentre os fungos com potencial de uso para o controle de nematóides, o gênero *Trichoderma* spp. apresenta características de um bom candidato para o controle biológico, pois é facilmente encontrado associado à matéria orgânica, possui rápido crescimento, além de produzir muitos conídios (Howell, 2003). *Trichoderma* spp. podem controlar fitopatógenos através de vários mecanismos, tais como micoparasitismo, antibiose, competição, produção de enzimas, indução de resistência da planta, estímulo de germinação e mecanismos adjuntos (Howell, 2003). Alguns estudos relatam o controle de fitonematóides por *Trichoderma* sp. (Windham *et al.*, 1989; Sharon *et al.*, 2001).

Coutinho *et. al* (2007) observaram abundante crescimento do fungo do gênero *Trichoderma* em vasos onde os solos foram tratados com brometo de metila e receberam a farinha de sementes de mamão (FSM). A

partir de tal observação, pode-se questionar o papel do fungo no controle do nematóide, observado na referida pesquisa.

Considerando que fungos do gênero *Trichoderma* e rizobactérias podem atuar como agentes de biocontrole, decidiu-se isolar *Trichoderma* e bactérias de amostras de solo oriundas desse experimento e avaliar o efeito dos isolados sobre *M. javanica*.

2. Material e Métodos

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico de Fitonematóides do Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO) e em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia, no campus da Universidade Federal de Viçosa.

2.1. Produção do inóculo do nematóide

Para a obtenção do inóculo utilizado nos experimentos, populações de *M. javanica* foram multiplicadas em tomateiros (*Lycopersicon esculentum* var. Santa Clara), mantidos em casa de vegetação, por aproximadamente 70 dias. Antes da condução dos experimentos, foi realizada eletroforese de isoenzimas para a confirmação da espécie e a verificação da ausência de contaminação. Os ovos foram extraídos pelo método de Hussey & Barker (1973), modificado por Boneti & Ferraz (1981) e as suspensões resultantes foram calibradas em câmara de Peters com o uso de microscópio estereoscópio.

2.2. Isolamento de rizobactérias do solo tratado com farinha de sementes de mamão (FSM) com potencial de controle sobre *M. javanica*

Amostras de solo foram coletadas da rizosfera das plantas cujo solo foi tratado com a farinha de sementes de mamão. Para o isolamento das rizobactérias do solo, foi adotado o método de diluição em placas de Petri (Korn-Wendisch & Kützner, 1992). Foram adicionados 10g de solo de cada amostra em 100 mL de solução salina (NaCl 0,85%). As amostras foram preparadas e mantidas sobre agitação vigorosa por 60 minutos, em temperatura ambiente. As suspensões foram filtradas e, a partir de cada filtrado, foi realizada a diluição serial. Uma alíquota de 50 µl de cada diluição, de 10^{-4} a 10^{-9} , foi depositada e espalhada com alça de Drigalsky em placa de Petri, contendo o meio 523 (Kado & Heskett, 1970).

2.3. Seleção massal de bactérias de solo tratado com farinha de sementes de mamão com potencial para o controle de *M. javanica*

Os isolados bacterianos obtidos foram avaliados quanto ao controle de *M. javanica* em casa de vegetação. Vinte sementes de tomate Santa Cruz 'Kada' foram microbiolizadas utilizando-se o método descrito por Oostendorp & Sikora (1989), modificado por Fabry (2002). As sementes foram imersas em suspensão de propágulos de bactérias ou em solução salina (NaCl 0,85%), durante 24 horas em temperatura ambiente. Em seguida, as sementes foram semeadas em tubetes plásticos com capacidade de 250 mL, contendo solo e areia, na proporção 1:1 (v:v). Após 21 dias, com o desenvolvimento satisfatório do sistema radicular, o solo de cada tubete foi infestado com 1.000 ovos de *M. javanica*. As plantas foram irrigadas diariamente com o auxílio de uma piseta e adubadas uma vez por semana com N-P-K e micronutrientes.

Quarenta e cinco dias após a infestação do solo, foram avaliados o número de massas de ovos por sistema radicular e a altura das plantas. Cada tratamento foi repetido oito vezes.

Os quatro isolados mais eficientes no controle de *M. javanica* foram novamente avaliados tal qual descrito anteriormente, exceto pelo fato que o solo foi desta vez infestado com 4.000 ovos e foi mantido em vasos de 1 L de capacidade, ao invés de tubetes.

2.4. Isolamento de *Trichoderma* spp. de solos tratados com FSM e o seu potencial para o controle de *M. javanica*

Amostras de solo coletadas de vasos onde foi incorporada a FSM foram diluídas serialmente a partir de 1 g de solo para 9 mL de ágar - água (0,05%). Uma alíquota de 1 mL da suspensão de cada diluição, de 10^{-3} a 10^{-9} , foi colocada em placas de Petri contendo meio batata - dextrose - ágar (BDA) e as placas foram armazenadas em câmara de crescimento a 25°C, até o surgimento das colônias fúngicas. As colônias foram identificadas quanto ao gênero e armazenadas em papel de filtro em sílica-gel para posteriores estudos.

2.5. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *M.javanica*

2.5.1. Ensaio 1

Cinco isolados de *Trichoderma* spp. foram multiplicados em substrato de grão de arroz, a 27°C por 10 dias. Após esse período, realizou-se a extração dos conídios, os quais foram utilizados para infestar o solo, na concentração de 10⁸ conídios/kg de solo, juntamente com 3.000 ovos de *M. javanica* por vaso, contendo 0,5 kg de solo. Deste modo, o fungo e os ovos do nematóides permaneceriam em contato e poderia verificar a ação do fungo nos ovos do nematóides. Após sete dias, uma muda de tomateiro foi transplantada por vaso, Ao final de 45 dias, foram avaliados o número de galhas, ovos, peso da parte aérea, peso de raiz e altura das plantas. Cada tratamento foi repetido oito vezes.

2.5.2. Ensaio 2

Neste ensaio, o fungo ficou em contato com as raízes do tomateiro por 15 dias antes da introdução dos ovos para permitir maior interação entre ambos, expondo as raízes a metabólitos formados pelo fungo que poderia vir a induzir resistência contra o nematóide, antes da inoculação da planta. Para estudar tal possibilidade no controle de nematóides, mudas de tomateiro foram transplantadas logo após a infestação do solo com os isolados de *Trichoderma* spp., na mesma concentração empregada no item 2.5.1. Após 15 dias, o solo foi infestado com 3.000 ovos do nematóide. A avaliação do experimento foi realizada 45 dias após a infestação do solo, tal como no item 2.5.1.

2.6. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento adotado nos experimentos foi do tipo inteiramente casualizado. Para análise da seleção massal, os isolados bacterianos foram submetidos à análise de variância e as médias do número de massas de ovos e da altura das plantas foram comparadas pelo teste Scott-Knot, ao nível de 5% de probabilidade, com o auxílio do programa SAEG (Euclides, 1983). Nos demais experimentos, as médias foram comparadas entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

3. Resultados e Discussão

Vinte e oito isolados bacterianos foram obtidos durante a seleção massal e, entre estes, 23 diferiram estatisticamente da testemunha quanto ao número de massas de ovos (Figura 1) e doze para a altura das plantas (Figura 2). Selecionaram-se os isolados I-2, I-4, I-9 e I-23, que resultaram em menor número de massas de ovos, variando de 33 a 38% apesar de não diferirem estatisticamente de outros nove isolados. Na reavaliação desses quatro isolados, não se obteve diferença estatística entre eles para o número de galhas, de ovos, peso de parte aérea e peso de raízes (Tabela 1) e não foi confirmado o potencial antagonístico indicado pelo teste de seleção massal. Além disso, todas as plantas originadas de sementes tratadas com isolados bacterianos apresentaram crescimento inferior ao da testemunha, não diferindo estatisticamente entre eles (Tabela 1). Segundo Oostendorp & Sikora (1989), menos de 10% dos isolados obtidos em uma seleção massal podem apresentar biocontrole de fitonematóides.

Considerando que as bactérias isoladas de solo tratado com farinha de sementes de mamão não controlaram *M. javanica* no presente trabalho, concluiu-se que a redução da população desse nematóide, relatada por Coutinho *et al.* (2007), não tenha sido em função das bactérias encontradas associadas ao solo e sim em razão do efeito nematicida da farinha de sementes de mamão, também observado por Neves *et al.* (2005a, b) no controle de *M. javanica* e *M. incognita*.

Tabela 1 – Efeito de isolados de bactérias sobre a altura, peso da parte aérea e das raízes de tomateiro, bem como o número de galhas e de ovos por sistema radicular causados por *M. javanica*, aos 45 dias após a infestação do solo

Tratamentos	Altura	Peso da parte aérea (g)	Peso das raízes (g)	Nº de galhas	Nº de ovos
Isolado I-2	52 bc	56,23 *ns	13,29 *ns	357 *ns	322.572 *ns
Isolados I-23	57 bc	53,78	15,37	336	260318
Isolado I-9	54 bc	58,18	14,35	254	350885
Isolado I-4	48 bc	46,56	15,13	333	201142
Testemunha (com nematóide)	67 ab	49,60	14,72	297	192239
Testemunha (sem nematóide)	73 a	52,00	14,50	.	.
CV (%)	25,9	31,6	28,23	32,99	85,87

^{ns} Não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

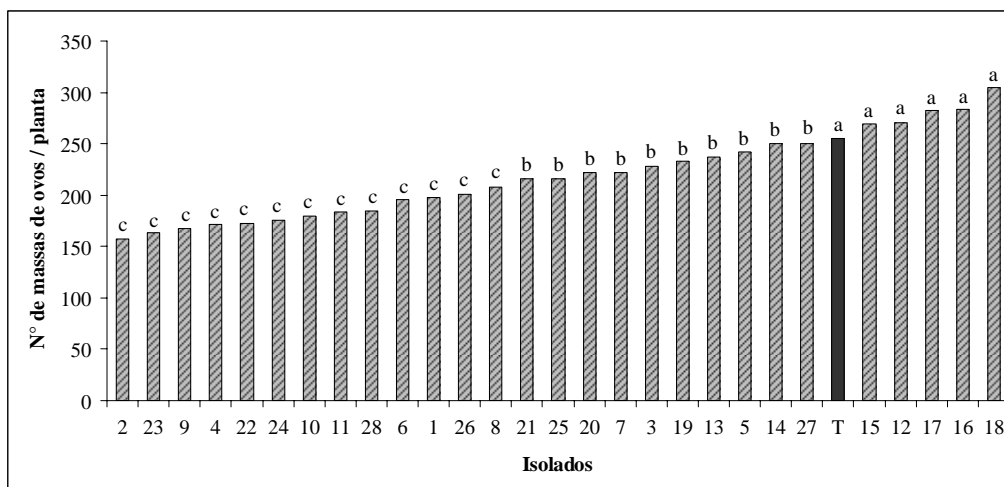


Figura 1 - Seleção massal de bactérias com potencial de controle de *Meloidogyne javanica*. Média do número de massas de ovos por sistema radicular de plantas de tomate após 45 dias da infestação com ovos de *M. javanica*. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste Scott-Knot, ao nível de 5% de probabilidade. A letra T representa o tratamento testemunha com sementes não microbiolizadas, imersas em água.

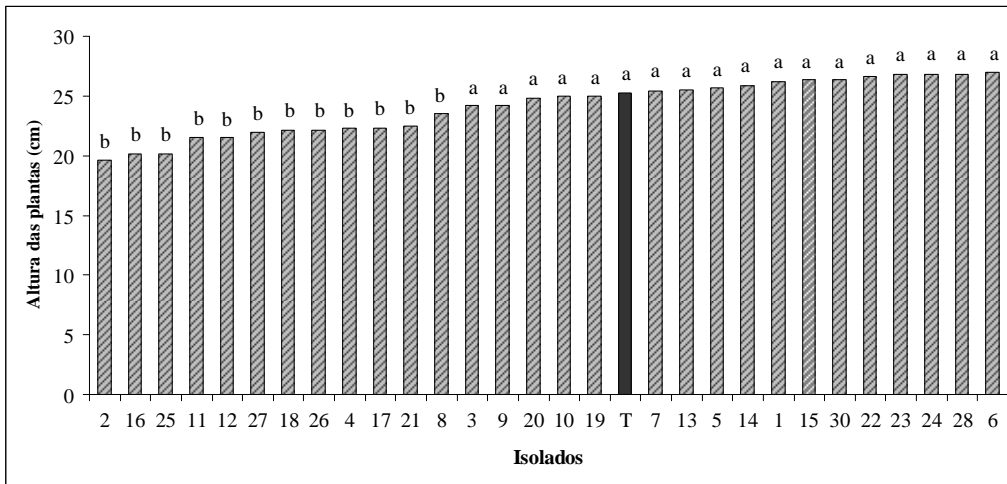


Figura 2 – Média da altura das plantas durante a seleção massal de bactérias com potencial de controle de *Meloidogyne javanica*. Média da altura das plantas de tomate após 45 dias da infestação com ovos de *M. javanica*. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste Scott-Knot, ao nível de 5% de probabilidade. A letra T representa o tratamento testemunha com sementes não microbiolizadas imersas em água.

Cinco isolados de *Trichoderma* sp. foram obtidos dos solos do experimento onde farinha de sementes de mamão (FSM) havia sido incorporada para promover o controle de *M. javanica*. Destes nenhum proporcionou redução do número de galhas e de ovos, altura das plantas, peso de parte aérea e no peso de raiz em comparação com o tratamento testemunha ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 2).

Tabela 2 – Efeito de isolados de *Trichoderma* sp. quando inoculado simultaneamente com os ovos de *M. javanica*, sobre a altura, peso da parte aérea e das raízes de tomateiro, bem como o número de galhas e de ovos por sistema radicular, aos 45 dias após a infestação do solo.

Tratamentos	Altura	Peso da parte aérea (g)	Peso das raízes (g)	Nº de galhas	Nº de ovos
Isolado A2	60,87 *ns	30,98 *ns	13,30 *ns	1.248 *ns	682.256 *ns
Isolado B1	62,00	30,56	14,72	1.149	606.318
Isolado C1	67,12	33,17	11,41	962	603.787
Isolado D1	55,87	32,19	15,27	995	571.556
Isolado D2	64,37	32,31	15,26	1.138	622.350
Testemunha (com nematóide)	55,5	30,88	13,84	1.295,25	663.187
Testemunha (sem nematóide)	59,25	34,24	11,03		
CV (%)	13,48	10,37	17,61	25,6	46,03

^{ns} Não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Ao verificar se os isolados de *Trichoderma*, ficando em contato com as raízes do tomateiro por 15 dias antes da introdução dos ovos, poderiam permitir maior interação entre ambos, apenas um isolado diferiu estatisticamente da testemunha com relação ao número de ovos. Deste modo, este isolado poderia estar induzindo resistência contra o nematóide. Porém, para a confirmação deste efeito indutor, deve-se adotar a técnica de raiz partida, que separa espacialmente o indutor, no caso o fungo, e o patógeno, no caso o nematóide, impedindo a ação direta do fungo sobre o nematóide pela produção de toxinas. Entretanto, para o número de galhas, peso da raiz, peso da parte aérea e altura das plantas nenhum isolado diferiu estatisticamente da testemunha ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 3).

Tabela 3 – Efeito de isolados de *Trichoderma* sp. quando inoculado no tomateiro 15 dias antes da inoculação com os ovos de *M. javanica*, sobre a altura, peso da parte aérea e das raízes de tomateiro, bem como o número de galhas e de ovos por sistema radicular causados por *M. javanica*, aos 45 dias após a infestação do solo.

Tratamentos	Altura	Peso da parte aérea (g)	Peso das raízes (g)	Nº de galhas	Nº de ovos
Isolado A2	56.5 ns	23.02 ns	5.52 ns	485 ns	127.210 a
Isolado B1	63.38	24.82	6.12	628	232.943 bc
Isolado C1	59.38	23.16	6.33	524	144.366 ab
Isolado D1	59.38	25.36	7.33	633	242.983 c
Isolado D2	55.50	22.63	6.01	577	185.287 abc
Testemunha (com nematóide)	62.13	23.80	6.62	590	220.997 bc
Testemunha (sem nematóide)	65.75	27.02	6.40	.	.
CV (%)	13.31	6.12	10	42.55	38.93

^{ns} Não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

O surgimento de fungos do gênero *Trichoderma* em solos tratados com brometo de metila e em seguida incorporados com matéria orgânica (FSM) já era esperado, pois o brometo de metila é um agente que ocasiona quase que total esterilização do substrato, facilitando sua recolonização por microrganismos mais agressivos, neste caso, o *Trichoderma* spp. (Peil, 1996). Este fungo também foi encontrado em experimentos onde se incorporou mostarda (*Brassica rapa*) para a biofumigação do solo visando ao controle de *M. incognita* (Lima, 2006). Segundo o autor, a presença deste fungo pode ser possível pela ausência do efeito tóxico da mostarda sobre este microorganismo, o que pode ter ocorrido neste experimento, no qual a FSM não foi prejudicial ao crescimento do fungo em questão *Trichoderma* spp. Os isolados de *Trichoderma* spp., mesmo apresentando apenas um que poderia estar induzindo resistência as plantas de tomateiro, não foi o responsável pelo controle do nematóide no experimento em que se

isolou este microrganismo, pois seria necessário um período de 15 dias de contato deste fungo com as raízes de tomateiro antes da introdução dos ovos. Este período de exposição não foi proporcionado no experimento de onde este fungo foi isolado.

Deste modo, podemos concluir que o sucesso obtido nos experimentos onde se incorporou a FSM no solo se deve ao efeito nematicida deste material e não a presença de microrganismos (Trichoderma e bactérias) que se desenvolveram após sua incorporação.

4. Literatura Citada

- BECKER, J.O., ZAVALETA-MEJIA, E., COLBERT, S.F., SCHROTH, M.N., WEINHOLD, A.R., HANCOCK, J.G., & VAN-GUNDY, S.D. 1988. Effects of rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation. *Phytopathology*, 78:1466-1469.
- BONETI, J.I.S. & S. FERRAZ. 1981. Modificação do método para extração de ovos para *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6: 553.
- BRIDGE, J. 1996. Nematode management in sustainable and subsistence agriculture. *Annual Review Phytopathology*, (34): 201-221.
- CHARCHAR, J.M. & F.A.S. ARAGÃO. 2005. Reprodução de *Meloidogyne* spp. em cultivares de tomate e pepino sob estufa plástica e campo. *Nematologia Brasileira*, 29 (2): 243-249.
- COUTINHO, M.M., W.S. NEVES, L.G. FREITAS, R. DALLEMOLE-GIARETA & S. FERRAZ. 2007. Efeito da incorporação de farinha de sementes de mamão e *Pochonia chlamydosporia* sobre *Meloidogyne javanica*. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, XL, Maringá. Resumos, p. 188.
- EUCLIDES, R.F. 1983. Sistema para análise estatística e genética: SAEG. Viçosa. p. 100-112.
- FABRY, C.F.S. 2002. Controle de *Meloidogyne javanica* por rizobactérias antagonistas a fitonematóides. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 68 p.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Forestry. Country information. Brazil. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 22 de fevereiro 2008.
- HOWELL, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the Biological Control of Plant Diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87 (1): 1- 10.

- HUSSEY, R.S. & K.R. BARKER. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57: 1025-1028.
- KADO, C.I. & M.G. RESKETT. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60: 969-979.
- KLOEPPER, J.W., R. RODRIGUEZ-KÁBANA., G.W. ZEHNDER., J. F. MURPHY., E SIKORA. & C. FERNÁNDEZ. 1999. Plant root-bacterial interactions in control of soilborne disease and potential extension to systemic and foliar disease. *Australasen Plant Pathology* 28(1): 21-26.
- KORN-WENDISCH, F. & H.J. KÜTZNER. 1992. The family Stretomycetaceae. In: BALOWS, A., H.G. TRÜPER, M. DWORKIN., W HARDER & K.H. SCHLEIFER. (eds). *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, 2 end. Springer, Berlin Heidelberg New York, p.921-995.
- LIMA, A.O. 2006. Biofumigação do solo com *Brassica rapa* para o controle de fitonematóides. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 56 p.
- NEVES, W.S., M.M. COUTINHO, R. DALLEMOLE-GIARETTA, R.J.F. ZOOCA, L.G. FREITAS & C.F.S. FABRY. 2005a. Atividade nematicida de extratos de semente de mamão sobre juvenis de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, XXXIII, Brasília. Resumos, p. 32.
- NEVES, W.S., M.M. COUTINHO, R.J.F. ZOOCA, R. DALLEMOLE-GIARETTA & L.G. FREITAS. 2005b. Inibição da eclosão de juvenis de *Meloidogyne javanica* e de *M. incognita* por extrato aquoso de sementes de mamão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, XXXIII, Brasília. Resumos, p. 32.
- OOSTENDORP, M. & R.A. SIKORA. 1989. Seed treatment with antagonistic rhizobacteria for the suppression of *Heterodera schachtii* early root infection of sugar beet. *Revue de Nématologie*, 12: 77-83.

- PEIL, R.M., E.A. ROSSETO, C.R. PIEROBOM & M.T. ROCHA. 1996. Desinfestação de compostos para cultivo de cogumelo *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *Revista Brasileira de Agrociência*, 2 (3): 159-164.
- SHARON, E., M. BAR-EYAL, I. CHET, A. HERRA-ESTRELLA, O. KLEIFELD & Y. SPIEGEL. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 91: 687- 693.
- SIKORA, R.A. 1988. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. *Med. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent*. 53, (2): 867-878.
- WELLER, D.M. 1988. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rizosphere with bactéria. *Annual Review of Phytophatology* 26: 1508-15012.
- WINDHAM, G.L., M.T. WINDHAM & W.P. WILLIAMS. 1989. Effects of *Trichoderma* spp. on maize growth and *Meloidogyne arenaria* reproduction. *Plant Disease*, 73: 493-494.

Conclusões Gerais

- A incorporação da farinha de sementes de mamão em substratos para o controle de nematóide do gênero *Meloidogyne* spp. é uma alternativa eficiente e pode ser usada como método de controle desse fitopatógeno;
- O controle do nematóide das galhas é maior em altas temperaturas, cobrindo ou não o solo com plástico;
- O isolado de *P. chlamydosporia* utilizado, PC (10), é promissor e o melhor modo de aplicação deste fungo no solo, foi por meio de incorporação de clamidósporos e não a fibra de coco colonizada pelo fungo;
- A aplicação de *P. chlamydosporia* deve ser feita em solo infestado e deve-se aguardar um período maior do que uma semana antes do plantio para que o fungo possa se estabelecer e atuar sobre o inóculo inicial do nematóide, sendo assim mais efetivo;
- Quando se incorpora uma baixa concentração do fungo *P. chlamydosporia* recomenda-se aliar ao tratamento a incorporação de FSM, pois se observou uma relação direta entre a dose de FSM e o controle do nematóide;
- Os isolados de bactérias e os de *Trichoderma* spp. provenientes de solo onde havia sido incorporada a FSM não exerceram controle do nematóide.